

Volume 12 - Número 2
Abril - Junho 2018

REVISTA

FITOS[®]

e-ISSN 2446-4775 | ISSN 1808-9569

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fitoterápicos

Anti-mycoplasma activity of *Curcuma longa* extracts and an isolated compound, the curcumin

Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico)

Avaliação da qualidade das plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes-RJ

Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit

Efeitos alelopáticos de extratos vegetais de *Hancornia speciosa*, Gomes na germinação de *Lactuca sativa* L.

Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açaizeiro

Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*

Guavira



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



farmanguinhos
Instituto de Tecnologia em Fármacos



e-ISSN: 2446-4775 | ISSN 1808-9569

Presidente da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): Nísia Trindade Lima

Diretor do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos): Jorge Souza Mendonça

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

**Editores Científicos
Coordenadores:** Glauco de Kruse Villas-Bôas, FIOCRUZ
Marcelo Neto Galvão, FIOCRUZ
José Luiz Mazzei da Costa, FIOCRUZ

**Editores de Área de
Conhecimento:** Emiliano de Oliveira Barreto, UFAL
Fátima Checheto, UNESP
Israel Felzenszwalb, UERJ
João Paulo Viana Leite, UFV
Marcos Sorrentino, USP
Paulo Rogério Lopes, UFSCar, ESALQ-USP

Editores Adjuntos: Érica Speaglich, USP
Ivanildes Vasconcelos Rodrigues, UFJF
Vanilde Citadini Zanette, UNESC

Editor Executivo: Rosane de Albuquerque dos Santos Abreu, FIOCRUZ

Corpo Editorial: Benjamin Gilbert, FIOCRUZ
Cecília Veronica Nunez, INPA
Claudia do Ó Pessoa, UFCE
Edeltrudes de Oliveira Lima, UFPB
Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha, UFPB
Jislaine de Fátima Guilhermino, FIOCRUZ
João Marcos Hausmann Tavares, UFRJ
José Maria Guzman Ferraz, UFSCar, Unicamp
Mahabir Gupta, Universidad do Panamá
Maria Aparecida Medeiros Maciel, UFRN
Maria Augusta Arruda, FIOCRUZ
Maria Cristina Marcucci Ribeiro, UNIBAN
Norma Albarello, UERJ
Sônia Soares Costa, UFRJ

REVISTA FITOS

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde - NGBS

Correspondência / Mail

Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde – NGBS

FIOCRUZ, Farmanguinhos, Complexo Tecnológico de Medicamentos - CTM

Av. Comandante Guarany, 447 Jacarepaguá - Rio de Janeiro

RJ - CEP 22775-903

revistafitos@far.fiocruz.br

Tel.: +55 21 3348.5370 / +55 21 3348.5598

Informações para cadastro e submissão / Registration and Submission Information

www.revistafitos.far.fiocruz.br

Tel: +55 21 3348.5370 / +55 21 3348.5598

E-mail: revistafitos@far.fiocruz.br

Acesso on-line / On line Access

Artigos disponíveis em formatos PDF e HTML no endereço eletrônico:

www.revistafitos.far.fiocruz.br

Classificação CAPES-Qualis

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

Qualis B4 (Engenharia e Biodiversidade)

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

Escritório Editorial - NGBS

Assistente Editorial – Yolanda de Castro Arruda

Revisora – Tatiana Vasconcelos Chaves Pontes

Apoio NGBS

Revisão Final e Controle de Qualidade – Preciosa de Jesus Meireles de Oliveira, Assessoria de Gestão

Divulgação e Comunicação – Denise Monteiro da Silva, Seção de Informação e Comunicação

Administrador SEER e Design – Eugênio Fernandes Telles, Seção de Informação e Comunicação

Associada à ABEC

**Associação Brasileira
de Editores Científicos**



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

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

Anual: 2007 e 2011
Interrompida: 2008, 2014
Quadrimestral: 2010
Trimestral: 2012, 2015, 2016
Semestral: 2005, 2006, 2009, 2013

ISSN 1808-9569
e-ISSN 2446-4775

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

CDD 615.32

Revista Fitos

e-ISSN 2446-4775 | ISSN 1808-9569

Volume 12, número 2

Abril - Junho, 2018

EDITORIAL

Ana Tereza Gomes Guerrero, Ana Cristina Araújo Ajalla, Raquel Pires Campos 107-109

ARTIGO DE PESQUISA

Anti-mycoplasma activity of *Curcuma longa* extracts and an isolated compound, the curcumin 110-116

Farmacologia

Ariela Maína Boeder, Adrielli Tenfen, Diogo Alexandre Siebert, Camila Leandra de Bueno Almeida, Cláudia Rafaela Marques Firmo, Dilamara Riva Scharf, Gustavo Amadeu Micke, Edésio Luís Siminionatto, Caio Mauricio Mendes de Cordova, Alessandro Guedes.

Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico) 117-126

Antioxidant activity of the essential oil from *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. by different antioxidants assays (ABTS, DPPH, FRAP, β -carotene/linoleic acid)

Química

Leomara Andrade da Silva, Juliana Divina Almeida Raposo, Laila Portil Garcino Campos, Edemilson Cardoso da Conceição, Ricardo Bezerra de Oliveira, Rosa Helena Veras Mourão.

Avaliação da qualidade das plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes-RJ 127-134

Quality assessment of medicinal plants marketed in the Municipal Market of Campos dos Goytacazes-RJ

Botânica

Marcos Vinicius Leal-Costa, Fernanda S. Teodoro, Caio Barbieri, Luís Felipe Umbelino dos Santos, Adriana Lima de Sousa.

Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit 135-146

Química

Mariana S. de Oliveira, Sávio L. Gontijo, Marina S. Teixeira, Karina I. Rosa Teixeira, Jacqueline A. Takahashi, Rubén Dario Sinisterra Millan, María Esperanza Cortés Segura.

Efeitos alelopáticos de extratos vegetais de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes, na germinação de <i>Lactuca sativa</i> L.	147-160
Allelopathic effects of plant extracts of <i>Hancornia speciosa</i> Gomes on germination of <i>Lactuca sativa</i> L.	
<i>Química</i>	
Lidiane Andressa Uhlmann, Rafael José Oliveira, Marcio Galdino Santos.	
Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açazeiro	161-174
Isolation and antimicrobial activity evaluation of endophytic fungi of açazeiro	
<i>Toxicologia</i>	
Bárbara Nunes Batista, Nádia Verçosa de Medeiros Raposo, Ingrid Reis da Silva.	
Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Cecropia pachystachya</i>	175-185
Phytochemical profile and evaluation of antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of <i>Cecropia pachystachya</i> leaves	
<i>Química</i>	
Jéssica Caroline Freitas da Costa, Jaqueline Hoscheid.	
ERRATA	186-198
INSTRUÇÕES AOS AUTORES	
Normas para submissão e apresentação do manuscrito	188-198

DOI: 10.5935/2446-4775.20180009

O Número 2 do volume 12 da Revista Fitos Eletrônica abre a publicação com Editorial sobre a Guavira, fruto símbolo do Estado do Mato Grosso do Sul.

A Guavira (*Campomanesia* spp.), também conhecida popularmente como Guabiroba, Gabiroba-do-mato e Gabiroba-miúda, apresenta frutos e folhas com efeitos medicinais promissores, com destaque em atividades anti-inflamatória, antidiarreica, antisséptica e antimicrobiana, especialmente contra *Mycobacterium tuberculosis* (1,2,3), além de alto teor de ácido ascórbico na polpa dos frutos (4).

Pertence à família *Myrtaceae*, cujos representantes botânicos se apresentam como arbustos decíduos e subarbustos, com período de floração entre agosto e outubro e frutificação entre novembro e dezembro (1). Os frutos são carnosos e as sementes amplamente dispersas pelos pássaros (5)

Nos últimos anos, no estado do Mato Grosso do Sul observa-se uma redução na quantidade de guavirais, dos quais a visita é uma prática cultural tradicional realizada por famílias de áreas rurais urbanas. O consumo do fruto “*in natura*”, bem como de produtos na forma de sorvetes, licor, suco e geleia é amplamente difundido pela população local (2)

Considerando-se o contexto histórico regional, a importância cultural dos guavirais e do consumo da fruta, bem como de produtos originados desta, foi publicada a Lei Estadual Nº 5.082, em 07 de novembro de 2017, que declara a Guavira como fruto símbolo do Estado de Mato Grosso do Sul. Diante desta ação, formou-se um grupo de trabalho composto por representantes, principalmente, da FIOCRUZ MS, AGRAER, UFMS, UCDB, UNIDERP SEBRAE e, ainda, da Assembleia Legislativa, Secretarias Estaduais de Cultura, Turismo, Ciência e Tecnologia, visando estruturar ações para incentivar a divulgação da referida Lei.

Desta forma, foi realizado o I Seminário Estadual da Guavira, nos dias 12 e 13 de abril de 2018, na Cidade de Campo Grande - MS, objetivando a discussão de temas relacionados à preservação, conservação e restauração da Guavira, além da exploração sustentável, desenvolvimento de produtos, turismo e fortalecimento de uma cadeia produtiva. Várias atividades integradas foram realizadas, como a exposição Coletiva de Fotografias da Guavira e a Feira de Produtos da Sociobiodiversidade.

