

## Perfil químico e atividade antimicrobiana de *abarema cochliacarpus*

Chemical profile and antimicrobial activity of *abarema cochliacarpus*

Perfil químico y actividad antimicrobiana de *abarema cochliacarpus*

Recebido: 21/02/2022 | Revisado: 01/03/2022 | Aceito: 09/03/2022 | Publicado: 17/03/2022

### **Pietra Alexia Lima dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7126-2265>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [pietra-alexia@hotmail.com](mailto:pietra-alexia@hotmail.com)

### **Ludmila Cruz dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6503-9908>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [ludmilahcruz@gmail.com](mailto:ludmilahcruz@gmail.com)

### **Rôas de Araujo Costa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0429-1709>  
Faculdade Ages, Brasil  
E-mail: [Roas.araujo@hotmail.com](mailto:Roas.araujo@hotmail.com)

### **Adriana dos Santos Estevam**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9008-3337>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [dricaestevam@bol.com.br](mailto:dricaestevam@bol.com.br)

### **Mário Rodrigues Pereira da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2444-5798>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
[Mariosilvarp29@gmail.com](mailto:Mariosilvarp29@gmail.com)

### **Igor Adriano de Oliveira Reis**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4941-9932>  
Instituto Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [resiigoradriano@gmail.com](mailto:resiigoradriano@gmail.com)

### **Jeison Saturnino de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3035-2560>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [jeison\\_fisioterapia@yahoo.com.br](mailto:jeison_fisioterapia@yahoo.com.br)

### **Brancilene Santos de Araujo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0281-8677>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [brancily@gmail.com](mailto:brancily@gmail.com)

### **Waldecy de Lucca Junior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2916-9101>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [wluccajr@academico.ufs.br](mailto:wluccajr@academico.ufs.br)

### **Samuel Bruno dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6420-406X>  
Faculdade de Aracaju, Brasil  
E-mail: [samuelbruno@gmail.com](mailto:samuelbruno@gmail.com)

### **Charles dos Santos Estevam**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6940-6891>  
Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
E-mail: [cse.ufs@gmail.com](mailto:cse.ufs@gmail.com)

### **Resumo**

*Abarema cochliacarpus* é uma espécie endêmica do Brasil, pertence à família Fabaceae e é conhecida popularmente como barbatimão, estando presente na caatinga e cerrado brasileiro. Em Sergipe, seu uso é em forma de chás para atividades anti-inflamatória e cicatrizante. Como objetos deste estudo foram utilizados as folhas do vegetal a fim de conhecer qualitativamente os constituintes químicos das frações obtidas a partir do extrato bruto: fração clorofórmica (FCL), fração hexânica (FHX), fração acetato de etila (FAE) e fração hidrometanólica (FHM) através da prospecção fitoquímica por ensaios colorimétricos, sendo detectada a presença de metabólitos secundários como fenóis, taninos, flavonóis, catequinas, esteroides, triterpenóides e saponinas. Na análise antimicrobiana apenas duas frações apresentaram halos de inibição. A FAE para as cepas de *Staphylococcus aureus* (19,3 mm), *Enterococcus durans* hiraе (10 mm), *Escherichia coli* derivada (9,6 mm) e *Pseudomonas aeruginosa* derivada (15 mm), e a FCL para a cepa *E. durans* hiraе (9 mm). Na concentração inibitória mínima (MIC) a FAE sobressaiu-se com 12,5 µg.mL<sup>-1</sup> para a *S. aureus* e *E. durans*, enquanto a FCL obteve 25 µg.mL<sup>-1</sup> para *E. durans*. Quanto à análise citotóxica, a FAE nas concentrações

testadas não favoreceu a viabilidade celular em 75%, apresentando capacidade antiproliferativa, exceto a FLC a 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A FAE e FCL apresentaram propriedades antioxidantes e obtiveram efeito antimicrobiano, além de possuírem metabólitos que corroboram com essas funções.

**Palavras-chave:** *Abarema cochliacarpus*; Folhas, atividade biológica; Análise citotóxica; Compostos fenólicos.

### Abstract

*Abarema cochliacarpus* is an endemic species from Brazil, it belongs to the Fabaceae family and is popularly known as barbatimão, being present in the Brazilian caatinga and cerrado. In Sergipe, its use is in the form of teas for anti-inflammatory and healing activities. As objects of this study, the leaves of the plant were used in order to qualitatively know the chemical constituents of the fractions obtained from the crude extract: chloroform fraction (FCL), hexane fraction (FHX), ethyl acetate fraction (FAE) and hydromethanolic fraction (FHM) through phytochemical prospection by colorimetric assays, being detected the presence of secondary metabolites such as phenols, tannins, flavonols, catechins, steroids, triterpenoids and saponins. In the antimicrobial analysis, only two fractions showed inhibition halos. The FAE for *Staphylococcus aureus* (19.3 mm), *Enterococcus durans hirae* (10 mm), derived *Escherichia coli* (9.6 mm) and derived *Pseudomonas aeruginosa* (15 mm) strains, and the FCL for the *E. durans* strain *hirae* (9 mm). In the minimal inhibitory concentration (MIC) the FAE excelled with 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for *S. aureus* and *E. durans*, while the FCL obtained 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for *E. durans*. As for the cytotoxic analysis, FAE at the concentrations tested did not favor cell viability in 75%, showing antiproliferative capacity, except for FLC at 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . FAE and FCL showed antioxidant properties and obtained an antimicrobial effect, in addition to having metabolites that corroborate these functions.

**Keywords:** *Abarema cochliacarpus*; Leaves, biological activity; Cytotoxic analysis; Phenolic compounds.

### Resumen

*Abarema cochliacarpus* es una especie endémica de Brasil, pertenece a la familia Fabaceae y es conocida popularmente como barbatimão, estando presente en la caatinga y el cerrado brasileños. En Sergipe, su uso es en forma de té para actividades antiinflamatorias y curativas. Como objetos de este estudio se utilizaron las hojas de la planta con el fin de conocer cualitativamente los constituyentes químicos de las fracciones obtenidas del extracto crudo: fracción de cloroformo (FCL), fracción de hexano (FHX), fracción de acetato de etilo (FAE) y fracción hidrometanólica. fracción (FHM) mediante prospección fitoquímica por ensayos colorimétricos, detectándose la presencia de metabolitos secundarios como fenoles, taninos, flavonoles, catequinas, esteroides, triterpenoides y saponinas. En el análisis antimicrobiano, solo dos fracciones presentaron halos de inhibición. El FAE para *Staphylococcus aureus* (19,3 mm), *Enterococcus durans hirae* (10 mm), cepas derivadas de *Escherichia coli* (9,6 mm) y derivadas de *Pseudomonas aeruginosa* (15 mm), y la FCL para la cepa *hirae* de *E. durans* (9 mm). En la concentración mínima inhibitoria (CIM) la FAE sobresalió con 12.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para *S. aureus* y *E. durans*, mientras que la FCL obtuvo 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para *E. durans*. En cuanto al análisis citotóxico, FAE a las concentraciones ensayadas no favoreció la viabilidad celular en un 75%, mostrando capacidad antiproliferativa, a excepción de FLC a 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . FAE y FCL mostraron propiedades antioxidantes y obtuvieron un efecto antimicrobiano, además de tener metabolitos que corroboran estas funciones.

