



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ETNOBIOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA  
NATUREZA

**VANESSA DE CARVALHO NILO BITU**

**ESTUDO BIOPROSPECTIVO DE PLANTAS COMERCIALIZADAS PARA FINS  
TERAPÊUTICOS EM MERCADOS PÚBLICOS DA REGIÃO NORDESTE DO  
BRASIL**

**RECIFE  
2015**

VANESSA DE CARVALHO NILO BITU

**ESTUDO BIOPROSPECTIVO DE PLANTAS COMERCIALIZADAS PARA FINS  
TERAPÊUTICOS EM MERCADOS PÚBLICOS DA REGIÃO NORDESTE DO  
BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes  
Departamento de Química Biológica, área de Farmacologia e Química Molecular/URCA

RECIFE  
2015

**ESTUDO BIOPROSPECTIVO DE PLANTAS COMERCIALIZADAS PARA FINS  
TERAPÊUTICOS EM MERCADOS PÚBLICOS DA REGIÃO NORDESTE DO  
BRASIL**

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu

Tese defendida e \_\_\_\_\_ pela banca examinadora em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

EXAMINADORES:

\_\_\_\_\_  
Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes, Universidade Regional do Cariri (URCA), Orientador -  
(Membro Interno)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, Universidade Regional do Cariri (URCA) -  
(Membro Interno)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Universidade Regional do Cariri (URCA) -  
(Membro Interno)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Joabe Gomes de Melo, Instituto Federal de Alagoas (IFAL) - (Membro Externo)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias, Faculdade Leão Sampaio (FALS) - (Membro  
Externo)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aracélio Viana Colares, Faculdade de Juazeiro do Norte (FJN) – Suplente

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thiago Fonseca Silva, Faculdade Leão Sampaio (FALS) - Suplente

Dedico o meu coração e a tese aos alunos que passaram pelos meus cuidados nos últimos dez anos; de modo especial aos filhos que arrebanhei no Laboratório de Anatomia da Faculdade Leão Sampaio.

## AGRADEÇO...

Ao meu Deus que me possibilita vitórias.

À Mãe de Deus pelos seus cuidados.

Aos meus pais José Alves Bitu (in memorian) e Valdeneide de Carvalho Nilo Bitu por sonharem com essa tese enquanto eu ainda treinava as primeiras letras.

Ao meu marido Heron Canêjo por ter assumido com excelência a função de mãe, dedicando aos nossos filhos e a mim o melhor de si, principalmente nos meses em que as responsabilidades me carregavam para longe.

Aos meus filhos Vinícius, Virna, Heron e Mariane por compreenderem as minhas ausências.

À Girlene Frazão, meu anjo da guarda particular, por cuidar da minha vida enquanto eu construo os meus sonhos.

Ao programa de pós-graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Ao orientador desse estudo Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes.

Aos professores que contribuíram para a minha formação na área: Henrique Douglas, José Galberto, Ulysses Paulino, Elcida Araújo, Nicola Schiel, Joabe Melo, Angelo Giuseppe e Marcelo Ramos.

Aos professores que compuseram a banca de qualificação do primeiro artigo da tese Henrique Douglas Melo Coutinho, Joabe Gomes de Melo e Felipe Silva Ferreira.

À Faculdade Leão Sampaio pelo apoio à minha capacitação profissional e de modo especial à direção do Campus Saúde na pessoa da Profa. Sonia Izabel Romero de Souza, ao Diretor Presidente Prof. Jaime Romero de Souza e à Coordenadora Geral do Campus Crajubar Ana Quésia Luna Ramos.

Aos alunos, monitores e técnicos de Anatomia Humana e Anatomia Buco-Facial da Faculdade Leão Sampaio.

À família que me abrigou, ofereceu carinho e proteção durante as disciplinas do doutorado João Bosco Sampaio Canêjo, Luzia Sampaio Canêjo e Laura Sampaio Canêjo.

Aos meus amigos Edinaldo Fagner, Débora Sena, Aline Portelo, João Marcos Ferreira, Aracélio Viana, Francisco Santos, Celestina Elba, Thiago Pereira, Daniele Cristina, José Aguiar, Karina Botelho e Wenderson Lima.

Aos vendedores de plantas medicinais dos mercados públicos das cidades de Juazeiro do Norte, Crato e Barbalha que pacientemente contribuíram com os seus conhecimentos para a realização desse estudo.

Aos gestores da Secretaria de Obras do Crato, da Secretaria de Meio Ambiente do Juazeiro do Norte e da Secretaria de Infraestrutura de Barbalha por ter-nos dado a anuência para que o trabalho fosse realizado.

Ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade Leão Sampaio a quem o projeto desse trabalho foi submetido.

*“ Não esmoreçam da luta, meus filhos. Deus sempre mostrará soluções para as crises e dificuldades.”*

José Alves Bitu (in memoriam) - meu pai

## SUMÁRIO

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS .....	09
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ANEXOS .....	13
RESUMO .....	14
ABSTRAT .....	15
CAPITULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 OBJETIVOS.....	18
1.2.1 Objetivo geral .....	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
CAPITULO 2: REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1 O comércio de plantas medicinais em mercados públicos .....	21
2.2 Bioprospecção de Produtos Naturais de Origem Vegetal .....	24
2.2.1 Prospecção Química .....	25
2.2.2 Atividades antibacteriana e moduladora da atividade de antibióticos.....	27
2.2.3 Atividade antiparasitária de espécies vegetais em estudos bioprospectivos .....	28
CAPITULO 3: METODOLOGIAS .....	31
3.1 Levantamento etnofarmacológico .....	32
3.1.1 Localização e caracterização da área de estudo.....	32
3.1.2 Procedimentos de coleta de dados .....	32
3.1.3 Análise dos dados .....	33
3.2 Análises fitoquímicas .....	34
3.2.1 Coleta do material vegetal .....	34
3.2.2 Obtenção dos produtos naturais.....	34
3.2.3. Análise da composição química dos óleos essenciais de <i>L. gracilis</i> .....	35
3.2.4 Análise da composição química dos produtos naturais da <i>O. hamiltonii</i> e da <i>C. ipecacuanha</i> .....	35
3.3 Avaliação da atividade antiparasitária da infusão de <i>O. hamiltonii</i> .....	36
3.3.1 Linhagens celulares utilizadas .....	36
3.3.2 Reagentes.....	37
3.3.3 Ensaio de susceptibilidade epimastigota in vitro.....	37
3.3.4 Ensaio leishmanicida in vitro .....	37
3.3.5 Ensaios citotóxicos .....	37

3.4 Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da ação dos antibióticos.....	38
3.4.1 Material bacteriológico.....	38
3.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	38
3.3.5 Avaliação da atividade moduladora por contato direto.....	39
3.3.6 Avaliação da atividade moduladora por contato gasoso.....	40
3.3.7 Análises de dados.....	40
CAPITULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Ethnopharmacological study plants sold for therapeutic purposes in public markets in the northeast Brazil.....	42
4.2 Composição química, atividade antiparasitária e citotoxicidade da <i>Operculina hamiltonii</i> (G. Don) D. F. Austin & Staples.....	51
4.3 Produtos naturais derivados na <i>Operculina hamiltonii</i> (G. Don) D. F. Austin & Staples e da <i>Cephaelis ipecacuanha</i> Rich. como modificadores da atividade antimicrobiana de aminoglicosídeos e $\beta$ -lactâmicos.....	65
4.4 Chemical composition of the essential oil of <i>Lippia gracilis</i> Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance.....	79
4.5 Effect of collection time on composition of essential oil of <i>Lippia gracilis</i> Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil.....	84
CAPITULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXOS.....	108

**LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS**

$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micrometros
BHI	<i>Breat Heart Infusion</i>
CG/EM	Cromatografia gasosa/espectrômetro de massa
CIM	Concentração inibitória mínima
DCi	Decocto de <i>C. ipecacuanha</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	Soro fetal de bovino
FCI	Fator de consenso do informante
HPLC	High-performance liquid chromatography
IOh	Infusão de <i>O. hamiltonii</i>
IR	Importância relativa
LOD	Limites de detecção
LOQ	Limites de quantificação
NP	Número de propriedades atribuídas para uma determinada espécie
NSP	Número de sistemas corporais tratados
NT	Número de espécies vegetais utilizadas
Nur	Número de citações de uso em cada sub-categoria
OEFF	Óleos essenciais extraídos das folhas frescas
OEFS	Óleos essenciais extraídos das folhas secas
OELG	Óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i>
PCA	Plate Count Agar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Artigo</b>	Ethnopharmacological study plants sold for therapeutic purposes in public markets in the northeast Brazil .....	44
<b>Figura 1.</b>	Localização geográfica da área de estudo na região do Cariri, Ceará, Brasil .....	45
<b>Artigo</b>	Chemical Composition, Antiparasitic Activity and Cytotoxicity Of <i>Operculina hamiltonii</i> (G. Don) D. F. Austin & Staples.....	53
<b>Figura 1.</b>	Representação do perfil de cromatografia líquida de alta eficiência da infusão de <i>Operculina hamiltonii</i> .....	64
<b>Artigo</b>	Produtos Naturais Derivados Da <i>Operculina Hamiltonii</i> (G. Don) D. F. Austin & Staples E Da <i>Cephaelis Ipecacuanha</i> Rich. Como Modificadores Da Atividade Antimicrobiana De Aminoglicosídeos E B-Lactâmicos .....	67
<b>Figura 1.</b>	CIM da amicacina e da gentamicina na ausência e presença do DCi .....	72
<b>Figura 2.</b>	CIM da oxacilina e do benzapen na ausência e presença do DCi .....	73
<b>Figura 3.</b>	CIM da amicacina e da gentamicina na ausência e presença da IOh .....	73
<b>Figura 4.</b>	CIM da oxacilina e do benzapen na ausência e presença da IOh .....	74
<b>Figura 5.</b>	Perfil de cromatografia líquida de alto desempenho do decocto liofilizado de <i>C. ipecacuanha</i> (DCi).....	75
<b>Figura 6.</b>	Perfil de cromatografia líquida de alto desempenho representante da infusão liofilizada de <i>O. hamiltonii</i> (IOh) .....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Artigo</b>	Ethnopharmacological study plants sold for therapeutic purposes in public markets in the northeast Brazil .....	44
<b>Tabela 1.</b>	List of plants sold in public markets in the Crajubar Triangle, state of Ceará, Northeast Brazil.....	47
<b>Tabela 2.</b>	Informant consensus factor (ICF) for various categories of use or medicinal plants sold in public markets in the Crajubar Triangle, state of Ceará, Northeast Brazil .....	50
<b>Artigo</b>	Chemical Composition, Antiparasitic Activity and Cytotoxicity Of <i>Operculina hamiltonii</i> (G. Don) D. F. Austin & Staples.....	53
<b>Tabela 1.</b>	Componentes da infusão de <i>Operculina hamiltonii</i> .....	65
<b>Tabela 2.</b>	Atividade antiparasitária e citotoxicidade de infusão de <i>Operculina Hamiltonii</i> .....	65
<b>Artigo</b>	Produtos Naturais Derivados Da <i>Operculina Hamiltonii</i> (G. Don) D. F. Austin & Staples E Da <i>Cephaelis Ipecacuanha</i> Rich. Como Modificadores Da Atividade Antimicrobiana De Aminoglicosídeos E B-Lactâmicos .....	67
<b>Tabela 1.</b>	Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência aos antibióticos ...	68
<b>Tabela 2.</b>	Componentes do decocto liofilizado de <i>C. ipepacuanha</i> (DCi) .....	75
<b>Tabela 3.</b>	Componentes da infusão liofilizada de <i>O. hamiltonii</i> (IOh) .....	76
<b>Artigo</b>	Chemical composition of the essential oil of <i>Lippia gracilis</i> Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance .....	81
<b>Tabela 1.</b>	Chemical composition and percentage of the components of essential oils of <i>Lippia gracillis</i> .....	87
<b>Tabela 2.</b>	Values for the minimal inhibitory concentration (MIC) of aminoglycosides on the presence or absence of essential oils from leaves of <i>L. gracillis</i> by direct contact .....	88
<b>Tabela 3.</b>	Values of the zone of inhibition of bacterial growth by EOLG tested by gaseous contact method .....	88

<b>Artigo</b>	Effect of collection time on composition of essential oil of <i>Lippia gracilis</i> Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil .....	90
<b>Tabela 1.</b>	Chemical composition of essential oils obtained from fresh (EOFL) and dry (EODL) leaves of <i>L. gracilis</i> (Schauer).....	92
<b>Tabela 2.</b>	Chemical composition and percentage of the components of essential oils of <i>Lippiagracillis</i> at different times of collection, on the same day .....	94

**LISTA DE ANEXOS**

- ANEXO A** - Normas para publicação no periódico Journal of Ethno-pharmacology
- ANEXO B** - Normas para publicação no periódico International for parasitology: drugs  
and drug resistance
- ANEXO C** - Normas para publicação no periódico BioMed Research International
- ANEXO D** - Normas para publicação no periódico Natural product research
- ANEXO E** - Normas para publicação no periódico Journal of Essential Oil Bearing  
Plants
- ANEXO F** - Comprovante de submissão de artigo
- ANEXO G** - Produção Científica Paralela a Tese - 2014
- ANEXO H** - Produção Científica Paralela a Tese - 2015
- ANEXO I** - Produção Científica Paralela a Tese - 2015

Bitu, Vanessa de Carvalho Nilo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; agosto, 2015. ESTUDO BIOPROSPECTIVO DE PLANTAS COMERCIALIZADAS PARA FINS TERAPÊUTICOS EM MERCADOS PÚBLICOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL. Irwin Rose de Alencar Menezes.

## RESUMO

Esse trabalho bioprospectivo com abordagem etnodirigida levou em consideração o conhecimento dos vendedores de plantas medicinais em uma região do Nordeste brasileiro conhecida como Triângulo Crajubar e objetivou realizar um levantamento das plantas comercializadas para fins terapêuticos nos mercados públicos da área estudada, selecionar espécies vegetais a partir do seu uso etnofarmacológico e realizar análises químicas, microbiológicas e parasitológicas. Foram aplicados aos vendedores de plantas nos mercados públicos, formulários que permitiram o cálculo da importância relativa das espécies e do fator de consenso dos informantes. Foram indicadas por estes, 91 espécies úteis terapeuticamente, distribuídas em 49 famílias botânicas e 89 gêneros. Treze espécies apresentaram grande versatilidade quanto ao seu uso. Foram obtidas 291 indicações de uso em 13 categorias de doenças. Com base nesses resultados, foram selecionadas as espécies botânicas *Operculina hamiltonii*, *Cephaelis ipecacuanha* e *Lippia gracilis*, que foram avaliadas nas etapas subsequentes, segundo o seu uso etnofarmacológico. A infusão de *Operculina hamiltonii* (IOh) e o decocto de *Cephaelis ipecacuanha* (DCi) tiveram seus compostos fenólicos e flavonóides quantificados por HPLC-DAD enquanto o óleo essencial de *Lippia gracilis* (OELG) teve a sua composição química analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas. A IOh foi submetida a ensaios de susceptibilidade epimastigota e promastigota *in vitro* e ensaios citotóxicos. Para a IOh, o DCi e o OELG foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas em ensaio de microdiluição em caldo; as soluções dos produtos naturais foram testadas em concentrações subinibitórias para avaliação da atividade moduladora da resistência aos antibióticos. *Operculina hamiltonii* apresentou uma elevada atividade leishmanicida e tripanossomicida, no entanto com citotoxicidade significativa. *Operculina hamiltonii* e a *Cephaelis ipecacuanha* não apresentaram atividade antibacteriana satisfatória, no entanto os testes de avaliação do potencial modulador demonstraram resultados relevantes com sinergismo observado em várias combinações dos antibióticos com os produtos naturais. O óleo essencial de *Lippia gracilis* teve a capacidade de modular a resistência bacteriana e pode ser utilizado como uma terapia coadjuvante contra microrganismos multirresistentes, o horário da coleta dessa espécie pode interferir na expressão do princípio ativo.

**Palavras-chave:** etnofarmacologia, mercados públicos, plantas medicinais, comércio de plantas terapêuticas, *Operculina hamiltonii*, *Cephaelis ipecacuanha*, *Lippia gracilis*.

Bitu, Vanessa de Carvalho Nilo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; August, 2015. BIOPROSPECTIVE STUDY OF PLANTS SOLD FOR THERAPEUTIC PURPOSES IN PUBLIC MARKETS IN NORTHEAST BRAZIL. Irwin Rose de Alencar Menezes.

### ABSTRACT

This bioprospective study with an ethno-directed approach took into consideration the knowledge of vendors of medicinal plants in a region of Northeast Brazil known as Triângulo Crajubar. Our aim was to survey the plants sold for therapeutic purposes in public markets in the area studied, to select the plant species based on ethnopharmacological use and to analyze them for phytochemical composition and antibacterial and antiparasitic activities. Medicinal plant vendors were asked to fill out a questionnaire to determine the relative importance of the species and informant consensus factor. Ninety-one species were indicated as being therapeutically useful; they were distributed in 49 families and 89 genera. Thirteen species showed great versatility in their use. There were 291 indications of use in 13 disease categories. On the basis of these results, the plant species *Operculina hamiltonii*, *Cephaelis ipecacuanha* and *Lippia gracilis* were selected and evaluated as follows, according to their ethnopharmacological use. The infusion of *O. hamiltonii* (IOh) and decoction of *C. ipecacuanha* (DCi) were analyzed by HPLC-DAD, while the chemical composition of the essential oil of *L. gracilis* (OELG) was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. IOh was tested in vitro for epimastigote and promastigote susceptibility and cytotoxicity. IOh, DCi and OELG were subjected to broth microdilution assays to determine the minimal inhibitory concentration against bacteria; solutions of the natural products were also tested at subinhibitory concentrations to evaluate them for antibiotic resistance-modifying activity. *O. hamiltonii* showed high leishmanicidal and trypanosomicidal activities, but also substantial cytotoxicity. *O. hamiltonii* and *C. ipecacuanha* did not exhibit satisfactory antibacterial activity, but assays for modulatory potential demonstrated interesting results with synergism observed using various combinations of antibiotics and natural products. OELG was able to modulate bacterial resistance and could be used as a coadjuvant therapy against multidrug-resistant microorganisms. In addition, we found that the time of collection for this species can interfere with the expression of the active principle.

**Key words:** public markets, medicinal plants, sale of therapeutic plants, *Operculina hamiltonii*, *Cephaelis ipecacuanha*, *Lippia gracilis*.

## **CAPITULO 1:**

# **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

---

## 1.1 INTRODUÇÃO

As pesquisas na área da Bioprospecção dos Produtos Naturais envolvem métodos complexos e múltiplos objetivos, dentre eles, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos aos quais se chega a partir da confluência de diversas áreas do conhecimento (MENEZES et al., 2015). Estudos dessa natureza abrangem atividades multidisciplinares que englobam a localização, a avaliação e a exploração legal dos recursos naturais de uma dada região no sentido de encontrar substâncias que possam ser aplicadas em produtos farmacêuticos, após serem submetidas a ensaios microbiológicos, farmacológicos e toxicológicos que validem cientificamente o seu uso terapêutico (BOLOGA et al., 2013; PEREIRA et al., 2009; ENRÍQUEZ, 2005).

As investigações etnobotânicas e etnofarmacológicas surgem nesse cenário como uma importante ferramenta para seleção de espécies vegetais com potencial terapêutico, as quais podem protagonizar avaliações experimentais de suas atividades biológicas em estudos bioprospectivos com abordagem etnodirigida, os quais levam em conta as indicações de uso das plantas medicinais por grupos populacionais específicos dentro de suas práticas terapêuticas (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Os mercados públicos municipais são locais onde comumente se observa a comercialização de plantas para fins medicinais. Nesses locais, os vendedores que as comercializam formam um grupo populacional que apresenta conhecimentos empíricos sobre a utilização desses recursos naturais no tratamento de doenças que geralmente são prevalentes a nível local ou regional, funcionando como prescritores populares dentro de um sistema médico informal, aberto e dinâmico, no qual o conhecimento sobre indicações, modos de preparo e de uso, partes das plantas, quantidades utilizadas e outras informações são provenientes de diferentes fontes e repassadas de várias maneiras, demonstrando valores biológicos e também culturais de um povo (VAN ANDEL et al., 2006; MONTEIRO et al., 2010; MELO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2008; AMOROZO, 1996).

Dentre as importantes informações que podem ser obtidas a partir de levantamentos etnofarmacológicos em mercados públicos estão as que dizem respeito às espécies vegetais utilizadas no tratamento de doenças causadas por bactérias e parasitas. Paes e Silva (1999) chamam a atenção para o impacto social que as doenças infecciosas e parasitárias representam, uma vez que a sua gênese pode estar relacionada às condições de moradia, alimentação e higiene da população; sendo que em países em desenvolvimento, mesmo

quando reconhecida a relevância de parasitoses como tripanossomíase, leishmaniose, dengue e malária entre outras, estas permanecem negligenciadas apresentando indicadores preocupantes, baixo investimento em pesquisas de medicamentos e poucas ações que visem o seu controle (LEMOS e LIMA, 2002).

Ao mesmo tempo, é urgente a necessidade de que surjam alternativas terapêuticas para tratar microrganismos que desenvolveram mecanismos de resistência aos antibióticos de uso clínico convencional, fato esse que impulsiona tanto estudos direcionados a descoberta de novas drogas (RIVERÓN et al., 2003) quanto pesquisas que associem a utilização de produtos derivados de plantas às principais classes de antibióticos no sentido de verificar a possibilidade de potencializar a ação antibiótica a partir dessa associação (BITU et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2013; VERAS et al., 2011).

Nesse processo de desenvolvimento de um possível fármaco a partir de estudos bioprospectivos, faz-se necessário ainda a realização da prospecção química através da qual, identifica-se ou determina-se estruturalmente os metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais que podem ser apontados como princípios ativos nas atividades biológicas (OMENA, 2007).

Esse trabalho teve o objetivo de realizar um levantamento das plantas comercializadas para fins terapêuticos nos mercados públicos de uma região do Nordeste brasileiro, no sul do estado do Ceará, denominada Triângulo Crajubar, que engloba as cidades de Juazeiro do Norte, Crato e Barbalha. O local onde a pesquisa aconteceu apresenta características marcantes: intensa atividade comercial o que atrai pessoas das regiões circunvizinhas, a diversidade florística e faunística e a forte religiosidade em torno da figura do Padre Cicero Romão Batista. Os resultados obtidos nessa etapa inicial permitiram a seleção de espécies vegetais (*Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, *Cephaelis ipecacuanha* Rich. e *Lippia gracillis* Schauer) cujos usos populares foram avaliados para testar as atividades antiparasitária, antibacteriana e moduladora da atividade de antibióticos; os produtos naturais obtidos a partir dessas espécies foram submetidos à prospecção química.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Realizar estudos bioprospectivos utilizando plantas comercializadas para fins terapêuticos em mercados públicos da região Nordeste do Brasil.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Traçar o perfil sócio-demográfico dos vendedores de plantas medicinais nos mercados públicos do Triângulo Crajubar.

- Identificar a partir do conhecimento dos vendedores, as famílias e as espécies botânicas de uso medicinal comercializadas nos mercados da região..

- Listar as doenças tratadas pelo uso das espécies botânicas comercializadas, o modo de preparo para cada indicação de uso e as partes das plantas indicadas para as práticas terapêuticas descritas pelos vendedores.

- Selecionar espécies vegetais para estudos de atividade biológica a partir do cálculo do fator de consenso dos informantes e da importância relativa das espécies.

- Avaliar a citotoxicidade e o potencial antiparasitário da infusão de *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples.

- Avaliar as atividades antibacteriana e moduladora da ação de antibióticos da infusão de *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples e do decocto de *Cephaelis ipecacuanha* Rich. pelo método do contato direto, e dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* Schauer pelos métodos do contato gasoso e contato direto.

- Realizar a investigação fitoquímica dos produtos naturais avaliados, identificando os principais metabólitos secundários.

## **CAPITULO 2:**

# **REFERENCIAL TEÓRICO**

---

## 2.1 O comércio de plantas medicinais em mercados públicos

Múltiplos são os fatores que contribuem para a ampla utilização das espécies botânicas terapêuticamente. O uso destas nas comunidades tradicionais pode ser atribuído à distância geográfica dos grandes centros urbanos, dificultando o acesso das pessoas aos sistemas médicos formais, à disponibilidade do recurso devido a grande biodiversidade da flora brasileira, ao valor comercial mais acessível das plantas em comparação aos medicamentos sintéticos e ao não reconhecimento pela população dos possíveis efeitos adversos (OMENA, 2007; VEIGA-JUNIOR., 2005; COSTA et al., 2005; MACÍA et al., 2005). Veiga-Junior (2008) relata que essa utilização também acontece em classes sociais mais abastadas devido aos modismos de consumo, sendo buscadas nas plantas medicinais soluções para o emagrecimento, o aumento do desejo sexual e o controle da ansiedade. Plantas para fins medicinais são cultivadas em quintais ou facilmente obtidas em mercados e feiras livres, o que expande ainda mais o uso destas pela população (MONTEIRO et al., 2010; SANTOS et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2007b; FUNARI e FERRO, 2005; ALVES e ROSA, 2005; MOREIRA et al., 2002; CHIVIAN, 2002).

Os mercados públicos funcionam nos centros urbanos como espaços de convivência permitindo a socialização entre os comerciantes, os frequentadores habituais e os transeuntes esporádicos (BITU et al., 2015a; FERREIRA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2010; MELO et al., 2009) e dessa forma, acabam por reproduzir em menor proporção a diversidade biológica e os hábitos culturais de uma determinada sociedade (ALBUQUERQUE et al., 2007a). Nesses locais, o comércio das plantas com finalidade terapêutica significa a obtenção de um lucro financeiro relevante, pois as espécies botânicas são largamente comercializadas para tratamento paliativo e curativo de diversas doenças (MACÍA et al., 2005; SHANLEY e LUZ, 2003).

Estudos etnofarmacológicos em mercados públicos demonstram os saberes empíricos que os vendedores de plantas para fins terapêuticos acumulam e transmitem ao longo dos anos de prática comercial, agindo como verdadeiros prescritores populares com base nos seus conhecimentos sobre indicações, modos de preparo e de uso, partes das plantas e quantidades utilizadas além de outras informações relevantes (SANTOS et al., 2009; SILVA e PEIXOTO, 2009; LEITÃO et al., 2009), inclusive sendo possível observar consenso entre os vendedores de plantas medicinais no que diz respeito as espécies utilizadas para tratar os problemas de saúde (ALBUQUERQUE et al., 2008).

Informações obtidas a partir de entrevistas com vendedores condizem com relatos da literatura científica sobre indicações de plantas medicinais (USTULIN et al., 2009; CARNEIRO, 2009; TRESVENZOL et al., 2006), mesmo levando em consideração que esses vendedores apresentam baixos níveis de escolaridade (NEGRELLE et al., 2007). Trabalhos de Ustulin et al. (2009) demonstram que informações obtidas a partir de entrevistas com raizeiros sobre espécies utilizadas terapêuticamente no Mercado Público Municipal de Campo Grande coincidem aproximadamente em 50% com as indicações etnofarmacológicas presentes na literatura pertinente. Albuquerque et al. (2012) relatam que apesar da qualidade de informação estar associada ao tempo de atividade nesse ramo, os mercados podem ser locais de grande aprendizagem para os que estão iniciando na profissão.

As relações que se estabelecem em torno desse comércio desempenham um papel social na troca de informações sobre o uso tradicional das ervas medicinais entre os diferentes grupos culturais e sociais a nível local (LEE et al., 2008). Nesse cenário, é perceptível que os levantamentos de natureza etnobotânica impedem que conhecimentos relevantes sejam perdidos por falta de registro adequado e conveniente, relatando de quais maneiras e como as pessoas e as plantas interagem em um determinado local (OLIVEIRA et al., 2010; HEINRICH 2000; LADIO e LOZADA 2004). Essas relações demonstram um sistema médico rico em informações que atravessam gerações resguardando os valores culturais e biológicos locais (BALDAUF, 2003; AMOROZO, 1996) e que por ser aberto e dinâmico, pode ser enriquecido pela adição de novas plantas, indicações e modos de uso destas pela população (ALBUQUERQUE et al., 2007b). Lima et al. (2011) relatam que a procura por novos itens pelos compradores habituais acaba por introduzir inovações nos estoques dos vendedores incrementando o repertório local de plantas medicinais; e em municípios que participam de rotas comerciais importantes dentro de uma região, o compartilhamento de informações sobre indicações e formas de uso das espécies vegetais pode significar maior possibilidade de transmissão do conhecimento popular.

Van Andel et al. (2006) ao analisarem a procura de plantas consideradas terapêuticas em mercados de Gana, perceberam que as plantas medicinais são usadas para complementar ou substituir as práticas da medicina formal. No entanto Veiga Jr. (2008) alerta para o quanto a substituição dos alopáticos pela automedicação com plantas medicinais pode ser perigosa para a saúde; outros autores mostram ainda a modificação da atividade de alguns antibióticos quando utilizados concomitantemente com plantas e seus derivados (MATIAS et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2005; BITU et al., 2014).

Em levantamentos etnobotânicos realizados em mercados e feiras livres, esse recurso natural é associado ao tratamento de distúrbios em vários sistemas corporais de acordo com as atividades biológicas atribuídas à determinada espécie pela população local, como a atividade analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, cicatrizante, antipirética, diurética, antidepressiva, anorexígenas, anti-hiperlipidêmicas, dentre outras (MONTEIRO et al., 2011; MATI e BOER, 2010; MACÍA et al., 2005; ALMEIDA E ALBUQUERQUE, 2002), refletindo as preocupações de saúde de um local e a importância das práticas de medicina tradicional entre os seus habitantes (VAN ANDEL et al., 2006). Por isso, informações oriundas desses estudos podem subsidiar pesquisas bioprospectivas que contribuam para a descoberta de novos fármacos de interesse médico (GONÇALVES et al., 2005; SILVA, 2003).

Diferentes partes do vegetal são aproveitadas pela população no atendimento de suas necessidades de saúde, por isso são amplamente citadas em trabalhos etnobotânicos realizados em mercados e feiras livres a comercialização de folhas, frutos, cascas, flores, raízes, sementes, bem como resinas, látex e óleos essenciais (KHAN et al., 2013; AMIRI e JOHARCHI, 2013; LUKELAL et al., 2013 ). A escolha da parte da planta utilizada no preparo é influenciada pela disponibilidade que varia conforme o período do ano ou pela facilidade de obtenção e armazenamento (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002). Dessa forma nos mercados são expostas para venda, partes de plantas na forma fresca e seca e ainda produtos delas derivados em diferentes estados de estocagem e muitas vezes, sem garantia de qualidade ou efeito comprovado (LIMA et al., 2011; VEIGA-JUNIOR., 2008; MELO et al., 2009), o que pode representar um risco potencial para a saúde dos usuários pois podem estar contaminadas por fungos e/ou outros microorganismos (USTULIN et al., 2009; ALVES et al., 2000), ou mesmo por metais pesados (HARRIS et al., 2011). Nesse sentido, LIMA et al. (2011) sugerem que as feiras e os mercados públicos sejam incluídos nas ações governamentais sobre políticas de saúde por serem locais onde é possível a comercialização de recursos naturais com finalidade terapêutica.

A aceitação dessas práticas médicas tradicionais provoca um incremento nas vendas de recursos biológicos causando uma pressão extrativista sobre as espécies vegetais, com o agravante de algumas técnicas de coleta serem agressivas e a casca do caule ser intensamente procurada (ALMEIDA e ALBUQUERQUE, 2002). Paralelo a isso, uma situação preocupante, demonstrada por LIMA et al. (2011), é o incremento na chegada de cascas de plantas ao mercado no período de seca e a procura por raízes podendo prejudicar a sobrevivência da planta e prejudicar a conservação das espécies mais comercializadas.

BRANDÃO et al. (2013) observaram que algumas cascas e raízes de plantas são coletadas e comercializadas em substituição a outras que foram extintas, correndo o mesmo risco de desaparecimento e muitas vezes sem apresentar efeito comprovado, o que pode gerar problemas de saúde pública.

O comércio de plantas com finalidade terapêutica requer medidas de monitoramento que busquem o equilíbrio entre a sustentabilidade dos recursos naturais e os benefícios econômicos associados a essa atividade, levando ainda em consideração a realidade local dos comerciantes e a dimensão cultural associada ao uso medicinal das espécies (ALVES et al., 2000). O reconhecimento dos produtos medicinais de origem florestal comercializados em mercados públicos fornece informações úteis para futuras investigações sobre a conservação das espécies vegetais comercializadas, pois demonstra as espécies importantes no comércio regional e local e de que forma o homem está interagindo com os recursos naturais disponíveis (LIMA et al., 2011; MONTEIRO et al. 2010; MELO et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2007a). Um exemplo dado por Monteiro et al. (2011) é o de espécies cujo valor comercial vem aumentando ou que se tornaram difíceis de serem encontradas na região; isto pode significar que as suas reservas estejam próximas à exaustão (MONTEIRO et al., 2010).

## **2.2 Bioprospecção de Produtos Naturais de Origem Vegetal**

A Bioprospecção é o método que engloba a localização, avaliação e exploração sistemática e legal da biodiversidade de um determinado local objetivando-se encontrar recursos genéticos e bioquímicos para diversos fins (ENRÍQUEZ, 2005). As atividades nesta área são complexas, multidisciplinares e relevantes em diversos setores econômicos como o farmacêutico, o cosmético, o agrícola e o alimentício (PEREIRA et al., 2009).

Nas últimas décadas, as pesquisas na área da Bioprospecção de Produtos Naturais vêm sendo direcionadas à validação científica ou descobrimento de substâncias que possam resultar em produtos farmacêuticos inéditos, a partir da observação de suas atividades pelos métodos microbiológicos, farmacológicos e toxicológicos conhecidos (MENEZES et al., 2015; MATIAS et al, 2013; BITU et al., 2012; COUTINHO et al., 2008). No entanto, as informações que levam à descoberta de novos fármacos de interesse médico podem ser mais efetivas, quando direcionadas a partir das práticas terapêuticas descritas em pesquisas etnodirigidas (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Albuquerque e Hanazaki (2006) descrevem a abordagem etnodirigida em estudos bioprospectivos como estratégia de investigação da ação terapêutica das plantas medicinais a partir do conhecimento e da utilização desses recursos naturais por grupos sociais específicos.

O advento da química farmacêutica fez com que os recursos provenientes da biodiversidade fossem explorados de forma cada vez mais intensa, estando os produtos naturais envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas no início do século XXI (HOSTETTMANN et al., 2003). A principal estratégia para investigar o uso dessas substâncias envolve a combinação entre a utilização popular das mesmas com pesquisas laboratoriais científicas que envolvam a composição, as atividades e a toxicidade dos produtos naturais, e que tenham como objetivos atender a demanda das indústrias farmacêuticas ávidas por encontrar novas substâncias terapêuticas e corresponder às necessidades do mercado consumidor onde se observa o surgimento de patógenos cada vez mais resistentes aos antibióticos disponíveis (PACKER e LUZ, 2007). Para Costa et al. (2005) é interessante que essas pesquisas levem ao desenvolvimento de substâncias que sejam de baixa toxicidade, baixo custo e fácil acesso pelas comunidades carentes.