Ao final do evento foi gerado um documento referente às ações que deverão ocorrer para consolidar o uso sustentável da Guavira, dentre as quais podem ser citadas:

- Realizar o diagnóstico, via georreferenciamento, das áreas de ocorrência de Guavira em Mato Grosso do Sul.
- Realizar um levantamento de quem comercializa e quem quer comercializar, pensando na rede de contatos em parcerias com a comunidade rural.
- Apoiar as licitações de compras públicas que contemplem os frutos do Cerrado e regionais, como a Guavira e outros;

- Estimular coletores extrativistas de comunidades rurais, comunidades tradicionais e povos indígenas a formarem cooperativas agroindustriais, estrategicamente localizadas a partir do mapeamento diagnóstico, com aproveitamento do conhecimento popular para o manejo da espécie;
- Estimular o consumo do fruto “*in natura*”, de maneira que possam ser consumidos com segurança, facilidade e conveniência, sendo lavados, e higienizados e acomodados em embalagens de pequenas porções;
- Garantir o fornecimento ao longo do ano;
- Promover o preparo da polpa para congelamento e de especiaria da casca, visando a comercialização em todas as redes de distribuição;
- Desenvolver estudos referentes a viabilidade da extração dos óleos da semente e da folha que poderiam estar ocorrendo como atividade paralela ao aproveitamento do fruto;
- Divulgar os nutrientes e propriedades da planta Guavira que são benéficas à saúde e ao desenvolvimento de nutracêuticos e fitoterápicos, além de produtos não alimentícios como cosméticos, incluindo sabonete antibacteriano;
- Lançar um edital que contemple pesquisas com Guavira pelo órgão de fomento estadual.
- Elaborar publicação sobre Guavira com as informações da pesquisa, saber popular, histórico, culinária, entre outros.

Considerou-se importante trazer essas informações em forma de editorial neste número da Revista Fitos para incentivar novos estudos e pesquisas e, também, para contribuir com a discussão sobre a riqueza da diversidade vegetal brasileira, destacando as propriedades terapêuticas da espécie e revelando as potencialidades econômicas e sociais, assim como os aspectos culturais que podem alavancar estratégias de desenvolvimento regional sustentável.

Referências

1. Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Plantarum, 2006, 640p.
2. Pavan FR, Leite CQF, Cardoso CL, Vilegas V, Leite SRA, Sato DN. Evaluation of anti-mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Quím Nova**. São Paulo. 2009; 32(5): 1222-1226.
3. Cardoso CAL, et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia species* (Myrtaceae). **J Med Food**. 2010; 13(5): 1273-1276.
4. Vallilo M I, et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Rev Ciên Tecnol Alim**. 2006; 26(4): 805- 810.

5. Landrum LR, Kawasaki ML. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**. 49(4): 508-536.

Ana Tereza Gomes Guerrero - Fiocruz Mato Grosso do Sul
ana.guerrero@fiocruz.br

Ana Cristina Araújo Ajalla - Agraer/Cepaer
anajallaagraer@gmail.com

Raquel Pires Campos - FAFAN/UFMS
pirescamposraquel@gmail.com

Anti-mycoplasma activity of *Curcuma longa* extracts and an isolated compound, the curcumin

DOI 10.5935/2446-4775.20180010

Boeder, Ariela Maína¹; Tenfen, Adrielli³; Siebert, Diogo Alexandre²; Almeida, Camila Leandra de Bueno⁴; Firmo, Cláudia Rafaela Marques⁴; Scharf, Dilamara Riva⁵; Micke, Gustavo Amadeu⁶; Siminionatto, Edésio Luís⁴; Cordova, Caio Mauricio Mendes de⁴; Guedes, Alessandro⁴.

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética do Comportamento, BEG, bloco C, 3º andar, Córrego Grande, CEP:88037-000, Florianópolis, SC, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Departamento de Química, Campus Trindade, Rua Reitor João David Ferreira Lima, s/nº, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

³Instituto Educacional de Santa Catarina, Faculdade Jangada, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Rua Presidente Epitácio Pessoa, 676, Centro, CEP: 89251-100, Jaraguá do Sul, SC, Brasil.

⁴Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Campus 3, Rua São Paulo - de 924 ao fim - Itoupava Seca, CEP: 89030-001, Blumenau, SC, Brasil.

⁵Fundação Universidade Regional de Blumenau, Laboratório de Cromatografia, Rua São Paulo, 3250, Itoupava Seca, CEP: 89030-000, Blumenau, SC, Brasil.

⁶Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Departamento de Química, laboratório 313, Rua Roberto Sampaio Gonzaga, s/nº, Campus Trindade, CEP: 88040900, Florianópolis, SC, Brasil.

*Correspondência: ariela_qs@hotmail.com

Abstract

Curcuma longa (saffron) is widely used in Western cuisine and its consumption is associated to the prevention and control of various diseases. Nevertheless, there no report on its antibacterial activity against mycoplasma strains. Thus, the present study aims to evaluate the antibacterial activity of *C. longa* and the curcumin against strains of mycoplasma. The rhizomes of *C. longa* were submitted to different processes of conservation followed by maceration to obtain ethanolic and acetonic extracts, and decoction to obtain aqueous extracts. The extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet detector (HPLC-UV) to quantify curcumin. Anti-mycoplasma activity of the extracts and curcumin were evaluated using a broth microdilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The best activity was observed in the ethanolic and acetonic extracts, which had the higher curcumin content, indicating a relationship between the presence of this compound and the anti-mycoplasmatic activity.

Keywords: *Curcuma*; Curcumin; Anti-bacterial activity; Mycoplasma.

Introduction

The Mycoplasmas are part of the Mollicutes class, a large group of peculiar microorganisms responsible for a series of diseases in animals, plants and in humans, being notable for causing sexually transmitted diseases (STDs) and respiratory infections (1). These microorganisms are capable of self-replication (2), whose major phenotypic characteristics are the absence of cell wall and its reduced genome (3). Additionally, a significantly increased incidence of infections, more likely in immunocompromised patients, causing opportunistic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), cancer chemotherapy and transplantation.

Due to the absence of cellular wall, mycoplasmas are just susceptible for a few antimicrobial agents such macrolides, tetracyclines and quinolones (4). The identification of new antimicrobials from plants can be of great contribution in the fight against these infections (5).

The *Curcuma longa*, popularly known as turmeric, golden ginger and earth's saffron, belongs to the family Zingiberaceae (6). Widely used as a spice, food conservative and dye material. In traditional medicine is used for disease control, due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, antifungal and anti-carcinogenic activities. The curcumin, a curcuminoid, is the main bioactive yellow component of turmeric and is the responsible for the broad spectrum of biological actions of this plant (7). Nevertheless, there was no report on its antibacterial activity against mycoplasma strains.

Thus, the objective of this study was to evaluate the anti-mycoplasma activity of *Curcuma longa* and its main compound (curcumin) against species of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri*, *Mycoplasma pneumoniae* strains FH and 129.

Material and Methods

Plant material: The rhizomes of *C. longa* were collected in Blumenau (SC, Brazil), identified by the botanist André Luiz Gasper, and a voucher specimen was deposited in the Dr. Roberto Miguel Klein herbarium, from Universidade Regional de Blumenau (FURB), under the number 46859.

Preparation of plant material: Samples of rhizomes (50 g) were submitted to different thermal processes to evaluate the best method of conservation of the main constituent of the plant, curcumin. Thus, three ethanolic extracts were prepared, process 1: rhizomes were frozen at -18°C for six months and extracted with 96% ethanol (EFH); process 2: rhizomes were stored away from light for six months and extracted with 96% ethanol (ESL); process 3: rhizomes *in natura* extracted after collection with 96% ethanol (EIH).

Then, the best extractive solvent for the curcuminoid compounds was evaluated using samples (50 g) oven-dried rhizomes at 60°C were extracted with 3 different solvents: 96% ethanol (EID), acetone (KID) and water (AID).

Extraction procedure: To obtain ethanolic (EtOH 96%) and acetonic extracts, rhizomes were crushed in a turbolizer and macerated with shaking for 4 hours. The extracts were subjected to filtration and concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure to constant weight.

To obtain the aqueous extract the rhizomes were crushed, macerated and extracted by decoction at 90°C for 10 minutes, mimicking the popular use in the form of tea. After filtration, the extracts were frozen at -18°C for 24 hours and lyophilized for 72 hours to constant weight.

Chromatographic analysis of curcumin: The chromatographic analysis was performed ⁽⁹⁾. Individual standard solutions and the extract were prepared by dissolving 5 mg of each in 10 mL of methanol to obtain a stock solution of 500 mg/L. Calibration curve was prepared with concentrations ranging from 0,2 to 100 mg/L by diluting the curcuminoid stock solution in methanol.

All chromatographic analyses were carried out using an Agilent 1260 infinity, using an Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 i.d. x 150 mm; 5 µm) column, set at 25 °C. The eluents were formed by mixing solvents, A (H₂O ultrapure/acetic acid 1 %) and B (acetonitrile) as follows: 1st stage – linear gradient of solvents A and B (from 45 to 50% of A) for 6 minutes; 2nd stage – linear gradient of solvents A and B (from 50 to 45% of A) for 1 minute; 3rd stage – 45% of solvent A and 55% B (isocratic mode) for 3 minutes with a flow rate of 1 mL/min of mobile phase. In all analysis, the injected volume was 5 µL. The DAD was set at 424 nm (at 4 nm bandwidth). Full spectral scanning was also performed from 190 to 600 nm, with a range step of 2 nm. Agilent Chem Station software was used to control all analytical conditions and data acquisition. Sample quantification was calculated by comparing peak area with the external calibration curve from neat standard solution.