**Palabras clave:** *Abarema cochliacarpus*; Hojas, actividad biológica; Análisis citotóxico; Compuestos fenólicos.

## 1. Introdução

A utilização de plantas com a finalidade de obtenção da cura e tratamento de diversas doenças estende-se desde os tempos mais remotos até os dias atuais, sendo uma prática comum em todo o mundo (Noldin et al., 2006; Veiga-júnior, 2008). Em algumas comunidades, esta prática, na maioria das vezes, é o principal recurso terapêutico. Atualmente, sabe-se que as plantas, ditas medicinais, são uma inesgotável fonte de substâncias bioativas e, por isso, vem sendo estudadas extensivamente por diversas instituições de pesquisa. Particularmente no Brasil, em que há uma ampla biodiversidade de flora, contando com aproximadamente 20% da diversidade florística global, essa busca vem se difundindo (Silva et al., 2014) muito embora, a passos lentos.

As plantas produzem substâncias denominadas de metabólitos secundários, produzidas a partir de adaptações edafoclimáticas e/ou condições de estresse, colocando-os como essenciais para sua defesa e perpetuação (Simões et al., 2007). Esta função produz consideráveis efeitos biológicos, tornando-as fontes interessantes para pesquisas farmacológicas. Muitas espécies vegetais são utilizadas na medicina popular, entretanto, conhecer seus constituintes químicos e verificar experimentalmente suas aplicações é imprescindível para a qualidade e a segurança do tratamento de quem faz uso (Firmo et al., 2011). Além disso, estes estudos colaboram para a obtenção de novas substâncias que possam atuar como agentes terapêuticos ou para servir como matéria-prima na produção de fitofármacos (Barreiro et al., 2007).

Neste sentido, há um grande interesse em buscar compostos químicos vegetais que apresentam atividades biológicas, como por exemplo, espécies que possuam efeito antioxidante e antimicrobiano. Muschiete e Martino (2009) relatam que, entre os metabólitos secundários, os compostos fenólicos, de maneira geral, atuam na captura e neutralização de radicais livres ou ainda ligam-se a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalizadores dos processos oxidativos. Outros autores, como Kumar, Pandey (2013), tratam os flavonoides como poderosos antioxidantes, e pesquisas relatam a presença do metabólito tanino nas plantas como um dos indicadores de atividade antimicrobiana (Maia, 2009).

Diante disso, destaca-se, neste trabalho, a espécie vegetal *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes, conhecida popularmente como “Barbatimão”, que é rica em compostos de natureza fenólica (Skotti et al., 2014). É uma planta pertencente à família Fabaceae, endêmica do Brasil, presente no estado de Sergipe (Landim et al., 2015) e está distribuída nos biomas Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (Da silva et al., 2010). Sua entrecasca é utilizada na forma de chá e/ou garrafadas, principalmente na região Nordeste do Brasil, para o tratamento e cura de vários problemas de saúde, tais como: úlceras, feridas de difícil cicatrização, gastrite, inflamação, leucorreias e corrimento vaginal (Silva et al., 2010).

Sua constituição química apresenta saponinas, catequinas, taninos, fenois, antraquinonas (Silva et al., 2009), flavonoides, proantocianidinas, entre outros (Da silva et al., 2010; Dias et al., 2012). As entrecascas de *A. cochliacarpus*, coletadas no estado de Sergipe apresentaram em sua composição química catequinas, saponinas, taninos, compostos fenólicos e proantocianidinas (Dias, 2015). Vale ressaltar, que esses metabólitos, além da atividade antioxidante, podem apresentar diversos benefícios terapêuticos, como ação anti-inflamatória e cicatrizante, antitumoral e antimicrobiana (Simões et al., 2007). As folhas da espécie também apresentaram potencial antioxidante e antimicrobiano (Dias, 2015) fato que gera uma perspectiva positiva para a descoberta de novos antibióticos que possam atuar sozinhos ou como coadjuvantes em patologias de origem microbiológicas.

Na medicina popular é escasso o conhecimento relacionado às folhas de *A. cochliacarpus*, uma vez que, a sua entrecasca é a parte da planta mais utilizada, podendo comprometer a manutenção do vegetal com o manejo incorreto da população durante a coleta (Dias, 2015). Além de que a maioria dos trabalhos com material vegetal se baseiam em estudos etnofarmacológicos, logo, é comum que utilizem partes vegetais de uso recorrente na população (Maciel et al., 2002); levando às folhas de *A. cochliacarpus* pouca visibilidade.

Diante disso, tendo em vista que a *A. cochliacarpus* é rica em metabólitos secundários que levam à ação antioxidante e antimicrobiana, além da importância da continuidade de estudos etnofarmacológicos de plantas medicinais e a oportunidade de atribuir um novo olhar às folhas do vegetal, este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar os principais constituintes químicos de frações derivadas do extrato hidroetanólico das folhas responsivos à atividade antioxidante e antimicrobiana exibida pelo vegetal; gerando, a partir da matéria-prima, insumos bioativos que permitam agregar valor à espécie e conhecimentos à população.

## 2. Metodologia

### Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *A. cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes (Fabaceae) foram coletadas no povoado Caípe, sob as coordenadas 11° 0' 49" Sul 37° 13' 21" Oeste, Município de São Cristóvão – Sergipe. A identificação botânica foi feita pelo Herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE), sob número de registro ASE 40474. A Professora Doutora Ana Paula do Nascimento Prata do Departamento de Biologia da UFS foi responsável pela identificação botânica do espécime. As amostras coletadas foram mantidas em estufa com circulação de ar a 37°C, até completa desidratação.