Para que seja desenvolvido um fitofármaco a partir de investigações bioprospectivas e haja a sua prescrição pelo profissional de saúde competente é necessário que haja rigoroso estudo científico com a utilização de protocolos rígidos aceitos internacionalmente; a segurança e a eficácia do produto são confirmadas após a realização dos testes pré-clínicos, das análises envolvendo toxicidade aguda e crônica, e dos testes clínicos (CALIXTO, 2000). No entanto, muitos trabalhos de bioprospecção com abordagem etnodirigida param em uma etapa inicial e não prosseguem para outras fases a ponto de serem testados clinicamente, deixando uma grande lacuna no conhecimento (IBRAHIM et al., 2014).

### **2.2.1 Prospecção Química**

É relevante que as plantas incorporadas à cultura popular pelas suas atividades biológicas não sejam apenas listadas em levantamentos etnobotânicos, mas que sejam reconhecidas as formas como estas são utilizadas e as quantidades necessárias em cada preparo, certificando-se da sua baixa toxicidade e da garantia de que o princípio ativo esteja presente em proporções suficientes para demonstrar a sua eficácia (ELDIN e DUNFORD, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008). Diversas são as pesquisas que buscam identificar e quantificar o componente químico presente nas espécies vegetais que possa ser apontado como princípio ativo nas atividades biológicas (BITU et al., 2012; JARDIM, SILVA e COSTA-NETO,

2005). Os princípios ativos são geralmente substâncias provenientes do metabolismo secundário dos (GONÇALVES et al., 2005; SILVA, 2003).

O metabolismo primário das plantas é responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares e outras substâncias que realizam suas principais funções vitais, no entanto os vegetais também apresentam o chamado metabolismo secundário, do qual resultam substâncias, às vezes produzidas em pequenas quantidades, como: alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, lignóides e derivados de fenilpropanóides (ALVES et al., 2000). Ríos e Recio (2005) demonstram que a atividade antimicrobiana dos extratos de plantas, óleos essenciais e dos compostos isolados está relacionado com a presença dessas substâncias. Cushnie e Lamb (2005) correlacionam a estrutura dos flavonóides à sua atividade antibacteriana, de modo a reconhecer que a atividade da quercetina é decorrente da inibição da DNA- girase, enquanto a sophoraflavona G e a galato-epigalocatequina inibem a função da membrana citoplasmática e a licochalconas A e C inibem o metabolismo energético da célula.

Esses compostos ativos são biossintetizados a partir de metabólitos primários e apresentam distribuição restrita a certas plantas ou microrganismos, sendo que muitas vezes a síntese desses compostos é específica de um dado gênero ou espécie (ALVES et al., 2000). Leonard e Viljoen (2015) atribuem aos sesquiterpenóides as atividades biológicas citadas para o gênero *Warburgia*, representado por plantas medicinais encontradas exclusivamente no continente africano, onde são utilizadas como antibióticos naturais contra bactérias, fungos e protozoários.

A atividade biológica de uma dada espécie vegetal geralmente é atribuída aos componentes majoritários presentes nos óleos ou extratos vegetais; por exemplo, a reconhecida atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Lippia* é decorrente da presença de componentes majoritários como timol e carvacol (BITU et al., 2012; PESSOA et al., 2005; SILVA et al., 2008); no entanto Kpoviessi et al. (2014) aponta os componentes minoritários do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* Linn., no caso o mirceno, a citronela e o limoneno, como os responsáveis pela atividade atividade tripanossomicida característica dessa espécie.

Diversos autores demonstram que a produção dos metabólitos secundários pode ser influenciada por fatores como altitude, poluição atmosférica, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, horário e época de coleta, condições climáticas e de solo, localização geográfica e ciclo vegetativo da espécie; percebe-se ainda que a atividade do metabólito presente no produto depende do processo de sua obtenção e das condições de secagem e estocagem (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; BITU et al., 2015; NEVES et al., 2007; ANDRADE e GOMES, 2003; AKROUT et al., 2003).

Em estudos de prospecção fitoquímica, é interessante quantificar os componentes levando em conta diferentes aspectos que permitam análises comparativas do teor de constituintes e da atividade observada, assim como fez Kpoviessi et al. (2014). Seu estudo envolveu a utilização da *Ocimum gratissimum* Linn, que na medicina popular está vinculada ao tratamento de infecções parasitárias e permitiu averiguar a parte da planta que possui as melhores propriedades antiparasitárias. Para isso, utilizaram óleos e extratos de folhas, caules e sementes, sendo possível observar que a atividade varia de acordo com a fase vegetativa e com a parte da planta utilizada, pois os extratos etanólicos obtidos de folhas e sementes em fase de floração completa demonstraram ser uma boa fonte de agentes tripanossomicidas.

Bitu et al. (2012) comparam os componentes presentes nos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Lippia gracillis* Schauer, onde o teor de timol e carvacrol foi significativamente maior no óleo extraído de folhas frescas, demonstrando que o processo de secagem influencia a fitoquímica do produto e consequentemente a atividade biológica esperada.

### **2.2.2 Atividades antibacteriana e moduladora da atividade de antibióticos**

Os antibióticos correspondem a uma classe de fármacos comumente utilizada em hospitais e comunidades. O seu uso é de importância coletiva, pois impactam não apenas o indivíduo que o utiliza, mas todo o ambiente por alterar a ecologia microbiana, portanto o seu uso deve ser feito sempre de forma racional. Para que o antibiótico realize a sua função é necessário que atinja concentração ideal no local de infecção, seja capaz de atravessar a parede celular, apresente afinidade pelo sítio de ligação no interior da bactéria e permaneça por tempo suficiente para exercer seu efeito inibitório (CAUMO et al., 2010; OLIVEIRA e SILVA, 2008).

O uso irracional dos antibióticos tem contribuído para que os microrganismos desenvolvam perfis de resistência. As bactérias podem desenvolver resistência ao uso de antibióticos devido à inativação destes por atividade enzimática, por modificações moleculares que impedem a ligação da droga ao seu sítio específico ou ainda por alterações na permeabilidade da parede bacteriana com modificação dos canais de entrada; esses três mecanismos podem ocorrer ainda de forma simultânea (DAZA, 1998, RIVERÓN et al., 2003).

García (2003) aponta para as complexas causas da resistência dos microrganismos aos antibióticos: o uso abusivo de agentes antimicrobianos, o enfraquecimento dos programas que

visem o controle de infecções, o aumento do uso de dispositivos e os procedimentos médicos invasivos. As consequências disso são o insucesso da terapia, o aumento dos índices de morbidade e mortalidade e o incremento dos custos crescentes de assistência médica.

Os mecanismos de resistência desenvolvidos por microrganismos frente aos antibióticos utilizados clinicamente geraram um problema de consequências imprevisíveis na saúde pública mundial e alertaram a comunidade científica para o fato de que a descoberta de novas drogas não está acompanhando a velocidade com que surgem microrganismos resistentes aos medicamentos de uso clínico convencional (RIVERÓN et al., 2003). Essa situação tem impulsionado muitos países a identificar quais os problemas mais sérios relacionados à resistência e qual o seu impacto na saúde coletiva com o intuito de direcionar pesquisas posteriores voltadas para a descoberta de novas alternativas terapêuticas (RIVERÓN et al., 2003; COMEGNA et al., 2000; BENAVIDES-PLASCENCIA et al., 2005).

São muitos os trabalhos de prospecção biológica com o objetivo de validar cientificamente o conhecimento popular sobre a atividade antibacteriana de produtos naturais derivados de plantas. Esses estudos são impulsionados principalmente pela necessidade atual de encontrar novas alternativas terapêuticas devido ao desenvolvimento dos mecanismos de resistência bacteriana à ação dos antibióticos já existentes (SHARIFI-RAD et al., 2015; FOURNOMITI et al., 2015; MUHAISEN et al., 2015).

Em avaliações que buscam possíveis agentes antimicrobianos com base nas indicações de uso popular das espécies vegetais, Ríos e Recio (2005) estabelecem algumas etapas de importância fundamental como: detectar-se a atividade antimicrobiana em relação à parte da planta, concentrar-se na flora natural de uma região ou país específico e testar a atividade de uma planta contra um princípio patológico ou um microrganismo concreto. É necessário ainda que sejam definidos parâmetros como material vegetal, técnicas empregadas, meio de crescimento e microrganismos testados.

Outra linha de pesquisa que surge nesse contexto é a que associa a utilização dos produtos naturais às principais classes de antibióticos, observando se há efeito modulador da ação antibiótica decorrente dessa associação (AGUIAR et al., 2015; LAVOR et al., 2014; FIGUEREDO et al., 2013; VERAS et al., 2011).

### **2.2.3 Atividade antiparasitária de espécies vegetais em estudos bioprospectivos**

As doenças parasitárias ocupam um papel relevante entre as principais causas de morte no Brasil e no mundo e apresentam relevância devido ao seu impacto social, pois geralmente estão relacionadas às condições de moradia, alimentação e higiene, explicitando as condições socioeconômicas de uma população (PAES e SILVA, 1999). Lemos e Lima (2002) descrevem a relevância de doenças dessa natureza no cenário mundial, mas cita várias que são negligenciadas quanto ao seu controle como cólera, leishmaniose, febre amarela, parasitoses intestinais, malária, esquistossomose, tripanossomíase e a dengue.

Nas regiões geográficas onde essas patologias são mais prevalentes, geralmente as comunidades locais conhecem um vasto repertório de plantas que podem ser usadas terapeuticamente (IBRAHIM et al., 2014), impulsionando diversas pesquisas de natureza bioprospectiva com o objetivo de descobrir substâncias oriundas do metabolismo vegetal que possam apresentar atividade antiparasitária (RIBEIRO et al., 2015; ANOSA et al., 2014; KPOVIESSI et al., 2014).

As indicações populares de uso da *Stryphnodendron obovatum* Benth. para tratar doenças causadas por protozoários levaram Ribeiro et al. (2015) a validar cientificamente a atividade dos compostos presentes na sua casca como terapêutica alternativa para o tratamento de *Leishmania amazonensis* (Ribeiro et al., 2015). A espécie *Cephaelis ipecacuanha* Rich., utilizada popularmente como antidiarréica, teve a sua atividade antiparasitária reconhecida por Lee (2008) contra *Entamoeba histolytica*. Anosa et al. (2014) analisaram extratos etanólicos da entrecasca da *Enantia polycarpa* (PC) Engl. Et Diels (Annonaceae), usada tradicionalmente no sul da Nigéria no tratamento da malária, seus resultados validam cientificamente a indicação etnofarmacológica e demonstram ser seguro o uso dessa planta oralmente. Santos et al. (2012) apresentam a *Eugenia uniflora* L. como planta promissora no desenvolvimento de uma medicação que trate a tripanossomíase.

Algumas buscas por agentes antiparasitários voltam-se sobre um gênero de plantas. Kpoviessi et al. (2014) demonstraram que espécies do gênero *Cymbopogon* são grandes fontes de agentes antitripanossômicos e antiplasmódicos. Espécies do gênero *Operculina* são citadas em estudo etnobotânicos como recurso terapêutico no tratamento de doenças parasitárias (CARVALHO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2007; MARTINS et al., 2000). Silva et al. (2010) mostrou que a *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples foi eficaz no controle de parasitas gastrointestinais de caprinos naturalmente infectados no sertão semi-árido do Brasil.

Apesar de muitos trabalhos já terem sido realizados, vários autores relatam a necessidade de aprofundar a busca por plantas que possam apresentar potencial contra

parasitas. Morais- Braga et al.(2013) demonstraram a atividade antiparasitária da *Lygodium venustum* SW., por ser essa a primeira espécie da família Lydodiaceae a ter a sua atividade antiparasitária validada cientificamente, esses autores sugerem que outros estudos sejam realizados nesse sentido com outras espécies da mesma família.

Traore et al. (2013) realizaram um levantamento etnofarmacológico em Guiné com o intuito de recolher informações sobre remédios a base de plantas usados popularmente no tratamento da malária; esse estudo demonstrou que os curandeiros locais apresentam um grande repertório de plantas antimaláricas, no entanto ficou evidente a necessidade de novas análises que abordem a atividade antimalárica de diferentes espécies comparativamente validando cientificamente essas informações. Ibrahim et al. (2014), a partir de uma revisão sistemática da literatura, listam vários compostos obtidos a partir de plantas medicinais africanas com atividade tripanossomicida e relatam que para a maioria delas ainda não existem estudos clínicos comprobatórios.

## **CAPITULO 3:**

# **METODOLOGIAS**

---

### **3.1 Levantamento etnofarmacológico**

#### **3.1.1 Localização e caracterização da área de estudo**

O Cariri cearense engloba outras seis cidades, além do Crato (latitude  $-7^{\circ}14'03''N$ , longitude  $-39^{\circ}24'34''W$ ), Juazeiro do Norte (latitude  $-7^{\circ}12'47''N$ , longitude  $-39^{\circ}18'55''W$ ) e Barbalha (latitude  $-7^{\circ}18'40''N$ , longitude  $-39^{\circ}18'15''W$ ), sendo que esses três municípios citados são os mais importantes do ponto de vista econômico e cultural. Pela proximidade territorial, Crato, Juazeiro do Norte e Barbalha sofreram um processo de conurbação formando uma área denominada Triângulo Crajubar, onde as atividades terciárias, formadas pelo comércio e serviços, são predominantes e sempre exerceram forte atração e influência sobre os centros locais circunvizinhos (OLIVEIRA, 2012). A região é considerada um polo cultural no estado, apresentando diversas manifestações artísticas entre as quais se destacam as danças folclóricas, as esculturas, as pinturas e as xilogravuras, as cantorias e a literatura de cordel que acontecem muitas vezes nos espaços públicos dos mercados. Outra característica local é a forte religiosidade em torno da figura do Padre Cícero Romão Batista, o que atrai milhares de turistas em datas anuais específicas (AUGUSTO e GÓES, 2007).

Os mercados públicos registrados nos órgãos oficiais das cidades do Triângulo Crajubar, são em número de oito, distribuídos da seguinte forma: um mercado na cidade de Barbalha (Mercado Municipal de Barbalha), cinco em Juazeiro do Norte (Centro de Abastecimento Dr. Mozart Cardoso de Alencar, Centro de Abastecimento Raimundo Viana, Centro de Abastecimento José Teófilo Machado, Mercado Governador Gonzaga Mota, Mercado Governador Aduino Bezerra) e dois no Crato (Centro de Abastecimento Walter Peixoto e Mercado Wilson Oriz). O levantamento etnofarmacológico do presente estudo foi realizado em seis dos mercados do Triângulo Crajubar; o Centro de Abastecimento Raimundo Viana e Mercado Wilson Oriz foram excluídos porque neles não havia comercialização de plantas para fins terapêuticos no período da coleta de informações.

#### **3.1.2 Procedimentos de coleta de dados**

A amostragem foi não aleatória-intencional, sendo pré-definidos como informantes os vendedores de plantas medicinais encontrados nos mercados públicos da área em estudo no período de março de 2012 a junho de 2014 (ALBUQUERQUE e LUCENA, 2004).

Após a obtenção do termo de anuência nas Secretarias Municipais, realizamos visitas preliminares aos mercados para conhecimento dos espaços e estabelecimento de contato com os possíveis entrevistados. Nessas primeiras visitas, fomos acompanhados sempre pelos administradores ou gerentes locais para estabelecimento de uma relação de confiança entre pesquisadores e participantes. A partir disso, os vendedores foram convidados a participar da pesquisa como informantes. Eles foram informados e esclarecidos previamente sobre os objetivos do estudo e o aceite foi dado mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme exigência do Comitê de Ética em Pesquisa (Resolução N° 292, de 08/07/1999). O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade Leão Sampaio (FALS), conforme parecer 477.828.

As informações foram coletadas através de entrevistas semiestruturadas. Foi utilizado um formulário através do qual foram levantados dados referentes à parte da planta utilizada, modo de preparo, quantidade necessária, indicações de uso e efeitos adversos conhecidos (AMOROZO e VIERTLER, 2010, ALBUQUERQUE et al., 2007b).

As espécies citadas foram fotografadas nos mercados e registradas pelo seu nome vulgar de acordo com a fala dos entrevistados. Foram confeccionadas as excicatas de plantas coletadas com a ajuda de dois vendedores, também coletores seguindo a técnica convencional (MORI et al., 1989). Para complementar este procedimento, amostras e fotografias das plantas que não puderam ser coletadas foram identificadas e comparadas com materiais depositados em herbários (ALBUQUERQUE et al., 2010).

### **3.1.3 Análise dos dados**

Para a análise dos dados, foram utilizadas técnicas descritas na literatura e comumente utilizadas em trabalhos da área para cálculo do fator de consenso do informante (FCI) e da importância relativa (IR) (TROTER e LOGAN, 1986; BENNET e PRANCE, 2000).

O FCI é utilizado para identificar os sistemas corporais que apresentam maior destaque local. Na categoria “uso medicinal” cada sistema é uma subcategoria e o valor máximo que cada uma pode atingir é 1 o que significa que quanto mais próximo da unidade for o valor obtido, maior a concordância entre os informantes (ALBUQUERQUE et al., 2010). Esse índice é obtido pelo uso da fórmula:

$FCI = (n_{ur} - n_t) / (n_{ur} - 1)$ ; onde  $n_{ur}$  corresponde ao número de citações de uso em cada sub-categoria e  $n_t$  é o número de espécies vegetais utilizadas nesta categoria.

O cálculo da IR aponta para as plantas mais versáteis que são aquelas com maior número de indicações terapêuticas ou que pertençam a mais sistemas corporais. O valor máximo que uma espécie pode obter é 2, e o cálculo é feito a partir da fórmula:

$IR = \frac{NSP + NP}{2}$ ; onde NSP é o número de sistemas corporais tratados por uma determinada espécie sobre o número total de sistemas tratados pela espécie mais versátil, enquanto NP corresponde ao número de propriedades atribuídas para uma determinada espécie sobre o número total de propriedades atribuídas à espécie mais versátil (ALBUQUERQUE et al., 2010).

## **3.2 Análises químicas**

### **3.2.1 Coleta do material vegetal**

As espécies vegetais *C. ipecacuanha*, *O. hamiltonii*, e *L. gracilis* foram coletadas respectivamente nas cidades de Patos-Paraíba, Serrita- Pernambuco e Crato- Ceará. As exsiccatas foram depositadas respectivamente nos herbários Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco (no. 35844) e herbário Caririense Dárdaro de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA (no. 4022 e no. 44.456). As folhas de *L. gracilis* foram coletadas em quatro diferentes horários do dia (7:00, 10:00, 13:00 e 16:00 horas), sendo parte das folhas submetida à desidratação.

### **3.2.2 Obtenção dos produtos naturais**

O tubérculo da *O. hamiltonii* e as raízes da *C. ipecacuanha* foram triturados e submetidos respectivamente à infusão e à decocção, seguindo o protocolo da Farmacopéia Brasileira (2010) quanto à proporção de material vegetal e quantidade de água bem como ao tempo de abafamento. Posteriormente os materiais obtidos, infusão de *O. hamiltonii* (IOh) e decocto de *C. ipecacuanha* (DCi), foram filtrados e levados à refrigeração e posteriormente submetidos ao processo de liofilização utilizando aparelho modelo Chisrt Alpha 1-4.

Os óleos essenciais extraídos das folhas de *L. gracilis* foram obtidos, separadamente, por hidrodestilação em um balão de vidro de 5 L contendo 2,5 L de água destilada, utilizando aparelho tipo Clevenger modificado por Gottlieb (1960) da marca Quimís, durante um período de 2 horas. Em seguida as misturas óleo/água foram coletadas, secas com sulfato de

sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtradas e armazenadas sob refrigeração a menos 4°C até a realização das análises químicas e dos ensaios antimicrobianos.

### **3.2.3. Análise da composição química dos óleos essenciais de *L. gracilis***

As análises das composições químicas dos óleos essenciais de *L. gracilis* foram realizadas usando um espectrômetro Shimadzu CG-17A / EM QP5050A (sistema de CG/EM): DB-5HT coluna de capilaridade (30 m x 0,251 mm); gás de portador: hélio 1,7 mL/min; pressão da coluna 107,8 kPa; velocidade linear = 47,3 cm/seg; fluxo total 24 mL/min; fluxo de portador 24 mL/min; temperatura do injetor 270 °C; temperatura de detector 290 °C; temperatura da coluna 60 (2 min) - 180 °C (1 min) a 4 °C/min, então 180 - 260 °C a 10 °C/min (10 min), operando sob energia de ionização de 70 eV. A identificação dos componentes foi baseada na fragmentação espectral, usando padrões da biblioteca de computador Wiley 229, além de dois outros argumentos: os índices de retenção e a comparação com dados da literatura (ADAMS, 2001; ALENCAR et al.,1990).

### **3.2.4 Análise da composição química dos produtos naturais da *O. hamiltonii* e da *C. ipecacuanha***

As análises cromatográficas foram realizadas sob as condições de gradiente usando coluna de Phenomenex C18 (4,6 mm x 250 mm) embaladas com partículas de 5 µM de diâmetro; a fase móvel foi água contendo 2% de ácido fórmico (A) e metanol (B), e a composição gradiente foi: 5% de (B) durante 2 min; 25% (B), até 10 min; 40, 50, 60, 70 e 80% (B) a cada 10 minutos; seguindo o método já padronizado. A IOh e a fase móvel foram filtradas através de membrana de 0,45 5 µM (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultra-sons antes da utilização, o extracto foi analisado para uma concentração de 15 mg / mL. A taxa de fluxo foi de 0,7 mL / min e o volume de injeção foi de 40 5 µL. As soluções estoque de referência de normalização foram preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,030-0,500 mg/mL para o ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico e ácido clorogénico, e 0,025-,300 mg/mL para a quercetina, rutina e luteolina. Quantificações foram realizadas por integração dos picos utilizando o método do padrão externo, a 254 nm para o ácido gálico e ácido elágico; 327 nm para ácidos clorogénicos e caféico, e 366 para a quercetina, rutina e luteolina. Os picos foram confirmados por cromatografia de comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por

espectros de DAD (200 a 600 nm). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. LOD e LOQ foram calculados como  $3,3$  e  $10 \sigma/S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta e  $S$  é o declive da curva de calibração. As diferenças entre os grupos de HPLC foram avaliadas por uma análise de modelo de variância e teste de Tukey. O nível de significância para as análises foi definido como  $p < 0,05$ . Estas análises foram realizadas usando o software livre R versão 3.1.1.

### **3.3 Avaliação da atividade antiparasitária da infusão de *O. hamiltonii***

#### **3.3.1 Linhagens celulares utilizadas**

Para os estudos *in vitro* com *Trypanosoma cruzi*, foi usado o clone CL-B5 ( Le Senne et al., 2002). Os parasitas foram estavelmente infectados com o gene da  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) da *Escherichia coli* que foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Comemorativo Gorgas (Panamá). As epimastigotas cresceram a  $28^{\circ}\text{C}$  em caldo de infusão de fígado (Difco, Detroit, MI) com 10% de soro fetal de bovino (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, SA, Barcelona, Espanha) e estreptomicina (Reig Jofré SA, Barcelona, Espanha), conforme descrito por Roldós et al. (2008), e colhidas durante a fase de crescimento exponencial. As culturas de *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum* foram obtidas a partir do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Assunção, Paraguai - IICS. A manutenção da pressão, a forma de cultura e isolamento da forma promastigota seguiram os procedimentos descritos por Roldós et al. (2008). Os ensaios de inibição de promastigotas foram realizados utilizando a estirpe de *L. braziliensis* e *L. infantum* (MHOM / BR / 75 / M2903), cultivadas a  $22^{\circ}\text{C}$  em meio de *Drosophila* de Schneider suplementado com 20% de FBS. Para os ensaios de citotoxicidade, foi utilizada a célula de fibroblasto linhagem NCTC929 cultivadas em Meio Mínimo Essencial (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com FBS inativado por calor (10%), penicilina G (100 U / mL) e estreptomicina (100 mg / mL). As culturas foram mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ . A viabilidade destas estirpes foi avaliada de acordo com Roldós et al. (2008), através da utilização de resazurina como um método colorimétrico.

### 3.3.2 Reagentes

A resazurina sódica foi obtida a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e armazenada a 4<sup>o</sup>C protegida de luz. Uma solução de resazurina foi preparada em tampão de 1% de fosfato, pH 7, e esterilizada antes da utilização. O clorofenol vermelho-b-D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em 0,9% de Triton X- 100 (pH 7,4). A penicilina G (Ern, SA, Barcelona, Espanha), estreptomicina (Reig Jofré SA, Barcelona, Espanha) e dimetilsulfato também foram utilizados.

### 3.3.3 Ensaio de susceptibilidade epimastigota *in vitro*

O ensaio de rastreio foi realizado em microplacas de 96 poços com as culturas que não atingiram a fase estacionária (Vega et al., 2005). As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram semeadas a  $1 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> em 200 µL de meio de cultura de caldo de fígado. As placas foram então incubadas com as drogas em concentrações variáveis entre 0,1 e 50 µg/mL a 28<sup>o</sup>C durante 72 horas, ao mesmo tempo que 50 µL de uma solução CPRG foi adicionada para dar uma concentração final de 200 µM. As placas foram incubadas a 37<sup>o</sup>C durante um tempo adicional de 6 horas e foram, em seguida, avaliadas por um espectrômetro a 595 nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, cada uma das concentrações foi testada em triplicata para cada experimento. A eficácia de cada composto foi estimada pelo cálculo dos percentuais anti-epimastigota.

### 3.3.4 Ensaio leishmanicida *in vitro*

Esse ensaio foi efetuado utilizando uma modificação do método anteriormente descrito. As culturas de promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. infantum* foram cultivadas a uma concentração de 10<sup>6</sup> células/mL e depois transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO nas concentrações a serem testadas e foram transferidos para microplacas. Cada teste foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72 h por contagem direta das células após diluições em série e em relação com um controle não tratado.

### 3.3.5 Ensaios citotóxicos

Os fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em microplacas de 96 poços a uma definitiva concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço. As células foram cultivadas a  $37^\circ\text{C}$  numa atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Depois disso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200  $\mu\text{L}$ , e realizada uma nova cultura por 24 h. Após esta incubação, 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de 2 mM de resazurina foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante 3 horas e a redução da resazurina foi mensurada usando dupla absorção de comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

### **3.4 Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da ação dos antibióticos**

#### **3.4.1 Material bacteriológico**

Foram utilizadas nos testes seguintes bactérias Gram-negativas e Gram-positiva, sendo sete cepas bacterianas: quatro linhagens padrão cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ (*E. coli* ATCC 10536, *P.aeruginosa* ATCC 15442 e *S.aureus* ATCC 12692 e ATCC 25923) e três isolados clínicos (*S. aureus* 358, e *P. aeruginosa* 03 e *E. coli* 27).

Previamente aos testes, as cepas bacterianas foram reavivadas em caldo BHI 3,8% durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Após esse subcultivo, procedeu-se a padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em BHI, apresentando turvação similar ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/ mL) em caldo BHI a 10%.

#### **3.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos naturais (IOh, DCi e OELG) foi avaliada dos pelo método de microdiluição em caldo, com base no documento M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2003). As amostras dos produtos naturais a serem testados (IOh, DCi, OELG) foram previamente preparados para obtenção de uma concentração inicial de 10 mg / mL, sendo observada a seguinte proporção: 10 mg da amostra solubilizada em 1 mL de DMSO. A partir desta concentração, foi efetuada uma diluição de 1: 10 em água destilada estéril (10 mg / mL), e em seguida, esta foi diluída da mesma forma formando uma solução estoque de 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após esse processo, diluições seriadas foram realizadas na proporção 1:1 em água destilada, obtendo-se as concentrações que variaram de 512-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Foram utilizados 100 µL de meios e de amostras, distribuídos em cavidades de microplacas estéreis. As amostras estavam preparadas em concentração dobrada (1.024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida em volumes de 100 µL e posteriormente foram diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura foi colocada uma amostra da suspensão bacteriana diluída na proporção de 1: 10 Figura 5 (pag. 43) resultando no inóculo final de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

O controle negativo foi realizado com o caldo BHI, enquanto o controle positivo foi o caldo mais o inóculo. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano. Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas incubadas por 24 h à  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  (JAVADPOUR et al., 1996). Como revelador foi utilizado 20 µL/ poço de resazurina sódica (SIGMA) preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v), por um período de 1 hora em temperatura ambiente. A leitura dos resultados para determinação da CIM foi considerada como positiva para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (COUTINHO et al., 2008).

### **3.3.5 Avaliação da atividade moduladora por contato direto**

Para a verificação do produto natural como modulador da atividade antibiótica somente foram testados a IOh, o DCi e o OELG. A sua concentração inibitória mínima (CIM) e a dos antibióticos aminoglicosídeos (neomicina, canamicina, amicacina e gentamicina) e  $\beta$ -lactâmicos ( oxacilina e benzapen) foram determinados de acordo com o método da microdiluição descrito no documento CLSI M7-A6, utilizando concentrações subinibitórias em BHI a 10%.

As amostras a serem testadas foram preparadas em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial (JAVADPOUR et al.,1996). Para avaliação do óleo essencial como modulador da resistência dos antibióticos, foram adicionados nos poços das placas de microdiluição, as bactérias a serem testadas, juntamente com os antibióticos (Sigma Chemical Co. All) e também, os produtos naturais em concentrações subinibitórias (CIM/8). O teste foi acompanhado de um controle negativo que consistia na solução de microrganismos e dos antibióticos supracitados. As placas foram incubadas por 24 h a  $37^\circ \text{C}$ . A leitura foi realizada pela adição da resazurina sódica, conforme descrito anteriormente.

### 3.3.6 Avaliação da atividade moduladora por contato gasoso

A modificação da atividade dos antibióticos pelos componentes voláteis do OELG foi determinada pelo método do contato gasoso (modificado por INOUE, TAKIZAWA e YAMAGUCHI, 2001). A avaliação foi realizada em triplicata, utilizando as soluções contendo 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12 % dos óleos essenciais diluído em DMSO.

Foram utilizadas duas culturas padrão, sendo uma Gram- negativa, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e outra Gram-positiva, *S. aureus* ATCC 12692, reavivadas em meio BHI, sendo incubadas por 24 horas a 37 °C. A seguir, as bactérias foram colocadas em suspensão no tubo de ensaio alcançando uma turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, os microrganismos foram semeados com o auxílio de um swab estéril em placas de Petri com *Plate Count Agar* (PCA, Difco). Na porção inferior e central das placas, foram utilizados discos com os antibióticos amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg) e tetraciclina (10µg) da LABORCLIN para verificar alterações no diâmetro da zona de inibição do crescimento dos microorganismos. As placas foram invertidas e na porção superior delas foi colocado 50 µL de cada concentração dos óleo essencial, para que os componentes voláteis interagissem com os antibióticos. Foram utilizadas como controle: placas contendo DMSO sem o óleo essencial e placas contendo somente os antibióticos. A leitura foi realizada após um período de incubação por 24 horas a  $35 \pm 2^\circ$  C, como auxílio de uma régua milimetrada.

### 3.3.7 Análises de dados

Os resultados dos testes microbiológicos foram obtidos em triplicata e expressos como média geométrica. Para análise estatística foi aplicada a ANOVA seguida do Bonferroni post test utilizando o software GraphPad Prisma 6.0 A significância foi considerada com  $p < 0,05$  (MATIAS et al., 2013)..

## **CAPITULO 4:**

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

#### **4.1 Ethnopharmacological study plants sold for therapeutic purposes in public markets in the northeast Brazil**

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu, Valdeneide de Carvalho Nilo Bitu, Edinaldo Fagner Ferreira Matias, Wenderson Pinheiro de Lima, Aline da Costa Portelo, Irwin Rose Alencar de Menezes

**Artigo aceito no periódico Journal of Ethno-pharmacology**

(Normas para publicação no anexo A)





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

## Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu<sup>a</sup>, Valdeneide de Carvalho Nilo Bitu<sup>a</sup>,  
Edinardo Fagner Ferreira Matias<sup>a,\*</sup>, Wenderson Pinheiro de Lima<sup>a</sup>, Aline da Costa Portelo<sup>a</sup>,  
Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Aplicadas Doutor Leão Sampaio, Lab. Bioquímica/Fisiologia, Avenida Leão Sampaio, Km 03 – Lagoa Seca, Juazeiro CEP 63180-000, Ceará, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM), Rua Coronel Antonio Luiz s/n, Pimenta, Crato CEP 63106-100, Ceará, Brasil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 1 April 2015  
Received in revised form  
13 June 2015  
Accepted 14 June 2015

**Keywords:**  
Traditional knowledge  
Public markets  
Medicinal plants ethnopharmacological information  
Sale of therapeutic plants

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Studies of ethnobiological nature favor the rescue of popular culture, preventing important cultural and biological information from being lost over time. Another interesting point is that it can support bioprospecting studies focusing on the discovery of new drugs.

**Objective of the study:** Our aim was to conduct a survey of plants sold for therapeutic purposes in public markets in the Crajubar Triangle in Northeast Brazil.

**Materials and methods:** Using a questionnaire, data were collected regarding the part of the plant used, method of preparation, quantity needed, instructions for use and known adverse effects. From the data obtained, we calculated the relative importance of species and informant consensus factor.

**Results:** Vendors indicated 91 useful species from a therapeutic point of view, distributed in 49 plant families. The preparation methods most frequently mentioned by informants were decoction, infusion, sauce with part of the plant in water and lozenge. The informants of this study mentioned bark, leaves, seeds and roots as parts of the plant most sold for therapeutic use. Disorders of the digestive system was the disease/disorder category with the highest consensus among the vendors, and the species *Ximenea americana*, *Lippia gracilis*, *Stryphnodendron rotundifolium*, *Anacardium occidentale*, *Hymenaea courbail*, *Myracrodruon urundeuva*, *Amburana cearensis* and *Himatanthus drasticus* were the most versatile among the plants sold in markets.

**Conclusions:** Vendors indicated 91 species belonging to 49 botanical families and 89 genera. The most frequent forms of preparation were decoction, infusion and sauce made with part of the plant in water. The most common form of administration was oral. Bark and leaves were the plant parts most used. Thirteen species showed great versatility regarding their use. We noted 291 indications for use in 13 disease/disorder categories.

© 2015 Published by Elsevier Ireland Ltd.

### 1. Introduction

Public markets are places where people often go not only to get marketed products but to socialize, where they are also true spaces of dialog and exchange of experiences between regulars and local merchants. Within these relevant socioeconomic institutions, the marketing of natural resources, especially medicinal plants, represents a significant economic activity, because various plant species have been widely used for palliative or curative treatment of pain and disease over time (Ferreira et al., 2012; Monteiro et al., 2010; Melo et al., 2009; Macía et al., 2005; Shanley and Luz, 2003).

The World Health Organization (WHO) estimates that many of the world's populations use medicinal plants therapeutically and rely solely on natural resources for their health care (Ustulin et al., 2009). This dependence is often related to the difficulty of access to health care systems, low cost compared to commercial medicine, and in some regions, geographical isolation from large urban centers (Costa et al., 2005; Macía et al., 2005). The great diversity of flora and the erroneous idea that herbals do not have side effects like synthetic drugs are factors that also favor the habit of using plants for therapeutic purposes by communities (Omena, 2007); another factor that promotes such use is the ease of obtaining them around the home, street fairs and public markets (Monteiro et al., 2010; Santos et al., 2009; Albuquerque et al., 2007; Funari and Ferro, 2005; Alves and Rosa, 2005; Moreira, 2002; Chivian, 2002).