Anti-mycoplasma activity: To evaluate the anti-mycoplasma activity the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method, in 96-well plates as indicated by the CLSI ⁽⁹⁾ with slight modifications ⁽¹⁰⁾. The microorganisms used were strains standardized of *Mycoplasma hominis* (ATCC 23114) in Arginine liquid medium (MLA), *Mycoplasma capricolum* (ATCC 27343), *Mycoplasma genitalium* (ATCC 33530), *Mycoplasma pneumoniae* strains FH (ATCC 15531) and 129 (ATCC 29342), as well as strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (NCTC 10137) in liquid medium SP4 (specific for Mycoplasmas) stored at -20 °C.

Subcultures were prepared by withdrawing 1 ml of a stock culture from each growth log strain, which was added to a sterile Falcon-type tube containing 9 ml of culture medium and incubated at 36 °C ± 1 °C for 2 hours in microaerophilic (2 - 3% CO₂). After this incubation period, the cultures diluted at 10⁴ CFU mL⁻¹ (colony-forming units) were used in the MIC tests. The crude extracts were diluted to 40 mg mL⁻¹ and the isolated compounds diluted to 4 mg mL⁻¹ in dimethylsulfoxide (100% DMSO), the samples was performed serial dilution of order 2 and added inoculum of the cultures of mollicutes in all wells. As growth control, a serial dilution of the culture of the microorganism was performed without the addition of solvent or extract; as a positive control the antibiotic azithromycin (DME®, Araçatuba, Brazil); as a negative control a serial dilution of the solvent itself (100% DMSO, without the presence of extract); as control of the culture medium, only medium; as control of sterility of the extracts and fractions a cavity was reserved for each sample plus the culture medium.

The plates were incubated at 37 °C for the time required for each strain (24h to 30 days), and growth is observed from the change in staining of the culture medium due to the presence of the red phenol pH indicator.

Results and discussion

For evaluation purposes of curcumin content in the different prepared extracts, the samples were submitted to HPLC-UV analysis (TABLE 1). Analyzing the results, it was concluded that the best way of conserving curcumin is to leave the stored rhizomes sheltered from the light in room temperature for 6 months (ESL), which presented a curcumin content of the 5,71%. Storing the tubers under the shelter of light conserves the content of curcumin, as evidenced in this work (11). These results are probably due to the photosensitive characteristic of turmeric (12).

Comparing the extractive capacity of the three used solvents (ethanol, acetone and water) the results indicated that ethanolic (EID) and acetonic (KID) extracts present higher levels of curcumin, 3,63% and 3,5% respectively. In addition, the aqueous extracts obtained the lowest levels of curcumin (0,16%). These results agree to literature, and are mainly related to the solubility of curcumin, which is better in ethanol and acetone (13).

TABLE 1: Curcumin dosing of the extracts.

Analysis	Extracts	Curcumin content (%) ^a
Conservation	ESL	5,71
	EFH	2,92
	EIH	0,62
Solvents	EID	3,63
	KID	3,5
	AID	0,16

Legend: ^aCalculated in g/100g; ESL = Ethanolic to the Shelter of Light; EFH = Ethanolic Frozen Humid; EIH = Ethanolic *In natura* Humid; EID = Ethanolic *In natura* Desiccated; KID = Acetonic *In natura* Desiccated; AID = Aqueous *In natura* Desiccated.

There are several studies that attribute antibacterial activity to *C. longa* (6) as well as curcumin (14). However, this is the first work that evaluates the antibacterial activity of *C. longa* and curcumin against bacteria without cell wall (TABLE 2).

TABLE 2: Anti-mycoplasma activity of the extracts and curcumin.

Samples	Minimal Inhibitory Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	<i>M. hominis</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>M. mycoides subsp. capri</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M. pneumoniae FH</i>	<i>M. Pneumonie 129</i>
ESL	125	500	250	125	250	125
EFH	125	250	250	125	125	500
EIH	1000	>1000	>1000	1000	1000	500
EID	125	500	250	125	250	125
KID	125	125	125	125	125	125
AID	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Curcumin	50	50	100	50	50	100
Control + ^b	2	2	2	2	2	2

Legend: ^bControl + = Azitromicin; ESL = Ethanolic to the Shelter of Light; EFH = Ethanolic Frozen Humid; EIH = Ethanolic *In natura* Humid; EID = Ethanolic *In natura* Desiccated; KID = Acetonic *In natura* Desiccated; AID = Aqueous *In natura* Desiccated.

The extracts were analyzed by the criteria established ⁽¹⁵⁾ which determines that samples with MIC values below 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are considered to have excellent antibacterial activity; Values between 10 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are considered good; Values between 100 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are considered moderate activity; Values between 500 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of weak activity, and the samples are considered inactive for MIC values above 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For the isolated compounds values above 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were considered inactive for *Mycoplasmas*.

The acetones and ethanolic extracts had better anti-mycoplasma activity. When related with the curcumin content was observed that samples with curcumin content greater than 2.5% showed the best results, like ESL with MIC of 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *M. hominis*, *M. genitalium* and *M. pneumoniae* 129, and KID with MIC of 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against all the strains. On the other hand, it is possible to observe that the aqueous extract with lower curcumin content, was considered inactive (MIC >1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ⁽¹⁵⁾.

In addition, it was evaluated that the MIC of curcumin being considered good activity for an isolated compound (MIC = 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *M. hominis*, *M. capricolum*, *M. genitalium* and *M. pneumoniae* FH).

A study was conducted ⁽¹⁶⁾ to evaluating an antibacterial activity of curcumin against cell wall bacteria such as methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella Pneumoniae*, where curcumin showed activities as MIC strains ranging from 129 mg mL^{-1} to 293 mg mL^{-1} . Another study found out affirm that the antibacterial activity presented by curcumin against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* occurs due to the inhibition of FtsZ polymerization ⁽¹⁷⁾. The FtsZ cytoskeletal protein plays a key role in prokaryotic cell division and is present in most bacterial species. The mycoplasma has more components of the division cellular being this protein responsible for one of them ⁽¹⁸⁾. This way, the inhibition of mycoplasmas growth by curcumin, evidenced in this work, may have occurred due to the inhibition of this protein, which also exists in this class of microorganisms.

Conclusion

In conclusion, it is possible to affirm that to obtain higher levels of curcumin it is necessary to use solvents like ethanol and acetone, and it was proved that the storage of the vegetal material conserves the content of curcumin. In addition, the *C. longa* has good activity against Mycoplasma strains and a minimum concentration of curcumin is need for a sample to become active, making the *C. longa* an important source of study for future. In addition, this work assists in the verification of another important biological activity for *C. longa*.

References

1. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol Mol Biol Rev.** 1998; 62 (4): 1094-1156. [[PubMed](#)].
2. Cordova CMM, Cunha RAF. Detecção de *Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans* em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil. **J Bras Patol Med Lab.** 2002; 38 (2): 119-126. ISSN: 1678-4774. [[CrossRef](#)].

3. Santos SB, Nascimento ER, Faccini JLH, Barreto ML, Almeida JF, Pereira VLA, et al. Detecção do Grupo *Mycoplasma mycoides* por imunoperoxidase indireta (IPI) e PCR-REA em conduto auditivo de bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 2010; 30 (5): 465-469. [[Link](#)].
4. Taylor-Robinson D, Bébéar C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. **J Antimicrob Chemother.** 1997; 40 (5): 622–630. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
5. Cordova SM, Benfatti CS, Magina MDA, Guedes A, Cordova CMM. Evaluation of the antibacterial activity of extracts isolated from native plants of the Brazilian flora against *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. **RBAC.** 2014; 42 (4): 241- 244. [[Link](#)].
6. Péret-Almeida L, Naghetini CDC, Nunan EDA, Junqueira RG, Glória MBA. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciênc Agrotec.** 2008; 32 (3): 875-881. ISSN: 1413-7054. [[CrossRef](#)].
7. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnol Adv.** 2014; 32 (6): 1053-1054. [[CrossRef](#)].
8. Kim Y, Lee HJ, Shin Y. Optimization and validation of high-performance liquid chromatography method for individual curcuminoids in turmeric by heat-refluxed extraction. **J Agric Food Chem.** 2013; 61(46): 10911-10918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
9. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Ninth Edition. 2012. CLSI document M97-A9.
10. Bebear C, Robertson J. **Determination of the minimal inhibitory concentration.** In: Tully JG, Razin S, editors. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. San Diego: Academic Press; 1996. p. 189-197.
11. Ganpati KS, Bhaurao SS, Iranna KK, Dilip CR, Nilkanth YP. Comparative studies on curcumin content in fresh and stored samples of turmeric rhizomes. **IRJP.** 2011; 2 (4): 127-129. ISSN: 2230-8407. [[Link](#)].
12. Sogi DS, Sharma S, Oberoi DPS, Wani, IA. Effect of extraction parameters on curcumin yield from turmeric. **J Food Sci Technol.** 2010; 47 (3): 300–304. [[CrossRef](#)].
13. Himesh S, Sharan OS, Mishra K, Govind N, Singhai AK. Qualitative and quantitative profile of curcumin from ethanolic extract of *Curcuma longa*. **IRJP.** 2011; 2 (4): 180-184. ISSN: 2230-8407. [[Link](#)].
14. Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine.** 2013; 20 (8-9): 714–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
15. Holetz FB, Penssini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura C, Dias-filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002; 97 (7):1027-1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

16. Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE. Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study. **Toxicol Ind Health**. 2016; 32 (2): 246-250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
17. Kaur S, Modi NH, Panda D, Roy N. Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ—a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. **Eur J Med Chem**. 2010; 45 (9): 4209-4214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
18. Vaughan S, Wickstead B, Gull K, Addinall SG. Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. **J Mol Evol**. 2004; 58 (1): 19-29. ISSN: 1432-1432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 20/01/2018 | Aceite: 25/05/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Boeder AM, Tenfen A, Siebert DA, Almeida CLB, Firmo CRM, Scharf DR, Micke GA, Siminionato EL, Cordova CMM, Guedes A. Anti-mycoplasma activity of *Curcuma longa* extracts and your isolated compound, the curcumin. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(2): 110-116. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/601>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico)

Antioxidant activity of the essential oil from *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. by different antioxidants assays (ABTS, DPPH, FRAP, β -carotene/linoleic acid)

DOI 10.5935/2446-4775.20180011

Silva, Leomara Andrade da^{1*}; Raposo, Juliana Divina Almeida²; Campos, Laila Portil Garcino³; Conceição, Edemilson Cardoso da³; Oliveira, Ricardo Bezerra de⁴; Mourão, Rosa Helena Veras⁴.

¹Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas-INPA. Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia. Av. André Araújo, 2.936, Petrópolis, CEP: 69067-375, Manaus, Amazonas, Brasil.

²Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Av. Universitária com 1ª Avenida s/n, Setor Universitário, CEP: 74605-220, Caixa-postal: 31, Goiânia, GO, Brasil.

⁴Universidade Federal do Oeste do Pará, Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBBEx), Unidade Amazônia, Av. Vera Paz s/n, Salé, 68040-070, Santarém, PA, Brasil.

*Correspondência: andrade.biologia@hotmail.com

Resumo

Entre as várias espécies que possuem ampla diversidade para atividades biológicas, estão as da família Myrtaceae, que apresentam alto teor de óleo essencial. Em virtude da carência de estudos com atividade antioxidante do gênero *Myrcia* (Myrtaceae), o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante do óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia sylvatica* (OEMS) por meio dos métodos de captura de radical livre (DPPH e ABTS) e pela auto-oxidação do FRAP e do sistema β -caroteno/ácido linoleico, comparando a padrões trolox e BHA como referências. A capacidade antioxidante pelo método DPPH apresentou IC₅₀ de 1,94 ± 0,12 mg/mL em 60 minutos de reação. Pelo método ABTS, apresentou atividade antioxidante correspondente a 32,85 ± 0,86 μ M de trolox/g de OEMS. Pelo método FRAP apresentou Z de 193,47 ± 2,63 de μ M de sulfato ferroso/g de OEMS, em 45 minutos de reação. No teste de β -caroteno/ácido linoleico, o OEMS (4 mg/mL) inibiu 26,1% da oxidação do β -caroteno em 120 min de reação. O óleo essencial de *M. sylvatica* apresentou baixa atividade antioxidante, sendo pouco eficaz comparativamente às referências, mesmo que testado por mais de um mecanismo.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Óleo essencial. DPPH. ABTS. FRAP. β -caroteno/ácido linoleico. *Myrcia sylvatica*.

Abstract

Among the various species that possess wide diversity for biological activities, are those from the Myrtaceae family, which have high content of essential oil. Due to the lack of studies with *Myrcia* (Myrtaceae) antioxidant activity, the aim of this work was to evaluate the antioxidant capacity of essential oil from fresh leaves of *Myrcia sylvatica* (OEMS) by free radical capture methods (DPPH and ABTS) and by autoxidation of the FRAP and the β -carotene/linoleic acid system, comparing trolox and BHA standards as references. The antioxidant capacity by the DPPH method showed IC 50 of 1.94 ± 0.12 mg/mL in 60 minutes of reaction. By the ABTS method, OEMS presented antioxidant activity corresponding to 32.85 ± 0.86 μ M trolox/g. By the FRAP method, Z showed 193.47 ± 2.63 μ M of ferrous sulfate/g of OEMS in 45 minutes of reaction. In the β -carotene/linoleic acid test, the OEMS (4 mg/mL) inhibited 26.1% of β -carotene oxidation in 120 min of reaction. The essential oil from *M. sylvatica* presented low antioxidant activity, being less effective compared to the references, even when it was tested by more than one mechanism.

Keywords: Antioxidant activity. Essential oil. DPPH. ABTS. FRAP. β -caroteno/linoleic acid. *Myrcia sylvatica*.

Introdução

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, quando ocorre a produção excessiva de radicais de oxigênio durante processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais (1). Através de um ou mais mecanismos, os antioxidantes têm como função reduzir a oxidação, como por exemplo, por meio da inibição de radicais livres e complexação de metais (2).

Naturalmente, os radicais livres são produzidos endogenamente ou adquiridos de forma exógena, e seu excesso gera o estresse oxidativo (3). Essas substâncias são cada vez mais conhecidas, incitando um maior interesse para o uso em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, capazes de substituir antioxidantes sintéticos suspeitos de induzir câncer (4-5). Há um crescente interesse pelos antioxidantes naturais provenientes dos extratos vegetais (6), principalmente a partir de plantas aromáticas e medicinais, consideradas fontes de antioxidantes naturais. Metabólitos secundários, como os compostos fenólicos têm ação antioxidante, que agem inibindo a formação de radicais livres (7-9). Dessa forma, os óleos essenciais e seus constituintes têm proporcionado aceitação devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo ação antioxidante (9).

Entre as várias espécies que possuem ampla diversidade para atividades biológicas, estão as da família Myrtaceae, que apresentam alto teor de óleo essencial (10). Algumas espécies da família Myrtaceae foram testadas quanto ao potencial antioxidante, a exemplo de: *Eucalyptus citriodora*, pelos métodos FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e de captura de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (11); *Eugenia stipitata*, testada pelas metodologias Folin-Ciocalteu e DPPH (12); *Eucalyptus rostrata* testada *in vitro* com membrana de coelhos (13); *Myrciaria dubia*, pelos métodos ABTS (ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) e FRAP (14); e *Myrtus comunis* L., pelos métodos DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu (15).

No entanto, devido ao grande número de representantes de Myrtaceae, existe uma ampla investigação a ser realizada, principalmente ao que se refere às suas propriedades biológicas. Entre as espécies, destaca-se *Myrcia sylvatica*, conhecida popularmente por "murtinha" ou "pedra-ume-caá", usualmente comercializada e utilizada na medicina popular para o controle da diabetes, diarreia, aftas, inflamação

intestinal e hemorragias, sendo as folhas a principal região vegetativa utilizada em forma de chá ou em banhos (16).

Pesquisas recentes mostram que o óleo essencial de *Myrcia sylvatica* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* (17). Além disso, o óleo essencial da espécie é também recomendado para anestesia e sedação em peixes, sendo eficaz na prevenção de uma resposta ao estresse e excesso de formação de espécies reativas de oxigênio (18-19).

No entanto, em virtude da carência de estudos com atividade antioxidante do gênero *Myrcia*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC., pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico.

Material e Métodos

Folhas de *Myrcia sylvatica* foram coletadas em uma área de savana (coordenadas 02° 30' 31,7"S e 54° 50' 59,9"W), perto da Comunidade São Pedro, estrada Everaldo Martins, Km 21, cidade de Santarém, Pará, Brasil. A coleta foi realizada no período da manhã em agosto de 2012. A amostra testemunha foi depositada no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental (Belém - PA), sob o número IAN 184696. Foram utilizadas na proporção de 1:10 (massa vegetal/água destilada), 100 g de folhas frescas cortadas manualmente e submetidas à hidrodestilação, usando um aparelho do tipo Clevenger (3 h), para obtenção do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (OEMS). O rendimento do OEMS foi de 0,9%, calculado em porcentagem, através da relação entre o volume de óleo obtido (0,9 mL) e a biomassa vegetal utilizada na extração (100 g).

Determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH

A atividade antioxidante do OEMS pela captura do radical livre DPPH foi determinada de acordo com o método de Kondo (20), com modificações. A amostra de OEMS foi solubilizada em etanol nas concentrações de 8, 20, 40 e 80 mg/mL. Preparou-se uma solução etanólica de DPPH (60 μ M) com absorvância inicial entre 0,6 e 0,7 à temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi analisada a 517 nm em espectrofotômetro UV-visível (NOVA 3300 UV). Realizou-se a mistura reacional pela adição de 1950 μ L da solução de DPPH e 50 μ L da solução do OEMS, em etanol. A reação controle (branco) foi realizada substituindo a amostra por 50 μ L de etanol. Para a comparação dos resultados utilizou-se trolox (Sigma) como padrão antioxidante, substituindo o branco por 50 μ L da solução trolox 1 mM em etanol. O controle e o padrão trolox foram testados nas concentrações de 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 e 0,20 mg/mL. A mistura reacional foi agitada, protegida da luz e oxigênio e a absorvância monitorada a cada 15 min a partir de 30 min de incubação até o ponto final de cada reação, quando a absorvância se manteve constante. A atividade de captura do radical DPPH foi expressa por meio da porcentagem de inibição (%I), onde Ac é a absorvância do controle e Aam a absorvância da amostra, segundo a equação: %I = (Ac - Aam) / Ac x 100%. A concentração mínima da amostra que inibiu 50% do radical DPPH (IC₅₀), no meio reacional, foi obtida por regressão linear utilizando-se os valores de concentração versus porcentagem de inibição.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do cátion radical livre ABTS

A atividade antioxidante do OEMS, através da captura do cátion radical ABTS, foi determinada conforme descrição de metodologia ⁽²¹⁾. Utilizou-se o trolox como padrão antioxidante e os resultados foram expressos em termos da capacidade antioxidante do composto equivalente ao trolox, expresso em valor de TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, capacidade antioxidante total do composto equivalente ao trolox). A solução do cátion radical foi preparada pela reação do ABTS 3,5 mM com persulfato de potássio 140 mM. Para completa reação e estabilização do radical, a solução radical ABTS permaneceu ao abrigo de luz, à temperatura ambiente, por um período de 16 horas. Diluiu-se a solução de ABTS em etanol até obter uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. A curva de calibração do padrão trolox foi feita nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 μ M. As concentrações utilizadas para construção da curva de calibração para capacidade antioxidante do OEMS foram de 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 μ g/mL. Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 30 μ L de cada solução padrão, para tubos de ensaio e adicionados 3,0 mL da solução de radical ABTS. As absorbâncias foram medidas a 734 nm após 6 min de reação, utilizando-se o etanol como branco. Realizou-se o mesmo procedimento para as soluções de OEMS. A atividade em capturar o cátion radical ABTS foi expressa em μ M trolox/g de OEMS (Z), obtida a partir das equações das retas das curvas: concentração de trolox versus absorbância e concentração da amostra versus absorbância ⁽²¹⁾.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante do OEMS, pela redução do ferro conhecida como método FRAP, foi determinada conforme descrição de metodologia. ⁽²²⁾ Obteve-se o reagente FRAP a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato de sódio - ácido acético 0,3 M, (pH 3,6), 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM (2,4,6-tris (2-piridil)-triazina) e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, usado imediatamente. Como padrão utilizou-se sulfato ferroso e a curva de calibração foi feita nas concentrações de 250, 500, 1000, 1500 e 2000 μ M.

Para avaliação da capacidade antioxidante foram testadas diferentes concentrações do OEMS, solubilizadas em etanol (1000, 2000, 4000, 6000, 8000 e 10000 μ g/mL). Trolox foi testado nas concentrações de 25, 62,5, 125 e 250 mg/L. O ensaio foi realizado através da adição em tubos de ensaio de uma alíquota de 90 μ L da solução padrão de sulfato ferroso, 270 μ L de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada, mantida em banho-maria a 37 °C durante 30 min, e a leitura da absorbância foi medida a 595 nm. O mesmo procedimento foi realizado para as soluções de OEMS e de trolox. O poder antioxidante do OEMS em reduzir o ferro foi expresso em μ M sulfato ferroso/g de amostra (Z), obtido a partir das equações das retas das curvas concentração de sulfato ferroso versus absorbância e concentração da amostra versus absorbância ⁽²²⁾.

Determinação da atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico

O método de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pela sua atividade de inibição de radicais livres, gerados durante a peroxidação do ácido linoleico ⁽²⁾. Assim, a habilidade do OEMS em prevenir o descoloramento do β -caroteno foi avaliada conforme descrito pela literatura ⁽²³⁻²⁴⁾.

As amostras de OEMS e dos padrões antioxidantes BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) e trolox foram solubilizadas em etanol em três concentrações (0,5, 1,0 e 4,0 mg/mL). Uma solução de β -caroteno e ácido linoleico foi preparada a partir de 0,2 mg de β -caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio e adicionado a 20 μ L de ácido linoleico e 265 μ L de Tween 40. O clorofórmio foi completamente evaporado com auxílio de oxigenador. Em seguida, adicionou-se cerca de 100 mL de água ultrapura previamente saturada com oxigênio por 30 minutos. Agitou-se vigorosamente a mistura, apresentando uma coloração amarelo-alaranjada e com absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Realizou-se o ensaio por meio da adição em tubos de ensaio de uma alíquota de 2,5 mL da mistura reativa, e 0,2 mL da amostra de OEMS nas diferentes concentrações e a leitura realizada imediatamente no tempo zero a 470 nm. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria à temperatura de 50 °C, e a absorvância monitorada por 120 min em intervalos contínuos de 15 min. Realizou-se o mesmo procedimento para o controle (etanol), e os padrões BHA e trolox. A atividade antioxidante (AA%) foi expressa como porcentagem de inibição da oxidação calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle (A_0-A_{120}) e da amostra (B_0-B_{120}) conforme a equação: $AA\% = [(A_0-A_{120}) - (B_0-B_{120})] / [A_0-A_{120}] \times 100$. Onde: 0 e 120 correspondem a absorvância no tempo 0 e 120 minutos de reação, respectivamente.

Resultados e Discussão

Determinação da atividade antioxidante pelo método captura do radical livre DPPH

O óleo essencial de *M. sylvatica* reagiu com radical DPPH com estabilização da absorvância em 60 min. A inibição variou de 8,6 a 52,0% nas concentrações de 0,2 a 2,0 mg/mL, com IC_{50} de $1,94 \pm 0,12$ mg/mL, na mistura reacional. A curva de concentração versus inibição exibiu boa correlação linear com coeficiente de determinação R^2 de 0,99. O padrão antioxidante trolox foi testado de maneira análoga ao OEMS. A curva de inibição do trolox foi feita nas concentrações de 1,0 a 5,0 μ g/mL, com variação na inibição de 10,7 a 63,2%, na mistura reacional ($R^2 = 0,99$). A reação foi bastante rápida em torno de 10 min. O OEMS reduziu o radical DPPH, porém apresentou baixo potencial antioxidante frente ao padrão trolox. Os valores de IC_{50} de OEMS, determinados em diferentes tempos de reação, assim como o do trolox, encontram-se na

TABELA 1.

TABELA 1: Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (OEMS) pelo método DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). * IC_{50} : concentração do antioxidante na mistura reacional que reduz 50% o radical DPPH.

Amostra	IC_{50}
OEMS 30 min	$2,55 \pm 0,25$ mg/mL
OEMS 45 min	$2,17 \pm 0,15$ mg/mL
OEMS 60 min	$1,93 \pm 0,12$ mg/mL
Trolox 10 min	$0,003 \pm 0,30$ mg/mL

Determinação da atividade antioxidante pelo método do ABTS

O óleo essencial de *M. sylvatica* apresentou atividade antioxidante pela captura do radical ABTS. Os resultados, expressos como valor TEAC, corresponderam a $32,85 \pm 0,86$ μ M de trolox/g.

Determinação da atividade antioxidante pelo método redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pela redução do ferro para o OEMS foi calculada a partir da equação da reta obtida pela curva padrão de sulfato ferroso ($R^2= 0,99$), onde foi possível quantificar a concentração de Fe^{2+} presente em solução. Realizou-se um estudo do tempo de reação para a redução do ferro pelo OEMS, realizando-se a leitura da absorbância das amostras nos tempos de 30, 45 e 60 min e concluiu-se o melhor tempo de reação de 45 min, sendo Z de $193,47 \pm 2,63$ de μM de sulfato ferroso/g de OEMS. O trolox apresentou maior poder antioxidante com Z de $3735,9 \pm 0,007$ μM , no tempo de reação de 10 min.

Determinação da atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico

Os padrões trolox, BHA e o OEMS foram testados em diferentes concentrações, contudo, com exceção dos padrões do OEMS, que apresentou valor percentual positivo de inibição somente após a segunda concentração testada (1 mg/mL). Comparado aos padrões, a inibição do OEMS foi baixa, inibindo 26,1% da oxidação do β -caroteno em 120 min de reação, na concentração de 4 mg/mL (concentração testada mais eficaz).

Não há um método único que avalie satisfatoriamente a atividade antioxidante de um extrato ou OEMS, pois alguns critérios devem ser levados em consideração, como: técnica de extração, tipo de amostra, componentes químicos presentes, além de parâmetros metodológicos, como tempo, temperatura, tempo de oxidação, mecanismo de ação, presença de componentes interferentes, entre muitos outros (25-26).

De acordo com a literatura, são poucas as pesquisas que descrevem a capacidade antioxidante de espécies do gênero *Myrcia*. Mas, além da carência de pesquisas, alguns trabalhos têm apontado à deficiência de padronização dos testes antioxidantes *in vitro* realizados, o que dificulta a comparação ou análise dos resultados relatados por diferentes pesquisadores (27-28). No entanto, há estudos sobre a atividade antioxidante de outros gêneros da família Myrtaceae, a exemplo de: *Eucalyptus citriodora*, a qual apresentou no óleo essencial das folhas frescas, moderada a forte, atividade antioxidante (11), para o óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* L. frente ao teste com DPPH e β -caroteno, observou-se uma moderada atividade antioxidante (29). E o óleo essencial de folhas de *Psidium guineense* Sw. apresentou alta atividade antioxidante quando comparado aos padrões (30). E com aproximadamente 89,0 – 89,5% de redução do padrão DPPH, o óleo essencial das folhas de três espécies de *Melaleuca* apresentaram forte atividade antioxidante (31).