### **Obtenção das frações das folhas de *Abarema cochliacarpus***

As folhas secas de *A. cochliacarpus* reduzidas a pó, com auxílio de um liquidificador, foram submetidas à extração em etanol a 90% durante 5 dias por maceração exaustiva. Foi utilizado 1,242 kg das folhas trituradas. Após o período de extração, o extrato hidroetanólico obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50°C.

Parte do extrato hidroetanólico produzido (56,20 g) foi dissolvido em uma solução metanol/água (2:3) e submetido à partição líquido-líquido para obtenção da fração hexânica (FHX), fração clorofórmica (FCL), fração acetato de etila (FAE) e fração hidrometanólica (FHM); com os respectivos solventes (Estevam et al., 2009). Cada uma das frações foi concentrada em evaporador rotativo a 50°C sob pressão reduzida resultando em quatro frações, com rendimento de 680 mg (FHX), 600 mg (FCL), 9,47 g (FAE) e 34,47 g (FHM).

### **Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Abarema cochliacarpus***

#### *Prospecção Fitoquímica*

Foram realizados testes qualitativos clássicos através de reações químicas que levam à formação de precipitados ou alteração de cor característica, com a finalidade de determinar a presença de classes de metabólitos secundários nas frações obtidas anteriormente. Para isso, foram utilizadas reações propostas por Matos (2009) e Shan et al., (2016) descritas a seguir, as quais, por meio de reagentes específicos, buscaram identificar a presença de derivados antracênicos, alcalóides, heterosídeos cardiotônicos, cumarinas, esteróis, fenóis totais, flavonóides, flavanonóis, flavanonas, antocianinas, antocianidinas, taninos e xantonas.

#### *Teste para Fenóis e Taninos*

Esse teste baseia-se na capacidade do grupo dos taninos de se complexar com íons metálicos formando precipitados, e do cloreto de ferro em oxidar os fenóis. Foram adicionadas 3 gotas da solução alcóolica de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ )  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  nos tubos correspondentes a fração hexânica (FHX), fração clorofórmica (FCL), fração acetato de etila (FAE) e fração hidrometanólica (FHM), depois de agitá-los foi observado qualquer variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. Como controle da reação foi utilizada uma amostra contendo somente água destilada e  $\text{FeCl}_3$ . O surgimento de cor variando entre azul e vermelha é indicativo da presença de fenóis, enquanto a formação de precipitado azul escuro indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde, a presença de taninos flabobênicos (taninos condensados ou catéquicos).

#### *Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonoides*

O teste baseia-se na capacidade dos esqueletos flavônicos de mudarem de cor, por ressonância eletrônica, em equilíbrio ácido-base. Para o ensaio foram necessários três tubos de ensaio para cada fração. Um dos tubos foi acidificado a pH 3 com ácido clorídrico (HCl)  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  e os outros dois tubos foram alcalinizados a pH 8,5 e 11 com hidróxido de sódio (NaOH)  $2 \text{ mol.L}^{-1}$ . A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi analisada conforme exposto abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Detecção colorimétrica de antocianinas, antocianidinas, flavonoides e chalconas.

Constituintes	Cor		
	pH = 3	pH = 8.5	pH = 11
Antocianidinas e antocianinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonois e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho-púrpuro
Flavononóis	-	-	Vermelho-laranja

Fonte: Matos (2009).

#### *Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas*

O teste baseia-se na possibilidade de levar a hidrólise dos *O*-heterosídeos flavônicos por temperatura. As hidrólises alcalinas e ácidas facilitam a identificação dos núcleos flavônicos. Para este ensaio, acidificou-se os tubos com as amostra por adição de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup> até pH 1-3 e alcalinizou-se outros tubos com as amostras contendo NaOH 2 mol. L<sup>-1</sup> até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente com auxílio de uma lamparina. A observação de qualquer mudança na coloração foi comparada com os tubos correspondentes utilizados no teste anterior, sendo a interpretação dos resultados feita com base na Tabela 2.

**Tabela 2.** Detecção colorimétrica de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.

Constituintes	Cor		
	pH = 3	pH = 8.5	pH = 11
Leucoantocianidinas	Vermelha	-	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Parda amarela	-	-
Flavononas	-	-	Vermelho- laranja

Fonte: Matos (2009).

#### *Teste para Esteroides e Triterpenoides (Liebermann-Buchard)*

Este teste é utilizado para averiguar a presença de núcleo esteroidal ou triterpenoidal. Para este ensaio foi preparado 10 mL de solução para cada fração utilizada, o resíduo seco das frações foi extraído com porções de 1-2 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>). A solução clorofórmica foi filtrada em um pequeno funil fechado com algodão coberto com alguns miligramas de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anidro para um tubo de ensaio seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Foi acrescentado três gotas de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado, agitou-se e foi observado se ocorria o desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida de verde permanente é um indicativo à presença de esteroides livres, enquanto a cor parda à vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

#### *Teste para Saponinas*

Este teste baseia-se no fato de que os heterosídeos saponosídeos (saponinas) tem propriedades detergentes e surfactantes e, quando tratados com HCl e aumento de temperatura, sofrem hidrólise, precipitam as agliconas e perdem suas propriedades detergentes. Foi usado neste ensaio os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, o material foi solubilizado em água destilada e filtrado em um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução por 2-3 minutos e foi observado a formação de espuma. O aparecimento de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas. Para confirmação da presença do metabólito, adicionou-se 2 mL de HCl concentrado ao conteúdo do tudo de ensaio que foi colocado imerso em banho-maria por 1 hora. Posteriormente, neutralizou-se, resfriando e agitando. A presença de precipitado e a não formação de espuma confirma a presença de saponina.

### *Teste para Alcaloides*

Este teste baseia-se na precipitação de alcaloides ao interagir com o reagente Dragendorff. Este reagente consiste numa solução de iodeto de bismuto de potássio, em ácido diluído. Quando em contato com a amostra que contém alcaloides e compostos nitrogenados, formam precipitados. A solução apresenta mudança de coloração que varia de amarela à vermelha alaranjada. O precipitado é obtido através da formação de um complexo entre o átomo de bismuto e os grupamentos amins presentes nos compostos a serem analisados. As frações testadas foram transferidas para tubos e foram adicionadas 3 gotas de Dragendorff observando o resultado.