\* Corresponding author. Tel.: +55 88 21011000; fax: +55 88 21011000.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.022>  
0378-8741/© 2015 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Vendors that sell plants for therapeutic purposes work in markets as popular prescribers, demonstrating empirical knowledge about indications, preparation methods and use, plant parts and quantities used and other relevant information (Santos et al., 2009; Silva and Peixoto, 2009; Leitão et al., 2009). In this context, one can say that the interactions in the sale of medicinal plants at public markets are an informal, open and dynamic medical system in which empirical knowledge about the use of these items comes from various sources and their transmission occurs in many ways, perpetuating the valuable cultural and biological information of a community (Baldauf, 2003; Amorozo, 1996). Studies of this nature foster the rescue of popular culture, because they record in a multidisciplinary way the existing socio-cultural interactions between people and plants in a given region, preventing the loss of important information with the passage of time (Oliveira et al., 2010; Heinrich, 2000; Ladio and Lozada, 2004). Another contribution of this type of study is that its results can support bioprospecting research that may lead to the discovery of new drugs (Gonçalves et al., 2005).

Our research area was the Crajubar Triangle, located in southern Ceará State in Northeast Brazil. This area corresponds to three cities that host eight public markets and for the meeting of people from other cities of the country and Latin America. This study aimed to survey the plants marketed for therapeutic purposes in public markets in the Crajubar Triangle, to answer the following questions: what is the profile of the vendors that sell plants in public markets in the region? What are the botanical species of medicinal use sold in local markets? What is the method of preparation and plant parts indicated by the sellers for therapeutic use? Which are the most versatile species among those marketed? Is there consensus between informants about the healing properties of the marketed plants?

## 2. Material and methods

### 2.1. Location and characterization of the study area

The Ceará Cariri includes six other cities, in addition to Crato (7°14'03"N, 39°24'34" W), Juazeiro do Norte (7°12'47"N, 39°18'55" W) and Barbalha (7°18'40" N, 39°18'15"W), which are the most important from an economic and cultural point of view. Due to their proximity, Crato, Juazeiro and Barbalha experienced a conurbation process forming an area called the Crajubar Triangle (IBGE, 2010) (Fig. 1), where the tertiary activities, formed by trade and services, are prevalent and always exert a strong attraction and influence on surrounding local centers (Oliveira, 2012).

The region was considered a cultural center in the state, with various art forms, particularly folk dances, sculptures, paintings and woodcuts, singing and the pamphlet literature, which often happen in public areas of the markets. Another local feature is the strong religiosity around the figure of Priest Cicero Romão Batista, which attracts thousands of tourists on specific annual dates. Historically, there has been extensive discussion on the origin of this region's population. Several local or ethnic groups have been or are referred to as belonging or related to the Kariris Indians or other Indian ethnic groups such as the Tubiba-Tapuia, Gavião, Tupinambá and Paupina. However, there are reports of colonization by religious missions of the Portuguese and Italians. The population of this region was then formed by the mixing of Europeans, Indians, blacks and mulattos (Augusto and Góes, 2007).

Public markets account for an economic center is also considered as a meeting and tourist point for the population. There are 8 public markets reported in the official organs of the cities of the Crajubar Triangle, distributed as follows: one market in the city of Barbalha (Municipal Barbalha Market), five in Juazeiro (Dr. Cardoso Mozart de Alencar Supply Center, Supply Center Raimundo Viana,



Fig. 1. Maps with geographical location of the area of study in the Cariri, Ceará, Brazil.

José Teófilo Machado Supply Center, Governor Gonzaga Mota Market, Governor Adauto Bezerra Market) and two in Crato (Walter Peixoto Supply Center and Wilson Oriz Market). The ethnopharmacological survey of the present study was conducted in six of the Crajubar Triangle markets; Raimundo Viana Supply Center and Wilson Oriz Market were excluded because there was no sale of plants for therapeutic purposes in the period of data collection.

### 2.2. Data collection procedures

The sampling was not random-intentional, where the vendors of medicinal plants found in the public markets of the study area from March 2012 to June 2014 were pre-defined as informants (Albuquerque and Lucena, 2004).

After obtaining consent from the municipal secretariats, we conducted preliminary visits to markets to check out the space and to establish contact with potential respondents. In these first visits, we were always accompanied by administrators or local managers to establish a trust relationship between researchers and participants. Accordingly, the vendors were invited to participate in the study as informants. They were told about the objectives of the study and signed an informed consent form, as required by the Research Ethics Committee (Resolution no. 292 of July 8, 1999). This project was approved by the Ethics Committee for Research in Humans of the Leão Sampaio Faculty (FALS) (No. 477,828).

Information was collected through semi-structured interviews. A form was used through which data were collected regarding the part of the plant used, method of preparation, quantity needed, known indications of use and adverse effects (Amoroso and Viertler, 2010; Albuquerque et al., 2007).

These species were photographed in the markets and recorded by the common name used by the interviewees. Dried specimens of the plants collected were prepared with the help of two vendors who were also collectors, according to the conventional technique (Mori et al., 1989). To complement this, samples and photographs of plants that could not be collected were identified and compared with materials deposited in the herbaria listed in the supplementary material (Albuquerque et al., 2010).

### 2.3. Data analysis

For data analysis, we used techniques described in the literature and commonly used in this area of study to calculate the informant consensus factor (ICF) and relative importance (RI) (Troter and Logan, 1986; Bennett and Prance, 2000). ICF is used to identify the

body systems that have greater local emphasis. In the “medicinal use” category, every system is a subcategory and the maximum value that each can achieve is 1, which means that the closer value is to unity, the greater the agreement is between informants (Albuquerque et al., 2010). This ratio is obtained by using the following formula:

$$ICF = (n_{ur} - n_t) / (n_{ur} - 1);$$

where  $n_{ur}$  is the number of use citations in each subcategory and  $n_t$  is the number of plant species used in this category.

RI determines the versatility of plants, where higher values indicate those with the largest number of therapeutic indications or that are used for more body systems. The maximum value that a species can get is 2, and the calculation is done using the following formula:

$$RI = NST + NP$$

where NST is the number of body systems treated by a particular species over the total number of systems treated by the most versatile species, while NP is the number of properties attributed to a given species over the total number of properties attributed to the most versatile species (Albuquerque et al., 2010).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Sociodemographic profile of respondents

Thirty people working in the trade of medicinal plants in the period of data collection were interviewed, namely 19 females and 11 males, aged 28–74 years, with 83.3% of them over 40. It is widely debated if gender, education level or age are indeed factors that interfere with knowledge of the therapeutic potential of botanical species. According to Proença and Silva (2008), studies that cover these issues are interesting to know the distribution of knowledge within the community. However, in relation to gender, the results presented in the literature are inconsistent, because some studies show that herbal knowledge is prevalent among females (Begossi et al., 2002; Negrelle et al., 2007), while others report no evidence of differences between the sexes (Botrel et al. 2006; Lozada et al., 2006). Regarding age, studies show that older individuals have more information about this topic, due to accumulated knowledge over the years (Borba and Macêdo, 2006; Pereira et al., 2005).

A small portion of the vendors in the public markets in the Cariri region said that they began their activities less than five years ago (16.7%), but the majority of respondents (70%) had been engaged in the trade of medicinal plants for over 10 years, and of these, 26.7% had accumulated experience in the practice of such sales for a period ranging between 25 and 46 years. It was reported that the majority (60%) had an incomplete primary education. Studies by Silva and Andrade (2005) and Negrelle et al. (2007) associated the knowledge of plants with lower levels of education; however, several studies have shown that although vendors of medicinal plants generally have little schooling, their knowledge is consistent with what the literature describes in relation to the therapeutic properties of botanical species (Ustulin et al., 2009; Tresvenzol et al., 2006).

According to the interviewees, the transmission of knowledge occurred predominantly in an oral and observational way. Most respondents (43.3%) said they acquired their knowledge of herbal medicines from their parents and grandparents, who developed the same activity in the markets and fairs of Cariri. Also, a high percentage of vendors (33.4%) reported knowing some plants when they started to work in this business, but did not know what or how they were used therapeutically, and they said that they learned about their healing properties from buyers. Therefore, we observed in this study that the transmission of knowledge

occurred both vertically (between different generations) and horizontally (between members of the same generation), as described by Baldauf et al. (2009).

We did not obtain information on income from this occupation from 36.7% of informants. Some looked uncomfortable when asked about it, while others were unable to provide this information due to the variations that exist in a few months of intense pilgrimage in the city, such as February, March, September, October and November, in which the influx of buyers in the market increases, dramatically leveraging sales. Among all, 23.3% earned less than the minimum wage, 33.3% between one and two times the minimum wage, and only 6.7% between two and three times. Proença and Silva (2008) correlated popular knowledge about medicinal plants with low-income families. Despite the results obtained, it was not possible to make correlations in this regard due to the number of informants who did not respond to the income question.

#### 3.2. Data relating to medicinal plants sold

The vendors indicated 91 useful species belonging to 49 botanical families and 89 genera (Table 1). Among the commercial species, 40 (44%) were native to the area. The family Fabaceae had the highest number of cited species (11). Other ethnopharmacological surveys also point to the large representation of the family and explain this result by the large number and diversity of species that compose it (Silva et al., 2012; Souza, 2007). Ribeiro et al. (2014) associated ethnopharmacological importance of this family with the presence of chemical components such as rutin, coumarin and canrenic acid in various species that are used for making medicinal products such as *Dimorphandra Gardneriana* Tull, *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. and *Copaifera langstonii* Desf. Besides the family Fabaceae, the others most cited were Euphorbiaceae (7), Lamiaceae (6) and Apocynaceae (5).

The most cited forms of preparation by the respondents were decoction (27.6%), infusion (23.4%) and part of the plant in water as a sauce (20%), followed by maceration (6.9%), extraction of oil (6.9%), lozenge (4.8%), potions (2.8%), homogenization in a blender (2.8%), boiling (2.8%) and mixing with milk (1.4%). Several studies show that the most common form of use of medicinal herbs is prepared by brewing tea where plant parts are covered with hot and steaming water (Baldauf et al., 2009; Maioli-Azevedo and Fonseca-Kruel, 2007; Chaves and Barros, 2012), while others indicate decoction as a more common way of preparation (Oliveira et al., 2010; Medeiros et al., 2003; Pinto and Maduro, 2003). Some authors stress the fact that the boiling time of leaves can change the chemical properties and biological activity of plant species, and the desired effect may not be obtained; thus, only tougher portions of the plant such as stem, root and bark should be boiled (Chaves and Barros, 2012; Arnous et al., 2005). Ribeiro et al. (2014a) showed that there may be variations in the preparation mode depending on the plant part used and how the solution will be administered, whether in an oral or topical way. In this study, apart from the oral administration, that is, intake of the herbals, the vendors mentioned other ways to use them, such as baths, foot baths, compresses, massage, chewing, inhalation, brushing and instillation.

Studies show that people, in making use of medicinal plants, try different parts of the plant such as leaves, fruits, bark, flowers, roots, seeds, resins, latex and essential oils, to meet their health needs (Khan et al., 2013; Amiri and Joharchi, 2013; Lulekal et al., 2013; Souza et al., 2014). However, there are some factors that interfere with the plant part of choice to be prepared for medicinal use. Authors report that the choice can be influenced by the ease of procurement and storage (Chaves and Barros, 2012), or the availability according to the season (Albuquerque and Andrade, 2002).

**Table 1**

List of plants sold in public markets in the Crajubar Triangle, state of Ceará, Northeast Brazil.

Species	Family	Common name	Herbarium	Voucher number	Part of plant	Form of preparation	Indications of use	RI
<i>Acmella uliginosa</i> (S. W.) Cass	Asteraceae	Agrião	HGM	43,955	SE	LO/IF	Expectorant	0.23
<i>Allium aescalonicum</i> L.	Liliceaeae	Cebola branca	HPVS	39,710	BL	DC	Flu, cough	0.33
<i>Alpinia speciosa</i> Schum.	Zingiberaceae	Colônia	HST	3523	LE	DC	High blood pressure and edema	0.33
<i>Amburana cearensis</i> (Allem.) A. C. Smith	Fabaceae	Imburana de cheiro	HCDAL	-	BA/SE	SA/CZ/DC/LO/IF	Worms, pain, circulation, wound healing, cough, flu, sore throat	1.33
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	Caju	HCDAL	9252	BA/LE	SA/DC	Urinary retention, edema, inflammation, wound healing, constipation, rheumatism, diabetes, bleeding	1.58
<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul	Fabaceae	Anjico	HGM	49,643	BA	LO	Diarrhea, cough, phlegm, venereal diseases	0.88
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	Graviola	HCDAL	9261	LE	IF	Poor digestion, worms, diabetes	0.55
<i>Argemone mexicana</i> L.	Papaveraceae	Carro santo	HLPX	31,013	SE	DC	Measles, chicken pox, asthma	0.55
<i>Aristolochia cymbifera</i> Kuntze	Aristolochiaceae	Jarrinha	HPVS	34,524	LE/RO	IF/SA	Blood circulation, fever, diabetes, weakness	0.9
<i>Aspidosperma parvifolium</i> A.DC	Apocynaceae	Pereiro	ASE	7661	BA	SA/DC	Diabetes	0.23
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	Asteraceae	Carqueija	-	-	BA	DC	Obesity	0.23
<i>Bahuinia variegata</i> L.	Fabaceae	Pata de vaca	HPB	29,849	BA/NO/LE	SA/DC	Diabetes	0.23
<i>Bixa orellana</i> L.	Bixaceae	Coloral, urucum	ASE	32,819	SE	SA	High cholesterol	0.23
<i>Bowdichia virgilioides</i> H.B.K.	Fabaceae	Sucupira	HCDAL	9268	SE	SA/CZ	Pain, hoarseness, sore throat	0.55
<i>Brassica integrifolia</i> Schulz	Brassicaceae	Mostarda	HPB	24,938	SE	IF	Indigestion, rheumatism	0.45
<i>Bursera leptophelos</i> Mart.	Burseraceae	Imburana	HLPX	31,826	BA	EO/DC	Healing, analgesic, anti-inflammatory, tonic	0.65
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntz	Theaceae	Chá preto	-	-	LE	DC	Premenstrual syndrome, loss of appetite, flu	0.68
<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm	Caryocaraceae	Pequi	HCDAL	9245	OI	EO/MA	Hoarseness, sore throat bronchitis, flu and cold	0.63
<i>Cecropia palmata</i> Wild.	Cecropiaceae	Torém, toré	HPB	35,499	LE	DC	Urinary retention	0.23
<i>Cedrela odorata</i> L.	Meliaceae	Cedro	ASE	31,994	BA	DC	Liver problems	0.23
<i>Ceiba glaziovii</i> (Kuntze) K.Schum	Malvaceae	Barriguda	HST	20,499	BA	SA	Cancer	0.23
<i>Cephaelis ipecacuanha</i> Rich.	Rubiaceae	Pepaçonha, Ipepaçonha	HGM	35,844	RO	IF/SA	Worms, wounds, cough, flu	0.78
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.	Lauraceae	Canela	HPB	15,631	BA/LE	DC	Weakness, low blood pressure	0.45
<i>Cleome spinosa</i> Jacq.	Capparaceae	Mussambé	HDAL	11,432	RO	LO	Otitis, bronchitis, cough, asthma, wound, headache	1.1
<i>Cnidioscolus quercifolius</i> Pohl.	Euphorbiaceae	Favela	HGM	55,098	BA	SA/DC	Cystitis, urethritis	0.33
<i>Cocos nucifera</i> L.	Areaceae	Coco	HPB	53,862	BA/AG	IF/SA	Kidney stones, liver problems	0.45
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Fabaceae	Copaíba	HCDAL	9833	OI	EO	Skin inflammation, bronchitis, venereal disease	0.55
<i>Crocus sativus</i> L.	Iridaceae	Açafrão	-	-	RO	DC	Fever	0.23
<i>Croton</i> SP.	Euphorbiaceae	Marmeleiro	HCDAL	9283	BA	IF/SA	Pain, stomach problems, vomiting	0.55
<i>Croton zehntneri</i> Pax&K. Hoffm.	Euphorbiaceae	Velame	HCDAL	9286	LE	DC/SA	Blood circulation, inflammation, mycose	0.68
<i>Cryptocarya mascata</i> Mez	Lauraceae	Noz-moscada	HST	2669	SE	DC	Intestinal colic, asthma, diarrhea, stomach ache	0.65
<i>Dorstenia arifolia</i> Lam.	Moraceae	Contra erva	HGM	71,004	RO	SA/DC	Flu, nervous fever, snakebite	0.68
<i>Egletes viscosa</i> Less.	Asteraceae	Macela	HPB	24,477	SE	SA/MA/DC	High cholesterol, liver problems, rheumatism, diabetes, malaise, upset stomach	1.1
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	Fabaceae	Tamboril, Orelha de onça	HCDAL	9277	BA/SE	DC/MA	Neuritis, muscle pain, sciatica, worms	0.78
<i>Equisetum hiemale</i> L.	Equisetaceae	Cavalinha	-	-	ST/LE	IF/DC/CZ	Conjunctivitis, edema, obesity	0.68
<i>Eschweira ovata</i> (Cambess.) Miers	Lecythidaceae	Embiriba, Embira	HST	1527	SE/BA	MA/IF	Throat irritation, abortifacient, back pain	0.68
<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.	Myrtaceae	Eucalipto	HDAL	58,851	LE	IF/SA	Pain, fever, flu	0.55
<i>Foeniculum vulgare</i> Gaertn.	Apiaceae	Endro	HDAL	7594	SE	IF	Nausea, nervousness, spasms, intestinal colic	0.53
<i>Gossypium barbadense</i> L.	Malvaceae	Algodão	HPB	31,947	SE	BL	Boils, burns, wounds	0.43
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	Apocynaceae	Mangaba	HCDAL	9254	BA/SE/LE	DC/IF	Worms, wound healing, constipation	0.55

Table 1 (continued)

Species	Family	Common name	Herbarium	Voucher number	Part of plant	Form of preparation	Indications of use	RI
<i>Helianthus annuus</i> L.	Asteraceae	Girassol	HPB	5657	SE	TI	Headache and nervous disorders	0.33
<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel	Apocynaceae	Quina-quina	HCDAL	9253	BA	DC	Asthma	0.23
<i>Himatanthus drasticus</i> (Mart.) Plumel	Apocynaceae	Janaguba	HCDAL	9253	AS	MM	Gastric ulcer, cancer, wound healing, worms, arthritis, laxative	1.23
<i>Hymenaea courba</i> L.	Fabaceae	Jatobá	HCDAL	9837	BA/VG/ST	SA/MM/DC/LO/SS	Blood circulation, anemia, pain, weakness, flu, inflammation, cough, angina	1.53
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit	Lamiaceae	Alfazema	HPVS	47,877	LE	DC	Anxiety, nervousness and depression	0.43
<i>Illicium verum</i> L.	Illiciaceae	Anis estrelado	-	-	SE	IF	Gastrointestinal spasms, gastritis	0.45
<i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) DC	Bignoniaceae	Caroba	ASE	20,857	BA/LE	DC	Emmenagogue	0.23
<i>Jatropha molissima</i> (pohl) Baill.	Euphorbiaceae	Pinhão branco	HCDAL	-	SE	DC/EO	Decoction, oil	0.45
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	Nogueira	HPVS	-	SE/OI	MA/IF/EO	Intestinal colic, diarrhea, stomach ache	0.43
<i>Laurus nobilis</i> L.	Lauraceae	Louro	HLPX	60,400	LE	SS	Malaise	0.23
<i>Licania rigida</i> Benth.	Rosaceae	Oiticica	HPB	36,134	LE	IF	High cholesterol, diabetes, itching, dandruff, mycosis	0.75
<i>Lippia alba</i> (Mill.) Brow	Verbenaceae	Erva cidreira	HDAL	70,003	LE	IF/BL	Spasms in the abdomen, vomiting, diarrhea, labyrinthitis, nervousness	0.88
<i>Lippia gracillis</i> Schauer	Verbenaceae	Alecrim	HGM	45,217	LE/SE	IF	Weakness, fever, wound healing, pain, lack of appetite, flu, cough, sore throat, gastritis, rheumatism	1.88
<i>Luffa operculata</i> Cong.	Cucurbitaceae	Cabacinha	HPB	43,056	RO	SA	Pain	0.23
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Asteraceae	Camomila	-	-	FL	DC	Gas, intestinal colic and nervousness	0.55
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Celastraceae	Espinheira santa	HCDAL	9290	LE	IF	Pain, malaise, stomach disease	0.55
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Fabaceae	Jurema preta	HCDAL	9251	BA	DC	Wound healing	0.23
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Anacardiaceae	Aroeira	HCDAL	8908	BA	SA/CZ	Pain, inflammation, skin wounds, itching, abdominal colic, cystitis, urethritis, diarrhea	1.43
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Manjeriço	HGM	34,868	LE	SA /IF/MA/ CZ	Cold, cracked nipple, abdominal cramps, bloating	0.78
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Lamiaceae	Alfavaca	HGM	34,869	LE	SA/BL	Pain, sedative, cancer, flu	0.9
<i>Operculina hamiltonii</i>	Convolvulaceae	Batata de purga	HCDAL	4022	RO	IF	Worms, wound healing	0.45
<i>Orbignya phalerata</i> Mart.	Arecaceae	Babaçu	HPB	23,898	BA/SE	IF /DC	Diarrhea, healing	0.33
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Orégano	-	-	LE	CZ/EO/IF/ MA	Diuretic, dandruff, wounds, colic, digestion	1
<i>Periandra mediterranea</i> (Vell.) Taub.	Fabaceae	Alcaçuz	HPB	18,750	RO	SA	Bronchitis, cough, hoarseness	0.43
<i>Persea americana</i> Mill.	Lauraceae	Abacate	HST	10,477	LE	IF	Urinary retention	0.23
<i>Petiveria alliacea</i> L.	Phytolaccaceae	Tipi, Tipim	HUEFS	18,855	RO	SA/TI	Pain, weakness	0.45
<i>Peumus boldus</i> Mol.	Monimiaceae	Boldo	-	-	LE	IF	Hepatitis, abdominal discomfort, gastritis	0.43
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Euphorbiaceae	Quebra pedra	HGM	45,199	RO	IF	Cystitis, kidney stones, urethritis	0.43
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Apiaceae	Erva doce	ASE	1643	SE	IF/SA	Pulmonary secretions, pain, intestinal colic, flatulence, soothing	0.88
<i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	Annonaceae	Pimenta de macaco	HGM	61,532	LE/FT	DC	Pain	0.23
<i>Pogostemon cablin</i> Beth.	Lamiaceae	Patchouli	ASE	13,173	SE	DC	Nervous breakdown, depression, mycosis	0.55
<i>Punica granatum</i> L.	Punicaceae	Romã	HPVS	46,202	FT/BA	DC	Hoarseness, throat irritation	0.33
<i>Ricinus communis</i> L.	Euphorbiaceae	Mamona	HGM	52,116	OI	EO	Wound healing, burns, hair loss, purgative, anthelmintic	0.75
<i>Roupala montana</i> Aubl.	Protaceae	Congonha	HCDAL	9267	LE	IF	Urinary retention, urethritis	0.33
<i>Sapium glandulatum</i> (Vell.) Pax.	Euphorbiaceae	Pau de leite	HGM	45,757	BA	SA	Emmenagogue	0.23
<i>Scoparia dulcis</i> L.	Plantaginaceae	Vassourinha	HCDAL	9288	LE/RO	LO/IF/DC/SA	Fever, asthma, flu, hemorrhoids, hepatitis, toothache	1.1
<i>Secundatia floribunda</i> A.DC.	Apocynaceae	Catuaba	HCDAL	9259	BA	DC/TI	Impotence	0.23
<i>Selaginella convoluta</i>	Selaginellaceae	Jericó	HDAL	48,333	WP	DC	Asthma, bronchitis, cough, hemorrhoids, gastrointestinal bleeding	0.88
<i>Senna corymbosa</i> (Lam.) H. Irwin & Barneby	Fabaceae	Sena	HGM	24,727	LE	DC	Constipation, nausea, slimming	0.55
<i>Sesamum indicum</i> L.	Pedaliaceae	Gergelim	HUEFS	168,126	SE	BL/EO	Thrombosis, heart attack, tonic, urinary tract infection, tachycardia, nervousness	1.2
<i>Sideroxylon obtusifolium</i> (Roem & Schult.) T.D. Penn	Sapotaceae	Quixaba	HPVS	49,434	BA	SA	Kidney stones, renal colic, acne, healing effect, blood circulation	0.88
<i>Stryphnodendron rotundifolium</i> (Mart.)	Fabaceae	Barbatimão	HCDAL	9263	BA	SA/TI/IF	Diabetes, ulcer, wound healing, venereal disease, hemorrhage, anthelmintic, high blood pressure, anemia, cancer, liver disease	1.88

Table 1 (continued)

Species	Family	Common name	Herbarium	Voucher number	Part of plant	Form of preparation	Indications of use	RI
<i>Syagrus picrophylla</i> Barb. Rodr.	Arecaceae	Catolé	HDAL	50,199	RO/LE	IF/SA/EO	Pruritus and urinary tract infection	0.45
<i>Syzygium aromaticum</i> L.	Myrtaceae	Cravo	HDAL	82,838	FB	IF/DC/EO	Bronchitis, cough, halitosis, oral mycosis, pharyngitis	0.75
<i>Tabebuia impertiginosa</i> (Mart. Ex DC.) Standl.	Bignoniaceae	Pau darco roxo	HPB	23,643	LE	IF	Uterus injury	0.23
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult) DC.	Rutaceae	Unha de gato	-	-	RO	DC	Arthritis, venereal diseases	0.45
<i>Xanthoxylum gardneri</i> Engl.	Rutaceae	Quebra faca	-	-	BA	DC	Enteritis	0.23
<i>Ximenia americana</i> L.	Oleaceae	Ameixa	HCDAL	nc	BA/RO/FT	SA/IF/MA/LO	Pain, obesity, inflammation, wound healing, diabetes, cough, hoarseness, constipation, venereal disease, osteoporosis	2
<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	Milho	ASE	20,644	FH/SA	DC	Urinary infection	0.23
<i>Zingiber officinalis</i> Rosc.	Zingiberaceae	Gengibre	HUEFS	61,813	RO	MA	Pain, cough, pharyngitis, obesity	0.78
<i>Zizyphus joazeiro</i>	Rhamnaceae	Juá	HGM	55,097	BA	SA/MA/LO	Inflammation, influenza, tooth whitening, dandruff	0.9

Bark=BA; leaves=LE; seeds=SE; roots=RO; oil=OI; fruit=FT; stem=ST; water=WA; floral bud=FB; bulb=BL; fruit husk=HH; stigma=SA; flower=FL; node=NO; sap=SV; whole plant=WP; pods=PO; decoction=DC; infusion=IF; sauce=SA; lozenge=LB; mash=MA; extraction of oil=EO; mixed in blender=BL; tincture=TI; cooked=CZ; seasoning=SS; boiled=BO; mixed in milk=MM. Herbarium Legend: HCDAL - Cariense Dárdano de Andrade Lima Herbarium; HPB - Prisco Bezerra Herbarium; HGM - Geraldo Mariz Herbarium; HDAL - Dárdano de Andrade Lima Herbarium; HPVS - Professor Vasconcelos Sobrinho Herbarium; HUEFS - Herbario da Universidade Estadual de Feira de Santana; ASE - Herbário da Universidade Federal de Sergipe; HST - Sérgio Tavares Herbarium; HLPX - Lauro Pires Xavier Herbarium. (-)without complete identification

In this study, informants mentioned bark (26.3%), leaves (24.6%), seeds (17.8%) and roots (12.8%) as most of the plant parts marketed for therapeutic use. Other parts used were cited in smaller proportion, such as oil (4.3%), fruit (2.4%), stem (1.7%), and flower (1.7%). Of the ten plants with higher RI value, six had the bark as the most sold part for medicinal purposes, which might have been due their being deciduous in some seasons or to higher expression of the active ingredients in the bark than leaves (Oliveira et al., 2010; Albuquerque and Andrade, 2002). On the basis of these results and literature data, we propose further work to determine the feasibility of replacing the bark with leaves if the active principles can be identified in the leaves and the manner of preparation of these plants. However, various natural factors such as temperature, humidity and soil composition can alter the chemical composition of plants, so the safety of medical use based solely on the history of past use from generation to generation may lead to mistakes. Therefore, the substitution of plants is not advisable until clinical trials for safety are first performed.

In some regions where the leaves cannot be found in times of drought, residents usually dry them and store them for later use (Oliveira et al., 2010), because the use of leaves is a common widespread practice (Luziatelli et al., 2010; Amiri and Joharchi, 2013; Cadena-González et al., 2013). However, studies by Bitu et al. (2012) showed that there are significant differences when comparing the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from fresh and dried rosemary leaves, where the biological activity can be modified by the leaf drying process.

Thirteen species of plants showed great versatility as to their uses, with RI values greater than or equal to 1, as shown in Table 1. Among these species, eight have up to five categories of related use: *Ximenia americana* (plum), *Lippia gracilis* (rosemary), *Strychnodendron rotundifolium* (barbatimão), *Anacardium occidentale* (cashew), *Hymenaea courba* (janaguba), *Myracrodruon urundeuva* (mastic), *Amburana cearensis* (imburana de cheiro), *Himatanthus drasticus* (janaguba); except *L. gracilis* and *H. drasticus*, all others have their bark marketed by vendors and with the exception of *X. americana* and *H. courba*, all others are native species, factors that are quite worrisome from a conservation point of view, since these are the most versatile species among those sold in the region.

Many families of plants and herbs used for traditional treatment of diseases and their components have been shown to have medicinal value and can be used to prevent, alleviate, or cure many human diseases. Many ethnopharmacological studies demonstrate that there is considerable variation between uses for different families of plants, and thus there are several factors that can influence indication, such as the availability of the plants, cognitive characteristics, environment and cultural history. A survey of medicinal plants is never a census, and always shows a difference between the selections of medicinal plants, causes variability in indications of pharmacological properties. Thus, this work demonstrated a balance in the distribution of families with medicinal properties, such as: Asteraceae had five species mentioned but only one had a high use value (20%); Lamiaceae had 6 species mentioned but only one had a high use value (17%); Fabaceae had 12 species mentioned but only three had a high use value (25%); and Euphorbiaceae had seven species mentioned but none had a high use value (0%).

Regarding the most versatile species, vendors reported adverse effects associated with the use of only three: malaise if the herbal is prepared using large amounts of bark of the species *M. urundeuva* and *S. rotundifolium* and an abortifacient effect with *Egletes viscosus* when used in excess. For the other species, the informants did not mention adverse effects, prevailing among them the ancient and harmful idea that what comes from the earth does no harm (Lanini et al., 2009; Baldauf et al., 2009). When asked about the amount of the plants used in the preparation, all informants made it known that there was no standardization of use. They used words such as "a scoop," "a sauce" and "a handful," but none knew how to express in kilograms or how much that meant. Thus, we believe that the use of plants prescribed by vendors may represent a significant risk to public health due to adverse effects from inaccurate dosing. Given this observation, we realize the importance of new studies that deal with the toxicity of plants traded for medicinal purposes (Sharma and Sarkar, 2012; Wu et al., 2008).

We observed 291 indications of use using in 13 categories of diseases/disorders and disorders of the digestive system were the category with the largest consensus value for vendors, immediately followed by diseases of the blood and blood-forming organs,

**Table 2**  
Informant consensus factor (ICF) for various categories of use or medicinal plants sold in public markets in the Crajubar Triangle, state of Ceará, Northeast Brazil.

Category	No. of plant species	No. of uses reported	ICF
Disorders of the digestive system	34	67	0.50
Diseases of the blood and hematopoietic organs	11	19	0.45
Disorders of the respiratory system	28	49	0.44
Disorders of the nervous system	10	15	0.36
Diseases of the skin and subcutaneous tissue	25	34	0.27
Diseases of the endocrine glands, nutrition and metabolism	18	23	0.23
Undefined pain and inflammation	30	38	0.22
Disorders of the genito-urinary system	24	30	0.21
Diseases of the skeletal system	6	6	0.00
Neoplasias	4	4	0.00
Disorders of sensory system	2	2	0.00
Parasitic diseases	6	6	0.00
Physical and mental disabilities	7	7	0.00

respiratory system disorders and disorders of the nervous system, as shown in Table 2. The aforementioned systems locally represent important categories from a cultural point of view. These results also suggest that the diseases involving these systems may be the most prevalent in the region studied and that is why they are recalled and cited the most often by respondents (Almeida and Albuquerque, 2002). An ethnobotanical study conducted in public markets in two Bolivian cities, La Paz and El Alto, indicated that most of the aforementioned plants and their therapeutic applications were related to the treatment of disorders of the digestive system, such as stomach ailments and liver problems (Maciá, 2004). The disorders in this body system were also reported as the most common therapeutic application of plants in an ethnopharmacological survey done by Mati and Boer (2010) in a market in Iraq. Chaves and Barros (2012) point out that the categories of use that have higher ICF values deserve further study and may guide ethnopharmacological research and informed bioprospecting, valuing traditional knowledge and local sustainable use of regional vegetation. An ethnobotanical study in public markets of two other categories of use in which there was consensus between the respondents is shown in Table 2; however, there was no consensus among informants with respect to the treatment of diseases of the skeletal system, cancer, disorders of the sensory system, parasitic diseases, physical and mental disabilities.

Therefore, knowledge of the use of medicinal plants has been seen by many as an alternative way of promoting development in poor populations in many parts of the world. As predicted, we demonstrated that empirical knowledge about native plant use is more diverse and more evenly shared by people through speech. The impact of out-migration and urban migration experience on medicinal plant knowledge was emphasized by social interactions. Interviews also indicated that the adoption of modern community services has had notable effects, eroding traditional knowledge about useful plants.

#### 4. Conclusions

This work recorded 91 plant species sold for therapeutic purposes in public markets in Crajubar Triangle, which were distributed in 49 botanical families and 89 genera, where the family Fabaceae had the largest number of species cited. These results allowed us to conclude that medicinal plants represent an important therapeutic resource in the study area.

A finding of concern, from a nature conservation point of view, was that the parts of the plants most used were their bark, so there

is a need for further work to determine the feasibility of replacing the bark with leaves, depending on the identification of the active ingredients in bark, and in the way these herbals are prepared.

Thirteen species showed great versatility regarding their use. A total of 291 indications for use in 13 disease/disorder categories were obtained, and the digestive disease system was the category with the highest ICF. The botanical species showing the highest RI, that is, those that were incorporated into popular culture for their curative function could help in later bioprospecting studies.

#### Acknowledgments

We thank the informants for their collaboration and the information provided and CAPES, FUNCAP and CNPq for the financial aid given to first author. We are also grateful to Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque for valuable discussions and contributions in the preparation of the manuscript. Dr. A. Leyva helped with English translation and editing of the manuscript.