Nos ensaios realizados com o OEMS foram encontrados resultados distintos entre as metodologias, com maior ou menor eficiência. No ensaio de captura do radical DPPH, por exemplo, o óleo essencial, mesmo apresentando a capacidade de agir como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons para que ocorresse a redução do radical DPPH, não se mostrou tão eficaz quando comparado ao padrão trolox. Da mesma forma ocorreu no ensaio de captura do cátion radical ABTS.

No método FRAP, o OEMS apresentou capacidade antioxidante de redução do ferro, porém com redução de 5,2% equivalente ao padrão trolox. No sistema β -caroteno/ácido linoleico, o OEMS não foi capaz de inibir os radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico nas concentrações 0,5 e 1 mg/mL, no entanto, na concentração de 4 mg/mL o OEMS apresentou capacidade de inibir a oxidação do β -caroteno. Esses resultados podem ser decorrentes possivelmente pela composição das substâncias químicas presentes na *M. sylvatica*, em atuar como antioxidante. Em particular, alguns hidrocarbonetos monoterpenos, ou seja, terpinoleno, α -terpineno e γ -terpineno, mostram uma ação antioxidante protetora

significativa (32). No entanto, a atividade antioxidante de hidrocarbonetos sesquiterpênicos no geral é baixa, sendo os sesquiterpenos oxigenados mais ativos. Conforme estudos, o OEMS apresenta maior porcentagem de sesquiterpenos oxigenados (43,9%) e de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (32,3%) em sua composição química (17).

Conclusão

Desta forma, para os ensaios realizados neste trabalho provavelmente os compostos sesquiterpenos oxigenados são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante do óleo essencial de *M. sylvatica*. Portanto, nos diferentes ensaios realizados com o OEMS observou-se que tanto a porcentagem de inibição, a IC₅₀ quanto o valor equivalente ao trolox do OEMS mostram capacidade antioxidante, porém, com valores baixos comparados aos padrões trolox e BHA.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES/Pró-Amazônia e FAPESPA pelo apoio financeiro.

Referências

1. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric Food Chem.** 2005; 53(6): 1841-1856. ISSN: 0021-8561. [[CrossRef](#)].
2. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciênc Tecnol Aliment.** Campinas. 2006; 26(2): 446-452. ISSN: 0101-2061. [[CrossRef](#)].
3. Núñez-Sellés AJ. Antioxidant therapy: Myth or reality?. **J Braz Chem Soc.** São Paulo. 2005; 16(4): 699-710. ISSN: 1678-4790. [[CrossRef](#)].
4. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutat Res.** 2002; 519(1-2):103-119. ISSN: 1383-5718. [[CrossRef](#)].
5. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chem.** 2006; 97(4): 654-660. ISSN: 0308-8146. [[CrossRef](#)].
6. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. **J Agric Food Chem.** 2003; 51(3): 609-614. ISSN: 0021-8561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
7. Singer AC, Crowley DE, Thompson IP. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. **Trends Biotech.** 2003; 21(3): 123-130. ISSN: 0167-7799. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].

8. Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **J Food Eng.** 2005; 71(2): 214-22. ISSN: 0260-8774. [[CrossRef](#)].
9. Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S. Eucalyptus essential oil as a nature pesticide. **For Ecol Manag.** 2008; 256(12): 2166-2174. ISSN: 0378-1127. [[CrossRef](#)].
10. Vieira TR, Barbosa LCA, Maltha CRA, Paula VF, Nascimento EA. Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Quim Nova.** 2004; 27(4): 536-539. ISSN: 0100-4042. [[CrossRef](#)].
11. Singh HP, Kaur S, Negi K, Kumari S, Saini V, Batish DR, Kohli RK. Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. **Food Sci Technol.** 2012; 48(2): 237-241. ISSN: 0101-2061. [[CrossRef](#)].
12. Neri-Numa IA, Carvalho-Silva LB, Pinto MJ, Gomes ML, Muramoto MT, Ferreira JEM, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Maróstica Junior MR, Pastore GM. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Res Inter.** 2013; 50(1): 70-76. ISSN: 0963-9969. [[CrossRef](#)].
13. Okamura H, Mimura A, Niwano M, Yokahara Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. **Phytoch.** 1993; 33(3): 557-561. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)].
14. Villanueva-Tiburcio JE, Condezo-Hoyos LA, Asquieri ER. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh). **Ciência Tecnol Aliment.** 2010; 30(Supl.1): 151-160. ISSN: 0101-2061. [[CrossRef](#)].
15. Gardeli C, Vassiliki P, Athanasias M, Kibouris T, Komaitis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. **Food Chem.** 2008; 107(3): 1120-1130. ISSN: 0308-8146. [[CrossRef](#)].
16. Silva FKS, Rosário AS, Secco RS, Zoghbi MGB. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (Myrtaceae), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amaz.** 2015; 5(1): 7-15. ISSN: 2179-5746. [[CrossRef](#)].
17. Silva LA, Sarrazin SLF, Oliveira RB, Suemitsu C, Maia JGS, Mourão RHV. Composition and antimicrobial activity of leaf essential oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Europ J Med Plants.** 2016; 13(3): 1-9. ISSN: 2231-0894. [[CrossRef](#)].
18. Saccol EMH, Londero EP, Bressan CA, Salbego J, Gressler LT, Silva LVF, Oliveira RB, Llesuy SF, Baldisserotto B, Pavanato MA. Oxidative and biochemical responses in *Brycon amazonicus* anesthetized and sedated with *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils. **Vet Anaesth Analg.** 2017; 44(3): 1467-2987. ISSN: 555-566. [[CrossRef](#)].
19. Saccol EMH, Jerez-Cepa I, Ourique GM, Pês TS, Gressler LT, Mourão RHV, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM, Baldisserotto B, Pavanato MA, Martos-Sitcha JA. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. **Res Vet Sci.** 2018; 117: 150-160. ISSN: 0034-5288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

20. Kondo S, Tsuda K, Muto N, Ueda J. Antioxidant activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development no selected apple cultivars. **Sci Hortic**. 2002; 96(1-4): 177-185. ISSN: 0304-4238. [[CrossRef](#)].
21. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto FD. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. EMBRAPA. **Comunicado Técnico on-line** nº 127. Fortaleza. 2007. ISSN: 1679-6535. [[Link](#)].
22. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). EMBRAPA. **Comunicado Técnico on-line** nº 125. Fortaleza. 2006. ISSN: 1679-6535. [[Link](#)].
23. Koleva II, van Beek TA, Linssen JPH, Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochem Anal**. 2002; 13(1): 8-17. ISSN: 1099-1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
24. Rufino MSM, Alves RE, Brito, ES, Mancini FJ, Moreira AVB. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico. EMBRAPA. **Comunicado Técnico on-line** nº 126. Fortaleza. 2006. ISSN: 1679-6535. [[Link](#)].
25. Bertoldi MC. **Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, dos óleos resinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. 116 f. 2006. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos], Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2006. [[Link](#)].
26. Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **Eur Food Res Technol**. 2004; 219(6): 561-571. ISSN: 1438-2377. [[CrossRef](#)].
27. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem**. 2005; 53(10): 4290-4302. ISSN: 0021-8561. [[CrossRef](#)].
28. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **J Sci Food Agric**. 2000; 80(13): 1925-1941. [[CrossRef](#)].
29. Lee WC, Mahmud R, Pillai S, Perumal S, Ismail S. Antioxidant activities of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves. **APCBEE Proc**. 2012; 2: 86-91. ISSN: 2212-6708. [[CrossRef](#)].
30. Nascimento KF, Moreira FMF, Santos JA, Kassuya CAL, Croda JHR, Cardoso CAL, Vieira MC, Ruiz ALTG, Foglio MA, Carvalho JE, Formagio ASN. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **J Ethnopharmacol**. 2018; 210: 351-358. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
31. Siddique S, Parveen Z, Bareen F, Mazhar S. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from leaves of three *Melaleuca* species of Parkistani flora. **Arab J Chem**. 2017. ISSN: 1878-5352. [[CrossRef](#)].

32. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chem.** 2000; 69(2): 167-174. ISSN: 0308-8146. [[CrossRef](#)]

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 15/01/2018 | Aceite: 29/05/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Silva LA, Raposo JDA, Campos LPG, Conceição EC, Oliveira RB, Mourão RHV. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2018; 12(2): 117-126. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/598>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

Avaliação da qualidade das plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes-RJ

Quality assessment of medicinal plants marketed in the Municipal Market of Campos dos Goytacazes-RJ

DOI 10.5935/2446-4775.20180012

Leal-Costa, Marcos Vinicius^{1*}; Teodoro, Fernanda S.²; Barbieri, Caio³; Santos, Luís Felipe Umbelino dos²; Sousa, Adriana Lima de³

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense, campus Cabo Frio, Estrada Cabo-Frio-Búzios, s/nº, CEP: 28909-971, Baía Formosa, Cabo Frio, RJ, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense campus Campos Centro, Rua Dr. Siqueira, 273, CEP: 28030-130, Parque Dom Bosco, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense campus Campos Guarus, Av. Souza Mota, 350, CEP: 28060-010, Parque Fundão, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.