### **Avaliação da Atividade Antimicrobiana**

As frações em estudo (FHX, FCL, FAE e FHM) foram submetidas aos testes de susceptibilidade microbiana pelo método de difusão em ágar Mueller-Hinton, conforme Bauer et al., (1996). As amostras que apresentaram resultado positivo no teste qualitativo foram encaminhadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC). Ambos os testes foram realizados em triplicata para cada microrganismo. Foram utilizadas cepas padrão de bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus durans* hiraie (SS1225/IAL03/10) e *Streptococcus mutans* (INCQS 00446); e bactérias gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* derivada (ATCC 27853), *Escherichia coli* derivada (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

### *Teste de Difusão em Ágar*

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o teste de difusão em ágar, proposto por Bauer et al., (1996) cuja análise é qualitativa. Foram realizadas culturas overnight de microrganismos mantidas em meio Brian Heart Infusion (BHI) suplementado com ágar (8 g.L<sup>-1</sup>) em estufa bacteriológica na temperatura de 37°C ±1. As culturas foram semeadas com auxílio de swab estéril em placas de Petri contendo 4mm de ágar Muller-Hinton (pH 7.2-7.4), previamente solidificado e semeado usando alça de Drigalsky. Posteriormente, discos de papel filtro embebidos com 20µL de cada amostra vegetal, na concentração de 100 mg/mL<sup>-1</sup>, foram depositados na superfície do meio de cultura inoculado com os microrganismos. Como controle negativo foram utilizados todos os reagentes em uso para diluição das amostras, enquanto para o controle positivo foi utilizado o fármaco antimicrobiano Gentamicina (20 mg.mL<sup>-1</sup>) devido a sua atividade conhecida para cepas padrão ATCC.

Após incubação, decorridas 24h, foram realizadas as medidas dos halos de inibição. Para interpretação dos resultados recomendações do CLSI (2003) e Santos et al., (2011) foram seguidas, onde os valores dos halos de inibição formados foram comparados com os de referência para o teste; sendo os microrganismos classificados como resistente quando o diâmetro do halo de inibição for inferior a 8 mm, intermediário (9 a 14 mm) e sensível (≥14 mm) à determinado agente.

### *Concentração Inibitória Mínima (MIC)*

Como teste quantitativo a concentração inibitória mínima (MIC) foi realizada em triplicata e determinada para cada microrganismo no qual as amostras vegetais apresentaram atividade antimicrobiana, para tal, foi utilizado o método de microdiluição em caldo proposto pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), permitindo assim a visualização da menor concentração da amostra vegetal capaz de inibir o crescimento de microrganismo. Foi usada placa de ELISA com 96 poços, aos quais foram adicionados 100 µL de caldo Mueller-Hinton, juntamente com 50 µL das amostras nas concentrações de 6,25 µg.mL<sup>-1</sup>, 12,5 µg.mL<sup>-1</sup>, 25 µg.mL<sup>-1</sup>, 50 µg.mL<sup>-1</sup>, 75 µg.mL<sup>-1</sup> e 100 µg.mL<sup>-1</sup>, além de 50 µL do inóculo. Poços contendo apenas meio de cultura para verificar se não haveria contaminação do meio, foram utilizados como controle negativo, poços com o inóculo e meio de cultura para análise da viabilidade das cepas testadas, como controle positivo; além de

poços com meio de cultura, dimetilsulfóxido (DMSO) usado para auxiliar a solubilização das amostras e suspensão bacteriana a fim de verificar se o DMSO não inibe o crescimento das bactérias testadas.

Posteriormente, a microplaca foi incubada durante 24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , após o período de incubação foram adicionados em cada poço 20  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de resazurina 0,01%, em seguida a microplaca foi encubada novamente durante 1 hora para posterior leitura de maneira visual, onde a coloração azul nos poços indicava a ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa/avermelhada mostrava a presença de metabolismo dos microrganismos no meio (Palomino et al., 2002).

### **Análise de Citotoxicidade (*in vitro*)**

Para a análise de citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas as frações (FAE e FCL). A viabilidade celular de macrófagos pertencentes à linhagem tumoral J774 ( $2 \times 10^4$  células) foi avaliada em triplicata após 24 horas de exposição contínua as amostras e medida através do ensaio colorimétrico de redução do MTT a formazan de acordo com Mosmann (1983). O ensaio relaciona a quantidade de formazan produzido com o número proporcional de células viáveis.

Foi utilizada placa com 96 poços para impregnação em meio de cultura das células viáveis, após a aderência celular em placa, o meio de cultura foi substituído por 200  $\mu\text{L}$  de meio contendo as amostras em DMSO 0,5%, nas concentrações 50, 100 e 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (FAE); 20, 100 e 250  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (FCL). Posteriormente as placas foram incubadas por 24 horas, após o período de incubação o meio de cultura foi substituído por 200  $\mu\text{L}$  de solução 0,5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  previamente filtrada em membrana milipore de 0,22  $\mu\text{m}$  contendo o corante MTT.

Após este preparo, as placas foram incubadas por 3 horas, tempo necessário para que ocorresse a redução do MTT à formazan. Seguido então, para aspiração do sobrenadante e adição de 200  $\mu\text{L}$  de DMSO em cada poço para solubilização do produto formazan.

O conteúdo solubilizado foi transferido para uma nova placa, e esta foi encaminhada para leitor de ELISA no comprimento de onda de 570 nm. Para análise, os resultados foram tratados de acordo com a equação:  $\% \text{VC} = [\text{DO} (\text{células tratadas}) - \text{DO} (\text{branco}) / \text{DO} (\text{controle}) - \text{DO} (\text{branco})] \times 100$ . Sendo VC correspondente à viabilidade celular e DO correspondente à densidade óptica.

## **3. Resultados e Discussão**

### **Prospecção Fitoquímica**

A prospecção fitoquímica de uma amostra é um ensaio preliminar qualitativo que tem como objetivo identificar as substâncias presentes em extratos e frações. A partir disso pode-se avaliar as classes de metabólitos secundários existentes. Essas informações são importantes para o desenvolvimento de pesquisas podendo contribuir para a identificação e isolamento de princípios ativos viáveis no desenvolvimento de novos fármacos (Silva et al., 2010). Além disso, se houver interesse em substâncias específicas que sejam responsáveis por uma determinada atividade biológica, a pesquisa poderá ser direcionada para tal, levando ao isolamento e elucidação dessas substâncias (Santos et al., 2011).

A triagem fitoquímica das frações (FHX, FCL, FAE e FHM) obtidas por partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico das folhas de *A. cochliacarpus* (Tabela 3) detectou diferentes tipos de compostos químicos: fenóis, taninos, flavonóis, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, esteroides, triterpenóides e saponinas.