#### References

- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C., 2002. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Bot. Bras.* 16 (3), 273–285.
- Albuquerque, U.P., Lucena, R.F.P., 2004. Métodos e técnicas de pesquisa etnobotânica. Recife: NUPPEA. 189p.
- Albuquerque, U.P., Monteiro, J.M., Ramos, A.A., Amorim, E.L.C., 2007. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 110, 1.
- Albuquerque, U.P., Monteiro, J.M., Ramos, M.A., Amorim, ELCA., Alves, R.R.N., 2010. A pesquisa Etnobiológica em mercados e feiras livres Série: Estudos e Avanços. In: Albuquerque, U.P., Lucena, R.F.P., Cunha, L.V.F.C. (Eds.), Métodos e Técnicas na Pesquisa Etnobiológica e Etnoecológica, vol. 1. NUPPEA.
- Almeida, C.F.C.B.R., Albuquerque, U.P., 2002. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste Brasil): Um estudo de Caso. *Interciência* 27 (6), 276–285.
- Alves, R.R.N., Rosa, I.M.L., 2005. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3 (14), Acesso em: 15 fev. 2014 (<http://www.ethnobiomed.com/content/3/1/14>).
- Amiri, M.S., Joharchi, M.R., 2013. Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. *Avicenna J. Phytomed.* 3 (3), 254–271.
- Amoroso, M.C.M., Viertler, R.B., 2010. A abordagem qualitativa na coleta e análise de dados em etnobiologia e etnologia. In: Albuquerque, U.P., Lucena, R.F.P., Cunha, L.V.F.C. (Eds.), Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. NUPPEA, Recife, pp. 69–70.
- Amoroso, M.C.M., 1996. Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi, L.C. (Ed.), Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. UNESP, São Paulo, pp. 47–68.
- Arnous, A.H., Santos, A.S., Beinier, R.P.C., 2005. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Rev. espaç,para a Saúde* 6 (2), 1–6.
- Augusto, L.G.S., Góes, M.L., 2007. Compreensões integradas para a vigilância da saúde em ambiente de floresta: o caso da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 23, 549–558.
- Baldauf, C., Kubo, R.R., Silva, F., Irgang, B.E., 2009. “Ferveu, queimou o ser da erva”: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* 11 (3), 282–291.
- Baldauf, S.L., 2003. The deep roots of eukaryotes. *Science* 300, 1703–1706.
- Begossi, A., Hanazaki, N., Tamashiro, J.Y., 2002. Medicinal plants and the Atlantic Forest (Brazil): knowledge, use and conservation. *Hum. Ecol.* 30, 281–299.
- Bennett, B.C., Prance, G.T., 2000. Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of Northern South America. *Econ. Bot.* 54, 90–102.
- Bitu, V., Botelho, M.A., Costa, J.G.M., da, Rodrigues, FFG., Veras, HNH., Martins, K.T., Lyra, A., Coluchi, G.G., Ruela, R.S., Queiroz, D.B., de Souza Siqueira, J., Quintans-Junior, L.J., 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippia gracilllis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22 (1), 69–75.
- Borba, A.M., Macêdo, M., 2006. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães. *Acta Bot. Bras.* 20 (20), 771–782.
- Botrel, R.T., Rodrigues, L.A., Gomes, L.J., Carvalho, D.A., Fontes, M.A.L., 2006. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 20, 143–156.
- Cadena-González, A.L., Sorensen, M., Theilade, I., 2013. Use and valuation of native and introduced medicinal plant species in Campo Hermoso and Zetaquira, Boyacá, Colombia. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 9, 23.

- 1 Chaves, E.M.F., Barros, R.F.M., 2012. Diversidade e uso de recursos medicinais do  
2 carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Pl.*  
3 *Med., Botucatu* 14 (3), 476–486.
- 4 Chivian, E., 2002. Biodiversity: Its Importance to Human Health Available. Center  
5 for Health and the Global Environment, Harvard Medical School, Boston, US  
6 ([www.med.harvard.edu/chge/Biodiversity\\_v2\\_screen.pdf](http://www.med.harvard.edu/chge/Biodiversity_v2_screen.pdf)). Acesso em: 16 de  
7 set. 2013.
- 8 Costa, J.G.M., Angelico, E.C., Rodrigues, F.F.G., Mota, M.L., Silva, M.R., Santos, N.K.A.,  
9 Lemos, T.L.G., 2005. Chemical-biological study of the essential oils of *Hyptis*  
10 *martiusii*, *Lippia sidoides* and *Zygium aromaticum* against larvae of *Aedes*  
11 *aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (4), 304–309.
- 12 Ferreira, F.S., Albuquerque, U.P., Coutinho, H.D.M., Almeida, Wde O., Alves, R.R.N.,  
13 2012. The trade in medicinal animals in Northeastern Brazil. *Evid. Based*  
14 *Complement. Altern. Med.* , <http://dx.doi.org/10.1155/2012/12638>.
- 15 Funari, C.S., Ferro, V.O., 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e  
16 oportunidade. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (2), 178–182.
- 17 Gonçalves, C.E.P., Araldid, D., Panatieri, R.B., Rocha, J.B.T., Zeni, G., 2005. Antinoci-  
18 ceptive properties of acetylenic thiophene and furan derivatives. Evidence for  
19 the mechanism of association. *Life Sci.* 76 (19), 2211–2234.
- 20 Heinrich, M., 2000. Ethnobotany and its role in drug development. *Phytother. Res.*  
21 14 (7), 479–488.
- 22 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. 2010. IBGE Cidades. [www.  
23 ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1). Acesso em 28 de abr. de 2014.
- 24 Khan, S.M., Page, S., Ahmad, H., Shaheen, H., Ullah, Z., Ahmad, M., Harper, D.M.,  
25 2013. Medicinal flora and ethnoecological knowledge in the Naran Valley,  
26 Western Himalaya, Pakistan. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 9, 4.
- 27 Ladio, A.H., Lozada, M., 2004. Os padrões de uso e conhecimento de plantas  
28 silvestres comestíveis em ambientes ecológicos distintos: um estudo de caso de  
29 uma comunidade Mapuche do noroeste da Patagônia. *Biodivers. Conserv.* 13  
30 (6), 1153–1173.
- 31 Lanini, J., Duarte-Almeida, J.M., Nappo, S., Carlini, E.A., 2009. "Natural and therefore  
32 free of risks" – adverse effects, poisonings and other problems related to  
33 medicinal herbs by "raizeiros" in Diadema/SP. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19 (1A),  
34 122–129.
- 35 Leitão, F., Fonseca-Kruel, V.S., Silva, I.M., Reinert, F., 2009. Urban ethnobotany in  
36 Petrópolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brazil). *Rev. Bras. Farmacogn.* 19  
37 (1), 333–342.
- 38 Lozada, M., Ladio, A., Weigandt, M., 2006. Cultural transmission of ethnobotanical  
39 knowledge in rural community of Northeastern Patagonia, Argentina. *Econ. Bot.*  
40 60 (4), 374–385.
- 41 Lulekal, E., Asfaw, Z., Kelbessa, E., Van Damme, P., 2013. Ethnomedicinal study of  
42 plants used for human ailments in Ankober District, North Shewa Zone,  
43 Amhara Region. *Ethioph. J. Ethnobiol. Ethnomed.* (accessed 28.02.14) ([http://  
44 www.ethnobiomed.com/content/9/1/63](http://www.ethnobiomed.com/content/9/1/63)).
- 45 Luziatelli, G., Sorensen, M., Theilade, L., Molgaard, P., 2010. Asháninka medicinal  
46 plants: a case study from the native community of Bajo Quimiri, Junín, Peru. *J.*  
47 *Ethnobiol. Ethnomed.* 6, 21 (accessed 12.03.14) ([http://www.ethnobiomed.com/  
49 content/6/1/21](http://www.ethnobiomed.com/<br/>48 content/6/1/21)).
- 50 Macía, M.J., 2004. Multiplicity in palm uses by the Huaorani of Amazonian Ecuador.  
51 *Bot. J. Linn. Soc.* 144 (2), 149–159.
- 52 Macía, M.J., García, E., Vidaurre, P.J., 2005. An ethnobotanical survey of medicinal  
53 plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J.*  
54 *Ethnopharmacol.* 97, 337–350.
- 55 Maioli-Azevedo, V., Fonseca-Kruel, V.S., 2007. Plantas medicinais e ritualísticas  
56 vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de  
57 caso nas zonas Norte e Sul. *Acta Bot. Bras.* 21, 263–275.
- 58 Mati, E., de Boer, H., 2010. Contemporary Knowledge of dye plant species and natural  
59 dye use in Kurdish autonomous Region, Iraq. *Econ. Bot.* 64 (2), 137–148.
- 60 Medeiros, M.F.T., Fonseca, V.S., Andreato, R.H.P., 2003. Plantas medicinais e seus  
61 usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ. *Acta Bot. Bras.*  
62 18 (2), 391–399.
- 63 Melo, J.O., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2009. Native medicinal plants  
64 commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environ. Monit. Assess.*  
65 156, 567–580.
- 66 Monteiro, J.M., Araujo, E.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2010. Local markets  
67 and medicinal plant commerce: a review with emphasis on Brazil. *Econ. Bot.*  
68 64, 4.
- 69 Moreira, R. de C.T., 2002. Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas  
70 Medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Farm. Bonaer.* 0326-  
71 238321 (3), 205–211.
- 72 Mori, L.A., Silva, L.A.M., Lisboa, G., Coradin, L., 1989. Manual de manejo do herbário  
73 fanerogâmico. Centro de Pesquisa do Cacau, Ilhéus, p. 104.
- 74 Negrelle, R.R.B., Tomazzoni, M.I., Ceccon, M.F., Valente, T.P., 2007. Estudo etno-  
75 botânico junto à Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes:  
76 subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica  
77 de Saúde do Município de Cascavel (Paraná). *Rev. Bras. Plantas Med.* 9 (3), 6–22.
- 78 Oliveira, G.L., Oliveira, A.F.M. de, Andrade, L. de H.C., 2010. Plantas medicinais  
79 utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. *Acta Bot.*  
80 *Bras.* 24 (2), 571–577.
- 81 Oliveira, R.L.C., 2012. Etnobotânica e plantas medicinais: estratégias de conser-  
82 vação. *Rev. Biol. Ciênc. Terra* 10 (2), 76–82.
- 83 Omena, MLRA., 2007. Ensaio Etnofarmacológico de espécies vegetais com ação no  
84 Sistema Nervoso Central, Originárias do Bioma Caatinga. *Saúde Ambiente Rev.* 2  
85 (2), 92–117.
- 86 Pereira, E., Queiroz, C., Pereira, H.M., Vicente, L., 2005. Ecosystem services and  
87 human well-being: a participatory study in a mountain community in Portugal.  
88 *Ecol. Soc.* 10 (2), 231–238.
- 89 Pinto, A.A.C. da, Maduro, C.B., 2003. Produtos e subprodutos da medicina popular  
90 comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. *Acta Amaz.* 33 (2), 281–290.
- 91 Proença, C.E.B., Silva, C.S.P., 2008. Uso e disponibilidade de recursos medicinais no  
92 município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 22 (2), 48–492.
- 93 Ribeiro, D.A., Oliveira, L.G., de Macêdo, D.G., de Menezes, I.R., de Costa, J.G., da Silva,  
94 M.A., da Lacerda, S.R., de A. Souza, M.M., 2014. Promising medicinal plants for  
95 bioprospection in the Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *J.*  
96 *Ethnopharmacol.* 1551522–1533 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.042>.
- 97 Ribeiro, D.A., Macêdo, D.G., Oliveira, L.G.S., Saraiva, M.E., Oliveira, S.F., Souza, M.M.  
98 A., Menezes, I.R.A., 2014a. Therapeutic potential and use of medicinal plants in  
99 an area of the Caatinga in the state of Ceará, Northeastern Brazil. *Rev. Bras.*  
100 *Plantas Med.* 16 (4), 912–930.
- 101 Santos, E.B., Dantas, G.S., Santos, H.B., Diniz, M.F.F.M., Sampaio, F.C., 2009. Etno-  
102 botanical studies of medicinal plants for oral conditions in the municipality of  
103 João Pessoa, Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19, 321–324.
- 104 Shanley, P., Luz, L., 2003. The impacts of forest degradation on medicinal plant use  
105 and implications for health care in Eastern Amazonia. *BioScience* 53 (6),  
573–584.
- Sharma, V., Sarkar, I.N., 2012. Bioinformatics opportunities for identification and  
study of medicinal plants. *Brief. Bioinform.* 14 (2), 238–250.
- Silva, A.J.R., Andrade, L.H.C., 2005. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da  
relação entre comunidades e vegetação na Zona do litoral – Mata do Estado de  
Pernambuco. *Acta Bot. Bras.* 19 (1), 85–97.
- Silva, M.S., Peixoto, A.L., 2009. Abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. and *Eugenia*  
*rotundifolia* Casar.) commercialized in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Farm-*  
*acogn.* 19 (1), 325–332.
- Souza, R.K.D., da Silva, M.A.P., de Menezes, I.R.A., Ribeiro, D.A., Bezerra, L.R.,  
de Almeida Souza, M.M., 2014. Ethnopharmacology of medicinal plants of  
Carrasco, Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 157, 99–104.
- Souza, L.F., 2007. Recursos vegetais usados na medicina tradicional do Cerrado  
(comunidade de Baús, Acorizal, MT, Brasil). *Rev. Bras. Plantas Med.* 9 (4), 44–54.
- Tresvenzol, L.M., Paula, J.R., Ricardo, A.F., Ferreira, H.D., Zatta, D.T., 2006. Estudo  
Sobre o Comércio Informal de Plantas Medicinais em Goiânia e Cidades  
Vizinhas. *Rev. Eletrônica Farm.* 3 (1), 23–28.
- Trotter, R., Logan, M., 1986. Informant consensus: a new approach for identifying  
potentially effective medicinal plants. *Indigenous medicine and diet: biobeha-*  
*vioural approaches*, New York. *J. Ethnopharmacol.*, 91–112.
- Ustulin, M., Figueiredo, B.B., Tremea, C., Pott, A., Pott, V.J., Bueno, N.R., Castilho, R.O.,  
2009. Commercialized medicinal plants in the Mercado Municipal of Campo  
Grande-MS. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19 (3), 805–813.

## **4.2 CHEMICAL COMPOSITION, ANTIPARASITIC ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples**

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu<sup>a</sup>, Edinaldo Fagner Ferreira Matias<sup>a</sup>, Maria Celeste Vega Gomez<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>a</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a\*</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>a</sup>

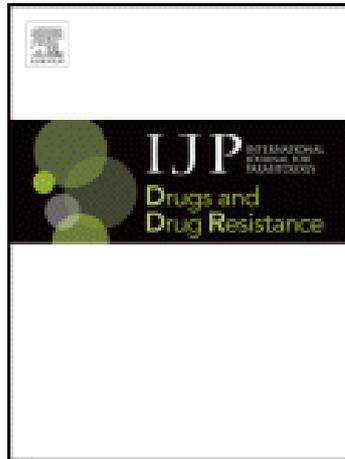
<sup>a</sup> Faculdade Leão Sampaio, Unidade Saúde, Juazeiro do Norte, Brazil

\* Autor para correspondência: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Av. Cel Antonio Luiz, 1161, CEP: 63105-000, Crato, CE, Brazil. Tel.: +55 88831021212; fax: +55 8831021291.

Endereço de e-mail: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

**Artigo submetido ao periódico International Journal for parasitology: drugs and drug resistance**

(Normas para publicação no anexo B)



## COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E CITOTOXICIDADE DA *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu<sup>a</sup>, Edinaldo Fagner Ferreira Matias<sup>a</sup>, Maria Celeste Vega Gomez<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>a</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a\*</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculdade Leão Sampaio, Unidade Saúde, Juazeiro do Norte, Brazil

\* Autor para correspondência: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Av. Cel Antonio Luiz, 1161, CEP: 63105-000, Crato, CE, Brazil. Tel.: +55 88831021212; fax: +55 8831021291.

Endereço de e-mail: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

**Resumo:** A tripanossomíase e a leishmaniose são doenças que apresentam altos índices de morbimortalidade em países em desenvolvimento, sendo relevante a realização de pesquisas que busquem novos agentes terapêuticos a partir de recursos da biodiversidade. A *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples é uma espécie botânica cujo uso etnomedicinal está associado às propriedades antiparasitária e depurativa do sangue; produz metabólitos secundários que podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos. Esse estudo tem como objetivos realizar a investigação fitoquímica da *Operculina hamiltonii*, avaliar o seu potencial antiparasitário frente ao *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum*, bem como a sua atividade citotóxica. A infusão liofilizada obtida do tubérculo da planta teve os seus compostos identificados por HPLC e foram testadas *in vitro* as atividades anti-epimastigota, antipromastigota e citotóxica. Destaca-se a atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi* que foi significativa na concentração de 62,5 µg/mL e a citotoxicidade foi moderada. Os resultados obtidos demonstram uma elevada atividade leishmanicida e tripanossomicida, no entanto o produto natural demonstra citotoxicidade significativa em concentrações iguais ou acima de 250 µg/mL, o que nos permite sugerir que sejam realizados estudos para avaliar a sua atividade anticancerígena.

**Palavras-chave:** *Operculina hamiltonii*; *Trypanosoma*; *Leishmania*; atividade antiepimastigota e epimastigota; citotoxicidade.

### 1 Introdução

As doenças infecciosas e parasitárias permanecem negligenciadas nos países em desenvolvimento apresentando dados epidemiológicos de morbimortalidade preocupantes que

dizem respeito a doenças como tripanossomíase e leishmaniose, dentre outras patologias prevalentes; mesmo sendo nítidos esses indicadores, ainda são insuficientes os investimentos em pesquisas de medicamentos e são precárias as ações que visam o seu controle em muitos países (Lemos e Lima, 2002). É inegável o impacto social dessas doenças, pois a sua gênese está também relacionada às condições de moradia, alimentação e higiene às quais a população está submetida (Paes e Silva, 1999).

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas e acomete aproximadamente oito milhões de pessoas nas Américas. Já a leishmaniose tem como agentes etiológicos protozoários do gênero *Leishmania*, sendo a leishmaniose tegumentar americana causada pela espécie *L. brasiliensis* e a leishmaniose visceral americana pela espécie *L. infantum* (Leon et al., 2015; Leça Júnio et al., 2015).

Em regiões geográficas onde essas patologias são prevalentes, geralmente as comunidades locais conhecem um vasto repertório de plantas que podem ser usadas terapêuticamente (Ibrahim et al., 2014), impulsionando estudos de natureza bioprospectiva com o objetivo de descobrir substâncias oriundas do metabolismo vegetal que possam apresentar atividade antiparasitária (Ribeiro et al., 2015; Anosa et al., 2014; Kpoviessi et al., 2014).

A Convolvulaceae é uma grande família botânica de distribuição em todo o mundo, apresentando uma rica diversidade de características morfológicas e habitats ecológicos (Stefanović et al., 2003); é composta por 55 gêneros e 1.930 espécies (Judd et al., 1999), cuja distribuição é predominante em regiões tropicais e subtropicais, sendo que no Brasil as espécies concentram-se no cerrado e na caatinga e são utilizadas como recurso alimentar e terapêutico pela população (Heywood, 1993). Estudos associam a essa família metabólitos secundários como ergolínicos, pirrolidinas, tropanos, alcalóides, glicosídeos e amidas, além dos flavonoides (Schimming et al., 2005; Mann et al., 1999). Espécies do gênero *Operculina* (Convolvulaceae) são citadas em estudo etnobotânicos como recurso terapêutico no tratamento de doenças parasitárias (Carvalho et al., 2013). A espécie *Operculina hamiltonii* é uma trepadeira de aspecto ornamental cujos nomes vernaculares variam de acordo com a região, sendo chamada de batata de purga, jalapa-brasileira, jalapa, raiz-do-jeticucu e mecoacã (Pereda-Miranda et al., 2003). Seu uso etnomedicinal está associado às propriedades antiparasitária e depurativa do sangue, que lhes são atribuídas pelas populações locais (Silva et al., 2010; Rodrigues et al., 2007; Martins et al., 2000).

Alguns estudos analisaram a atividade anti-helmíntica da *O. hamiltonii*, mas não encontramos quaisquer trabalhos que examinaram sua atividade contra outros tipos de

parasitas. Assim, verificamos a hipótese de que eles também podem ser eficazes no tratamento de outras doenças parasitárias, como a tripanossomíase e leishmaniose, uma vez que estas doenças parasitárias são muito prevalentes nos trópicos. Segundo Braz et al., (2014) pacientes imuno comprometidos são mais afetados por essas doenças e requerem uma atenção especial quanto ao seu diagnóstico e tratamento, que deve ser feito precocemente para evitar complicações mais graves.

Esse estudo tem como objetivos: realizar a investigação química da infusão liofilizada obtida da *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, avaliar o seu potencial antiparasitário frente a *Trypanossoma cruzi*, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum*, bem como a sua atividade citotóxica.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Material vegetal

A espécie seca do material vegetal foi depositada no Herbário Dárdaro Andrade Lima do Departamento de Biologia da Universidade Regional do Cariri sob o número 4022.

### 2.2 Preparo do pó liofilizado

O tubérculo da *Operculina hamiltonii* foi triturado e submetido à infusão, seguindo o protocolo da Farmacopéia Brasileira (2010) quanto à proporção de material vegetal e quantidade de água bem como ao tempo de abafamento. Posteriormente, a infusão congelada foi levada à refrigeração e posteriormente submetida ao processo de liofilização.

### 2.3 Linhagens celulares utilizadas

Para os estudos *in vitro* com *T. cruzi*, foi usado o clone CL-B5 (Le Senne et al., 2002). Os parasitas foram estavelmente infectados com o gene da  $\beta$ -galactosidase (lacZ) da *Escherichia coli* que foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Comemorativo Gorgas (Panamá). As epimastigotas cresceram a 28<sup>o</sup>C em caldo de infusão de fígado (Difco, Detroit, MI) com 10% de soro fetal de bovino (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, SA, Barcelona, Espanha) e estreptomicina (Reig Jofré SA, Barcelona, Espanha) (Roldós et al., 2008), colhidas durante a fase de crescimento exponencial. A cultura de *L. brasiliensis* foi

obtida a partir do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Assunção, Paraguai - IICS. A manutenção da pressão, a forma de cultura e isolamento da forma promastigota seguiram os procedimentos descritos pelo autor Roldós et al. (2008). Os ensaios de inibição de promastigotas foram realizados utilizando a estirpe de *L. braziliensis* (MHOM / BR / 75 / M2903), cultivadas a 22<sup>o</sup>C em meio de *Drosophila* de Schneider suplementado com 20% de FBS. Para os ensaios de citotoxicidade, foi utilizada a célula de fibroblasto linhagem NCTC929 cultivadas em Meio Mínimo Essencial (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com FBS inativado por calor (10%), penicilina G (100 U / ml) e estreptomicina (100 µg / mL). As culturas foram mantidas a 37<sup>o</sup> C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade destas estirpes foi avaliada de acordo com Roldós et al. (2008), através da utilização de resazurina como um método colorimétrico.

#### 2.4 Reagentes

A resazurina sódica foi obtida a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e armazenada a 4<sup>o</sup>C protegida de luz. Uma solução de resazurina foi preparada em tampão de 1% de fosfato, pH 7, e esterilizada antes da utilização. O clorofenol vermelho-b-D-galactopiranosido (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em 0,9% de Triton X- 100 (pH 7,4). A penicilina G (Ern, SA, Barcelona, Espanha), estreptomicina (Reig Jofré SA, Barcelona, Espanha) e dimetilsulfato também foram utilizados.

#### 2.5 Ensaio de susceptibilidade epimastigota *in vitro*

O ensaio de rastreio foi realizado em microplacas de 96 poços com as culturas que não atingiram a fase estacionária (Vega et al., 2005). As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram semeadas a  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  em 200 µL de meio de cultura de caldo de fígado. As placas foram então incubadas com as drogas em concentrações variáveis entre 0,1 e 50 µg / mL) a 28<sup>o</sup>C durante 72 horas, ao mesmo tempo em que 50 µL de uma solução CPRG foi adicionada para dar uma concentração final de 200 µM. As placas foram incubadas a 37<sup>o</sup>C durante um tempo adicional de 6 horas e foram, em seguida, avaliadas por um espectrômetro a 595 nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, cada uma das concentrações foi testada em triplicata para cada experimento. A eficácia do composto foi estimada pelo cálculo dos percentuais anti-epimastigota.

## 2.6 Ensaio leishmanicida in vitro

Esse ensaio foi efetuado utilizando uma modificação do método anteriormente descrito. As culturas de promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. infantum* foram cultivadas a uma concentração de  $10^6$  células / mL e depois transferidas para o teste. O composto foi dissolvido em DMSO nas concentrações a serem testadas e foram transferidos para microplacas. Cada teste foi realizado em triplicata. A atividade do composto foi avaliada após 72 h por contagem direta das células após diluições em série e em relação com um controle não tratado.

## 2.7 Ensaio citotóxicos

Os fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em microplacas de 96 poços a uma definitiva concentração de  $3 \times 10^4$  células / poço. As células foram cultivadas a  $37^{\circ}\text{C}$  numa atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Depois disso, o meio de cultura foi removido e o composto foi adicionado a 200  $\mu\text{L}$ , e realizada uma nova cultura por 24 h. Após esta incubação, 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de 2 mM de resazurina foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante 3 horas e a redução da resazurina foi mensurada usando dupla absorção de comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (em branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

## 2.8 Química, aparatos e procedimentos gerais

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido caféico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A quercetina e a rutina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A análise da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-DAD) foi feita com o sistema de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão), Destaque Auto Sampler (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT alternativo Bombas ligado ao DGU 20A5 com integrador CBM 20A, UV-VIS detector DAD (diodo) SPD-M20A e Software LC solução 1,22 SP1.

## 2.9 Quantificação do composto por HPLC-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas sob as condições de gradiente usando coluna de Phenomenex C18 (4,6 mm x 250 mm) embaladas com partículas de 5  $\mu\text{M}$  de

diâmetro; a fase móvel foi água contendo 2% de ácido fórmico (A) e metanol (B), e a composição gradiente foi: 5% de (B) durante 2 min; 25% (B), até 10 min; 40, 50, 60, 70 e 80% (B) a cada 10 minutos; seguindo o método descrito por Sousa et al. (2015) com ligeiras modificações. A IOh e a fase móvel foram filtradas através de membrana de 0,45 5 µM (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultra-sons antes da utilização. A taxa de fluxo foi de 0,7 mL / min e o volume de injeção foi de 40 5 µL.. As soluções estoque de referência de normalização foram preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,030-0,500 mg / mL para o ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico e ácido clorogénico, e 0,025-,300 mg / mL para a quercetina, rutina e luteolina. Quantificações foram realizadas por integração dos picos utilizando o método do padrão externo, a 254 nm para o ácido gálico e ácido elágico; 327 nm para ácidos clorogênicos e caféico, e 366 para a quercetina, rutina e luteolina. Os picos foram confirmados por cromatografia de comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). Curva de calibração para o ácido gálico:  $Y = 13179x + 1.263,8$  ( $r = 0,9998$ ); ácido clorogênico:  $Y = 12594x + 1.267,9$  ( $r = 0,9995$ ); ácido caféico:  $Y = 11983x + 1.327,6$  ( $r = 0,9999$ ); ácido elágico:  $Y = 13547x + 1.308,1$  ( $r = 0,9997$ ); quercetina:  $Y = 12564x + 1194,7$  ( $r = 0,9996$ ); rutina:  $Y = 11839x + 1263,2$  ( $r = 0,9999$ ) e luteolina:  $Y = 13287x + 1285,9$  ( $r = 0,9998$ ). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

## 2.10 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

LOD e LOQ foram calculados com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, conforme definido por Boligon et al. (2015). LOD e LOQ foram calculados como  $3,3$  e  $10 \sigma / S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta e  $S$  é o declive da curva de calibração.

## 2.11 Análise estatística

As diferenças entre grupos no HPLC foram analisadas pelo modelo de análise de variância e teste de Tukey. O nível de significância para essas análises foi de  $p < 0.05$ . As análises foram feitas utilizando o software R versão 3.1.1 (R Core, 2014).

### 3 Resultados e Discussão

Uma grande diversidade de metabólitos é produzida pelas espécies da família Convolvulaceae, entre os quais se destacam os compostos fenólicos e as glicorresinas, além de outros metabólitos secundários de baixo peso molecular contendo grupos nitrogenados como os alcalóides e os flavonóides, compostos que podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos (Lobo et al., 2010; Jerba et al., 2004). Foi obtido o perfil de HPLC da IOh (infusão de *Operculina hamiltonii*) e a sua análise está demonstrada na Fig. 1. Além de outros minoritários, foram observados os seguintes compostos: ácido gálico (tempo de retenção, tR = 10,15 min, pico 1), ácido clorogênico (tR = 18,63 min, pico 2), ácido caféico (tR = 22,07 min, pico 3), ácido elágico (tR = 30,26 min, pico 4), rutina (tR = 38,11 min, pico 5), quercetina (tR = 44,76 min, pico 6) e luteolina (tR = 47,19 min, pico 7). Os ácidos fenólicos têm sido descritos como antioxidantes, antimutagênicos e antimicrobianos (Proestos et al., 2006; Kim et al., 2006), enquanto os flavonóides como a quercetina, são reconhecidos como agentes antioxidantes, anticarcinogênico e pela proteção que exercem em órgãos como os rins, o fígado e o aparelho cardiovascular (Behling et al., 2004).

A atividade antiparasitária da IOh está representada na Tabela 2, onde podem ser observados resultados clínicos relevantes em todas as concentrações frente ao *T. cruzi*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*. Na literatura pertinente, não constam outros estudos que avaliem a atividade tripanossomicida e leishmanicida dessa espécie. Lobo et al. (2010) com base no uso etnofarmacológico dessa espécie vegetal, foi estudada a sua atividade antibacteriana demonstrando resultados insatisfatórios frente a linhagens bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococos aureus* e *Escherichia coli*; esses autores especularam que o fato talvez esteja vinculado a teores baixos de taninos no tubérculo da batata de purga. Outros estudos apontam para um potencial anti-helmíntico significativo da *Operculina hamiltonii*, que se mostra eficaz no controle de nematóides gastrointestinais de caprinos na região do semiárido brasileiro sendo amplamente utilizada em programas alternativos de controle parasitário (Silva et al., 2010).

Relacionando a atividade antiparasitária com a citotoxicidade apresentada, observa-se que os melhores resultados do produto natural são apresentados frente ao *T. cruzi* na concentração de 62,5 µg/mL com boa atividade antiparasitária (75,84%) e citotoxicidade moderada (54,73%). Esse resultado é relevante devido a grande incidência de tripanossomíase

no continente americano bem como a existência de linhagens de *T. cruzi* naturalmente resistentes a drogas utilizadas convencionalmente, fato que justifica a baixa porcentagem de cura da doença entre os pacientes tratados (Who, 2003; Murta et al., 2008).

A IOh também apresentou eficácia contra as espécies de *Leishmania* estudadas em concentrações maiores ou igual a 250 µg/mL, no entanto a elevada citotoxicidade nessas concentrações é significativa. A *L. brasiliensis* foi mais sensível à ação do produto natural do que a *L. infantum* em todas as concentrações.

#### **4 Conclusão**

O produto natural testado apresentou atividade antiparasitária contra *T. cruzi* em todas as concentrações testadas, e frente às *L. brasiliensis* e *L. infantum* em concentrações iguais ou acima de 250 µg/mL. A citotoxicidade da IOh foi elevada nas concentrações iguais ou acima de 250 µg/mL o que nos permite considerar que os melhores resultados estão relacionados ao *T. cruzi* onde o produto é eficaz nas concentrações em que a citotoxicidade é moderada. Nós sugerimos a partir da atividade citotóxica observada que novos estudos sejam realizados para investigar a atividade anticancerígena desse produto natural.

#### **Agradecimentos**

aos presidentes da CAPES, CNPq e Funcap para o auxílio financeiro dado à primeira autora. Todos os autores agradecem a colaboração da Prof. Sonia Izabel Romero de Souza DA Faculdade Leão Sampaio.

#### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

#### **Referencias**

Anosa, G. N.; Udegbumam, R. I.; Okoro, J. O.; Okoroafor, O. N., 2014. In vivo antimalarial activities of *Enantia polycarpa* stem bark against *Plasmodium berghei* berghei in mice. *J. Ethnopharmacol*, 28, 531-534.

Behling, E. B.; Sendão, M. C.; Francescato, H. D. C.; Antunes, L. M. G.; Bianchi, M. de L. P., 2004. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 15, 3, 285-292.

Braz, A. S.; Andrade, C. A.; Mota, L. M.; Lima, C. M., 2014. Recommendations from the Brazilian Society of Rheumatology on the diagnosis and treatment of intestinal parasitic infections in patients with autoimmune rheumatic disorders. *Rev Bras Reumatol.*, 19, 14.

Farmacopéia Brasileira, 2010. 5ed. Brasília: Anvisa, pp. 546.

Heywood, V. H., 1993. Flowering Plants of the world. Oxford: Oxford University Press. p. 335.

Ibrahim, M. A.; Mohammed, A.; Isah, M. B.; Aliyu, A. B., 2014. Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: a review update. *J. Ethnopharmacol.*, 1, 26-54. doi: 10.1016/j.jep.2014.04.012

Jerba, V. F.; Medeiros, S. R.; Fernandes, C. D., 2004. Forrageiras: principais fatores de antiquidade. Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, 38p.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F., 1999. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sunderland, Sinauer Associates, 462p.

Kim, D. O.; Jeong, S. W.; Lee, C. Y., 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, Kidlington, 81, 231-326.

Kpoviessi, K. B. G.; Kpoviessi, S. D.; Ladekan, Y. E.; Gbaguidi, F.; Frédérick, M.; Moudachirou, M.; Quetin-Leclercq, J.; Accrombessi, G. C.; Bero, J., 2014. In vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activities of crude extracts and essential oils of *Ocimum gratissimum* Linn from Benin and influence of vegetative stage. *J Ethnopharmacol.*, 3, 17-23. doi: 10.1016/j.jep.2014.07.014.

Le Senne, A.; Muelas-Serrano, S.; Fernandez-Portillo, C.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A.,

2002. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97, 1101– 1105.

Leça Júnior, N. F.; Guedes, P. E. B.; Santana, L. N.; Almeida, V. dos A.; Carvalho, F. S.; Albuquerque, G. R.; Wenceslau, A. A.; Munhoz, A. D.; Silva, F. L., 2015. Epidemiology of canine leishmaniosis in southern Bahia, Brazil. *Acta Tropica*, 148, p. 115-119.

Lemos, J. C.; Lima, S. C., 2002. A Geografia Médica e as doenças infecto-parasitárias. *R On Line Cam. de Geo.*, Uberlândia, 3, 6.

León, C. M.; Hernández, C.; Montilla, M.; Ramírez, J. D., 2015. Retrospective distribution of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 4, 28.

Lôbo, K. M. S.; Athayde, A. C. R.; Silva, A. M. A.; Rodrigues, F. F. G.; Lôbo, I. S.; Bezerra, D. A. C.; Costa, J. G. M., 2010. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiáridoparaibano. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, 12, 2, p. 227-233.

Mann, P.; Tofern, B.; Kaloga, M.; Eich, E., 1999. Flavonoid sulfates from the *Convolvulaceae*. *Phytochemistry*, 50, 267-271.

Martins, E. R.; Castro, D. M. de; Castellani, D. C.; Dias, J. E., 2000. *Plantas medicinais*. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, p. 220.

Murta, S. M. F.; Nogueira, F. B.; Santos, P. F. dos; Campos, F. M. F.; Volpe, C.; Liarte, D. B.; Nirdé, P.; Probst, C. M.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S.; Romanha' A. J., 2008. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Tropica*, 107, 1, 59-65.

Paes, N. A.; Silva, L. A. A., 1999. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil: uma década de transição. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 6, 2.

Pereda-Miranda, R.; Taketa, A.T.C.; Villatorovera, R.A., 2003. Alucinógenos naturais: etnobotânica e psicofarmacologia. In: Simões, C. M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao*

medicamento. 5ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 919-958.

Proestos, C.; Boziaris I.S.; Nychas, G.J.E.; Komaitis, M., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 95, 4, 664-671.

R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ribeiro, T. G.; Nascimento, A. M.; Henriques, B. O.; Chávez-Fumagalli, M A.; França, J. R.; Duarte, M. C.; Lage, P. S.; Andrade, P. H.; Lage, D. P.; Rodrigues, L. B.; Costa, L. E.; Martins, V. T.; Faraco, A. A.; Coelho, E. A.; Castilho, R.