*Correspondência: marcos.costa@iff.edu.br

Resumo

O Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, é um tradicional ponto de comercialização de plantas medicinais no Norte Fluminense. Tendo em conta a sua importância como fonte de conhecimento tradicional, foi realizado um levantamento de plantas medicinais comercializadas em 2014, e analisadas as embalagens nas quais eram oferecidas ao consumidor. As espécies amplamente comercializadas foram assapeixe, balieira, capim-limão, chá verde, erva cidreira, erva doce e espinheira santa. A análise de controle de qualidade demonstrou que as amostras vendidas no mercado municipal não estão em conformidade com as resoluções RDC Nº 26/2014 e RDC Nº 84/2016 da ANVISA. Os resultados mostraram que as embalagens não conferem proteção adequada ao produto, bem como não há na embalagem dos fitoterápicos comercializados todas as informações necessárias ao consumidor. Além disso, a espinheira-santa foi comercializada com erro de identificação botânica.

Palavras-chave: Fitoterápicos. Controle de qualidade. Conformidade de embalagens. Erro de identificação botânica.

Abstract

The Municipal Market of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil, is a traditional marketing point of medicinal plants in Northern Rio de Janeiro. Considering its importance as traditional knowledge source, a

survey was conducted in 2014 intending to know which medicinal plants are sold frequently, and to analyze the packaging in which they were offered to the consumer. The bestselling species were *assapeixe*, *balieira*, *capim limão*, green tea, *erva cidreira*, sweet fennel and *espinheira santa*. The quality control analysis showed that samples sold in the local market are not in accordance with ANVISA resolutions, Brazilian standards (RDC N^o. 26/2014 and the RDC N^o. 84/2016). The results showed that the packaging does not provide adequate protection to the product, and there is not the necessary information to consumer in packaging of herbal medicines sold. Furthermore, *espinheira santa* was commercialized with botanical misidentification.

Keywords: Herbal Medicine. Quality control. Packaging compliance. Botanical misidentification.

Introdução

O uso de plantas medicinais é uma prática popular muito difundida em todo o Brasil, que é detentor de um rico conhecimento tradicional associado às plantas. A fitoterapia, então, pode ser entendida como parte fundamental de nossa cultura⁽¹⁾. A importância desta prática terapêutica, e os muitos trabalhos atestando sua eficiência, levou o Ministério da Saúde a elaborar, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos⁽²⁾. Em junho de 2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou a primeira edição do Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira, visando orientar a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos⁽³⁾.

Contrastando com o empenho dos órgãos governamentais em regular e tornar o uso de plantas medicinais seguro para a população, há a automedicação e a venda destas drogas por pessoas sem conhecimento técnico. Plantas medicinais são comercializadas em feiras livres e mercados em todo o país. Estes são espaços importantes à manutenção de aspectos culturais e para o reconhecimento de potenciais recursos biológicos⁽⁴⁾. Apesar de sua importância, a comercialização de plantas medicinais em mercados nem sempre é acompanhada com rigor, quanto aos aspectos de garantia de proteção ao produto e das informações instrutivas ao consumidor⁽⁵⁾.

Tratando especificamente da embalagem e do rótulo de plantas medicinais, a ANVISA publicou em 13 de maio de 2014 a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n^o 26, onde, o artigo 52^o determina que: "As embalagens devem garantir a proteção do produto contra contaminações e efeitos da luz e umidade e apresentar lacre ou selo de segurança que garanta a inviolabilidade do produto". A resolução também especifica as informações que devem constar no rótulo ou folheto informativo. Entre as informações estão (1) nomenclatura botânica e popular, (2) parte utilizada, (3) nome do fabricante, (4) data de fabricação, e (5) prazo de validade. Estas informações têm por finalidade garantir o uso seguro por parte do consumidor.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar a embalagem de produtos que continham plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes/RJ, verificando sua conformidade com as normas estabelecidas pela ANVISA.

Material e Métodos

Em novembro de 2014, foram realizadas visitas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes, para identificar, junto aos comerciantes, quais produtos de origem vegetal e/ou fitoterápicos eram os mais

procurados. Posteriormente, as plantas foram compradas e levadas ao Laboratório de Biologia do Instituto Federal Fluminense, *campus* Campos Centro, para a avaliação das embalagens e reconhecimento botânico. As amostras foram obtidas de três diferentes bancas e fabricantes. Estas foram analisadas e avaliadas para averiguar o atendimento às exigências da RDC Nº 84/2016 e RDC nº 26/2014. De acordo com a regulamentação de embalagens, foram avaliados os seguintes aspectos de garantia de proteção ao produto: (1) modo de preparo, (2) nome do fabricante, (3) data de fabricação, (4) prazo de validade, (5) nomenclatura popular, e (6) nomenclatura botânica.

A fim de identificar a espécie comercializada como espinheira santa, o material seco foi reidratado e seccionado no terço médio foliar e na porção mediana do pecíolo. Os cortes foram corados em solução hidroalcoólica (50%, v/v) de safranina a 1% (m/v)⁽⁶⁾. Os cortes foram visualizados e fotografados em microscópio Nikon Eclipse CI-S (Nikon Instruments Inc.) equipado com câmera digital Moticam Pro 252B (Moticam North America). Fragmentos foliares foram diafanizados⁽⁷⁾.

Resultados e discussão

Análise de embalagem, rótulos e folheto informativo

A **TABELA 1** apresenta a avaliação das informações exigidas pela RDC nº 26/2014.

No primeiro momento de contato com as amostras, verificaram-se as informações ao consumidor contidas na embalagem, de acordo com a regulamentação RDC Nº 84/2016 e 26/2016, e os aspectos referentes à inviolabilidade do produto.

Através de observações feitas durante as visitas realizadas ao Mercado Municipal, foi possível elencar sete espécies de drogas vegetais de elevada comercialização: assapeixe, balieira, capim-limão, chá verde, erva cidreira, erva doce e espinheira santa, todas comercializadas secas. Apenas o chá verde e uma amostra de espinheira santa eram comercializadas em embalagens industrializadas e lacradas. As demais embalagens, feitas de forma manual, consistiam de sacos plásticos amarrados com barbantes, não oferecendo correto acondicionamento para o material vegetal (**FIGURA 1**). Os sacos são pendurados no exterior das lojas, onde ficam expostos à luz e à variação de temperatura. O papel da embalagem no acondicionamento de plantas medicinais é indispensável, pois as protege de variações de umidade e da ação de fungos, fatores que podem afetar a qualidade do produto. Luz e temperatura também podem afetar os princípios ativos, alterando-os, fazendo com que o material perca suas propriedades farmacológicas⁽⁸⁾. As amostras analisadas não estão em conformidade com a legislação, todas deixaram de apresentar ao menos uma das informações exigidas. Por exemplo, nenhuma das amostras exibia a nomenclatura botânica. A RDC nº 26/2014 exige a presença do nome popular e da nomenclatura botânica em embalagens de produtos à base de plantas medicinais.

FIGURA 1: Um exemplo do tipo de embalagem utilizada pelos comerciantes de plantas medicinais do Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes. Notar a precariedade da embalagem, assim como a falta de informações no rótulo.



TABELA 1: Tabela de verificação de embalagens das amostras vendidas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes – RJ (segundo RDC nº 84/2016).

Amostra	Modo de preparo	Nome do fabricante	Data de fabricação	Prazo de validade	Nomenclatura popular	Nomenclatura botânica
Assapeixe	+	-	+	-	+	-
Balieira	+	-	+	-	+	-
Capim-limão	-	-	-	-	+	-
Chá verde	+	+	+	+	+	-
Erva cidreira,	+	-	-	-	+	-
Erva doce	-	-	-	-	+	-
Espinheira santa (ES1)	+	-	-	-	+	-
Espinheira santa (ES2)	+	+	+	+	+	-

Legenda: + (positivo) – informação presente; - (negativo) – informação ausente

Análise morfoatômica das espécies de espinheira-santa

Na visita ao mercado foram identificadas duas amostras que eram comercializadas como espinheira-santa. A espécie foi encontrada disponível para venda em dois tipos diferentes de embalagem: uma “caseira” e uma industrializada. Para esta espécie, foi realizado estudo morfoanatómico.

De acordo com o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (RDC Nº 84/2016), espinheira-santa corresponde às espécies *Maytenus ilicifolia* Mart.ex Reissek e *Maytenus aquifolia* Mart. (Celastraceae).

A espinheira-santa é a planta indicada para afecções estomacais⁽³⁾ e frequentemente confundida com outras espécies, o que gera uma preocupação em relação à adulteração^(9,10,11). À primeira vista, as duas amostras eram bem diferentes e isso gerou a necessidade de uma investigação mais aprofundada que revelasse características que pudessem confirmar (ou não) a autenticidade das amostras. Uma das características marcantes de *M. ilicifolia* foi a presença de espinhos na borda de suas folhas. Essa característica leva essa espécie a ser confundida com *Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg. Lanj. & Boer (Moraceae) e *Zollernia ilicifolia* (Brongn.) Vogel (Fabaceae)⁽¹²⁾.

A análise morfológica das folhas diafanizadas das duas amostras de espinheira-santa apontam que apenas amostra ES2 apresenta características de *M. ilicifolia*, como a venação do tipo craspedódroma simples e o menor ângulo de divergência das nervuras secundárias (FIGURA 2A e 2B)⁽¹²⁾. A análise das secções transversais do pecíolo e da nervura mediana da amostra ES2 permitiu a observação de características de pecíolo comumente encontradas em *M. ilicifolia*, como sistema vascular cilíndrico com medula parenquimática e rodeado por bainha esclerenquimática⁽¹²⁻¹³⁾ (FIGURA 3A e 3B). A amostra ES1 apresenta pecíolo com feixes colaterais concêntricos e feixes centrais, e nervura mediana de secção côncavo-convexa, característicos de *S. bonplandii* (FIGURA 3C e 3D)⁽¹²⁾. *S. bonplandii* tem efeitos farmacológicos similares aos de *M. ilicifolia*⁽¹⁴⁾ e cerca de dois terços das espinheiras santas comercializadas não são *M. ilicifolia*⁽¹⁵⁾. Um estudo realizado com 28 amostras no município do Rio de Janeiro, indicou que nenhuma delas era de *M. ilicifolia*⁽¹⁶⁾.