Estes metabólitos secundários são de grande importância em pesquisas que mensuram determinadas atividades biológicas, entre elas a ação de atividade anti-inflamatória (Saturnino-oliveira et al., 2014), antioxidante, cicatrizante e antimicrobiana (Santos et al., 2007; Pires, 2011; Dias et al., 2012; Dias, 2015), essas atividades foram comprovadas na entrecasca do vegetal.

Jesus (2010) ao realizar uma prospecção fitoquímica na casca de *A. cochliacarpus* constatou a presença de proantocianidinas, leucoantocianidinas, saponinas e flavonoides, enquanto Silva et al, (2009), detectou metabólitos como saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas; semelhante ao trabalho de Sarmiento (1999), o qual relatou compostos fenólicos, saponinas e taninos no extrato hidroetanólico da entrecasca de *A. cochliacarpus*.

Todas as frações analisadas (Tabela 3) apresentaram compostos importantes, dentre eles os taninos, os quais apresentam como característica a capacidade de complexação com moléculas e macromoléculas, além de agir no sequestro de radicais livres permitindo uma série de aplicações farmacológicas, tais como, o controle de bactérias, insetos e fungos (Jesus; Cunha, 2012). É possível observar na tabela que há presença de compostos fenólicos, muitas vezes associados à atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (Andrade et al., 2007; Pires, 2011; Dias, 2015), vale ressaltar que a função de determinadas atividades biológicas pode estar atrelada com o sinergismo de compostos presentes na amostra vegetal.

**Tabela 3.** Prospecção fitoquímica das frações das folhas de *Abarema cochliacarpus*.

Constituintes Químicos	Fração Clorofórmica	Fração Hexânica	Fração Acetato Etila	Fração Hidrometanólica
<b>Fenóis</b>	-	-	+	+
<b>Taninos</b>	+	-	+	+
<b>Taninos Flabobênicos</b>	+	-	-	-
<b>Taninos Hidrolisáveis</b>	-	-	+	+
<b>Antocianinas/ Antocianidinas</b>	-	-	-	-
<b>Flavonas/Flavonóis/ Xantonas</b>	+	-	+	+
<b>Chalconas/ Auronas</b>	-	-	-	-
<b>Flavononóis</b>	+	-	+	+
<b>Leucoantocianidinas</b>	+	-	+	+
<b>Catequinas</b>	+	-	+	-
<b>Flavononas</b>	+	-	+	+
<b>Esteróides</b>	+	+	-	-
<b>Triterpenóides</b>	-	-	-	+
<b>Saponinas</b>	-	-	+	+

Onde o (+) demonstra presença do metabólito e o (-) demonstra ausência do metabólito. Fonte: Santos (2022).

Na medicina popular o conhecimento relacionado às folhas de *A. cochliacarpus* é quase desconhecido, uma vez que, a sua entrecasca é a parte da planta mais utilizada, podendo comprometer a manutenção do vegetal com o manejo incorreto da população durante a coleta (Dias, 2015). De acordo com a busca de dados nas bases analisadas (SciELO, CAPES/MEC, Science Direct, entre outras) pesquisas voltadas às folhas de *A. cochliacarpus* são escassas, sendo que a maioria dos trabalhos com material vegetal se baseiam em estudos etnofarmacológicos, logo, é comum que utilizem partes vegetais de uso recorrente na população (Maciel et al., 2002).

Diante disso, as folhas de *A. cochliacarpus* são deixadas em segundo plano. Este estudo, contudo, atribui um novo olhar às folhas do vegetal, contribuindo para o conhecimento popular e científico.

### Avaliação da Atividade Antimicrobiana

É perceptível o aumento da resistência de microrganismos nas últimas décadas, apesar dos esforços da indústria farmacêutica na produção de novos agentes antimicrobianos e na modificação das drogas existentes. Os produtos naturais tem sido uma alternativa viável para manutenção da saúde da população, com isso, pesquisas com plantas medicinais vem ganhando espaço entre a comunidade científica, além de serem uma fonte em potencial para a obtenção de novas drogas (Santos et al., 2007).

A avaliação da atividade antimicrobiana qualitativa foi feita por difusão em discos (Tabela 4), onde as amostras das folhas de *A. cochliacarpus* em análise (FHX, FCL, FAE, FHM) foram depositadas em discos de papel em contato com o meio de cultura sólido inoculado com o microrganismo; decorrido o tempo de incubação, o diâmetro do halo de inibição foi medido e a sensibilidade do microrganismo à amostra estabelecida (Santos et al., 2011). Foi adotado como critério de susceptibilidade o padrão sugerido por Santos et al., 2011, onde o diâmetro do halo de inibição do crescimento  $\leq 8$  mm (resistente); 9 - 14 mm (intermediário) e  $\geq 14$  mm (sensível).

**Tabela 4.** Teste antimicrobiano qualitativo da FAE (100 mg.mL<sup>-1</sup>) e FCL (100 mg.mL<sup>-1</sup>) das folhas de *Abarema cochliacarpus*.

Bactérias	Diâmetro do halo de inibição da FAE (mm ± DP)	Diâmetro do halo de inibição da FCL (mm ± DP)	Diâmetro do halo de inibição do C <sup>+</sup> (mm ± DP)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	19,3 ± 0,94	-	25 ± 0,00
<i>Enterococcus durans hiraе</i> (SS1225/IAL03/10)	10 ± 0	9 ± 0,81	25 ± 0,81
<i>Streptococcus mutans</i> (INCQS 00446)	-	-	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	-	-	ND
<i>Escherichia coli</i> derivada (ATCC 25922)	9,6 ± 0,47	-	25 ± 0,00
<i>Pseudomonas aeroginosas</i> derivada (ATCC 27853)	15 ± 0	-	23 ± 1,00

FAE (fração acetato de etila), FCL (fração clorofórmica). Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (DP), onde (-) representa a não formação de halo de inibição na concentração testada de cada amostra; ND: não determinado. Controle positivo (C<sup>+</sup>) foi utilizado o fármaco Gentamicina (20 mg.mL<sup>-1</sup>). Fonte: Santos (2022).

Conforme Tabela 6, apenas a FAE e a FCL apresentaram halos de inibição frente a alguns dos microrganismos testados, escolhidos pela importância na saúde pública. Não houve formação de halos de inibição na concentração testada de 100 mg com a FHX e FHM. A FAE e FCL apresentaram atividade frente à bactéria gram-positiva *E. durans hiraе* com halos intermediários de inibição de 10 e 9 mm, respectivamente. Percebe-se que a FAE foi a que obteve o melhor comportamento à susceptibilidade dos microrganismos. Das 6 cepas analisadas houve formação de halos de inibição intermediários e sensíveis em 4 delas: *S. aureus* e *E. durans* - bactérias gram-positivas -; *E. coli* derivada e *P. aeroginosas* derivada - bactérias gram-negativas -.