O., 2015. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds. *J. Ethnopharmacol.*, 13, 165, 238-242.

Rodrigues, A. B.; Athayde, A. C. R.; Rodrigues, O. G.; Silva, W. W.; Faria, E. B., 2007. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesq. Vet. Bras.*, 27, 4, 162-166.

Roldós, V.; Nakayama, H.; Rolon, M.; Montero, A. T.; Trucco, F.; Torres, S.; Vega, C.; Ponce, Y. M.; Heguaburu, V.; Yalluff, G.; Gomes-Barrio, A.; Sanabria, L.; Ferreira, M. E. de; Arias, A. R.; Pandolfi, E., 2008. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. *Eur. J. Med. Chem.*, 43, 1797– 1807.

Schimming, T.; Jenett-Siems, K.; Mann, P.; Tofern-Reblin, B.; Milson, J.; Johnson, W.; Deroin, T.; Austin, D. F.; Eich, E., 2005. Calystegines as chemotaxonomic markers in the *Convolvulaceae*. *Phytochemistry*, 66, 469-480.

Silva, C. F.; Athayde, A. C. R.; Silva, W. W.; Rodrigues, O. G.; Vilela, V. L. R.; Marinho, P. V. T., 2010. *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples in natura sobre nematóides gastrintestinais de caprinos, naturalmente infectados, em clima semi-árido. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 12, 4, 466-471.

Smith, S. D.; Miller, R. E.; Otto, S. P.; Otto, R. G.; Fitzjohn, M. D., 2010. The Effects Of Flower Color Transitions On Diversification Rates In Morning Glories (Ipomoea Subg. Quamoclit, Convolvulaceae). Proceedings Of The Darwin 2000 Beijing International Conference, 07, 186 – 210.

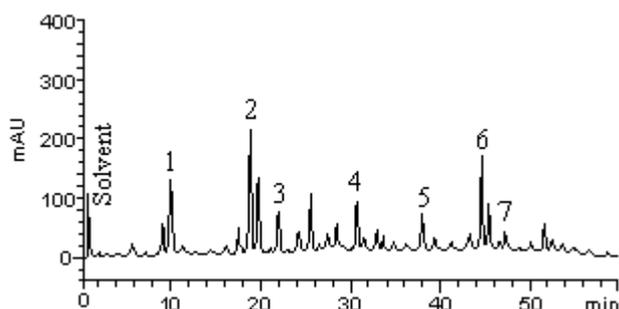
Stefanović, S.; Austin, D. F.; Olmstead, R. G., 2003. Classification of Convolvulaceae: A phylogenetic approach. Syst. Bot., 28, 4, 797-806.

Valença, L. C.; D'angelis, C.; Silva, M., 2013. Investigação de plantas utilizadas com fins terapêuticos por algumas comunidades da região de Montes Claros (MG). IFB/ Brasília Rev. Mult. fip-moc., 11, 16.

Vega, M. C.; Rolón, M.; Montero-Torres, A.; Fonseca-Berzal, C.; Escario, J. A., 2005. Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives 1, 2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug. Eur. J. Med. Chem., 58, 214-227.

World Health Organization, 2002. Report on infectious diseases. Geneva: WHO.

### Material adicional



**Figura 1** – Representação do perfil de cromatografia líquida de alta eficiência da infusão de *Operculina hamiltonii*. Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido caféico (3 pico), ácido elágico (pico 4), quercetina (pico 5), quercetina (pico 6) e luteolina (pico 7).

**Tabela 1** – Componentes da infusão de *Operculina hamiltonii*

Componentes	IOh	LOD	LOQ
	mg/g	µg/mL	µg/mL
Ácido gálico	5,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,013	0,043
Ácido clorogênico	8,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,027	0,091
Ácido caféico	2,83 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,011	0,036
Ácido elágico	3,16 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,009	0,030
Rutina	2,79 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,024	0,079
Quercetina	6,45 ± 0,04 <sup>f</sup>	0,018	0,060
Luteolina	0,91 ± 0,01 <sup>g</sup>	0,015	0,048

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ .

**Tabela 2** – Atividade antiparasitária e citotoxicidade de infusão de *Operculina hamiltonii*

Concentrações (µg/mL)	Atividade antiparasitária			(%C)
	% ATc	% ALb	% ALi	
<b>1000</b>	86,86	100,00	86,75	94,92
<b>500</b>	85,32	91,34	82,46	94,84
<b>250</b>	79,07	70,98	22,99	93,80
<b>125</b>	77,23	0,00	0,00	55,66
<b>62,5</b>	75,84	0,00	0,00	54,73

%C: percentual de fibroblastos mortos; %ATc: percentual de *T. cruzi* mortos; % ALb: percentual de *L. braziliensis* mortos; %Ali: percentual *L. infantum* mortos.

### **4.3 PRODUTOS NATURAIS DERIVADOS DA *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples E DA *Cephaelis ipecacuanha* Rich. COMO MODIFICADORES DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMINOGLICOSÍDEOS E $\beta$ -LACTÂMICOS**

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu <sup>a</sup>, Edinaldo Fagner Ferreira Matias <sup>b</sup>, José J. S. Aguiar <sup>b</sup>, Victória R.A. Carvalho <sup>b</sup>, Aline Augusti Boligon <sup>b</sup>, Margareth Linde Athayde <sup>b</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>a\*</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM), Rua Coronel Antonio Luiz s/n, Pimenta, Crato CEP 63106-100, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup> Faculdade Leão Sampaio, Unidade Saúde, Juazeiro do Norte, Brazil

\* Corresponding author at: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Av. Cel Antonio Luiz, 1161, CEP: 63105-000, Crato, CE, Brazil. Tel.: +55 88831021212; fax: +55 8831021291. E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

**Artigo a ser submetido no periódico BioMed Research International**

(Normas para publicação no anexo C)



## **PRODUTOS NATURAIS DERIVADOS DA *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples E DA *Cephaelis ipecacuanha* Rich. COMO MODIFICADORES DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMINOGLICOSÍDEOS E $\beta$ -LACTÂMICOS**

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu <sup>a</sup>, Edinaldo Fagner Ferreira Matias <sup>b</sup>, José J. S. Aguiar <sup>b</sup>, Victória R.A. Carvalho <sup>b</sup>, Aline Augusti Boligon <sup>b</sup>, Margareth Linde Athayde <sup>b</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>a\*</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM), Rua Coronel Antonio Luiz s/n, Pimenta, Crato CEP 63106-100, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup> Faculdade Leão Sampaio, Unidade Saúde, Juazeiro do Norte, Brazil

\* Corresponding author at: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Av. Cel Antonio Luiz, 1161, CEP: 63105-000, Crato, CE, Brazil. Tel.: +55 88831021212; fax: +55 8831021291. E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

### **Resumo**

Esse estudo teve como objetivos, além da análise fitoquímica da infusão e do decocto derivados respectivamente da *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples e da *Cephaelis ipecacuanha* Rich., averiguar possíveis interações entre esses produtos naturais e quatro drogas antimicrobianas da classe dos aminoglicosídeos e dos  $\beta$ -lactâmicos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi detectada a concentração inibitória mínima para avaliação da atividade antimicrobiana; a determinação da atividade moduladora da resistência aos antibióticos foi feita por microdiluição utilizando a concentração subinibitória. Apesar de não ter sido observada atividade antibacteriana satisfatória, os testes de avaliação do potencial modulador demonstram resultados relevantes com sinergismo observado em várias combinações dos antibióticos com os produtos naturais.

### **1. Introdução**

A saúde pública mundial enfrenta as consequências do uso indiscriminado dos antibióticos; diversos fatores contribuem para formar um ambiente propício ao desenvolvimento pelas bactérias de mecanismos genéticos, bioquímicos e celulares que as tornem resistentes às drogas disponíveis no mercado atualmente [1]. Considerando a velocidade com que as bactérias desenvolvem resistência às drogas disponíveis, urge que surjam pesquisas voltadas para a descoberta de substâncias naturais que driblem a perda da eficácia dos antimicrobianos de uso clínico convencional. Vários estudos investigam os produtos naturais na forma de óleos essenciais, extratos vegetais, frações e metabólitos secundários isolados como possíveis modificadores da resistência bacteriana [2-7].

*Operculina hamiltonii* é uma espécie botânica da família Convolvulaceae também conhecida como batata de purga, jalapa-brasileira, jalapa, raiz-do-jeticucu e mecoacã [8]. Essa espécie é utilizada terapeuticamente no cerrado e na caatinga onde a população justifica o seu uso no tratamento de parasitoses intestinais e na desintoxicação do sangue [9-12].

*Cephaelis ipecacuanha* pertence à família botânica Rubiaceae, uma das mais representativas do cerrado brasileiro [13] e cuja importância reside no fato de suas espécies serem utilizadas pela população como recurso alimentar e terapêutico [14]. A *C. ipecacuanha* apresenta os seguintes nomes vernaculares: pepaconha, ipecacuanha e poaia; o seu uso etnofarmacológico encontra-se relacionado ao tratamento de febre, diarreia, amebíase e expectoração [15]. Estudos laboratoriais demonstram a sua atividade adstringente, anti-inflamatória e amebicida [16,17].

Esse estudo teve como objetivos: realizar a investigação fitoquímica do decocto de *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples (DOh) e da infusão de *Cephaelis ipecacuanha* Rich. (ICi), avaliar o seu potencial antibacteriano e a atividade modificadora da ação de antibióticos frente a bactérias padrão e multirresistentes.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material bacteriológico

As cepas bacterianas utilizadas no presente estudo foram linhagens padrão e multirresistentes de *S. aureus* (SA-ATCC 25923 e SA358), *E. coli* (EC- ATCC 10536 e EC 27) e *P. aeruginosa* (PA-ATCC15442 e PA03) com perfil de resistência identificado na tabela 1. Todas as cepas foram mantidas em placas com Heart Infusion Agar (HIA, Difco Laboratories LTDA). Antes do ensaio, as células foram cultivadas por 24h a 37°C em Brain Heart Infusion (BHI), Difco Laboratories LTDA.

**Tabela 1.** Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência aos antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> SA 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–	–
<i>Escherichia coli</i> EC27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA03	Ponta de catéter	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

---

Ast-Aztreonan; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefaclor; Cf- Cefalotina; Caz-Ceftazididima; Cip-Ciproflaxacina; Clo –Clorafenicol; Im- Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim, Tet-Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Oxa- Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paramomicina; But- Butirosina; Sis-Sisomicina; Net- Netilmicina; (-)ausência de resistência ou resistência sem relevância.

## 2.2 Material vegetal

As espécies vegetais de *O. hamiltonii* e *C. ipecacuanha* foram coletadas respectivamente nas cidades de Patos-Paraíba e em Serrita- Pernambuco. As exsiccatas foram depositadas respectivamente nos herbários Caririense Dárdaro de Andrade Lima e Herbário Geraldo Mariz, da Universidade Regional do Cariri– URCA e da Universidade Federal de Pernambuco sob os números 4022 e 35844 respectivamente.

## 2.3 Preparo do material vegetal

O tubérculo da *O. hamiltonii* e as raízes da *C. ipecacuanha* foram triturados e submetidos respectivamente à infusão e à decocção, seguindo o protocolo da Farmacopéia Brasileira quanto à proporção de material vegetal e quantidade de água bem como ao tempo de abafamento [18]. Posteriormente, os materiais filtrados foram levados à refrigeração e posteriormente submetidos ao processo de liofilização utilizando aparelho modelo Chisrt Alpha 1-4.

## 2.4 Testes da atividade antibacteriana

A CIM (concentração inibitória mínima) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo (NCCLS 2003) utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentava uma concentração de  $10^5$  UFC/mL em placas de microtitulação com 96 poços, com diluições em série ½. Em cada poço foi adicionado 100µL das soluções das amostras e de suas respectivas combinações. As concentrações finais variaram entre 512 - 8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões amicacina e gentamicina cujas concentrações finais variaram entre 2500 µg/mL – 2,4 µg/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina [19]. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento.

## 2.5 Determinação da atividade moduladora da resistência aos antibióticos

As soluções foram testadas em concentrações sub-inibitórias (MIC/8) [20]. Foram distribuídos 100 $\mu$ L de solução contendo BHI 10%, inóculo e amostra em cada poço no sentido alfabético da placa. Em seguida, 100 $\mu$ L da droga foram misturados ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações de antibióticos variavam gradualmente de 5000 a 2,44 $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina sódica.

## 2.6 Quantificação dos compostos por HPLC-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas sob as condições de gradiente usando coluna de Phenomenex C18 (4,6 mm x 250 mm) embaladas com partículas de 5  $\mu$ M de diâmetro; a fase móvel foi água contendo 2% de ácido fórmico (A) e metanol (B), e a composição gradiente foi: 5% de (B) durante 2 min; 25% (B), até 10 min; 40, 50, 60, 70 e 80% (B) a cada 10 minutos; seguindo o método já padronizado [21]. As soluções e a fase móvel foram filtradas através de membrana de 0,45 5  $\mu$ M (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultra-sons antes da utilização, o extracto foi analisado para uma concentração de 15 mg / mL. A taxa de fluxo foi de 0,7 mL / min e o volume de injeção foi de 40 5  $\mu$ L.. As soluções estoque de referência de normalização foram preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,030-0,500 mg / ml para o ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico e ácido clorogénico, e 0,025-,300 mg / mL para a quercetina, rutina e luteolina. Quantificações foram realizadas por integração dos picos utilizando o método do padrão externo, a 254 nm para o ácido gálico e ácido elágico; 327 nm para ácidos clorogênicos e caféico, e 366 para a quercetina, rutina e luteolina. Os picos foram confirmados por cromatografia de comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

## 2.7 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

LOD e LOQ foram calculados com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes, [22]. LOD e LOQ foram calculados como 3,3 e 10  $\sigma$  / S, respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

## 2.8 Análises de dados

Os resultados dos testes microbiológicos foram obtidos em triplicata e expressos como média geométrica. Para análise estatística foi aplicada a ANOVA seguida do Bonferroni *post test* utilizando o software GraphPad Prisma 6.0 [23]. A significância foi considerada com  $p < 0,05$ . As diferenças entre os grupos de HPLC foram avaliadas por uma análise de modelo de variância e teste de Tukey. O nível de significância para as análises foi definido como  $p < 0,05$ . Estas análises foram realizadas usando o software livre R versão 3.1.1. [24].

## 3. Resultados

Analisando a atividade antibacteriana dos produtos naturais testados (DCi e IOh) frente as linhagens de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, tanto linhagens padrão quanto multirresistentes foram observados valores de CIM  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ , sendo que o valor considerado clinicamente relevante segundo o CLSI é a CIM  $\leq 128 \mu\text{g/mL}$ . Estudo anterior já relatava que a atividade da *O. hamiltonii* frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* não era satisfatória, no entanto sugeria que se realizassem estudos no sentido de averiguar o potencial modulador sobre a ação de antibióticos dessa espécie 922 [25]. A *C. ipecacuanha* demonstrou-se eficaz no tratamento de diarreias quando ocasionadas por *Entamoeba histolytica*, no entanto não foi eficaz para tratá-las quando a causa era bacteriana, resultado sugestivo de que essa espécie possa apresentar boa atividade antiparasitária, mas atividade antibacteriana insatisfatória [16].

Mesmo diante desses resultados, por reconhecermos que a população faz uso concomitante de fármacos e plantas medicinais, consideramos oportuno testar a modulação da atividade de antibióticos exercida pelo extrato dessas plantas.

Para avaliar a atividade moduladora da resistência bacteriana aos antibióticos foram utilizados  $\beta$ -lactâmicos (benzopen e oxacilina) e aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina). O benzopen e a oxacilina são antibióticos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos cujos alvos são respectivamente as enzimas transpeptidase e  $\beta$ -lactamase. Possuem amplo espectro de ação, apresentam excelente perfil de segurança e são clinicamente eficazes [26]. O principal mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos ocorre pela produção de enzimas que promovem a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico [27]. Os aminoglicosídeos têm como alvo a subunidade 30S ribossômica, inibindo a síntese proteica bacteriana [26]. A via de administração dessas drogas deve ser a injetável e seu uso deve ser rigidamente controlado, devidos aos seus efeitos

tóxicos sobre os néfrons e adversos sobre a audição e o equilíbrio [28]. São eficazes contra bactérias Gram-negativas aeróbias [29].

Nos testes de avaliação do potencial modulador da resistência bacteriana aos antibióticos, quando combinados os produtos naturais (DCi e IOh) com amicacina, gentamicina, oxacilina e benzipen frente as linhagens de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* multirresistentes observou-se tanto sinergismo, onde a presença do produto natural reduziu a CIM do antibiótico, quanto antagonismo, apresentando aumento da CIM do antibiótico na presença do produto natural. A redução e o aumento das CIM's dos antibióticos nos testes de modulação foram comparados com as CIM's dos antibióticos testados isoladamente, e ilustrados nas figuras 1, 2, 3 e 4.

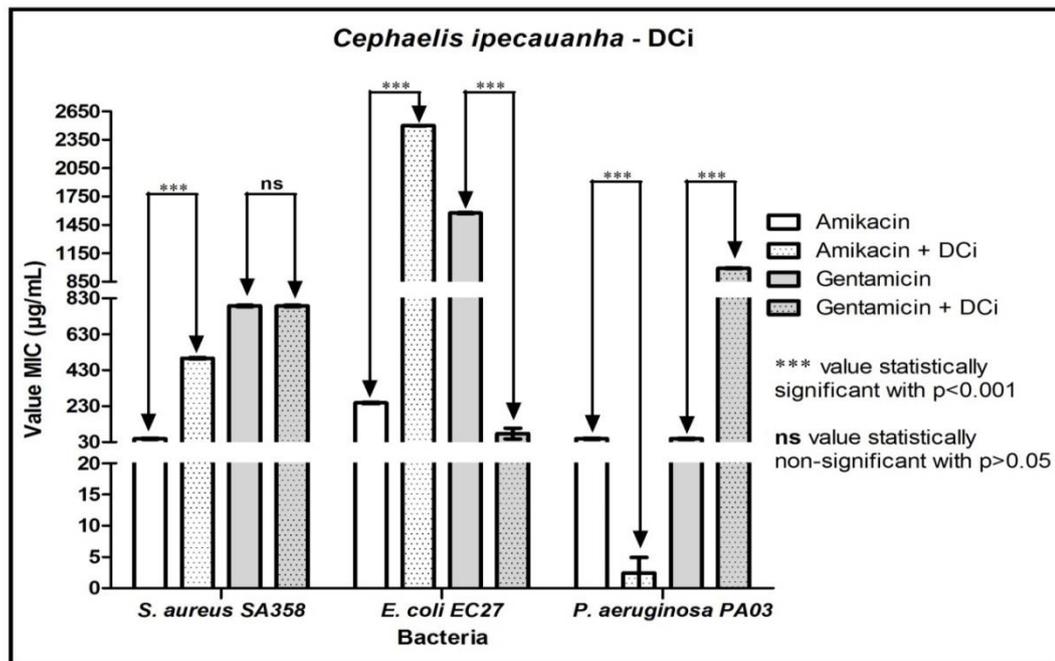
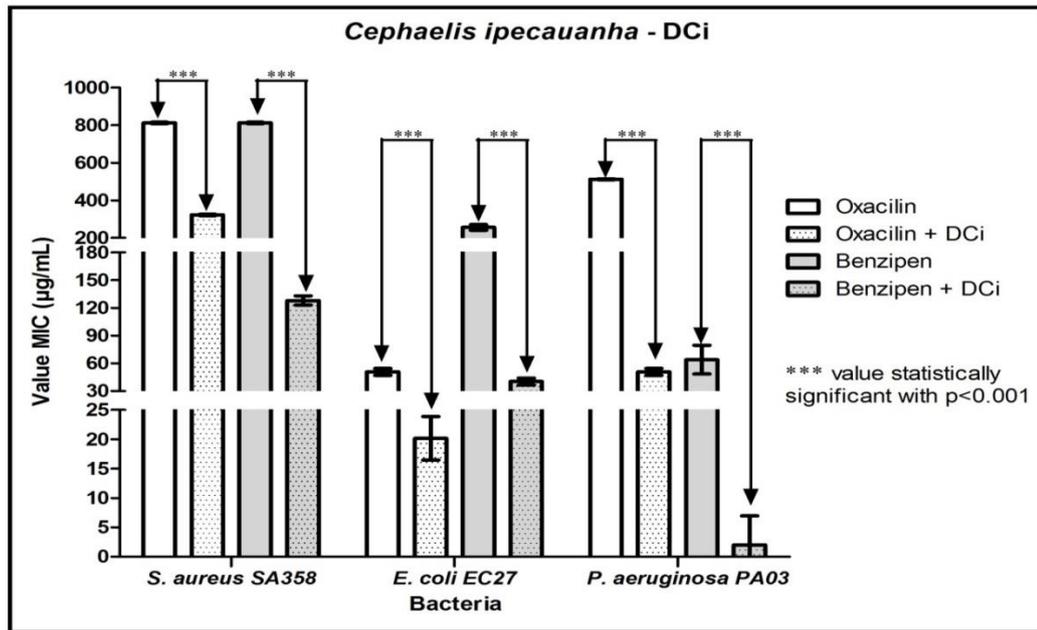
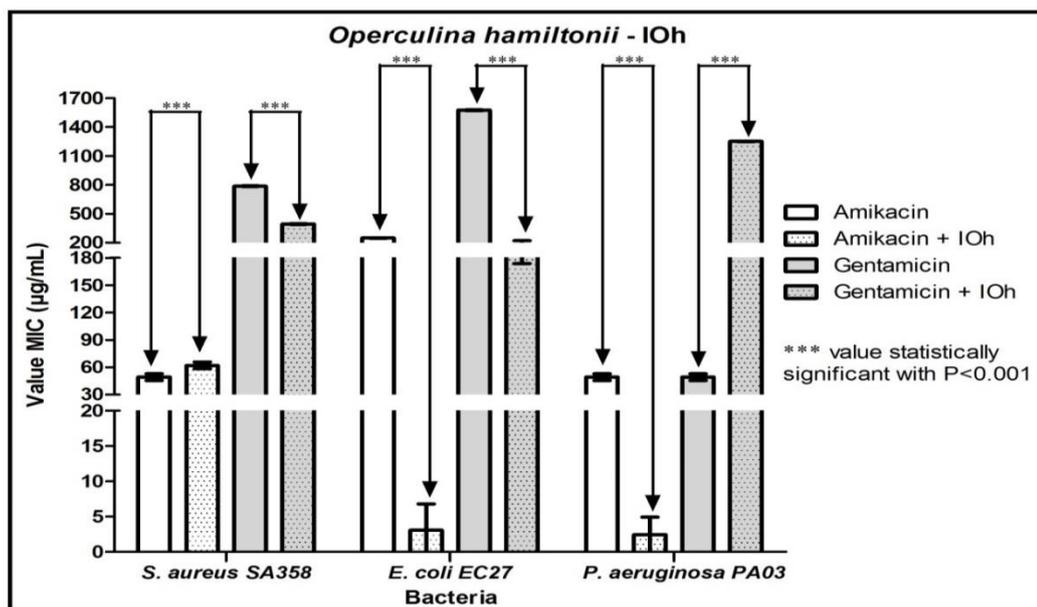


Figura 1. CIM da amicacina e da gentamicina na ausência e presença do DCi



**Figura 2.** CIM da oxacilina e do benzapen na ausência e presença do DCi

As figuras 1 e 2 demonstram os resultados da atividade moduladora da resistência aos antibióticos, utilizando o decocto de *C. ipepacuanha* (DCi). A partir da análise das figuras, observa-se que o DCi combinado com oxacilina e o DCi com benzipen apresentaram sinergismo frente a todas as linhagens bacterianas testadas. Sinergismo também foi observado na combinação do DCi com gentamicina frente a *E. coli* e na combinação de DCi com amicacina frente a *P. aeruginosa*. Na combinação do DCi com amicacina testado frente a *S. aureus* e *E. coli* houve antagonismo, que também foi observado quando DCi foi combinado com gentamicina testado frente *P. aeruginosa*.



**Figura 3.** CIM da amicacina e da gentamicina na ausência e presença da IOh

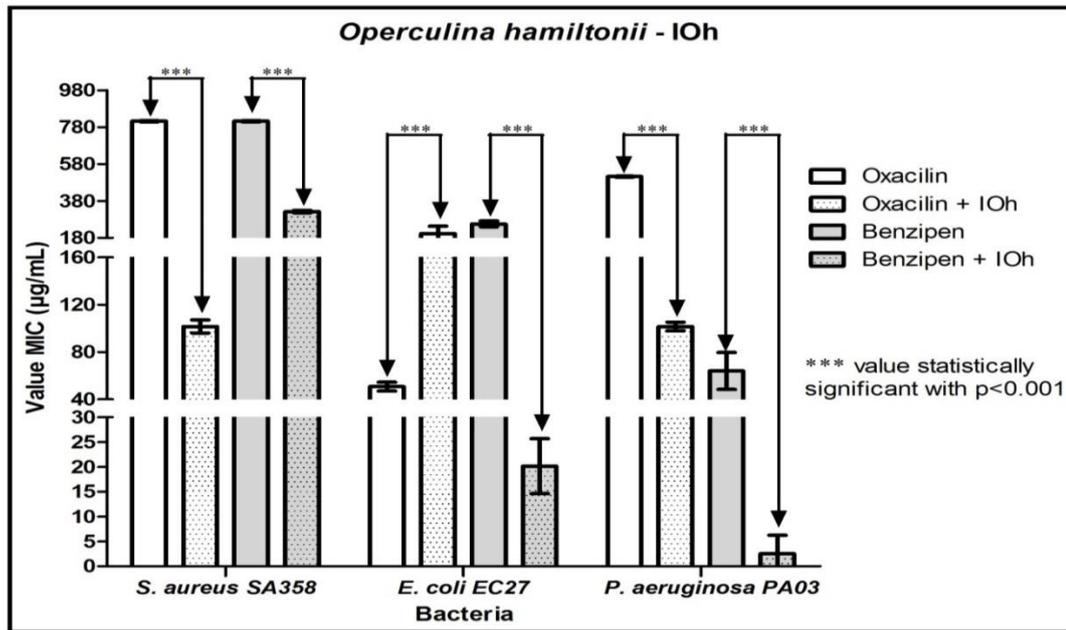


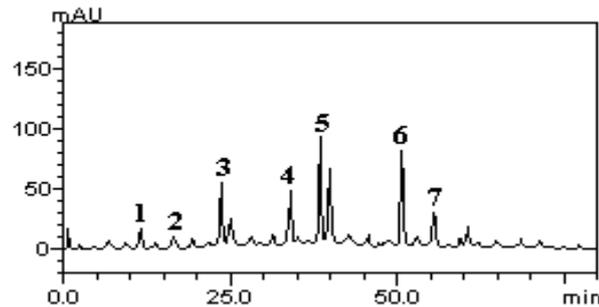
Figura 4. CIM da oxacilina e do benzapen na ausência e presença da IOh

Quanto aos testes de modulação utilizando a IOh demonstrados nas figuras 3 e 4, foram observados sinergismo quando combinado IOh com amicacina frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*. Sinergismo também observado na combinação IOh com gentamicina frente *S. aureus* e *E. coli*. A combinação IOh com oxacilina e IOh com benzipen apresentaram sinergismo quando testado frente a todas as linhagens bacterianas, exceto na combinação IOh com oxacilina frente à *E. coli* que apresentou antagonismo. Antagonismo foi observado também quando combinado IOh com amicacina e IOh com gentamicina frente à *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

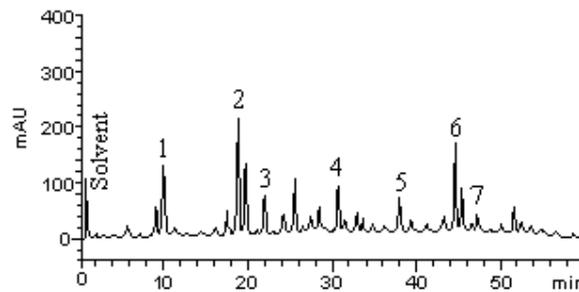
### Prospecção Fitoquímica

A presença de compostos fenólicos e flavonoides em produtos naturais, alterando a fluidez da membrana celular, pode ser a responsável pela atividade moduladora da resistência bacteriana aos aminoglicosídeos [30,31]. Os produtos naturais estudados tiveram alguns dos seus compostos identificados por CLAE; em ambos observou-se a presença de compostos fenólicos e flavonoides. A análise cromatográfica por CLAE do decocto liofilizado de *C. ipepacuanha* (DCi) revelou a presença do ácido gálico (tempo de retenção - tR = 11,27 min; pico 1), ácido clorogênico (tR = 15,64 min; pico 2), ácido caféico (tR = 23,81 min; o pico 3), ácido elágico (tR = 34,05 min; pico 4), rutina (tR = 38,29 min; pico 5), a quercetina (tR = 50,37 min; pico 6) e luteolina (tR = 55,12 min; pico 7), demonstrado na Figura 5 e na Tabela 1. Também foi obtido o perfil de HPLC da infusão liofilizada de *O. hamiltonii* (IOh) (Figura 6

e Tabela 2). O produto natural IOh apresentou os seguintes compostos: ácido gálico (tempo de retenção, tR = 10,15 min, pico 1), o ácido clorogênico (tR = 18,63 min, pico 2), ácido caféico (tR = 22,07 min, pico 3), ácido elágico (tR = 30,26 min, pico 4), a rutina (tR = 38,11 min, pico 5), quercetina (tR = 44,76 min, pico 6) e luteolina (tR = 47,19 min, pico 7).



**Figura 5** - Perfil de cromatografia líquida de alto desempenho do decocto liofilizado de *C. ipepacuanha* (DCi). O ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido caféico (3 pico), ácido elágico (pico 4), a rutina (pico 5), quercetina (pico 6) e luteolina (pico 7).



**Figura 6** - Perfil de cromatografia líquida de alto desempenho representante da infusão liofilizada de *O. hamiltonii* (IOh). O ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido caféico (3 pico), ácido elágico (pico 4), quercetina (pico 5), quercetina (pico 6) e luteolina (pico 7).

**Tabela 2**- Componentes do decocto liofilizado de *C. ipepacuanha* (DCi)

Compostos	DCi	LOD	LOQ
	mg/g	µg/mL	µg/mL
Ácido gálico	1,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,008	0,027
Ácido clorogênico	0,84 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,019	0,063
Ácido caféico	4,79 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,017	0,059
Ácido elágico	4,05 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,021	0,070
Rutina	6,37 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,023	0,075
Quercetina	5,19 ± 0,02 <sup>f</sup>	0,015	0,048
Luteolina	2,08 ± 0,04 <sup>g</sup>	0,007	0,023

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey  $p < 0,05$

**Table 3** – Componentes da infusão liofilizada de *O. hamiltonii* (IOh)

Compounds	IOh	LOD	LOQ
	mg/g	µg/mL	µg/mL
Ácido gálico	5,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,013	0,043
Ácido clorogênico	8,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,027	0,091
Ácido caféico	2,83 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,011	0,036
Ácido elágico	3,16 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,009	0,030
Rutina	2,79 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,024	0,079
Quercetina	6,45 ± 0,04 <sup>e</sup>	0,018	0,060
Luteolina	0,91 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,015	0,048

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey  $p < 0,05$

## Conclusão

Os testes de avaliação do potencial modulador demonstram resultados significativos em que o DCi + oxacilina e o DCi + benzipen apresentaram sinergismo frente a todas as bactérias testadas; houve ainda sinergismo quando combinados o DCi + gentamicina contra *E. coli* e DCi + amicacina contra *S. aureus*. A combinação IOh com os antibióticos permitiu efeito sinérgico frente a quase todas as linhagens bacterianas.

## Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

## Agradecimentos

Nós agradecemos a cooperação da Profa. Sonia Izabel Romero de Souza. Esse artigo recebeu o suporte financeiro da Faculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte- CE.

## Referências

1. Cabrera, C. E.; Gómez, R. F.; Zúñiga, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 2007, 38 (2), 149-158.
2. Veras, H. N. H.; Santos, I. J. M. dos. Santos, A. C. B. dos. Fernandes, C. N.; Matias, E. F. F.; Leite, G. de O.; Souza, H. H. F. de. Costa, J. G.M. da. Coutinho, H. D.M. Comparative Evaluation Of Antibiotic And Antibiotic Modifying Activity Of Quercetin And Isoquercetin In Vitro. *Current Topics In Nutraceutical Research* .2011, 9 (1/2), 25-30.
3. Bitu, V. de C. N.; Fecundo, H. Di T. F.; Costa, J. G. M. da; Coutinho, H. D. M.; Rodrigues, F. F. G.; Santana, N. M. de; Botelho, M. A.; Menezes, I. R. A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. *Natural Product Research*, 2014, 28 (6), 399–402.
4. Barreto, H. M.; Fontinele, F. C.; Oliveira, A. P.; Arcanjo, D. D. R.; Santos, B. H. C.; Abreu, A. P. L.; Coutinho, H. D. M.; Silva, R. A. C.; Sousa, T. O.; Medeiros, M. G. F.; Citó, A. M. G. L.; Lopes, J. A. D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *taphylococcus aureu*. *BioMed Research International*, 2014, 7 p.
5. Matias, E. F. F.; Alves, E. F.; Santos, B. S.; Souza, C. E. S. de; Ferreira, J.V. de A.; Lavor, A. K. L. S. de; Figueredo, F. G.; Lima, L. F. de; Santos, F. A. V. dos; Peixoto, F. S. das N.; Colares, A. V.; Boligon, A. A.; Saraiva, R. de A.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T. da; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G. M. da; Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage . *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicin*. 2013, Article ID 164215.
6. Lavor, A. K. L.S.; Matias, E. F. F.; Alves, E. F.; Santos, B. S., Figueredo, F. G.; Lima, L. F.; Leite, N. F.; Sobral-Souza, C. E.; Andrade, J. C.; Alencar, Liscássia B.B.; Brito, D. I.V.; Albuquerque, R. S.; Coutinho, H. D.M. Association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). *European Journal of Integrative Medicine*. 2014, 6, 301–306.
7. Aguiar, J. J. S.; Sousa, C. P. B.; Araruna, M. K. A.; Silva, M. K. N.; Portelo, A. P.; Lopes, J. C.; Carvalho, V. R. A.; Figueredo, F. G.; Bitu, V. C. N.; Coutinho, H. D. M.; Miranda, T. A. S.; Matias, E. F. F. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. *European Journal of Integrative Medicine*. 2015, 2 (4), 151-156.
8. Pereda-Miranda, R.; Taketa, A. T. C.; Villatorovera, R. A. Alucinógenos naturais: etnobotânica e psicofarmacologia. In: Simões, C. M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2003, 919-958.
9. Carvalho, R.R.C., Laranjeira, D., Carvalho-Filho, J.L.S., 2013. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. *Química Nova*. 6(2), 241-244.
10. Silva, C. F.; Athayde, A. C. R.; Silva, W. W.; Rodrigues, O. G.; Vilela, V. L. R.; Marinho, P. V. T. *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples in natura sobre nematóides

gastrintestinais de caprinos, naturalmente infectados, em clima semi-árido. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, 2010, 12, 4, 466-471.

11. Rodrigues, A. B.; Athayde, A. C. R.; Rodrigues, O. G.; Silva, W. W.; Faria, E. B. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesq. Vet. Bras.*, 2007, 27, 4, 162-166.

12. Martins, E. R.; Castro, D. M. de; Castellani, D. C.; Dias, J. E. *Plantas medicinais*. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000, p. 220.