Santos et al., (2007) mostraram que o extrato hidroalcoólico da casca de *A. cochliacarpus* inibiu o crescimento de cepas gram-positivas, com halos de inibição variando entre 8 e 9 mm, 11 a 13 mm e 14-15 mm para *S. aureus*; e de 13-14 mm, 17-18 mm e 21-22 mm para *Micrococcus luteus*; enquanto Dias (2011), observou atividade para as cepas gram-positivas (*S. aureus* e *M. luteus*) e gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) com a entrecasca da mesma espécie vegetal, obtendo resultados semelhantes ao do presente estudo.

Coelho et al., (2003) sugerem que a atividade antimicrobiana das plantas pode ser atribuída à presença de metabólitos secundários do grupo dos flavonoides, por conta da capacidade de se complexar com proteínas solúveis e extracelulares e também

com a parede celular das bactérias. Na quantificação de compostos fenólicos ambas as frações que apresentaram atividade antimicrobiana (FAE e FCL) obtiveram alto teor de metabólitos dessa classe, o que pode ter influenciado no resultado positivo.

**Tabela 5.** Teste antimicrobiano quantitativo (Concentração Inibitória Mínima – MIC) da FAE e FCL das folhas de *Abarema cochliacarpus*.

Bactérias	Concentração inibitória mínima da FAE ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Concentração inibitória mínima da FCL ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	12,5	50
<i>Enterococcus durans hiraе</i> (SS1225/IAL03/10)	12,5	25
<i>Escherichia coli</i> derivada (ATCC 25922)	50	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> derivada (ATCC 27853)	50	-

A menor concentração capaz de inibir o crescimento de microrganismos foi expressa em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , as frações foram testadas nas concentrações de 6,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 12,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Fonte: Santos (2022).

A avaliação quantitativa (Tabela 7) foi mensurada pela concentração inibitória mínima (MIC) que é a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento de microrganismos. Foi levado em consideração o resultado qualitativo para escolha das cepas, ou seja, aquelas que a FAE e FCL formaram halos de inibição microbiana. Foram testadas concentrações de 6,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a FAE apresentou os melhores resultados para concentração inibitória mínima, para cepas *S. aureus* e *E. durans hiraе*; enquanto da FCL foi obtido um MIC de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. aureus* e 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *E. durans hiraе*, valores abaixo do relatado por Santos et al., (2007) referente ao extrato hidroalcoólico da casca de *A. cochliacarpus*, com MIC de 0,1562  $\text{mg.mL}^{-1}$  para cepa de *M. luteus* e 0,3125  $\text{mg.mL}^{-1}$  para *S. aureus*; esse comportamento pode acontecer, pois, mesmo sendo plantas da mesma espécie ocorre de produzir metabólitos diferentes, além de partes do vegetal utilizadas para os ensaios serem distintas e das condições ambientais às quais foram submetidas (Alves, 2001).

Não foi encontrado na literatura pesquisas de atividade antimicrobiana com as folhas de *A. cochliacarpus*, o que pode ser explicado pela preferência de análises antimicrobiana com extratos e/ou frações das cascas e entrecascas de plantas, pois, possuem um maior teor de taninos, sendo esse metabólito associado à atividade antimicrobiana (Soares et al., 2008), além do uso recorrente das partes do vegetal na medicina popular. Diante disso percebe-se a importância da pesquisa com as folhas da espécie.

Colacite (2015) também relata que taninos e flavonoides são considerados os principais responsáveis pelo potencial antimicrobiano. Os taninos podem agir nas membranas dos microrganismos modificando seu metabolismo, inibindo as enzimas bacterianas ou se complexando com o substrato delas, além de se complexarem com íons metálicos diminuindo o aporte dos mesmos ao metabolismo microbiano (Santos, Mello, 2007). Estudos relatam que esteroides e triterpenos apresentam atividades biológicas importantes, incluindo a atividade antimicrobiana; bem como metabólitos como, saponinas e catequinas (Virtuoso et al., 2005; Silva et al., 2010).

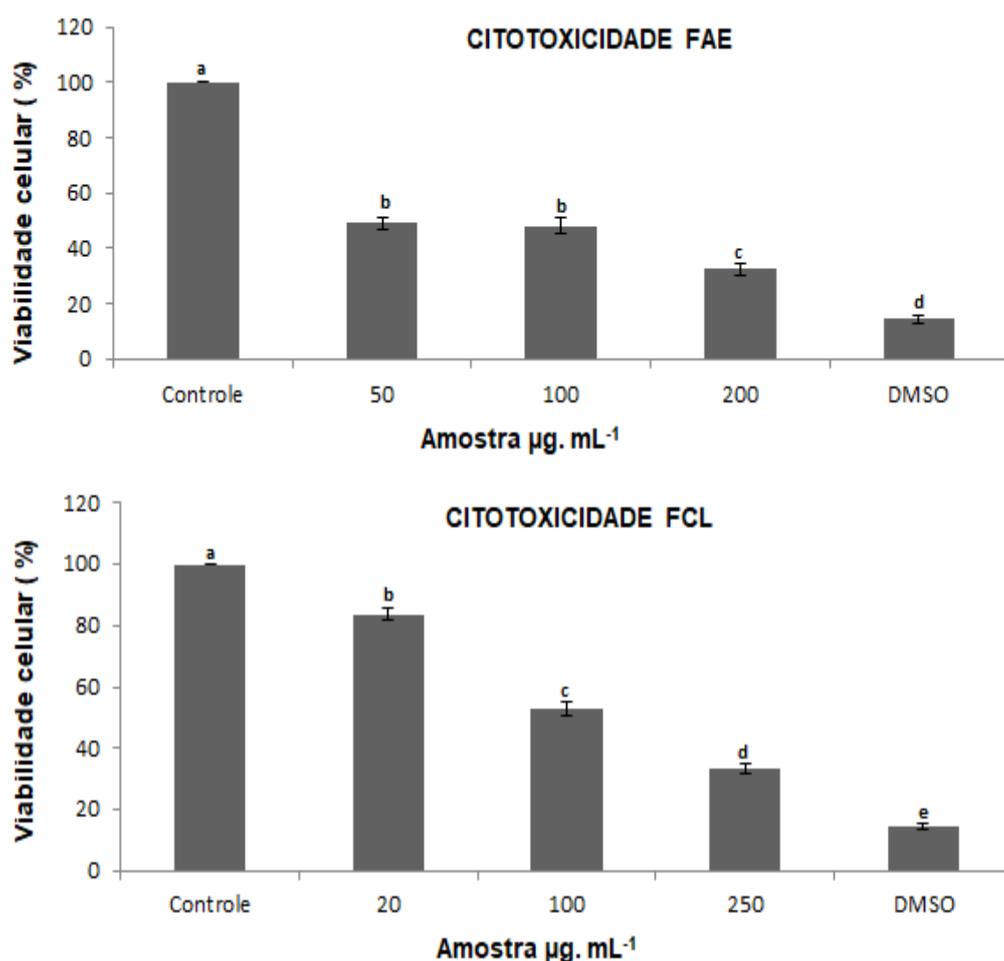
Baseado no que foi exposto, percebe-se que a ação antimicrobiana da FAE e FCL pode ser proveniente de um conjunto de substâncias, a análise fitoquímica (Tabela 3) realizada com ambas as frações de *A. cochliacarpus* revelou a presença de taninos, fenóis, saponinas, esteroides, entre outros; tornando-a uma espécie promissora na busca de novos agentes antimicrobianos.

### Análise de Citotoxicidade (*in vitro*)

Na análise de citotoxicidade *in vitro* das folhas de *A. cochliacarpus* foram utilizadas as frações que apresentaram resultado significativo na atividade antimicrobiana, ou seja, a FAE e FCL nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; 20, 100 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Conforme figura 3 a FAE não favoreceu significativamente ( $p < 0,05$ ) a viabilidade dos macrófagos J774 em nenhuma das concentrações testadas quando comparada com as células não tratadas (controle).

A maior viabilidade celular observada foi da FCL na concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 1), a qual favoreceu a proliferação celular cerca de  $83,5\% \pm 1,97$ , apresentando comportamento não citotóxico, visto que não diminuiu a viabilidade celular em 75%, o qual é considerado citotóxico para extratos de plantas (RIBEIRO et al., 2012).

**Figura 1.** Efeito da FAE e FCL das folhas de *Abarema cochliacarpus* frente à viabilidade celular dos macrófagos J774 a partir do ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difeniltetrazólio, MTT. As células foram tratadas com as frações FAE e FCL (50, 100, 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 20, 100, 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, por 24 h. Os dados foram expressos como percentual de células viáveis comparadas com o grupo veículo e representados como média  $\pm$  desvio padrão. FAE: fração acetato de etila; FCL: fração clorofórmica.



Fonte: Santos (2022).

A FAE na menor concentração (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou uma viabilidade celular de  $49,02\% \pm 2,33$ , ou seja, seu comportamento foi antiproliferativo/citotóxico de acordo com o relatado por Neri-Numa et al., (2014), onde um extrato que inibe mais de 50% do crescimento celular exibe comportamento antiproliferativo. Essa situação pode ser observada na concentração

de 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do presente estudo da FAE e na concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da FCL, a qual apresentou uma viabilidade celular de apenas 33,13%  $\pm$  1,54.

Dias (2015) relatou que a FAE e FHM da entrecasca de *A. cochliacarpus* apresentaram toxicidade na concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , as quais obtiveram uma viabilidade celular de apenas 33% e 37%, respectivamente, porém o extrato bruto e extrato aquoso das folhas de *A. cochliacarpus* não apresentaram toxicidade. Enquanto Oliveira et al., (2013) demonstraram que extratos da casca de *A. cochliacarpus* causaram hepatotoxicidade em camundongos nas concentrações de 125 a 1000  $\text{mg.mL}^{-1}$ , valores superiores ao deste estudo.

Jesus (2010) observou que o extrato etanólico da casca de *A. cochliacarpus* administrado por via intraperitoneal em camundongos ocasionou distúrbios consideráveis como, taquicardia, movimentos estereotipados, alterações gastrointestinais e edema de focinho nas concentrações de 100 a 176  $\text{mg.kg}^{-1}$ , acima dessas concentrações a taxa de mortalidade chegou à 85%. A análise comportamental da *Artemia salina* Leach frente ao extrato etanólico de *A. cochliacarpus* nas concentrações de 40 a 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  mostrou alteração sobre a movimentação da *Artemia* e após 24 horas de exposição observou um número moderado de mortalidade (Jesus, 2010).

Estudos apontam que os constituintes químicos presentes no vegetal podem ser responsáveis pelos distúrbios supracitados como, por exemplo, a presença de saponinas, as quais são capazes de formar complexos com esteroides e fosfolípídeos na mucosa intestinal causando irritação, levando a possíveis contorções abdominais (MELO et al., 2007; JESUS, 2010). Quanto ao teste de citotoxicidade com *A. salina*, pesquisas correlacionam resultados de toxicidade a este organismo com várias atividades biológicas, entre elas, a atividade antitumoral e antibacteriana, sugerindo que o extrato de *A. cochliacarpus* possua tais propriedades biológicas (Jesus, 2010).

Diante disso, como ambas as frações (FAE e FCL) apresentaram citotoxicidade na maioria das concentrações testadas frente aos macrófagos J774, o indicativo que essas amostras possam ter substâncias com potencial de inibição às células tumorais deve ser considerado.

#### 4. Conclusão

As frações (FHX, FCL, FAE e FHM) das folhas de *Abarema cochliacarpus*, apresentaram constituintes químicos na análise qualitativa do tipo fenóis, taninos, saponinas, esteroides, triterpenóides, entre outros. Foram testadas as quatro frações, porém, apenas a FAE e FCL apresentaram atividade antimicrobiana. A FAE obteve os melhores resultados para as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus durans*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas*, enquanto a FCL obteve atividade para cepas gram-positivas *S. aureus* e *E. durans*. A FAE apresentou citotoxicidade frente aos macrófagos de linhagem J774 nas concentrações testadas, mostrando um comportamento antiproliferativo. Enquanto a FLC não apresentou toxicidade às células J774 na concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### Referências

- Alves, H. M. (2001) A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. Nº 3.
- Andrade, C. A., Costa, C. K., Bora, K., Miguel, M. D., Miguel, O. G., & Kerber, V. A. (2007) Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (2): 231-235.
- Barreiro, E. J., Fraga, C. A. M., & Araújo Júnior, J. X. (2009). O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. *Química Nova*, 32(3), 679-688.
- Bauer A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standartized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-6.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. (2010). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. (6a ed.), M7-A6, 23(2), 49p.
- Coelho, A. M. S. P., Silva, G. A., Vieira, O. M. C., & Chavasco, J. K. (2003). Atividade antimicrobiana de *Bixaorellana* L. (Urucum). *Revista Lecta*, 1(2), 47-54.