13. Mendonça, R. C., J. M. Felfili, B. M. T. Walter, M. C. S. Junior, A. V. Rezende, T. S. Filgueiras, P. E. Nogueira. 1998. Flora vascular do cerrado. In: S. M. Sano & S. P. de Almeida (Ed.), *Cerrado, Ambiente e Flora*. EMBRAPA, Planaltina, DF

14. Delprete, P. G.; Smith, L. B.; Klein, R. M. Rubiáceas: Flora Ilustrada Catarinense. Santa Catarina: Ademir Reis, p. 353-360, 2005. 2. v.

15. Matos, F. J. Abreu. O Formulário Fitoterápico do Professor Dias da Rocha. Mossoró: ESAM, 1987.

16. Lee M. R. Ipecacuanha: the South American vomiting root. *J R Coll Physicians Edinb*. 2008 Dec;38(4):355-60.

17. Kaplan, M.A.C.; Gottlieb, O.R. Amazônia: Tesouro químico a preservar. *Ciência hoje* 61: 17-29, 1990.

18. Farmacopéia Brasileira. 5ed. Brasília: *Anvisa*, 2010, pp. 546.

19. Salvat, A. A, Antonnacci, L, Fortunato R. H, Suarez, E. Y. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol*. 2001, 32:293-7.

20. Coutinho, H. D. M.; Costa J. G.; Lima, E. O.; Falcão-Silva, V. S.; Siqueira-Júnior J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, Genebra, 54, 4, p. 328-330. 2008

21. Sousa, E.O.; Miranda, C.M.B.A.; Nobre, C.B.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L.; Costa, J.G.M. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. *Industrial Crops and Products*, 70: 7-15, 2015.

22. Boligon, A. A.; Pimentel, V.C.; Bagatini, M.D.; Athayde, M.L. Effect of *Scutia buxifolia* Reissek in nucleotidase activities and inhibition of platelet aggregation. *J. Nat Med*. 2015, 69, 46-54.

23. Matias, E. F. F.; Alves, E. F.; Santos, B. S.; Souza, C. E. S. de; Ferreira, J. V. de A.; Lavor, A. K. L. S. de; Figueredo, F. G.; Lima, L. F. de; Santos, F. A. V. dos; Peixoto, F. S. N.; Colares, A. V.; Boligon, A. A.; Saraiva, R. de A.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T. da; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G. M. da. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

24. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014.
25. Lôbo, K. M. S.; Athayde, A. C. R.; Silva, A. M. A.; Rodrigues, F. F. G.; Lôbo, I. S.; Bezerra, D. A. C.; Costa, J. G. M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, 2010, 12, 2, p. 227-233.
26. Guimarães, D. O.; Momesso, L. da S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Nova Quim.*, 2010, 33 (3), 667-679.
27. Suárez, C.; Gudiol, F. Antibióticos beta-lactâmicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2009, 27, 116.
28. Patrick, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16.
29. Walsh, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.
30. Menezes, I. R.; Santana, T. I.; Varela, V. J.; Saraiva, R. A.; Matias, E. F.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Coutinho, H. D.; Costa, J. G.; Rocha, J. B. Composição química e avaliação da toxicidade aguda, resistência antimicrobiana e modulador do extrato de *Murraya paniculata*. *Pharm Biol.* 2015, 53, 2, 185-91.
31. Matias, E. F.; Santos, F. A.; Silva, J. M. F.; Souza, C. E. S.; Tintino, S. R.; Guedes, G. M. M.; Medeiros, C. R.; Braga, M. F. B. M.; Almeida, T. S.; Costa, J. G. M.; Menezes, I. R. A.; Coutinho, H. D. M. Screening the in vitro modulation of antibiotic activity of the extracts and fractions of *Ocimum gratissimum* L. *Afr J Microbiol Res.* 2012, 6 (9), 1902-1907, Março de 2012.

#### 4.4 Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu, Heberly Di Tarso Fernandes Fecundo, José Galberto Martins da Costaa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Fabíola Fernandes G. Rodrigues, Nathalia Matos de Santana, Marco Antônio Botelho e Irwin R. Alencar Menezes

#### Artigo publicado no periódico **Natural Product Research:**

(Normas para publicação no anexo D)



## SHORT COMMUNICATION

### Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance

Vanessa de Carvalho Nilo Bitu<sup>a</sup>, Hebert Di Tarso Fernandes Fecundo<sup>b</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>ac</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>a\*</sup>, Fabíola Fernandes G. Rodrigues<sup>ac</sup>, Nathalia Matos de Santana<sup>a</sup>, Marco Antônio Botelho<sup>c</sup> and Irwin R. Alencar Menezes<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculdade Leão Sampaio, Unidade Saúde, Juazeiro do Norte, Brazil; <sup>b</sup>Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri, Juazeiro do Norte, Brazil; <sup>c</sup>Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Av. Cel. Antônio Luiz, 1161, CEP: 63105-000, Crato, CE, Brazil

(Received 4 June 2013; final version received 8 November 2013)

*Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) is an aromatic plant widely used in folk medicine in the Brazilian semi-arid region. This work aims at evaluating the antimicrobial activity of essential oils from the leaves of *L. gracilis* (EOLG) when associated with commercial antibiotics against bacterial resistance. The essential oil obtained by hydrodistillation has 38 chemical constituents with thymol (44.4%), carvacrol (22.2%), *p*-cymene (6.2%) and  $\alpha$ -pinene (5.6%) as major constituents. Microbiological assays were conducted by direct and gaseous contacts. We demonstrated that EOLG has significant synergism with all antibiotics tested. EOLG decreased the minimal inhibitory concentration of the aminoglycosides and improved their zone of inhibition more than 300% against *Staphylococcus aureus* and 270% against *Pseudomonas aeruginosa*. These results demonstrate that natural substances present in EOLG have the capacity to modulate bacterial resistance and can be used as an adjuvant therapy against multi-resistant microorganisms such as *S. aureus*, *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*.

**Keywords:** *Lippia gracilis*; minimal inhibitory concentration; gaseous contact; synergism

#### 1. Introduction

The extensive and widespread use of antibiotics has contributed substantially to the development of bacterial defence mechanisms causing the so-called phenomenon of bacterial resistance. This resistance severely limits the efficacy of standard antibiotic treatment, and therefore, poses a significant threat to public health (Wise 2003). Thus, there is a continuous need for the discovery of new antimicrobial compounds with diverse chemical structures and novel mechanisms of action. Besides the problem of bacterial resistance, there has been an alarming increase in the incidence of new and re-emerging infectious diseases and undesirable side effects of certain antibiotics (Cowan 1999).

A promising alternative to overcome the pitfalls of some classical antibiotics is the search for natural products with antimicrobial activity (Mbwapo et al. 2007; Matias et al. 2010). Another method would be the formulation of new synergistic combinations using commercially available antibiotics associated with natural active substances with antimicrobial properties (Araruna et al. 2012). Among such products are essential oils that are composed of secondary metabolites of

\*Corresponding author. Email: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)

aromatic plants and are attractive antimicrobial agents. These oils have antimicrobial properties and are characterised by their volatility, strong odour and medicinal use as traditional remedies against several health problems (Santos et al. 2011; Veras et al. 2012). Mounting evidence points to pivotal roles of natural essential oils as broad-spectrum antimicrobial agents against Gram-positive and Gram-negative strains (Rodrigues et al. 2009).

*Lippia gracilis*, also called 'alecrim-da-chapada' or 'alecrim-de-serrote' in Portuguese, is a widespread aromatic plant present throughout the Brazilian northeast region. Due to this widespread availability, this plant is easily found and used in traditional medicine for the treatment of flu, cough, bronchitis, sinusitis, nasal congestion, headache, jaundice and paralysis (Pascual et al. 2001). Its leaves possess essential oil with strong antimicrobial activity against fungi and bacteria (Fontenelle et al. 2007).

The aims of this work were to identify the volatile compounds in the essential oil of Brazilian-grown *L. gracilis* leaves and determine whether a synergistic relationship exists between the essential oil of *L. gracilis* (EOLG) and selected commercial antibiotics against clinically important strains of bacteria.

## 2. Results and discussion

The essential oils extracted from fresh leaves resulted in a yield of 0.56%. The essential oils from the leaves of *L. gracilis* (EOLG) were characterised by a strong odour of thymol, rarely coloured. The chemical GC/MS analysis of EOLG identified 38 chemical constituents representing 97.9% present in the essential oil, namely 4-terpineol, thymol methyl ether, carvacrol methyl ether, thymol and carvacrol, caryophyllene oxide. The constituents present at the highest concentrations in the oil were thymol (44.4%), carvacrol (22.2%), *p*-cymene (6.2%) and  $\alpha$ -pinene (5.6%). The composition of this essential oil is shown in Table S1 (Alencar et al. 1990; Adams 2007).

Tables S2 and S3 show that, if associated with sub-inhibitory concentrations, EOLG has a modulatory effect on aminoglycoside activity. We observe the reduction in minimal inhibitory concentration (MIC) of all the antibiotics tested against the clinical strain *Escherichia coli* 27 and a reduction in MIC of amikacin and gentamicin against *E. coli* ATCC10536 and *S. aureus* ATCC12692.

Using the microdilution test, we demonstrated that EOLG alone had significant antimicrobial activity against all the strains tested. In addition, in some cases, EOLG had comparable or even lower MIC values when compared to commercial antibiotics (Bitu et al. 2012). This effect was similar to that of kanamycin or gentamicin against all the three strains tested. On the other hand, the effect was less prominent when compared to that of amikacin against *S. aureus* ATCC12692 and neomycin against *E. coli* 27. The effect of EOLG was similar to that of neomycin when tested against *S. aureus* ATCC12692. In agreement with a study done by Alekshun and Levy (2007), the bactericidal action of aminoglycosides is attributed to protein synthesis inhibition and to an increased error rate in the mRNA proofreading process. However, Jana and Deb (2006) highlighted that the action mechanisms of aminoglycosides depend, fundamentally, on the entrance of the active drug into the microorganisms, making the drug available for inhibiting the bacterial ribosomes (Jana & Deb 2006). This observation would explain the synergism among the essential oils and aminoglycoside antibiotics. In fact, the aminoglycosides would have facilitated entrance into the cells by the membrane permeability alterations triggered by the components of the essential oils (Sousa et al. 2012).

Essential oils are present in different parts of the plants contributing to a broad range of functions, which among them includes the defence against microorganisms. For this reason, several groups have focused on the potential antimicrobial activity present on the essential oils. In this context, a lot of attention has been given to the promising effects of *Lippia* genus (Kunle

et al. 2003). Coutinho et al. (2011) have reported the predominance of these components in *L. microphylla*, while Veras et al. (2012) reported their abundance in *L. sidoides*.

Using the method of gaseous contact, we found that EOLG modified the activity of all antibiotics against *S. aureus* ATCC12692 in all concentrations tested. However, this effect was not observed for lower concentrations of tobramycin. A similar result was observed against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, by evaluating the activity of all antibiotics in the presence of EOLG. EOLG enhanced the activity of all antibiotics tested. Again the antibiotic tobramycin associated with EOLG (25%, 12% and 6%) was an exception. In addition, gentamicin associated with 6% EOLG had no effect. One remarkable and relevant observation here is the effect of 50% EOLG that had enhanced the activity of all antibiotics tested going over 310% against *S. aureus* and 270% against *P. aeruginosa*. The modulatory activity of essential oils has been demonstrated by other studies, either by direct contact as with *Ocimum gratissimum* (Braga et al. 2011) or by gaseous contact as with *Croton zehntneri* (Rodrigues et al. 2009), *L. microphylla* (Coutinho et al. 2011), *Vanillosmopsis arborea* (Santos et al. 2011) and *L. sidoides* (Veras et al. 2012). The ability to interact with antibiotics via synergism highlights the importance of using natural products against microbial resistance. Undoubtedly, the synergism between essential oils and commercial antibiotics will spark additional studies designed to identify the specific components responsible for the properties shown in this study.

### 3. Conclusion

The results obtained in this study reveal the antimicrobial properties of EOLG, which presents *L. gracilis* as a source of substances capable of modulating bacterial resistance and can be used as a supplemental therapeutic treatment against multi-resistant microorganisms such as *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*.

### Supplementary material

Experimental details relating to this article are available online, alongside Tables S1–S3.

### References

- Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Palm Springs: Allured Pub Corp.
- Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128:1037–1050.
- Alencar J, Craveiro A, Matos F, Machado M. 1990. Kovats indices simulation in essential oils analysis. *Quím Nova*. 13:282–284.
- Araruna MK, Santos KK, Costa JGM, Coutinho HDM, Boligon AA, Stefanello ST, Athayde ML, Saraiva RA, Rocha JBT, Kerntopf MR. 2012. Phenolic composition and *in vitro* activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm. *Eur J Integr Med*. 5:178–183.
- Bitu V, Botelho A, Costa JGM, Rodrigues FF, Veras HN, Martins KT, Lyra A, Coluchi GG, Ruela RS, Queiroz DB. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracilis*. *Rev Bras Farmacog*. 22:69–75.
- Braga LKA, Macedo AKC, Cunha AA, Silva JMF, Santos FA, Souza CE, Coutinho HDM, Almeida TS, Costa JGM. 2011. Potentiation of *in vitro* antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. *Afr J Pharm Pharmacol*. 5:2145–2149.
- Coutinho HDM, Rodrigues FF, Nascimento EM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. 2011. Synergism of gentamicin and norfloxacin with the volatile compounds of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae). *J Essent Oil Res*. 23:24–28.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 12:564–582.
- Fontenelle R, Morais S, Brito E, Kerntopf M, Brilhante M, Cordeiro R, Tomé A, Queiroz M, Nascimento N, Sidrim J. 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J Antimicrob Chemother*. 59:934–940.
- Jana S, Deb J. 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70:140–150.

402 V. de Carvalho Nilo Bitu et al.

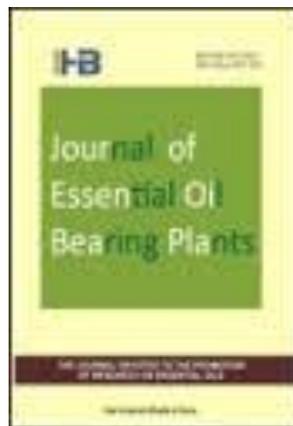
- Kunle O, Okogun J, Egamana E, Emojevwe E, Shok M. 2003. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*. 10:59–61.
- Matias EEF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. 2010. Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenacea* DC. *Latin Am J Pharma*. 29:1049–1052.
- Mbwambo ZH, Moshi MJ, Masimba PJ, Kapingu MC, Nondo RS. 2007. Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. *BMC Comp Altern Med*. 7:1–9.
- Pascual M, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol*. 76:201–214.
- Rodrigues FF, Costa JGM, Coutinho HDM. 2009. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. *Phytomedicine*. 16:1052–1055.
- Santos NKA, Coutinho HDM, Viana GSB, Rodrigues FFG, Costa JGM. 2011. Chemical characterization and synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Vanillosmopsis arborea*. *Med Chem Res*. 20:637–641.
- Sousa EO, Almeida TS, Menezes IRA, Rodrigues FFG, Campos AR, Lima SG, Costa JGM. 2012. Chemical composition of essential oil of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) and synergistic effect of the aminoglycosides gentamicin and amikacin. *Rec Nat Prod*. 6:144–150.
- Veras H, Rodrigues FFG, Colares AV, Menezes IRA, Coutinho HDM, Botelho MA, Costa JGM. 2012. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia*. 83:508–512.
- Wise R. 2003. Maximizing efficacy and reducing the emergence of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 51(Suppl 1): 37–42.

**4.5 Effect of collection time on composition of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil**

**Vanessa de Carvalho Nilo Bitu, José Galberto Martins da Costa, Fabíola Fernandes G. Rogrigues, Aracélio Viana Colares, Henrique Douglas Melo Coutinho, Marco Antônio Botelho, Aline da Costa Portela, Nathalia Matos de Santana,\*Irwin R. Alencar Menezes**

**Artigo publicado no periódico Journal of Essential Oil Bearing Plants:**

(Normas para publicação no anexo E)



**Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of  
*Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil**

**Vanessa de Carvalho Nilo Bitu<sup>1,3</sup>, José Galberto Martins da Costa<sup>2</sup>, Fabíola Fernandes G. Rogrigues<sup>3</sup>, Aracélio Viana Colares<sup>3</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>4</sup>, Marco Antônio Botelho<sup>5</sup>, Aline da Costa Portela<sup>3</sup>, Nathalia Matos de Santana<sup>3</sup>, Irwin R. Alencar Menezes<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Chemistry Biology Department, Medicinal chemistry and Pharmacology Laboratory (LFQM) Regional University of Cariri, Brazil. Rua Coronel Antônio Luiz, 1161, Pimenta, CEP 63.105-000-Crato/Ceará, Brasil

<sup>2</sup> Chemistry Biology Department, Research Laboratory of Natural Products (LPPN), Regional University of Cariri, Brazil. Rua Coronel Antônio Luiz, 1161, Pimenta, CEP 63.105-000-Crato/Ceará, Brasil

<sup>3</sup> Leão Sampaio Facult, Av Leao Sampaio Km 3, CEP63.180-000 Juazeiro do Norte/Ceará, Brasil

<sup>4</sup> Chemistry Biology Department, Molecular Biology and Microbiology Laboratory (LMBM), Regional University of Cariri, Brazil. Rua Coronel Antônio Luiz, 1161, Pimenta, CEP 63.105-000 – Crato/Ceará, Brasil

<sup>5</sup> Programa de Pós-graduação em Odontologia, Laboratório de Biotecnologia da Universidade Potiguar, Brazil

---

**Abstract:** The specie *Lippia gracilis* Schauer is largely utilized for their antimicrobial properties, which are attributed to the presence of phenolic monoterpenes such as thymol and carvacrol. The aim of this study was to determine the yields and chemical composition of the essential oils obtained from fresh and dry leaves of collected at different times in the city of Crato-CE, in January 2009. The essential oils were extracted by hydrodistillation, and its components were identified by gas chromatography coupled with mass spectrophotometry. The time of plant collection should coincide with the moment of greatest expression of the active principle.

**Key words:** *Lippia gracilis*, essential oils, times of collection.

---

**Introduction**

The family Verbenaceae comprises approximately 36 genera and 1000 species of pantropical distribution, where 17 genera and 250 species occur in Brazil, with economic potential widely

exploited<sup>1,2</sup>.

The genus *Lippia*, belonging to this family was first described by Linnaeus in middle of XVIII century; where the first in-depth taxonomic works were by Schauer in the following century. In

---

\*Corresponding authors (Irwin R. Alencar Menezes)

E-mail: <irwinalencar@yahoo.com.br/irwin.alencar@urca.br>

© 2015, Har Krishan Balla & Sons

Brazil, there are 111 distinct species belonging to this genus. In semi-arid northeastern Brazil, various species known as “*alecrins*”, are widely distributed in the Caatinga, where they are endemic in this region of the country. The climatic irregularity of this region interferes strongly with the life of millions of its inhabitants, forcing the interaction between humans and this biome, which justifies studies that involve the phytotherapeutic potential that this type of vegetation offers <sup>3</sup>.

The species of the genus *Lippia*, native of Northeast Brazil, are largely utilized for their antimicrobial properties, which are due to the presence of phenolic monoterpenes such as thymol and carvacrol, chemical components of proven efficacy by various studies <sup>4-6</sup>. These compounds account for the antimicrobial activities of the essential oils present in the glandular trichomes of the species *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), popularly known as “*alecrim-da-chapada*” <sup>7</sup>.

Other activities are recognized, such as the larvicidal and antioxidant activities of *L. gracilis* <sup>8</sup>. As it is a potent natural antiseptic, thymol shows recognized fungicidal activity and its use is recommended by health authorities as an external disinfectant because of its easy access in rural communities, where it is also utilized in the form of tinctures and teas <sup>9</sup>. Studies have demonstrated that oropharyngeal candidiasis and other ailments of the oral cavity can be treated with essential oils rich in carvacrol <sup>6,10</sup>.

It is known that the type of soil, time of the year and temperature are environmental factors that influence the production of essential oils. In the course of a day, variations in light intensity and temperature can be observed, altering the processes of respiration and photosynthesis of plants and influencing the production of secondary metabolites, through interference with the mevalonic acid pathway, which produces terpenes, principal chemical constituents of the essential oils <sup>11</sup>.

Studies have demonstrated significant differences in the chemical composition and yield of essential oils depending on the time, period and area of collection, suggesting the existence of different chemotypes by the variation of the

chemical constituents identified by chromatography <sup>12,13</sup>.

The aim of this study was to determine the yields and chemical composition of the essential oils obtained from the fresh and dry leaves of *L. gracilis* collected at different times of the day in the city of Crato-CE, in January 2009.

## Materials and methods

### Plant material

Leaves of *L. gracilis* were collected in the month of January 2009, at four different times of the day (8:00, 11:00, 14:00 and 17:00 h), in the botanical gardens of the University Regional do Cariri, in Crato (CE), where part of the leaves were dried. A representative sample of the species was classified and deposited in the Prisco Bezerra Herbarium of the University Federal do Ceara, under the number 44,456. The city of Crato is located in the microregion of Cariri, in semi-arid Northeast Brazil, at latitude 7° 14' 03", where there is a warm tropical climate with the rainy period occurring between January and May. The collection period of the leaves coincided with the start of the rains in the first two weeks of January.

### Extraction of essential oil

The essential oils were extracted from fresh leaves (EOFL, 77 g) and dry leaves (EODL, 35.6 g) by hydrodistillation, utilizing a Clevenger type of apparatus, for a period of 2 h. Next, the oil/water mixtures were collected, dried with anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered and stored under refrigeration until analyses.

### Analysis of chemical composition

The analyses of chemical composition were performed using a Shimadzu CG-17A spectrometer / in QP5050A (GC-MS system): DB-5HT capillary column (30 m x 0.251 mm); carrier gas: helium 1.7 mL/min; column pressure 107.8 kPa; linear velocity = 47.3 cm/s; total flow 24 mL/min; carrier flow 24 mL/min; injector temperature 270°C; detector temperature 290°C; column temperature 60°C (2 min) - 180°C (1 min) at 4°C/min, then 180°C - 260°C at 10°C/min (10 min). The system was operated at 70 eV ionizing energy.

The identification of the components was based

on spectral fragmentation, using the Wiley 229 online library of fragmentation patterns, along with two other criteria: the retention indices and comparison with data in the literature <sup>14,15</sup>.

### Statistical analysis

The chemical constituents and yields obtained were submitted to statistical analysis by Tukey's test for multiple comparisons. The results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

#### *Analysis of the chemical composition of the essential oils of fresh and dry leaves of Lippia gracilis*

The yield of the oil of *L. gracilis* extracted from dry leaves was considerably superior to that with fresh leaves, namely 2.6 % and 0.6 %, respectively. In the studies of the chemical composition of the essential oils, there is generally one major active compound. However, because they consist of complex mixtures of volatile substances, the

oils contain other chemical components, such as a series of terpenoid hydrocarbons, esters, organic acids, aldehydes, ketones, and phenols, among others, at different concentrations <sup>16,17</sup>.

GC-MS analysis of the essential oil of fresh leaves (EOFL) allowed the identification of 17 chemical constituents representing 96.3 % of the essential oil, namely 13 monoterpenes and 4 sesquiterpenes. Of the monoterpenes, 5 are oxygenated (4-terpineol, thymol-methyl ether, carvacrol-methyl ether, thymol and carvacrol), whereas only one sesquiterpene (caryophyllene oxide). The constituents present at the highest concentrations in the oil were: thymol (44.4 %), carvacrol (22.2 %), p-cymene (6.2 %) and  $\alpha$ -pinene (5.7 %). The composition of this essential oil is shown in Table 1.

In relation to the chemical composition of the essential oil of dry leaves (EODL), making use of the same analytical process, 87.2 % of its chemical constitution was identified, corresponding to 15 compounds (Table 1). These included 7 non-

**Table 1. Chemical composition of essential oils obtained from fresh (EOFL) and dry (EODL) leaves of *L. gracilis* (Schauer)**

Component	EOFL		EODL	
	RT*	(%)	RT*	(%)
$\alpha$ -Thujene	7.7	0.5	-	-
$\alpha$ -Pinene	11.0	5.7	10.7	19.4
$\beta$ -Pinene	12.4	0.3	12.4	0.8
Myrcene	12.7	1.6	12.7	2.00
$\alpha$ -Terpinene	13.8	0.6	13.8	0.8
p-Cymene	13.9	6.2	13.9	8.6
Limonene	14.3	0.4	14.3	0.80
$\gamma$ -Terpinene	16.5	2.8	15.3	3.5
4-Terpineol	19.5	3.3	19.5	0.4
Thymol methyl ether	21.3	0.6	21.3	3.5
Carvacrol methyl ether	21.7	0.8	21.7	0.7
Thymol	23.2	44.4	23.0	21.3
Carvacrol	23.5	22.2	23.4	20.9
$\beta$ -Caryophyllene	28.4	5.6	28.4	3.6
$\alpha$ -Humulene	29.5	0.5	29.5	0.3
$\delta$ -Cadinene	31.3	0.3	31.3	0.6
Caryophyllene oxide	33.4	0.5	-	-
Total		96.3		87.2

RT\* - retention time

oxygenated monoterpenes; 5 oxygenated monoterpenes and 3 non-oxygenated sesquiterpenes. The compounds found in the highest quantities in the volatile oil were thymol (21.3 %), carvacrol (20.9 %),  $\alpha$ -pinene (19.4 %) and p-cimene (8.6 %).

Table 1 shows that the studied essential oils contained practically the same chemical components, although in variable amounts. In the two oils, the major substances were the same, thymol and carvacrol. In EOFL, the quantity of thymol (44.4 %) was double that of carvacrol (22.2 %), while in EODL, the two components appeared to be in practically the same proportion (21.3 and 20.9 %, respectively). Thymol and carvacrol have a similar structure, differing only in the position of the hydroxyl group in the phenol ring<sup>18</sup>. These compounds act against microorganisms through a lipophilic action on the cell membrane, causing the dispersion of polypeptide chains of the cell membrane and destabilizing the target cell<sup>19,20</sup>.

Other constituents identified in the essential oils studied were p-cimene and  $\alpha$ -pinene. The amount of  $\alpha$ -pinene was considerably greater in EODL (19.4 %) than in EOFL (5.7 %). However, in relation to p-cymene, there was no considerable quantitative variation (8.6 and 6.2 % for EODL and EOFL, respectively). Studies have demonstrated that higher quantities of p-cymene can be formed from the oxidation of  $\gamma$ -terpinene and  $\alpha$ -terpinene, caused by light and air<sup>21</sup>. The literature recognizes the properties of p-cymene and  $\alpha$ -pinene and identifies them in the composition of the essential oils of various species of *Lippia*, suggesting that as minor components of essential oils, they can work synergistically to exert biological activities<sup>22,23</sup>.

#### **Effect of time of collection on the chemical composition of the essential oils of *Lippia gracilis***

The essential oils obtained from fresh leaves of *L. gracilis* collected at different times of the same day showed similar yields of approximately 0.6 %. The time of collection is an important point, where it is necessary to define the best time to harvest the material, which should coincide with the moment of greatest expression of the active

principle and highest yield of phytomass<sup>24</sup>.

In the procurement of essential oils, intrinsic (genetic) factors can be influenced by extrinsic factors such as soil, method of extraction, drying of the plant, temperature, times of collection, seasonality, day length, humidity, intensity and quality of light<sup>25</sup>. These factors can explain the difference in the major components in the species *L. gracilis*, because some authors have cited carvacrol as being the major component in essential oils<sup>26,27,9</sup>; while other studies have reported that thymol is the component of major expression<sup>22</sup>.

The chemical composition of the essential oils analyzed is shown in **table 2**, making it possible to observe the quantitative and qualitative differences related to different times of collection. GC-MS analysis allowed the identification of the chemical composition of the essential oils, where 17 (96.3 %), 20 (94.1 %), 20 (86.1 %) and 16 (89.3 %), were the constituents identified respectively in the oils obtained from the leaves collected at 7:00, 10:00, 13:00 and 16:00 h. In all cases, there was a predominance of monoterpenes over sesquiterpenes.

The main components observed in these essential oils were thymol (44.4- 3.5 %), carvacrol (35.3-17.1 %),  $\alpha$ -pinene (5.7- 5.7 %), p-cymene (8- 4.2 %) and  $\beta$ -caryophyllene (6.0- 3.0 %), with a great variation in the proportions of the chemical constituents.

Thymol, the major component found in the essential oil obtained from the collection carried out at 7:00 h (44.4 %), was found only at a concentration of 3.5 % in oil from the collection performed at 16:00 h. The highest concentration of carvacrol was found in the essential oil of 10:00 h (35.3%), but the concentrations of this component were also significant at other times of collection.  $\alpha$ -Pinene was identified only in the essential oils of 7:00 (5.6 %) and 16:00 h (5.7 %).

Information in regard to the effect of abiotic factors on the yield and chemical composition of the essential oils are important to maximize the production of active constituents of plant species<sup>24</sup>.

#### **Acknowledgments**

The authors acknowledge financial support from FUNCAP and CNPq

**Table 2. Chemical composition and percentage of the components of essential oils of *Lippiagracillis* at different times of collection, on the same day**

Component	KI*	Composition			
		7:00 h	10:00 h	13:00 h	16:00 h
$\alpha$ -Thujene	927	0.5	0.6	-	0.3
$\alpha$ -Pinene	931	5.6	-	-	5.7
Canfene	948	-	0.3	-	-
$\beta$ -Pinene	965	0.3	0.5	1.2	0.3
Myrcene	992	1.6	0.8	2.5	0.8
$\alpha$ -Terpinene	1012	0.6	1.5	0.9	0.5
p-Cymene	1028	6.2	8.0	7.8	4.2
cis-Ocimene	1032	-	7.2	0.2	-
Limonene	1033	0.4	0.5	0.7	0.4
$\gamma$ -Terpinene	1060	2.8	4.3	3.7	3.3
Linalol	1095	-	1.4	0.3	8.4
Borneol	1168	-	-	0.2	-
4-Terpineol	1170	3.3	0.5	0.6	0.3
Thymol methyl ether	1231	0.6	4.4	6.3	-
Carvacrol methyl ether	1239	0.8	0.5	0.9	-
Thymol	1285	44.4	4.2	17.2	3.5
Carvacrol	1296	22.2	35.3	17.1	19.8
Methyl cinnamate	1374	-	16.7	21.0	38.2
$\alpha$ -Copaene	1369	-	-	0.2	-
$\beta$ -Caryophyllene	1405	5.6	6.00	4.2	3.0
Bicyclogermacrene	1491	-	-	-	0.3
$\alpha$ -Humulene	1452	0.5	0.5	0.6	-
$\delta$ -Cadinene	1501	0.3	0.3	0.3	-
Caryophyllene oxide	1581	0.5	0.6	0.2	0.3
Total	-	96.3	94.1	86.1	89.3

KI\*- Kovats index

### References

1. **Lorenzi, H. and Souza, H.S. (2001).** Ornamental Plants From Brazil: bush, grasses and creepers. Plantarum Institute of Studies of the Flora, Nova Odessa. pp. 1030-1056.
2. **Souza, V.C., Lorenzi, H. (2005).** Verbenaceae. Systematic Botany. Plantarum Institute of Studies of the Flora, Nova Odessa, p. 529-532.
3. **Salimena, F.R.G. (2002).** Two new species of *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae) in South America. Hickenia, 3: 145-147.
4. **Matos, F.J.A., Machado, M.L.L., Craveiro, A.A., Alencar, J.W., Silva, M.G. (1999).** Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol-*Lippia sidoides* Cham, and *Lippia gracilis* HBK (Verbenaceae). J. Essent. Oil Res., 11: 666-668.
5. **Blank, A.F., Carvalho-Filho, J.L.S., Santos Neto, A.L. (2004).** Morphological characterization and agronomic hits basil and alfavaca. Hortic. bras, 22: 113-116.
6. **Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., Brito, G.A.C. (2007).** Antimicrobial

- activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian, Braz J. Med. Biol. Res, 40: 349-356.
7. **Murari, A.L., Carvalho, F.H., Heinzmann, B.M., Michelot, T.M., Höner, R., Mallmann, C.A. (2008).** Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. Quim Nova, 31: 1081-1084.
  8. **Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marçal, R.M., Cavalcanti, S.C.H. (2008).** Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource Technol, 99: 3251-3255.
  9. **Matos, F.J.A. (1994).** "Pharmacies Alive: System Use Of Medicinal Plants Designed for Small Communities". Ed. Ufc, Fortaleza, p. 52-54.
  10. **Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., Remmal, A. (2004).** Antifungal Treatment with Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis In Immunosuppressed Rats. Braz. J. Infect. Dis., 8: 217-226.
  11. **Santos, M.R.A., Inneco, R. (2003).** Influence of drying periods of leaf essential oil of lemongrass. Agronomic Science Magazine, 34: 5-11.
  12. **Manganotti, S.A., Souza, M.F., Silva Souza, P.N., Meira, M.R., de Matos, C.C., Martins, E.R. (2011).** Influence of time of collection, geographic orientation and canopy in the production of essential oil of Cordiaverbenacea DC. Biotemas, 24: 9-14.
  13. **Neves, I.A., de Oliveira, J.C.S., da Camara, C.A.G., Schwartz, M.O.E. (2008).** Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco. J. Essent. Oil. Res. 20, 157-160
  14. **Adams, R.P. (2011).** Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Il.
  15. **Alencar, J.W., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A. & Machado, M.I. (1990).** Kovats Indices Simulation in Essential Oil Analysis Quim. Nova, 13(4): 282-4.
  16. **Sousa E.O., Colares A.V., Rodrigues F.G., Campos A.R., Lima S.G., Costa J.G.M. (2010).** Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana Camara* Linn (Verbenaceae) Growing In Brazil Northeastern. Rec. Nat. Prod. 4: 31-37.
  17. **Burt, S. (2004).** Essential oils their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int. J. Food Microbiol, 94: 223-253.
  18. **Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. (1999).** Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Appl. Environ. Microb, 174: 233-238.
  19. **Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S., Alonzo, V. (2004).** Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbiol Letters, 230: 191-195.
  20. **Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev, Washington, 12: 564-582.
  21. **Brophy, J.J., Jogia, M.K. (1986).** Essential oils from Fijian *Ocimum basilicum* L. Flavour Frag. J., 1: 53-55.
  22. **Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Leitão, S.G. (2007).** Chemical And Antimicrobial Analyses Of Essential Oil Of *Lippia organoides* H.B.K. Food Chem., 101: 236-240.
  23. **Morais, L.A.S. (2009).** Influence of abiotic factors on the chemical composition of the essential oils. Hort. bras., 27: 4050-4063.
  24. **Sorensen, J. (2000).** *Melissa officinalis*. Int J. Aromather, 10: 7-15.
  25. **Lima, M.C.L., Lemos, T.L.G., Pessoa, O.D.L., Santiago, G.M.P., Matos, F.J.A., Arriaga, A.M.C., Oliveira, J.P.P.S. (2008).** Composition and biological activities of *Lippia* Aff. *gracillis* essential oil. Chem. Nat. Compd., 44: 254-256.
  26. **Pessoa, O.D.L., Carvalho, C.B.M., Silvestre, J.O.V.L., Lima, M.C.L., Neto, R.M., Matos,**

- F.J.A., Lemos, T.L.G. (2005).** Antibacterial Activity of the essential oil from *Lippia gracillis* Aff. Fitoterapia, 76: 712-714.
27. **Mendes, S.S., Bomfim, R.R., Jesus, H.C., Alves, P.B., Blank, A.F., Estevam, C.S., Antonioli, A.R., Thomazzi, S.M. (2010).** Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil *Lippia gracillis* leaves. J. Ethnopharmacol, 129: 391-397.

## **CAPITULO 5:**

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em sua maioria os vendedores dos mercados públicos no Triângulo Crajubar eram do sexo feminino, apresentavam idade superior a 40 anos e o nível de escolaridade predominante foi o 1º grau incompleto. Avaliando os informantes desse estudo como detentores de conhecimento sobre plantas medicinais, a transmissão de informações ocorreu predominantemente de forma oral e observacional, tanto verticalmente, onde estas foram transmitidas de uma geração a outra em uma mesma família como horizontalmente, pelo contato dos vendedores com os usuários/compradores, demonstrando que os mercados públicos como espaços de convivência contribuem para a disseminação dos hábitos culturais da população.

As espécies vegetais representam um relevante recurso terapêutico local. Os vendedores indicaram 91 espécies úteis para fins terapêuticos, representando 49 famílias botânicas e 89 gêneros. Dentre as famílias, a Fabaceae foi a mais representativa em relação ao número de espécies citadas. Das treze espécies mais versáteis, oito atingiram até cinco categorias de uso: *Ximenia americana*, *Lippia gracillis*, *Stryphnodendron rotundifolium*, *Anacardium occidentale*, *Hymenaea courbail*, *Myracrodruon urundeva*, *Amburana cearenses*, *Himatanthus drasticus*. Dois fatores são preocupantes sob o ponto de vista da conservação dos recursos naturais: o intenso comércio das cascas de seis dessas espécies, exceto da *Lippia gracillis* e da *Himatanthus drasticus*, e o fato de seis delas serem nativas da região, com exceção da *Ximenia americana* e *Hymenaea courbail*.

Entre os vendedores prevaleceu a ideia não verídica de que “o natural não faz mal”. Os modos de preparo mais citados foram decocção, infusão e parte da planta submersa em água. As partes vegetais mais vendidas foram cascas e folhas. A forma de administração mais comum foi a oral. Foram obtidas 291 indicações de uso em 13 categorias de doenças; a categoria com o maior valor de consenso entre os vendedores foi a dos transtornos do sistema digestório.

A partir do perfil por cromatografia líquida de alta eficiência foi possível observar compostos fenólicos e flavonóides na infusão de *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples (IOh) e no decocto de *Cephaelis ipecacuanha* Rich. (DCi). Na IOh, os constituintes observados foram: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, rutina, quercetina e luteolina. No DCi, foram identificados: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido elágico, rutina, quercetina e luteolina.

O rendimento do óleo de *Lippia gracilis* (OELG) extraído de folhas secas foi consideravelmente superior ao das folhas frescas, sendo de 2,6% e 0,6% respectivamente. A análise do OELG por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas identificou os componentes químicos presentes nos óleos essenciais extraídos das folhas frescas e secas dessa espécie sendo os majoritários respectivamente: timol (44,4%; 21,3%), carvacrol (22,2%; 20,09%), *p*-cimeno (6,2%; 8,6%),  $\alpha$ -pineno (5,7%; 19,4%) e  $\beta$ -cariofileno (5,6%; 3,6%). Pode-se concluir que a secagem das folhas interfere tanto no rendimento do óleo essencial quanto no teor dos constituintes químicos. O horário da coleta das folhas de *Lippia gracilis* Schauer também é fator que influencia a quantificação dos princípios ativos presentes no óleo, verificando-se que o horário de maior expressão do timol foi no óleo obtido das folhas coletadas às 7 horas, enquanto do carvacrol, foi na coleta realizada às 10 horas.

A IOh apresentou elevada atividade leishmanicida e tripanossomicida em concentrações iguais ou acima de 250  $\mu\text{g/mL}$ , destacando-se a atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi* na concentração de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  onde a citotoxicidade foi moderada. No geral, a citotoxicidade desse produto natural permite-nos sugerir que sejam realizados estudos para avaliar a sua atividade anticancerígena.

Os produtos naturais IOh e DCi não apresentaram atividade antibacteriana clinicamente relevante para os métodos testados, no entanto os testes de avaliação do potencial modulador demonstram resultados significativos em que o DCi + oxacilina e o DCi + benzipen apresentaram sinergismo frente a todas as bactérias testadas; houve ainda sinergismo quando combinados o DCi + gentamicina contra *E. coli* e DCi + amicacina contra *S. aureus*. A combinação IOh com os antibióticos permitiu efeito sinérgico frente a quase todas as linhagens bacterianas.

O OELG apresentou atividade antimicrobiana significativa contra todas as cepas testadas. Pelos métodos do contato direto e do contato gasoso, a combinação do óleo com os aminoglicosídeos, houve efeito sinérgico em várias combinações. Estes resultados demonstram que as substâncias naturais presentes no EOLG têm a capacidade de modular a resistência bacteriana e podem ser usadas como uma terapia alternativa contra microorganismos multirresistentes, tais como *S. aureus*, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*.

As espécies botânicas e seus metabólitos secundários representam uma ampla fonte de elementos a serem investigados em pesquisas na área da Bioprospecção de Produtos Naturais, principalmente quando guiadas pelo conhecimento que as comunidades locais detêm a respeito do uso medicinal das plantas. No entanto, estudos etnofarmacológicos não podem estar alicerçados somente na busca por substâncias promissoras para as indústrias química e

farmacêutica; é imprescindível que o conhecimento popular seja registrado de forma isenta assegurando a perpetuação de informações que fazem parte da sociobiodiversidade de um povo. E mesmo que as práticas informais de saúde de uma população não sejam validadas cientificamente por métodos laboratoriais, elas continuam sendo válidas dentro de um contexto cultural. Por outro lado, quando dessas informações resultarem benefícios, estes precisam primordialmente ser compartilhados com os detentores locais do conhecimento.

## **REFERÊNCIAS**

---

ADAMS, R. P.; **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

AGUIAR, J. J. S.; SOUSA, C. P. B.; ARARUNA, M. K. A.; SILVA, M. K. N.; PORTELO, A. P.; LOPES, J. C.; CARVALHO, V. R. A.; FIGUEREDO, F. G.; BITU, V. C. N.; COUTINHO, H. D. M.; MIRANDA, T. A. S.; MATIAS, E. F. F.; Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**, v.2, n. 4, p. 151-156, 2015.

AKROUT, A. A.; CHEMIL, R.; SIMMONDS, M.; KITE, G.; HAMMANI, M.; CHREIF, I.; Seasonal variation of the essential oil of *Artemisia campestris* L. **Journal of Essential Oil Research**, n.15, p. 333-336, 2003.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 16, n. 3, p. 273-85, 2002.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N.; As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, p. 678-689. 2006.

ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; ALENCAR, N. L.; Métodos e técnicas para a coleta de dados etnobotânicos. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA R. F. P. & CUNHA, L. V. F. C. C. (Orgs.). **Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica**. 2ed. Recife: Comunigraf, 2008.

ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; **Métodos e técnicas de pesquisa etnobotânica**. Recife: NUPPEA, 2004. 189p.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINSNETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P.; Medicinal plants of the caatinga (semiarid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 114, p. 325–354, 2007a.

ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, A. A.; AMORIN, E. L. C.; Medicinal and magIc plants from a public market in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, n. 1, 2007b.

ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. A.; ALVES, R. R. N.; A pesquisa Etnobiológica em mercados e feiras livres. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; CUNHA, L. V. F. C. (Orgs.). **Métodos e Técnicas na Pesquisa Etnobiológica e Etnoecológica**. Recife: NUPPEA, 2010.

ALBUQUERQUE, U. P.; RAMOS, M. A.; MELO, J. G.; Novas estratégias para a descoberta de drogas em florestas tropicais com base em estudos ecológicos etnobotânicos e químicas. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 140 , p. 197-201, 2012.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats indices simulation in essential oils analysis. **Química Nova** , v. 13, n.4, p. 282-284, 1990.

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.276-85, 2002.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. M. L.; Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.3, n.14, 2005.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; JUNIOR, A. S.; ZANI, C. L.; Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMIRI, M. S.; JOHARCHI, M. R.; Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. **Avicenna Journal of Phytochemistry**. v.3, n.3, p. 254-271, 2013.

AMOROZO, M. C. M.; Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C.; (Ed.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. p. 47-68.

AMOROZO, M. C. M.; VIERTLER, R. B.; A abordagem qualitativa na coleta e análise de dados em etnobiologia e etnologia. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; CUNHA, L. V. F. C. (Orgs.). **Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica**. Recife: NUPPEA, 2010. p.69-70.

ANDRADE, A. M.; GOMES, S. S.; Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**,v.7, n.1, p.181-189, 2003.

ANOSA, G.N.; UDEGBUNAM, R.I.; OKORO, J.O.; OKOROAFOR, O.N. In vivo antimalarial activities of *Enantia polycarpa* stem bark against *Plasmodium berghei* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 28, n. 153, p. 531-4, 2014.

AUGUSTO, L. G. S.; GÓES, M. L.; Compreensões integradas para a vigilância da saúde em ambiente de floresta: o caso da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. n.23, p. 549-558, 2007.

BALDAUF, S. L.; The deep roots of eukaryotes. **Science**. n. 300, p. 1703-1706, 2003.

BENAVIDES-PLASCENCIA, L.; ALDAMA-OJEDA, A. L.; VÁZQUEZ, H. J.; Surveillance of antibiotic utilization and bacterial resistance profiles in tertiary level hospitals in Mexico City. **Salud Publica Mex.**, v. 47, n.3, p. 219- 226, 2005.

BENNETT, B. C.; PRANCE, G. T.; Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of Northern South America. **Economic Botany.**, n. 54, p. 90-102, 2000.

BITU, V. C. N.; BITU, V. C. N.; MATIAS, E. F. F.; LIMA, W. P.; PORTELO, A. C.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015a.

BITU, V. C. N.; COSTA, J. G. M. C.; RODRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; PORTELO, A. C.; SANTANA, N. M.; MENEZES, I. R. A.; Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. **Journal of Essencial Oil Bearing Plants**, 2015b.

BITU, V. C. N.; FECUNDO, H. T. F.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, F. F. G.; SANTANA, N. M.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. **Natural Product Research**, v.28, n. 6, p. 399–402, 2014.

BITU, V.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; VERAS, H. N. H.; MARTINS, K. T.; LYRA, A.; COLUCHI, G. G.; RUELA, R. S.; QUEIROZ, D. B.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; Phytochemical screening and antimicrobial activity of essential oil from *Lippia gracilllis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n.1, p. 69-75, 2012.

BOLOGA, C. G.; URSU, O.; OPREA, T. I.; MELANÇON, C. E.; TEGOS, G. P.; Emerging trends in the discovery of natural product antibacterials. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 678-87. 2013.

BRANDÃO, M. D.; COSENZA, G. P.; PEREIRA, F. L.; VASCONCELOS, A. S.; FAGG, C. W.; Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 8, p. 7013-23, 2013.

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

CARNEIRO, M. R. B.; **A Flora Medicinal no Centro Oeste do Brasil: Um Estudo de Caso com abordagem Etnobotânica em Campo Limpo de Goiás.** Anápolis, 2009.

CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D.; CARVALHO-FILHO, J. L. S.; In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components

against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Química Nova**, v. 6, n. 2, p. 241-244, 2013.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J.; Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v.11, n.16, p.89-188, 2010.

CHIVIAN, E.; **Biodiversity**: its importance to human health. Boston, US, Center for Health and the Global Environment, Harvard Medical School. Available, 2002.

COMEGNA, V.; DAMIANI, P.; SOMMELLA, A.; Scaling the saturated hydraulic conductivity of a vertic ustorthens soil under conventional and minimum tillage. **Soil & Tillage Research**, Madison, n.54, p.1-9, 2000.

COSTA, J. G. M.; ANGELICO, E. C.; RODRIGUES, F. F. G.; MOTA, M. L.; SILVA, M. R., SANTOS, N. K. A.; LEMOS, T. L. G.; Estudo químico-biológicos dos óleos essenciais de *hyptis martiusii*, *lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COUTINHO, H. D.; COSTA, J.G.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA JR, J.P. M. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v.54, n. 4, p. 328-330, 2008.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J.; Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 26, p. 343-356, 2005.

DAZA, R. M.; Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diária. **Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud**, n. 22, 1998.

ELDIN, S.; DUNFORD, A.; **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole. 2001.

ENRÍQUEZ, G. V.; Os caminhos da bioprospecção para o aproveitamento comercial da biodiversidade na Amazônia. **Revista Com Ciência**, v. 64, n. 4, 2005.

FERREIRA, F. S.; ALBURQUERQUE, U. P.; COUTINHO, H. D. M.; ALMEIDA, W. O.; ALVES, R. R. N. T.; The rade in Medicinal Animals in Notheastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; SILVA, J. M. F. L.; SANTOS, F. A. V.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M. M.; COLARES, A. V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SILVA, J. C. F.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; MATIAS, E. F. F.; Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana*

*cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.). **BioMed Research International**, 2013.

FOURNOMITI, M.; KIMBARIS, A.; MANTZOURANI, I.; LESSA, I.; THEODORIDOU, I.; PAPAEMMANOUIL, V.; APSIOTIS, I.; PANOPOULOU, M.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. E.; ALEXOPOULOS, E.; Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 2015.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GARCIA, C. P.; Resistência bacteriana no Chile. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 20, (Supl. 1), p. 11-23, 2003.

GARCÍA, P.C.; Bacterial resistance to antimicrobial agentes. **Revista chilena de infectología**, v.20 (1), p.11-23, 2003.

GOBBO-NETO L.; LOPES, N. P.; Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, n. 30, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, C. E. P.; ARALDID, D.; PANATIERI, R. B.; ROCHA, J. B. T.; ZENI, G.; Antinociceptive proprieties of acetylenic thiophene and furan derivatives evidence for the mechanim of association. **Life Sciences**, v. 76, n. 19, p. 2211-2234, 2005.

HARRIS, E. S.; CAO, S.; LITTLEFIELD, B. A.; CRAYCROFT, J. A.; SCHOLTEN, R.; KAPTCHUK, T.; FU, Y.; WANG, W.; LIU, Y.; CHEN, H.; ZHAO, Z.; CLARDY, J.; WOOLF, A. D.; EISENBERG, D. M.; Heavy metal and pesticide content in commonly prescribed individual raw Chinese Herbal Medicines. **Science of the Total Environment**, v. 15, n. 20, p. 4297-305, 2011.

HEINRICH, M.; Ethnobotany and its role in drug development. **Phytotherapy Research**, v. 14, n.7, p. 479-488, 2000.

HOSTETTMANN, T.; QUEIROZ, F. E.; VIEIRA, C. P. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003.

IBRAHIM, M. A.; MOHAMMED, A.; ISAH, M. B.; ALIYU, A. B.; Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 28, n. 154(1), p. 26-54, 2014.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. A ntibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.

JARDIM, M. A. G.; SILVA, J. C.; COSTA-NETO, S. V.; Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodal, Município de Maracanã, Estado do Pará, Brasil Resultados preliminares. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 8, n. 6(3), p. 117-118, 2005.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M. L. New antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 107-3113, 1996.

KHAN, S. M.; PAGE, S.; AHMAD, H.; SHAHEEN, H.; ULLAH, Z.; AHMAD M.; HARPER, D. M.; Medicinal flora and ethnoecological knowledge in the Naran Valley, Western Himalaya, Pakistan. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 4, 2013.

KPOVIESSI, S.; BERO, J.; AGBANI, P.; GBAGUIDI, F.; KPADONOU-KPOVIESSI, B.; SINSIN, B.; ACCROMBESSI, G.; FRÉDÉRICH, M.; MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 151, p. 652–659, 2014.

LADIO, A. H.; LOZADA, M.; Os padrões de uso e conhecimento de plantas silvestres comestíveis em ambientes ecológicos distintos: um estudo de caso de uma comunidade Mapuche do noroeste da Patagônia. **Biodiversidade e Conservação**, v. 13, n. 6, p. 1153-1173, 2004.

LAVOR, A. K. L. S.; MATIAS, E. F. F.; ALVES, E. F.; SANTOS, B. S., FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, L. B. B.; BRITO, D. I. V.; ALBUQUERQUE, R. S.; COUTINHO, H. D. M.; Association between drugs and herbal products: In vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). **European Journal of Integrative Medicine**, n. 6, p. 301–306, 2014.

LEE, M. R.; Ipecacuanha: the South American vomiting root. **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 38, n. 4, p. 355-60, 2008.

LEITÃO, F.; FONSECA-KRUEL, V. S.; SILVA, I. M.; REINERT, F.; Urban ethnobotany in Petrópolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brazil). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 333-342, 2009.

LEMOS, J. C.; LIMA, S. C. D.; A Geografia Médica e as doenças infecto-parasitárias. **Revista Caminhos de Geografia**, Instituto de Geografia/UFU/MG, 2002. pp.74-86.

LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M.; Warburgia : Uma revisão abrangente da botânica, usos tradicionais e fitoquímica. **Jornal de Etnofarmacologia**, n. 165, p. 260-285, 2015.

LE SENNE, A., MUELAS-SERRANO, S., FERNANDEZ-PORTILLO, C., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A.; Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1101–1105, 2002.

LIMA, R. A.; MAGALHÃES, S. A, SANTOS, M. R. A.; Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas na cidade de Vilhena, Rondônia. **Revista Pesquisa & Criação**, v.10, n.2, p.165-179, 2011.

LULEKAL, E.; ASFAW, Z.; KELBESSA, E.;VAN-DAMME, P.; Ethnomedicinal study of plants used for human ailments in Ankober District, North Shewa Zone, Amhara Region, Ethiopia, **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2013.

MACÍA, M. J.; GARCÍA, E.; VIDAURRE, P. J.; An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. **Journal of Ethnobiology**, n. 97, p. 337-350, 2005.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. DE; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E.; **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220p.

MATI, E., BOER, H.; Contemporary Knowledge of dye plant species and natural dye use in Kurdish autonomous Region, Iraq. **Economic Botany**, v. 64, n. 2, p. 137-148, 2010.

MATIAS, E. F. F.; ALVES, E. F.; SANTOS, B. S.; SOUZA, C. E. S.; FERREIRA, J. V. A.; LAVOR, A. K. L. S.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; SANTOS, F. A. V.; PEIXOTO, F. S. N.; COLARES, A. V.; BOLIGON, A. A.; SARAIVA, R. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T. DA; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicin**. 2013.

MELO, J. O.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; Native medicinal plants commercialized in Brazil- priorities for conservation. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 156, p. 567-580. 2009.

MENEZES, M. A. G.; OLIVEIRA NETO, F. B.; BERTINI, L. M.; ALVES, L. A.; SILVA, F. F. M.; Quantificação de antocianinas dos extratos de embiratanha (*Pseudobombax marginatum*). **HOLOS**, v. 31, n. 1, 2015.

MONTEIRO, J. M.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; Local Markets and Medicinal Plant commerce: A Review with Emphasis on Brazil. **Economic Botany**, v. 64, n. 4, 2010.

MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an

urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 178, p. 179-202, 2011.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, GLÁUCIA M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D. M.; Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.12, n.1, p. 38 – 43, 2013.

MOREIRA, R. C. T.; Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas Mediciniais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmáutica Bonaerense**, v. 21, n. 3, 2002.

MORI, L. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADIN, L.; **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. Centro de Pesquisa do Cacau, Ilhéus, 1989, 104p.

MUHAISEN, H. M.; AB-MOUS, M. M.; DDEEB, F. A.; RTEMI, A. A.; TABA, O. M.; PARVEEN, M. Antimicrobial agents from selected medicinal plants in Libya. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 2015.

NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade de Recife – PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.56-64, 2005.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically**. 6ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standart M7-A6, 2003.

NEGRELLE, R.R.B.; TOMAZZONI, M.I; CECCON, M.F; VALENTE, T.P. Estudo etnobotânico junto à Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes: subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica de Saúde do município de Cascavel (Paraná). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.6-22, 2007.

NEVES, I. A.; OLIVEIRA, J. C. S.; SELVA, T. M. G.; SCHWARTZ, M. O. E.; CAMARA, A. G.; Composição química do óleo das folhas de *Lippia gracillis* Schauer de duas localidades de Pernambuco. **Journal of Essential Oils**, v.2, p.32-36, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S.; Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletronica de Enfermagem**, n. 10, p. 189-97, 2008.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 571-577, 2010.

OLIVEIRA, R. L. C.; Etnobotânica e plantas medicinais: estratégias de conservação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 10, n. 2, p.76-82, 2012.

OMENA, M. L. R. A.; Ensaio Etnofarmacológico de espécies vegetais com ação no Sistema Nervoso Central, Originárias do Bioma Caatinga. **Saúde e Ambiente em Revista**. V. 2, n. 2, p. 92-117, 2007.

PAES, N. A.; SILVA, L. A. A.; Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil: uma década de transição. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 6, n. 2, 1999.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método de avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.1, p. 345-353, 2007.

PEREIRA, C. S.; BELO, R. S. A.; KHOURI, S.; CARDOSO, M. A. G.; Desenvolvimento de uma formulação farmacêutica utilizando óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia*. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. **Resumos...** São José dos Campos: UNIVAP, 2009.

PESSOA, O. D. L.; CARVALHO, C. B. M.; SILVESTRE, J. O.V. L.; LIMA, M. C. L.; NETO, R. M.; MATOS, F. J. A.; LEMOS, T. L. G.; Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. Gracillis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 712-714, 2005.

RIBEIRO, T. G.; NASCIMENTO, A. M.; HENRIQUES, B. O.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; FRANÇA, J. R.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H.; LAGE, D. P.; RODRIGUES, L. B.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; FARACO, A. A.; COELHO, E. A.; CASTILHO, R. O.; Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

RIOS, J. L.; RECIO, M.; Medicinal plants and antimicrobial plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.80-4, 2005.

RIVERÓN, F. F.; HERNÁNDEZ, J. L.; MARTÍNEZ, L. P.; BETARTE, C. M. Resistência Bacteriana. **Revista Cubana de Medicina Militar**, v.32, n.1, p.44-48, 2003.

RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. B. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 162-166, 2007.

ROLDÓS, V., NAKAYAMA, H., ROLON, M., MONTERO, A.T., TRUCCO, F., TORRES, S., VEGA, C., PONCE, Y.M., HEGUABURU, V., YALLUFF, G., GOMES-BARRIO, A.,

SANABRIA, L., FERREIRA, M.E., DE ARIAS, A.R., PANDOLFI, E.; Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: In silico, in vitro and in vivo activity studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p. 1797–1807, 2002.

SANTOS, E. B.; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; DINIZ, M. F. F. M.; SAMPAIO, F. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 19, p. 321-324. 2009.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. B. B. M.; GUEDES, G. M. M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 130-132, 2012.

SANTOS, N. Q.; A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto - Enfermagem**, Florianópolis, v. 13, n. spe, 2004 .

SHANLEY, P.; LUZ, L.; The impacts of forest degradation on medicinal plant use and implications for health care in Eastern Amazonia. **BioScience Journal**, v. 53, n. 6, p. 573-584, 2003.

SHARIFI-RAD, J.; ALFATEMI, S. M. H.; SHARIFI-RAD, M.; MIRI, A.; Frequency of Adenoviruses, Rotaviruses and Noroviruses Among Diarrhea Samples Collected From Infants of Zabol, Southeastern Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 3, 2015.

SILVA, C. F.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, W. W.; RODRIGUES, O. G.; VILELA, V. L. R.; MARINHO, P. V. T.; *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples in natura sobre nematóides gastrintestinais de caprinos, naturalmente infectados, em clima semi-árido. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.12, n. 4, p. 466-471, 2010.

SILVA, M. I. G.; **Utilização de fitoterápicos nas Unidades Básicas de Atenção à Saúde da Família, no Município de Maracanaú – Ceará**. Dissertação (Mestrado em ciencias Farmaceuticas) – Faculdade de Farmacia, Odontologia e Enfermagem. 160p., 2003.

SILVA, M. S.; PEIXOTO, A. L.; O abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 325-332, 2009.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H.; Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, n. 99, p. 3251-3255, 2008.

TRAORE, Y.; PADDEA, S.; BOUCHARD, P. J. AND GHARGHOURI, M. A.; Measurement of the residual stress tensor in a compact tension weld specimen. **Experimental Mechanics**, v. 53, n.4, p. 605–618, 2013.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D. T.; Estudo Sobre o Comércio Informal de Plantas Medicinais em Goiânia e Cidades Vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2006.

TROTTER, R.; LOGAN, M.; Informant consensus: A new approach for identifying potentially effective medicinal plants. Indigenous medicine and diet: biobehavioural approaches. **New York Journal de Etnofarmacologia**. p.91-112, 1986.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J., BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O.; Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 3, p. 805-813, 2009.

VAN-ANDEL, T.; MYRENB, B.; VAN-ONSELEN, S.; Ghana's herbal market. **Journal Ethnopharmacology**, p11, 2006.

VEGA, C., ROLÓN, M., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R., ESCARIO, J.A., GÓMEZ-BARRIO, A.; A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing b-galactosidase. **Parasitology Research**, v. 95, p. 296–298, 2005.

VEIGA-JUNIOR V. F, MELLO, J. C. P.; As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, n.18, p. 464-471, 2008.

VERAS, H. N. H.; SANTOS, I. J. M.; SANTOS, A. C. B.; FERNANDES, C. N.; MATIAS, E. F. F.; LEITE, G. O.; SOUZA, H. H. F.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; Comparative Evaluation Of Antibiotic And Antibiotic Modifying Activity Of Quercetin And Isoquercetin In Vitro. **Current Topics In Nutraceutical Research**, v. 9, n. 1/2, p. 25-30, 2011.

# **ANEXOS**

---

## ANEXO A: Normas para publicação no periódico Journal of Ethno-pharmacology

### Elsevier for authors

#### Publish in an Elsevier journal. The process step by step.

##### Prepare your paper for submission

Before you begin

Read your journal's Guide for Authors. It contains requirements specifically for the journal you want to submit to. You need to consider topics in advance related to ethical requirements, open access options, copyright and funding body agreements relevant for that journal. This guide can be found on the journal's homepage.

In addition, download our '**Get Published**' quick guide with a one page overview of the most essential steps in preparing a paper.

This is also available in **Chinese**

Preparation of your paper

Consulting and following the instructions in the Guide for Authors on the journal's homepage is essential. You will find information about:

- article structure
- abstract
- highlights
- keywords (see the 'Promote your work' section for more on Search Engine Optimization)
- accepted formats for artwork, data sources and video

Content enhancement Content innovations available for your journal of choice also require preparation. Examples include **article-based publishing, graphical abstracts, highlights** and **Google Maps**

##### Additional resources

Understand the Publishing process

More general background information about the publishing process can be found in the **Understanding the publishing process** guide. It covers topics such as using EES, Authors' Rights, Ethics & Plagiarism, the Impact Factor and other so-called bibliometric indicators

Online training

Watch short and long videos to educate yourself on the Publishing process. Visit our **Early career resources** area and chose any topic related to funding, writing, reviewing and publishing.

Avoiding grammar and artwork mistakes

Elsevier has created a **language editing checklist** to help authors avoid some of the more common errors and grammatical mistakes found in papers. We also provide basic **author artwork and multimedia instructions**.

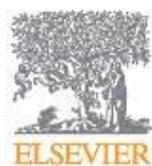
Elsevier Author **WebShop** services offer

- **language editing and quality services** which ensure that your manuscript is free of grammatical and spelling errors within five business days

**WebShop**  
webshop.elsevier.com

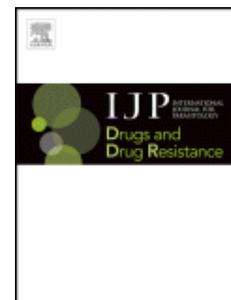
- **illustration services** offer you world-class artistic support for your professional research and images. You can easily upload your drafted illustrations, sketches, or just an idea, and we will send you a free time and cost proposal within 24 business hours. Following acceptance and payment, the illustration will be delivered within a couple of days. Illustrations are offered in four categories: Medical, Technical, Scientific, and Graphs, Charts and Tables.

## ANEXO B: Normas para publicação no periódico International for parasitology: drugs and drug resistance



# INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY: DRUGS AND DRUG RESISTANCE

Sponsored by the Australian Society for Parasitology



### INFORMATION PACK

### AUTHOR

#### DESCRIPTION

*The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance* publishes the results of original research in the area of anti-parasite drug identification, development and evaluation, and parasite drug resistance. The journal also covers research into natural products as anti-parasitic agents, and bioactive parasite products. Studies can be aimed at unicellular or multicellular parasites of human or veterinary importance.

A list showing the types of articles that are considered is included below. Original research includes the development of novel and innovative concepts and ideas, as well as experimental and observational science that raises new hypotheses. Because of its breadth of organism coverage, all contributions should include relevant information about the parasite of interest in order to be comprehensible to non-experts in the particular subject of the articles. The principal form of publication is the full length article which contains substantial results from a major program of research. The journal also accepts brief reports that have similar subject scope as the full-length article, but do not merit a full-length publication.

In addition, the journal provides a medium for highlighting selected articles reporting highly significant original findings, as Editor's Choice Manuscripts. It also commissions articles with emphasis on shorter, focused Reviews of topical issues and strategically important subjects. The journal encourages critical comment and debate on matters of current controversy in the area of parasite drug resistance and anti-parasite drugs via "Current Opinions".

This title is fully open access and therefore funded not through library subscription payments but through author fees. If you would like your article to be published open access, but you genuinely cannot afford these fees, then individual waiver requests are considered on a case-by-case basis and may be granted in cases of genuine need. Priority for this waiver programme will be given to applications by authors from countries eligible for the Research4Life programme (see <http://www.research4life.org/institutions.html>).

**Types of articles considered:** Compound library screening for inhibitors against enzymes or whole parasites Drug target validation (chemical and/or genetic) Drug target identification (must include some inhibitor studies rather than characterisation of an enzyme, for example) Drug structure-activity relationship studies Mechanisms of drug action and resistance Reports of the development of drug resistance both in the field and

laboratory Studies on drug toxicity to the host (either on single host cells or whole organism) Reports on toxicity in the field Computational approaches to drug discovery or drug-target identification Development of assays directed at screening for inhibitors Drug combination studies Natural products as anti-parasitic agents Bioactive products produced by parasites Use of live parasites as immunomodulatory agents Epidemiological aspects of the emergence and spread of parasite drug resistance Human clinical trials

---

## AUDIENCE

Parasitologists, Zoologists, Entomologists, schools of tropical medicine.

---

## IMPACT FACTOR

2014: 3.294 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

---

## EDITORIAL BOARD

### **Editors in Chief:**

**Andrew Kotze**, Principal Research Scientist, CSIRO Agriculture Flagship , St Lucia, QLD, Australia  
**Kevin Saliba**, Research School of Biology, The Australian National University, Acton, ACT, Australia

### **Managing Editor:**

**Meghan Jendrysik**, Elsevier Inc., Cambridge, Massachusetts, USA

### **Associate Editors:**

**K. Andrews**, Griffith University, Nathan, Queensland, Australia  
**M. Barrett**, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK  
**C. Caffrey**, University of California at San Francisco (UCSF), San Francisco, California, USA  
**S. Croft**, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK  
**H. de Koning**, University of Glasgow, Glasgow, UK  
**A. Djimdé**, University of Bamako, Bamako, Mali  
**T.G. Geary**, McGill University, Ste-Anne de Bellevue, Quebec, Canada  
**N. Goyal**, CSIR-Central Drug Research Institute, Lucknow, India  
**T. Graczyk**, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA  
**N. Jonsson**, University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK  
**R. Kaplan**, University of Georgia, Athens, Georgia, USA  
**K. Kita**, University of Tokyo, Tokyo, Japan  
**C. Lanusse**, Universidad Nacional del Centro, Tandil, Argentina  
**R. Martin**, Iowa State University, Ames, Iowa, USA  
**A. Maule**, Queen's University Belfast, Belfast, UK  
**S. Moreno**, University of Georgia, Athens, Georgia, USA  
**J. Morris**, Clemson University, Clemson, South Carolina, USA  
**R. Price**, Menzies School of Health Research, Winnellie, Northern Territory, Australia  
**S. Ralph**, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia  
**N.C. Sangster**, Charles Sturt University, Wagga Wagga, New South Wales, Australia  
**P. Skuce**, Moredun Research Institute, Edinburgh, Scotland, UK  
**A. Thompson**, Murdoch University, Murdoch, Western Australia, Australia  
**G. Von Samson-Himmelstjerna**, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany  
**A. Wolstenholme**, University of Georgia, Athens, Georgia, USA  
**D. Woods**, Pfizer Animal Health, Kalamazoo, Michigan, USA

---

## GUIDE FOR AUTHORS

### INTRODUCTION

The *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* publishes the results of original research in the area of anti-parasite drug identification, development and evaluation, and parasite drug resistance. The journal also covers research into natural products as anti-parasitic agents, and bioactive parasite products. Studies can be aimed at unicellular or multicellular parasites of human or veterinary importance. Because

of its breadth of organism coverage, all contributions should include relevant information about the parasite of interest in order to be comprehensible to non-experts in the particular subject of the articles.

### **Types of article**

The principal form of publication is the full length article which contains substantial results from a major program of research. The journal also accepts brief reports that have similar subject scope as the full-length article, but do not merit a full-length publication.

In addition, the journal provides a medium for highlighting selected articles reporting highly significant original findings, as Editor's Choice Manuscripts. It also commissions articles with emphasis on shorter, focused Reviews of topical issues and strategically important subjects. The journal encourages critical comment and debate on matters of current controversy in the area of parasite drug resistance and anti-parasite drugs via "Short Communication".

### **Contact details for submission**

General enquiries prior to submission should be directed to the Editorial Office: [IJPDDR@elsevier.com](mailto:IJPDDR@elsevier.com)

### **BEFORE YOU BEGIN**

#### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### **Policy and ethics**

**Care of experimental animals.** It is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with their national animal ethics guidelines. Submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially interventions such as surgery and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

**Clinical studies.** If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the manuscript contains a statement that all procedures were performed in compliance with relevant laws such as *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> and institutional guidelines and that the appropriate institutional committee(s) has approved them. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

The required form can be downloaded at: <http://ees.elsevier.com/ijpddr/img/COI.pdf>. You will be asked to upload the completed and signed form as part of the submission process. The corresponding author may sign on behalf of all the authors.

#### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously

(except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published :* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information on author rights please see <http://www.elsevier.com/copyright>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This is an open access journal: all articles will be immediately and permanently free for everyone to read and download. To provide open access, this journal has an open access fee (also known as an article publishing charge APC) which needs to be paid by the authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution. Permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses (see

<http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>):

*Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 1750**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

**Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

**Submission**

Submission to this journal proceeds totally online at <http://ees.elsevier.com/ijpddr> and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

The final pdf should be no larger than 5 MB.

If file size cannot be reduced to less than 10 MB, the author should contact the IJPDDR Editorial Office for instructions ([IJPDDR@elsevier.com](mailto:IJPDDR@elsevier.com)).

*Required Information:*

Name, affiliation, email, telephone and fax numbers and mail address information for one corresponding author.

This must be the same person nominated as corresponding author on the manuscript title page and this person must submit the manuscript on-line.

The corresponding author, through the web access, is responsible for actions with respect to each paper. E-mail prompts will be delivered only to the corresponding author. Articles can also be tracked by the corresponding author via the online system.

Name and affiliations of all other authors.

Cover letter is mandatory for all submissions and should address the novelty, significance of the work. Order of files

Manuscript should contain (in order) Title, Authors and addresses, Corresponding Author and address, Abstract, Keywords. In numbered sections: 1. Introduction; 2. Materials and methods; 3. Results; 4. Discussion; then Acknowledgements; References; Legends to Figures. Tables with their legends (in separate or combined files, numbered, in order). Figures (in separate files); preferred formats: JPEG, EPS or PDF. Supplementary and

multimedia files.