- Da Silva, M. S., Almeida, A. C. A., Faria, F. M., Luiz-Ferreira, A., Silva, M. A., Vilegas, W., Pellizon, C. H., & Brito, A. R. M. S. (2010) *Abarema cochliacarpus*: Gastroprotective and ulcer-healing activities. *Journal Ethnopharmacology*, 132, 134-142.
- Dias, A. S. (2015). *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes. Caracterização química e potencial biológico. *Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais)* – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.
- Dias, A. S., Lima, A. C. B., Santos, A. L. M. L., Rabelo, T. K., Serafini, M. R., Andrade, C. R., Fernandes, X. A., Moreira, J. C. F., Gelain, D. P., Estevam, C. S., & Araujo, B. S. (2012). Redox properties of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes (Fabaceae) stem bark ethanol extract and fractions, *Natural Product Research*.
- Estevam, C. S., Cavalcante, A. D. M., Cambui, E. V. F., Araújo Neto, V., Leopoldo, P. D. T. G., Fernandes, R. P. M., De Araujo, B. S., Porfírio, Z., & Sant'ana, A. E. G. (2009) Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). *Revista brasileira de Farmacognosia*, 19(1B): 299-303.
- Firmo, W. C. A., Menezes, V. J. M., Passos, C. E. C., Dias, C. N., Alves, L. P. L., Dias, I. C. L., Neto, M. S., & Olea, R. S. G. (2011) Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Revista Cadernos de Pesquisa*, 18.
- Jesus, R. P. F. S. (2010) Bioensaios de *Abarema cochliacarpa* (Gomes) Barneby & Grimes (Leguminosae). 239 f. *Tese (Doutorado)* – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas.
- Jesus, W. M. M., & Cunha, T. N. (2012) Estudos das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Mytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) e de suas espécies adulterantes. *Ver Saúde Desenvolvimento*, 1, 20-24.
- Kumar, S., & Pandey, A.K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 16 p.
- Landim, M. F., Proença, C. E. B., Sales, A. B., & Matos, I.S. (2015) Floristic characterization of an Atlantic Rainforest remnant in Southern Sergipe: Crasto forest. *Biota Neotropica*, 15(1), 1-16.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A., Veija Júnior, V. F., Grynberg, N. F., & Echevarria, A. (2002) Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25, 429-438.
- Maia, M. S., & Bicudo, S. D. (2009) Radicais livres antioxidantes e função espermiática em mamíferos, uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 33(34), 183 – 193.
- Matos, F. J. (2009) *Introdução à fitoquímica experimental*, (3a ed.), Edições UFC.
- Melo, D. S., Corrêa, A. D., Marcos, F. C. A., Sousa, R. V., Abreu, C. M. P., & Santos, C. D. (2007) Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. *Ciência Agrotecnica*, 31(2), 420-428.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Noldin, V. F., Isaias, D. B., & Filho, V. C. (2006) Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Revista Química Nova*, 29(3), 549-554.
- Palomino, J.C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., F. & Portaels. (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46 2720-2722.
- Pires, A. M. L. (2011) Estudo fitoquímico de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes e *Calliandra depauperata* Benth. 211 f. *Tese – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Química*, Fortaleza.
- Ribeiro, A. F. C. (2012) Avaliação das atividades anti-inflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. 92 f., *Tese (Doutorado em Ciência Animal)* – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- Santos, R., Silva, I., Veríssimo, R., Lúcio, I., Campesatto, E., Conserva, L., & Bastos, M. (2015) Study of antimicrobial and cytotoxic potential of *Pouteria venosa* species (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17(3), 367-373.
- Santos, S. C., Ferreira, F. S., Rossi-Alva, J. C., & Fernandez, L. G. (2007) Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2), 215-219.
- Santos, S. C., Mello, J. C. P. Taninos. In: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosman, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2007) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, (5a ed.), Editora UFRGS.
- Saturmino-Oliveira, J., Santos, D. C., Guimarães, A. G., Dias, A. S., Tomaz, M. A., Monteiro-Machado, M., Estevam, C. S., De Lucca Junior, W., Maria, D. A., Melo, P. A., Araújo, A. A. S., Santos, M. R. V., Almeida, J. R. G. S., Oliveira, R. C. M., Oliveira, A. P., & Quintans-Júnior, L. J. (2014) *Abarema cochliacarpus* extract decreases the inflammatory process and skeletal muscle injury induced by *Bothrops leucurus* Venom. *BioMed Research International*, 1-9.
- Shan, A. Y. K., Almeida, E. C. V., Santos, A. L. L. M., Lima, A. C. B., Santos, C. C. S., Souza, M. T. S., Damascena, N. P., Araujo, S. S., Santos, J. L. S., Paixao, M. S., Marçal, A. C., Quintans-Junior, L. I. J., Araujo, B. S., & Estevam, C. S. (2016) Antioxidant and antinociceptive effect of the hydroethanolic extract and fractions of the bark of *Bowdichia virgilioides* in orofacial pain. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 10(15), 320-329.
- Silva, F. C., Duarte, L. P., & Vieira Filho, S. A. (2014) Celastráceas: Fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. *Revista Virtual de Química*, 6(5), 1205-1220.
- Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., & Koblitz, M. G. B. (2010) Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 669-682.

- Silva, N. L. A., Miranda, F. A. A., & Conceição, G. M. (2010) Triagem fitoquímica de plantas do cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia plena*, 6(2), 1-17.
- Silva, N. C. B., Esquibel, M. A., Alves, I. M., Velozo, E. S., Almeida, M. Z., Santos, J. E. S., Campos-Buzz, F., Meira, A. V., & Cechinel-Filho, V. (2009) Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B. A. Gomes) Barneby & J. W. Grimes (Mimosaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1), 46-50.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., De Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2007) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, (2a ed.), Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 821 p.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014) Total phenolic content, antioxidant activity of aqueous extract from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54.
- Soares, S. P., Vinholis, A. H. C., Casemiro, L. A., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., & Martins, C. H. G. (2008) Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. *Revista Odonto Ciência*, 23 (2): 141-144.
- Veiga-Júnior, V. F. (2008) Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-oeste do estado do Rio de Janeiro e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 308-313.
- Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J. F. G., Cunico, M. M., Miguel, M. D., Oliveira, A. B., & Miguel, O. G. (2005) Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2): 137-142.