#### Format

The preferred format for the text is Microsoft Word. The title page, abstract and text should be formatted with line numbers. The manuscript should be formatted to A4 size paper, in English, double spaced and with 2 cm margins.

#### Further journal requirements

During submission you will also have to confirm that all authors have read the manuscript and accept responsibility for its contents and agree to an 'Ethics in Publishing' document.

#### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the Editors retain the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

#### **PREPARATION**

The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions.

#### **Article structure**

##### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

##### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

##### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

##### *Results*

Results should be clear and concise. For brief reports, the Results and Discussion sections need to be combined.

##### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

##### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which

may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

This journal does not publish appendices. Information should be included within the manuscript text or provided as supplementary material.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### *Abstract*

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The maximum length of the abstract is 300 words.

#### **Graphical abstract**

A graphical abstract is mandatory for this journal. Authors should supply a thumbnail image for all types of manuscripts. Articles accepted for publication will be featured via a copy of the article abstract together with a thumbnail image to direct people to the manuscript. An image that serves to illustrate the theme of the paper is desired. It can be a figure from the paper or a related image that typifies the content of the paper. Authors must supply the thumbnail image separately as an electronic file. The maximum final dimensions of the thumbnail image will be 5 cm x 5 cm. Please consider readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself.

#### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### **Abbreviations**

Avoid the use of abbreviations, but if necessary, authors should use the list (click here to see

list) as a guide to those terms that need not be given in full, or define each abbreviation on first use.

### **Acknowledgments**

Authors should provide confirmation of consent from persons acknowledged in manuscripts for example personal communications. This can be provided in a covering letter or by e-mail to the editorial office.

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Footnotes**

Footnotes should only be used in tables. Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork** *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color Artwork*

Illustrations of all kinds should be listed together under 'Legend to Figures' numbered consecutively and their positions indicated in the text. Figures should be high quality, of an adequate size to ensure clarity, and letters and numbers should be at least 4 mm in height. Magnification should be indicated by inclusion of a scale bar in the figure and its value should be indicated on the figure or in the legend. Each figure should be obvious from its file name. If images have been altered, describe the nature of changes made and software used. This information should be included in the 'Materials and methods' section of the manuscript.

### **Illustration services**

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical- style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

#### **References**

Correct references are the responsibility of the author. Please ensure that all references cited in the text are included in the reference list.

References in the text start with the name of the author(s), followed by the publication date in brackets, e.g. 'Combes (2001) has shown the importance of ...', or '... has been described (Combes, 2001; Kumar et al., 2004) ...', using date order. More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by two authors, use (Sangster and Dobson, 2002) or for more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al.

The references in the reference list should be in alphabetical order. References to journal articles should contain names and initials of all author(s), year of publication, article title, abbreviation of the name of the journal, volume number and page numbers.

Unpublished data, personal communications and papers 'in preparation' or 'submitted', abstracts (whether published or not) and these should not be listed in the references (but may be incorporated at the appropriate place in the text); work "in press" may be listed only if it has been accepted for publication. Personal communications must be accompanied by a letter or e-mail from the named person(s) giving permission to quote such information. References to books should also include the title (of series and volume), initials and names of the editor(s) and publisher and place of publication.

#### *Examples:*

Combes, C., 2001. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. University of Chicago Press, Chicago and London.

Kumar, N., Cha, G., Pineda, F., Maciel, J., Haddad, D., Bhattacharyya, M.K., Nagayasu, E., 2004. Molecular complexity of sexual development and gene regulation in *Plasmodium falciparum*. Int. J. Parasitol. 34, 1451-1458.

Pettersson, E.U., Ljunggren, E.L., Morrison, D.A., Mattsson, J.G., in press. Functional analysis and localisation of a delta-class glutathione S-transferase from *Sarcoptes scabiei*. *Int. J. Parasitol.*

Sangster, N.C., Dobson, R.J., 2002. Anthelmintic resistance. In: Lee, D.L. (Ed.), *The biology of nematodes*. Taylor and Francis, London and New York, pp. 531-567.

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references to published articles can be included in the reference list. Other web references such as software programs, databases and individual web pages, should have the reference details included at the appropriate place within the text.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/international-journal-for-parasitology-drugs-and-drug-resistance> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-

ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the NLM catalogue: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these

within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com> Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Supplementary data**

For non-integrated supplementary files, a footnote should be typed on the title page of the manuscript:

'Note: Supplementary data associated with this article. A copy of supplementary material should be submitted at the same time as the manuscript. Preferred formats are Microsoft Office for text or graphics and AVI for movie files. Maximum size of files is 10 MB. If files cannot be reduced to 10MB, authors should contact the IJPDDR Editorial Office at [IJPDDR@elsevier.com](mailto:IJPDDR@elsevier.com). Please submit the supplementary data as one file containing all the supplementary figures and tables.

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web).

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

If you use the DOI to create hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

### ***Online proof correction***

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

### ***Additional information***

#### ***Submission of sequence data to databases***

Novel nucleotide or protein sequence data must be deposited in the GenBank™, EMBL or DDBJ databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the collaborating databanks is sufficient to ensure entry in all. The accession number should be included as a footnote on the title page of the manuscript: 'Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession number(s)'. If requested the database will withhold release of data until publication. The usual method for submitting sequence data is by the World Wide Web to either GenBank (via BankIt:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>), EMBL (via WebIn: <http://www.ebi.ac.uk/subs/allsubs.html>) or to DDBJ (via SAKURA: <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>). Special types of submissions, such as genomes, bulk submissions, segmented sets, and population/phylogenetic/mutation studies, can be more easily prepared with the Sequin programme (available from the above Web sites). Authors are encouraged by the databases to update their entries as the need arises.

**GenBank/DNA sequence linking.** In order for automatic links to be made between papers and GenBank, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See the example). When published they will appear in normal type.

Example: ' GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)' .

Additionally, any multiple alignments of nucleotide or protein data must be submitted to a recognised database and must also receive a unique accession number. The accession number can appear in the text in the relevant section of the Results, as: ' Alignment files are available by anonymous FTP from FTP.EBI.AC.UK in directory/pub/databases/embl/align or via the EMBLALIGN database via SRS at <http://srs.ebi.ac.uk>; under accession(s)' . The usual method for submitting alignments is by the World Wide Web to the European Bioinformatics Institute (via Webin-Align: <http://www.ebi.ac.uk>). Microarray data, in MIAME-compliant format, should be submitted to ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Accession identifiers relating to the data should be provided in the manuscript text.

**Policy on bioinformatics papers.** In silico analysis: The following guidelines apply to papers that exclusively use in silico analysis or rely heavily on this approach for analysis and conclusions. Such papers should address a significant biological issue or issues. Bioinformatic data should be supported by novel or published biological data. Work would typically use information from a number of databases and even from a number of parasite or host species and use a number of analytical methods. Types of ' metaanalysis' are encouraged either across a wide range of parasites or, say, at a number of points in a metabolic or signalling pathway or an immune cascade. In silico analysis may be especially suitable for review articles.

*Guidelines for reporting of protein identifications using mass spectrometry*

The following information should be provided for protein or peptide identifications using mass spectrometry:

1. The program, and version number, used to create peak lists and the parameters used in the creation of the list.
2. The program, and version number, of the program used for database searching. Parameters used for searching should be specified, including, but not limited to, precursor-ion mass tolerance, fragment- ion mass tolerance, modifications allowed for, missed cleavages and enzymes used in protein cleavage.
3. The name and version number of the sequence database used in searches. If a custom-made database is used then complete information on the origin of the sequences and database size should be disclosed. Given the dependence of scoring on database size, the use of a small database, or one excluding contaminants, should be justified.
4. A short description of the methods use to interpret the significance of search results, including any statistical analysis, confidence thresholds and other values specific to judging the certainty of the identification.

5. For large-scale experiments a false-positive determination should be reported. This may be the result of randomized database searches or other approaches.
6. Each protein identification should include the accession number, score generated by the search algorithm used, sequence coverage and the number of unique peptide sequences assigned in the protein identification.
7. Single peptide identifications should include an annotated MS/MS spectrum showing fragment assignments together with the peptide sequence, precursor mass, charge and error.
8. Identifications arising from peptide mass fingerprinting should include an annotated mass spectrum. The number of matched peaks, the number of unmatched peaks and the sequence coverage should also be reported along with all parameters and thresholds used to analyse the data. This includes mass accuracy, resolution, calibration methods, contaminant exclusions along with the scoring scheme used and measure of the false-positive rate.

**Author inquiries**

For inquiries relating to IJPDDR please contact the Managing Editor of IJPDDR at: [IJPDDR@elsevier.com](mailto:IJPDDR@elsevier.com). You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

© Copyright 2014 Elsevier |  
<http://www.elsevier.com>

## ANEXO C: Normas para publicação no periódico BioMed

BioMed Central's online submission system makes the process of publishing research in BioMed Central's journals simple and efficient. To help, there is a **quick instructions guide** outlining the key aspects of the online submission process, including tips and advice, plus links out to additional pages for more information.

For full detailed instructions for authors for each journal use the drop down menu below to choose the relevant journal and then click the 'Instructions for Authors' button.

### **Submit a manuscript**

Parte inferior do formulário

### **Quick instructions guide**

---

**Online submission** | **Manuscript preparation** | **Illustration/figure preparation** | **Submitting your article**

### **Online submission**

---

BioMed Central journals use online submission. The submission process is compatible with all major web browsers and can be used from PC, Mac, or Unix platforms.

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time: when users return to the site, they can carry on where they left off.

### **Manuscript preparation**

---

#### ***Word processing formats***

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document for all of BioMed Central journals:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- TeX/LaTeX (use **BioMed Central's TeX template**)

Please visit **My BioMed Central** for instructions for uploading files.

Please note that figures and additional files must be submitted as separate files, not as part of the main manuscript file. See the **Additional Files Quick Reference** for more information.

### **Illustration/figure preparation**

---

Each figure should be submitted as a separate graphics file. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file is submitted that contains all parts of the figure.

***Illustration file formats***

All of BioMed Central's journals accept the following formats for figure files:

- EPS (preferred format for diagrams)
- PDF (also especially suitable for diagrams)
- TIFF (for photographs and screen dumps, 300 dpi if possible)

Text within figures should usually be either Arial or Helvetica fonts; Courier may be used if a monospaced font is required. Text should be designed to be legible when the illustration is scaled to a width of 600 pixels.

**Submitting your article**

---

When a manuscript is ready to be submitted please go to the **Submit a manuscript page** and choose one of the peer-reviewed journals for the research article. Then follow the step by step process to submit the article.

**ANEXO D:** Normas para publicação no periódico Natural product research

## Submission of Manuscripts

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher.

Authors are strongly encouraged to submit their manuscripts as a single file in electronic form (email); all graphics and tables can be integrated into the manuscripts where author wishes to place them, or mail (post) to any of the following Editors:

1. Dr. Pawan K. Agrawal  
Natural Product, Inc.  
7963, Anderson Park Lane  
Westerville, OH, 43081  
USA  
Email: [agrawal@naturalproduct.us](mailto:agrawal@naturalproduct.us)
2. Professor Alejandro F. Barrero  
Department of Organic Chemistry  
University of Gandade  
Campus De Fuente Nueva,  
S/N, 18071, Granada Spain  
Email: [afbarre@ugr.es](mailto:afbarre@ugr.es)
3. Professor Alessandra Braca  
Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia  
Universita di Pisa,  
via Bonanno, 56125 Pisa  
Italy  
Email: [braca@farm.unipi.it](mailto:braca@farm.unipi.it)
4. Professor Dean Guo  
State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs  
School of Pharmaceutical Sciences, Peking University

Beijing 100083

China

Email: **gda5958@163.com**

5. Professor Yoshihiro Mimaki  
School of Pharmacy  
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences  
Hachioji, Tokyo 192-0392  
Japan  
Email: **mimakiy@ps.toyaku.ac.jp**
6. Professor Professor Stephen G. Pyne  
Department of Chemistry  
University of Wollongong  
Wollongong, New South Wales, 2522  
Australia  
Email: **spyne@uow.edu.au**
7. Professor Manfred G. Reinecke  
Department of Chemistry  
Texas Christian University  
Fort Worth, Texas 76129  
USA  
Email: **m.reinecke@tcu.edu**
8. Professor Yasuhiro Tezuka  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Hokuriku University  
Ho-3 Kanagawa-machi  
Kanazawa 920-1181  
Japan  
Email: **y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp**
9. Professor David E. Thurston  
Department of Pharmacy and Forensic Science  
King's College London  
Britannia House, 7 Trinity Street

London SE1 1DB

UK

Email: **david.thurston@kcl.ac.uk**

Electronic Submission:

In order to speed up processing times, Authors are strongly encouraged to prepare their manuscripts using template and saved in PDF format to ensure the integrity of the file. Adobe Acrobat (full version) is required to convert files to PDF format. The original Word and graphic files should also be submitted.

Manuscripts can also be submitted via email (as an attachment) without using template, although this is not the preferred option; all graphics and tables can be integrated into the manuscripts where author wishes to place them. Authors are encouraged to save their manuscript in PDF format. The original Word and graphic files should also be submitted.

In creating the electronic version of their manuscript, authors are requested to follow the guidelines. The paper should be submitted as a single file, prepared with a standard word-processor such as Microsoft Word, with embedded tables and graphics. Please note that any embedded graphics must also be submitted as separate, original files. It is possible to submit an article in PostScript or Adobe Acrobat PDF format, but if article is accepted, the original source files will be needed. All correspondence between authors, reviewers and editors is performed by email and no paper correspondence is necessary. However, authors are still legally obliged to sign and return a physical transfer of copyright form by conventional mail.

If the authors are asked to revise their manuscripts, the revised manuscript must be returned to the Editors within one month; otherwise, it may be deemed to be new and subject to further review.

Authors are advised to keep a backup copy of both the electronic files and original manuscript for reference and safety since Editors cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

Suggested Referees:

Authors are encouraged to supply the names, addresses, and email addresses of 3-4 potential referees. Authors may also mention persons who they would prefer not to

review their paper.

Submission Checklist:

- Letter including statement of justification for publication
- A single Word file containing text, tables, and graphic materials
- A PDF version of same file
- Names of potential referees
- Supporting materials as appropriate
- Completed copyright transfer form

Editorial Authority:

The Editors reserve the right to make alterations to manuscripts submitted for publication. Such alterations will be made if manuscripts do not conform with accepted scientific standards or if they contain matter which in the opinion of the Editors is unnecessarily verbose or unclear. Alterations may be queried, but this will inevitably delay publication.

## ANEXO E: Normas para publicação no periódico Molecules

### Instructions for authors

#### SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the **guide for ScholarOne authors** before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

#### Regular articles

These should describe new and carefully confirmed findings, and experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

#### Short Communications

A Short Communication is suitable for recording the results of complete small investigations or giving details of new models or hypotheses, innovative methods, techniques or apparatus. The style of main sections need not conform to that of full-length papers. Short communications are 2 to 5 printed pages (about 6 to 15 manuscript pages) in length.

#### Reviews

Submissions of reviews and perspectives covering topics of current interest are welcome and encouraged. Reviews should be concise and no longer than 4-12 printed pages (about 12 to 36 manuscript pages).

#### Peer review

All papers are subject to peer review. The Journal has an identified panel of reviewers and will also seek additional reviewers as the topic of a paper requires.

#### Citations

Please note that all papers accepted for this journal are subject to originality checking. To avoid potential problems, please ensure that all citations are fully disclosed at the point of submission. **View guide to correct citations.**

#### Regular articles

All portions of the manuscript must be typed double-spaced and all pages numbered starting from the title page. The Title should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the

corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present addresses of authors should appear as a footnote. The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions.

The Abstract should be 100 to 300 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 10 key words that will provide indexing references should be listed.

A list of non-standard Abbreviations should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelled out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended

SI

units should be used. Authors should use the solids presentation (mg/ml). Standard abbreviations (such as ATP, cGMP, DNA and RNA) need not be defined.

The Introduction should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the authors' experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the Results but should be put into the Discussion section.

The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The Acknowledgments of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph form or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

### **References**

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parenthesis. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al' (Verma, et.al., 2010). In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works. The list of references should be on separate page. Authors bear the complete responsibility for the accuracy of the references. The following examples illustrate the format for reference

**Pande, C. and Mathela, C.S. (2000).** Chemical composition of the leaf oil of *Juniperus communis* L. from the Kumaon region. *J. Essential oil Bearing Plants*. 3(3): 135-138.

**Kaur, S., Dayal, R., Varshney, V.K. and Bartley, J. P. (2001).** GC-MS analysis of essential oils of heartwood and resin of shore robusta. *Planta Med*. 67: 883-886.

**Adams, R.P. (1991).** Cedar wood oil-analysis and properties in: *Modern Methods of Plant Analysis-oils and waxes*. Linsking H.F and Jackson, J.E.(eds.) Springer Verlag, Lerrin,? pp.

**Adams, R.P. (1995).** *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromato- graphy/ Mass Spectroscopy*. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.

### **Short Communications**

Short Communications are limited to a maximum of two figures and one table. They should present a complete study that is more limited in scope than is found in full-length papers. The items of manuscript preparation listed above apply to Short Communications with the following differences: (I) Abstracts are limited to 120 words; (II) instead of a separate Materials and Methods section, experimental procedures may be incorporated into Figure Legends and Table footnotes; (III) Results and Discussion should be combined into a single section.

### **Proofs and Reprints**

Electronic proofs will be sent (e-mail attachment) to the corresponding author as a PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. An e-copy (PDF file) of the published article will be sent to the corresponding author.

### **Copyright**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis) that it is not under consideration for publication elsewhere; that if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher.

### **Publication Charges**

Publication charges are applicable for all articles published in *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. The charges are **\$125USD** for each accepted article, with a reduced rate of **\$75USD** for authors from SAARC member nations (Bangladesh, Bhutan, India, Maldives, Nepal, Pakistan, and Sri Lanka). Publication charges may be reduced/waived at the discretion of Har Krishan Bhalla & Sons.



Visit our **Author Services website** for further resources and guides to the complete publication process and beyond.

## Anexo E: Normas periodico Journal of Essential Oil Bearing Plants

### Journal of Essential Oil Bearing Plants



Co-published with Har Krishan Bhalla &  
ISSN 0972-060X (Print), 0976-5026 (Online)

Sons

#### Publication

6 issues per year

#### Frequency

#### Instructions for authors

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

**Regular articles :** These should describe new and carefully confirmed findings, and experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

**Short Communications:** A Short Communication is suitable for recording the results of complete small investigations or giving details of new models or hypotheses, innovative methods, techniques or apparatus. The style of main sections need not conform to that of full-length papers. Short communications are 2 to 5 printed pages (about 6 to 15 manuscript pages) in length.

**Reviews:** Submissions of reviews and perspectives covering topics of current interest are welcome and encouraged. Reviews should be concise and no longer than 4-12 printed pages (about 12 to 36 manuscript pages).

**Peer review:** All papers are subject to peer review. The Journal has an identified panel of reviewers and will also seek additional reviewers as the topic of a paper requires.

**Citations:** Please note that all papers accepted for this journal are subject to originality checking. To avoid potential problems, please ensure that all citations are fully disclosed at the point of submission. [View guide to correct citations.](#)

**Regular articles:** All portions of the manuscript must be typed double-spaced and all pages numbered starting from the title page. The Title should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present addresses of authors should appear as a footnote. The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions.

The Abstract should be 100 to 300 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited. Following the abstract, about 3 to 10 key words that will provide indexing references should be listed.

A list of non-standard Abbreviations should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelled out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solids presentation (mg/ml). Standard abbreviations (such as ATP, cGMP, DNA and RNA) need not be defined.

The Introduction should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail. Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the authors' experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the Results but should be put into the Discussion section.

The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The Acknowledgments of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph form or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

### **References**

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parenthesis. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al' (Verma, et.al., 2010). In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works. The list of references should be on separate page. Authors bear the complete responsibility for the accuracy of the references. The following examples illustrate the format for reference

**Pande, C. and Mathela, C.S. (2000).** Chemical composition of the leaf oil of *Juniperus communis* L. from the Kumaon region. *J. Essential oil Bearing Plants*. 3(3): 135-138.

**Kaur, S., Dayal, R., Varshney, V.K. and Bartley, J. P. (2001).** GC-MS analysis of essential oils of heartwood and resin of shore robusta. *Planta Med*. 67: 883-886.

**Adams, R.P. (1991).** Cedar wood oil-analysis and properties in: *Modern Methods of Plant Analysis-oils and waxes*. Linsking H.F and Jackson, J.E.(eds.) Springer Verlag, Lerner,? pp.

**Adams, R.P. (1995).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromato- graphy/ Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.

### **Short Communications**

Short Communications are limited to a maximum of two figures and one table. They should present a complete study that is more limited in scope than is found in full-length papers. The items of manuscript preparation listed above apply to Short Communications with the following differences: (I) Abstracts are limited to 120 words; (II) instead of a separate Materials and Methods section, experimental procedures may be incorporated into Figure Legends and Table footnotes; (III) Results and Discussion should be combined into a single section.

### **Proofs and Reprints**

Electronic proofs will be sent (e-mail attachment) to the corresponding author as a PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. An e-copy (PDF file) of the published article will be sent to the corresponding author.

### **Copyright**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis) that it is not under consideration for publication elsewhere; that if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher.

### **Publication Charges**

Publication charges are applicable for all articles published in *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. The charges are **\$125USD** for each accepted article, with a reduced rate of **\$75USD** for authors from SAARC member nations (Bangladesh, Bhutan, India, Maldives, Nepal, Pakistan, and Sri Lanka). Publication charges may be reduced/waived at the discretion of Har Krishan Bhalla & Sons. Visit our [Author Services website](#) for further resources and guides to the complete publication process and beyond.

## Anxo F : Comprovante de submissão de artigo

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal for Parasitology: Drugs and Drug  
Resistance  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIPARASITIC ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF *Operculina  
hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples

Article Type: Full Length Article

Section/Category: unicell

Keywords: *Operculina hamiltonii*; *Trypanosoma*; *Leishmania*; antiepipimastigote and epimastigote  
activity; cytotoxicity

Corresponding Author: Prof. Henrique Coutinho, Professor

Corresponding Author's Institution: URCA

First Author: Henrique Coutinho, Professor

Order of Authors: Henrique Coutinho, Professor

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Trypanosomiasis and leishmaniasis are diseases that have high rates of morbidity and mortality in developing countries, and it is important to conduct studies to find new therapeutic agents from biodiversity resources. *Operculina hamiltonii* (G. Don) DF Austin & Staples is a plant species whose ethnomedicinal use is associated with antiparasitic and blood purifying properties; it produces secondary metabolites that have been shown to be active in biological and pharmacological models. The aim of this study was to carry out a phytochemical characterization of *O. hamiltonii* and to assess its antiparasitic potential against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania brasiliensis* and *L. infantum* and also its cytotoxic activity. A lyophilized infusion prepared with plant tubers was analyzed by HPLC and tested in vitro for anti-epimastigote and antipromastigote activity and cytotoxicity. There was antiparasitic activity against *T. cruzi*, which was significant at a concentration of 62.5 µg/mL, and cytotoxicity was moderate. The results showed a high leishmanicidal and trypanocidal activity, but the natural product demonstrated significant cytotoxicity at concentrations equal to or greater than 250 µg/mL, which suggests that studies are needed to evaluate its anticancer activity.

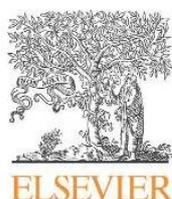
Suggested Reviewers: Saulo Tintino  
URCA  
saulorelison@gmail.com

Humberto Barreto  
UFPI  
hmbdoc@gmail.com

Fernando Figueredo  
FMJ  
fgfigueredo@gmail.com

## ANEXO G: PRODUÇÃO CIENTÍFICA PARALELA A TESE - 2014

Rev Bras Farmacogn 24(2014): 124-132



# Revista Brasileira de Farmacognosia

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY

www.journals.elsevier.com/revista-brasileira-de-farmacognosia/



## Original article

## Ethnopharmacological study of *Stryphnodendron rotundifolium* in two communities in the semi-arid region of northeastern Brazil



Dayanne Rakelly de Oliveira<sup>a</sup>, Washington Soares Ferreira Júnior<sup>b</sup>,  
Vanessa de Carvalho Nilo Bitu<sup>c</sup>, Patricia Gonçalves Pinheiro<sup>a</sup>,  
Cicero Diego Almino Menezes<sup>a</sup>, Francisco Elizauo de Brito Junior<sup>a</sup>,  
Ulysses Paulino de Albuquerque<sup>b</sup>, Marta Regina Kerntopf<sup>a</sup>,  
Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>d,\*</sup>, Roselei Fachinnetto<sup>e</sup>, Irwin Rose Alencar Menezes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Etnobotânica Aplicada, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup>Faculdade Leão Sampaio Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

<sup>e</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 October 2013

Accepted 24 March 2014

## Keywords:

Ethnopharmacology

Ethnobotany

*Stryphnodendron rotundifolium*

Traditional Medicine

Medicinal use

## ABSTRACT

This work describes the local knowledge of the medicinal use of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., Fabaceae, according to informants in two areas of the Araripe bioregion, in the Northeast Region of Brazil. We used interviews to investigate the ethnomedicinal use of the local species to determine the mode of use, frequency of administration, duration of treatment and restrictions of use. In traditional medicine, the use of *S. rotundifolium* is associated with the treatment of inflammatory and infectious diseases. The part of the plant most used was the stem bark (86.11%), the predominant mode of preparation was immersion in water (52.83%), and oral administration was the most cited (48.43%). For inflammatory and infectious diseases, the treatment lasted 3-10 days and the frequency of administration was 2-3 times/day. For gastroprotective effects, treatment lasted up to 30 days, and the herb was administered 1-3 times/day. For pain complaints, the therapy varied from 2-3 days to continuous administration. The informants (46.87%) did not mention restrictions of use, except for pregnant women, with a rate of 25%. A comparison of these results with the ethnopharmacological information from other studies showed that some of the traditional indications are scientifically supported by the literature or clinical studies. Nevertheless, the results showed that pharmacologists have not fully investigated all the possible bioactivities that healers credit to this plant.

© 2014 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail: hdmcoutinho@urca.br (H.D.M. Coutinho).

## ANEXO H: PRODUÇÃO CIENTÍFICA PARALELA - 2015

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

European Journal of Integrative Medicine 7 (2015) 251–257

European Journal of  
**INTEGRATIVE  
MEDICINE**[www.elsevier.com/uejim](http://www.elsevier.com/uejim)

Original article

## Phytochemical characterization by HPLC and evaluation of antibacterial and aminoglycoside resistance-modifying activity of chloroform fractions of *Cordia verbenacea* DC leaf extracts

Edinaldo Fagner Ferreira Matias, Erivania Ferreira Alves, Maria Karollyna do Nascimento Silva, Victoria Regina de Alencar Carvalho, Cassio Rocha Medeiros, Francisco Antonio Vieira dos Santos, Vanessa de Carvalho Nilo Bitu, Celestina Elba Sobra de Souza, Fernando Gomes Figueredo, Irwin Rose Alencar Menezes, Henrique Douglas Melo Coutinho\*, João Victor de Alencar Ferreira, Luciene Ferreira de Lima, José Galberto Martins da Costa

Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

Received 10 December 2014; received in revised form 14 March 2015; accepted 15 March 2015

### Abstract

**Introduction:** “Erva-baleeira,” *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae), is one of the species of plants currently exploited for the purpose of producing a phytotherapeutic product, which is extracted from the leaves.

**Methods:** Extracts of *C. verbenacea* were prepared from fresh leaves, and chloroform fractions were obtained from the different extracts for evaluation. Phytochemical screening was performed and the phytochemicals were quantified by HPLC-DAD. The microdilution assay was used to determine antibiotic and aminoglycoside-modifying activities (2.4–2500 µg/mL), and the results were analyzed using two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

**Results:** Phytochemical screening and HPLC analysis of the fractions were in agreement with the literature, which describes the presence of several tannins and flavonoids in *C. verbenacea* leaves. The fractions showed moderate antibacterial activity when considering clinical relevance with a MIC of 128 µg/mL against a resistant strain of *Staphylococcus aureus* and 512 µg/mL against a resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. However, when they were combined with antibiotics, synergism was observed, significantly lowering the MIC of the antibiotics by 12.5 ( $P < 0.001$ ).

**Conclusions:** Our results indicated that the fractions of *C. verbenacea*, when combined with an antibiotic, demonstrated significant synergistic activity. Due the extensive use and sale of products derived from *C. verbenacea* may exert pressure on the populations of this species. The development of management plans for rational and sustainable use of the species and more studies with emphasis on the use of such fractions in the treatment of other diseases are necessary.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Microbiology; Natural product; Resistance bacterial; Screening phytochemical

\* Corresponding author at: Av. Leão Sampaio, km 3, s/n, CEP: 63.180-000, Brazil. Tel.: +55 88 21011000; fax: +55 88 21011000.

**E-mail addresses:** [effm\\_biolgia@hotmail.com](mailto:effm_biolgia@hotmail.com) (E.F. Ferreira Matias), [erivania\\_alves@hotmail.com](mailto:erivania_alves@hotmail.com) (E. Ferreira Alves), [mariakarollns@hotmail.com](mailto:mariakarollns@hotmail.com) (M.K.d. Nascimento Silva), [victoria\\_alencar1@hotmail.com](mailto:victoria_alencar1@hotmail.com) (V.R.d. Alencar Carvalho), [cassiomedeiros@leaosampaio.edu.br](mailto:cassiomedeiros@leaosampaio.edu.br) (C. Rocha Medeiros), [francisco.santos@leaosampaio.edu.br](mailto:francisco.santos@leaosampaio.edu.br) (F.A.V. dos Santos), [vanessa@leaosampaio.edu.br](mailto:vanessa@leaosampaio.edu.br) (V.d.C. Nilo Bitu), [elba.sobral@hotmail.com](mailto:elba.sobral@hotmail.com) (C.E.S. de Souza), [fernandobiomedico2008.2@gmail.com](mailto:fernandobiomedico2008.2@gmail.com) (F. Gomes Figueredo), [irwinalencar@yahoo.com](mailto:irwinalencar@yahoo.com) (I.R. Alencar Menezes), [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com) (H.D.M. Coutinho), [jvaferreira@yahoo.com.br](mailto:jvaferreira@yahoo.com.br) (J.V.d. Alencar Ferreira), [cienicalima@hotmail.com](mailto:cienicalima@hotmail.com) (L.F. de Lima), [galberto.martins@gmail.com](mailto:galberto.martins@gmail.com) (J.G.M. da Costa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.uejim.2015.03.007>

1876-3820/© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

European Journal of Integrative Medicine 7 (2015) 151–156

European Journal of  
**INTEGRATIVE  
MEDICINE**[www.elsevier.com/uejim](http://www.elsevier.com/uejim)

Original article

## Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L.

Jos J.S. Aguiar, Cicera P.B. Sousa, Mariana K.A. Araruna, Maria K.N. Silva, Aline C. Portelo, Jeferson C. Lopes, Vict ria R.A. Carvalho, Fernando G. Figueredo, Vanessa C.N. Bitu, Henrique D.M. Coutinho\*, Thiago Adolfo Sobreira Miranda, Edinando F.F. Matias

Faculdade Le o Sampaio Unidade Sa de, Juazeiro do Norte, Cear , Brazil

Received 12 August 2014; received in revised form 9 October 2014; accepted 13 October 2014

### Abstract

**Introduction:** Developing resistance to antimicrobial agents is increasingly observed for many microorganisms is increasingly becoming a problem worldwide. The aim of the present work was to evaluate the antibacterial and antibiotic-modifying activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Plectranthus amboinicus* (Lamiaceae), alone and combined.

**Methods:** Standard and multiresistant bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were utilized, and antibiotics of the aminoglycoside class were tested, using the microdilution technique.

**Results:** The antibacterial effect of the *O. gratissimum* L. and *P. amboinicus* L. oils alone and combined have a minimum inhibitory concentration (MIC)  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ , except against *E. coli* ATCC10536, which showed a MIC =  $128 \mu\text{g/mL}$  and against *S. aureus* ATCC25923 with MIC =  $512 \mu\text{g/mL}$ . The drug-modifying effect of the essential oil of *O. gratissimum* L. resulted in an antagonism, reducing the effect of antibiotics, against all bacterial strains assayed. However, the essential oil of *P. amboinicus* L. showed a synergistic effect, potentiating the antibiotic activity of these drugs against the bacterial strains assayed. When the mixture of the *O. gratissimum* and *P. amboinicus* oils was combined with the antibiotic, a synergistic effect was observed.

**Conclusions:** The data obtained are promising, but further studies are needed to isolate the active compounds and to conduct pharmacological tests *in vivo*, making it possible to develop new therapeutic alternatives for the treatment of diseases caused by multiresistant microorganisms.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** *Ocimum gratissimum*; *Plectranthus amboinicus*; Antibiotic-modifying activity; Antibacterial; Essential oils

### Introduction

Bacteria are prokaryotic microorganisms that reproduce by binary fission and characterized by the presence of filamentous double-strand circular DNA. They are differentiated by their cell wall, which is used to classify whether they are Gram-positive or Gram-negative [1]. These microscopic organisms are usually found on the surface of the skin, mucosae and intestinal tract of

humans and animals. The genus *Staphylococcus* is commonly distributed in nature and occurs in the normal microbiota [2]. The bacteria are usually found as single cells, doublets, or chains and are classified as important human pathogens, causing diseases with a fatal prognosis [3].

The bacterial species *Escherichia coli* is classified as a microorganism capable of causing severe infections and is associated with a variety of diseases, included sepsis, urinary tract infection (UTI), meningitis and gastroenteritis. On the other hand, *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacillus with polar flagella, which confer motility, where it causes various cutaneous infections, in cases where there are severe burns and also for example, in endocarditis in immunocompromised patients [1].

\* Corresponding author at: Laborat rio de Microbiologia e Biologia Molecular, Av. Cel Antonio Luiz, 1161, CEP: 63105-000, Crato, CE, Brazil. Tel.: +55 88831021212; fax: +55 8831021291.

E-mail address: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com) (H.D.M. Coutinho).

**APENDICE A: INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS****ESTUDO BIOPROSPECTIVO DE PLANTAS COMERCIALIZADAS PARA FINS  
TERAPÊUTICOS EM MERCADOS PÚBLICOS NA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL****MERCADO PÚBLICO:****DADOS PESSOAIS DO ENTREVISTADO**

NOME: IDADE:  
ENDEREÇO: SEXO: ( ) M ( ) F  
GRAU DE ESCOLARIDADE:  
RENDA FAMILIAR:  
Nº DE PESSOAS QUE VIVEM NO DOMICÍLIO:

- ( ) Vendedor simples  
( ) Erveiro  
( ) Doutor-raiz

**ENTREVISTA:**

- 1- Qual o nome da planta?
- 2- Quais as indicações de uso(s) da planta?
- 3- Quais as formas possíveis de uso?
- 4- Quais os efeitos indesejáveis conhecidos?
- 5- Quais as contra-indicações do uso?
- 6- Como se prepara a planta para uso?
- 7- Qual a quantidade indicada?
- 8- Qual o local da coleta?
- 9- A planta é coletada ou cultivada?
- 10- Qual o habitat ou a origem da planta:
- 11- Qual o preço de venda?
- 12- O preço varia de acordo com a estação do ano?
- 13- Como exerce a atividade?  
( ) coletor-vendedor  
( ) revendedor