FIGURA 2: Folhas diafanizadas das duas amostras de espinheira-santa. As folhas em A apresentam venação característica de *Maytenus ilicifolia*.

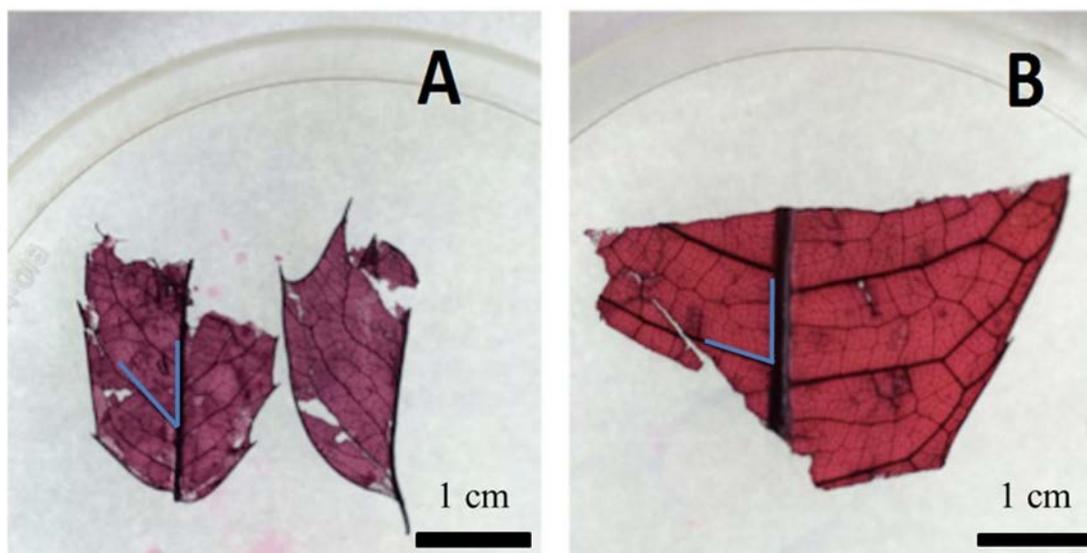
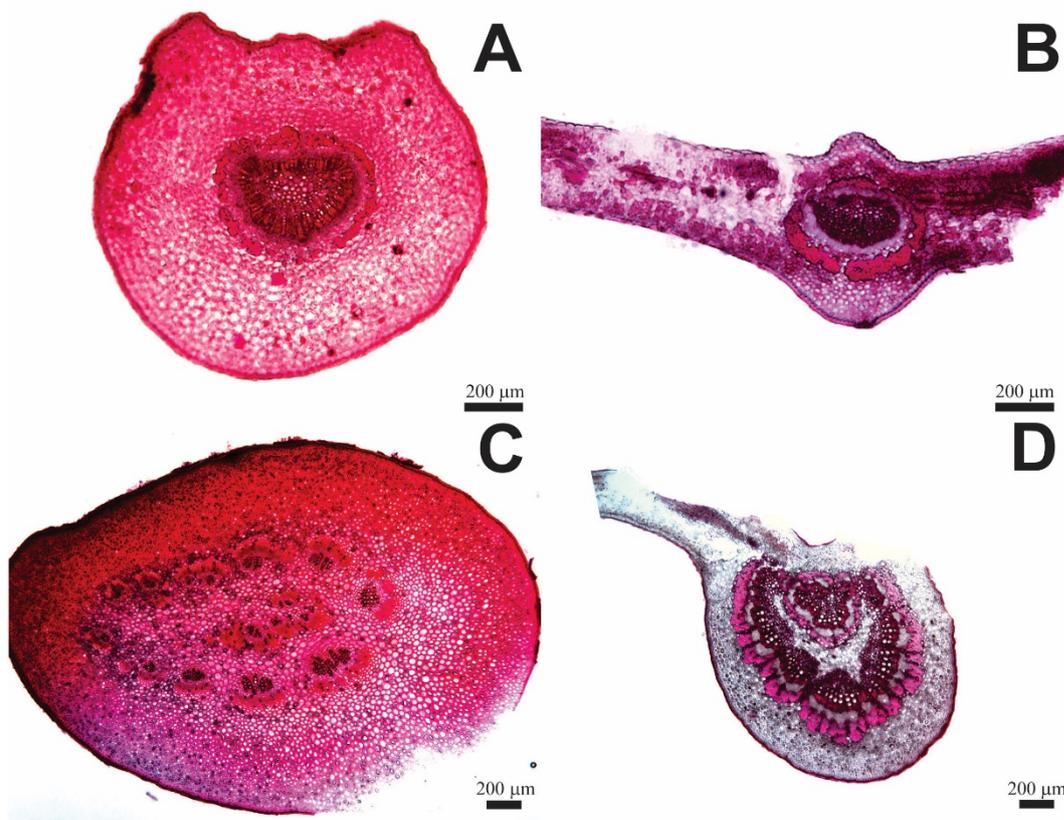


FIGURA 3: Secções transversais de pecíolo e nervura mediana. A e B – *Maytenus ilicifolia*; C e D – *Sorocea bomplandii*. Em C, vascularização típica do pecíolo de *S. bonplandii*. Em D, secção côncavo-convexa da nervura mediana, característica de *S. bonplandii*.



Conclusão

As plantas medicinais podem aliviar ou curar enfermidades, mas seu uso depende de conhecimento sobre a planta e onde colhê-la e como prepará-la. Seu uso é fortemente estimulado pela tradição e vem ganhando notoriedade junto aos órgãos oficiais de saúde pública.

Os resultados aqui apresentados demonstram uma grande distância entre o que é recomendado pela ANVISA e o que é praticado pelos comerciantes de plantas medicinais do Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes-RJ. Embalagens inadequadas, sem informações importantes para o consumidor e acondicionadas sem cuidado podem comprometer a qualidade do produto. Também é preocupante ver que houve falha na identificação da espinheira-santa, embora a troca tenha sido feita por espécie com efeito similar.

Portanto, os resultados demonstraram que órgãos de gestão e fiscalização, bem como instituições de ensino e pesquisa, deveriam contribuir com ações direcionadas ao treinamento e à capacitação dos comerciantes e mateiros. Estas ações trariam mais qualidade aos produtos comercializados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Referências

1. Assis M A, Morelli-Amaral VF, Pimenta FP. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Rev Fitos**, Rio de Janeiro, 2015; 9(1): 1-72. [\[CrossRef\]](#)
2. Brasil. **Decreto nº 5.813**, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 jun. 2006, p. 2. [\[Link\]](#)
3. Brasil. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 84**, de 17 de junho de 2016. Aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira e dá outras providências. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 04/11/2016.
4. Cajaiba RL, Silva WB, Sousa RDN, Sousa AS. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no município de Uruará, Pará, Brasil. **Biotemas**. Florianópolis. 2016; 29(1): 115-131. [\[CrossRef\]](#)
5. Nascimento VT, Lacerda EU, Melo JG, Lima CSA, et al. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Rev Bras PI Med**. 2005; 7(3):56-64. [\[Link\]](#)
6. Johansen DA. *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York, 1940.
7. Arnott HJ. Leaf clearings. **Turtox News**, 37(8):192-194, 1959.
8. Colet CF, Dal Molin GT, Cavinatto AW, Baiotto CS, Oliveira KR. Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Rev Bras PI Med**. Campinas. 2015; 17(2):331-339. [\[CrossRef\]](#)
9. Alberton MD, Falkenberg DDB, Falkenberg MDB. Análise cromatográfica de fitoterápicos a base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Rev Bras Farmacog**. 2002; 12: 11-13. [\[CrossRef\]](#)
10. Jesus WMDM, Cunha TND. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Rev S Des**. 2012; 2(1): 20-46. ISSN: 2316-2864. [\[Link\]](#)
11. Oliveira ASC. **Qualidade da espinheira-santa comercializada no mercado formal na cidade de Pelotas**. 2016. 102f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. [\[Link\]](#)

12. Machado AV, Santos M. Morfo-anatomia foliar comparativa de espécies conhecidas como espinheira-santa: *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), *Sorocea bonplandii* (Moraceae) e *Zollernia ilicifolia* (Leguminosae). **Insula**. Florianópolis. 2004; (33):01-19. [\[Link\]](#)
13. Duarte MR, Debur MC. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitot**. Novara. 2005; 76(1): 41-49. ISSN: 0367-326X. [\[CrossRef\]](#)
14. Gonzalez FG, Portela TY, Stipp EJ, Di Stasi LC. Antiulcerogenic and analgesic effects f *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J Ethnop**. Graz. 2001; 77: 41–47. ISSN: 0378-8741. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Ruschel AR, Nodari RO. Colheita foliar da cancorosa [*Sorocea bonplandii* (Baill.) urg., Lanj. & W. Boer]: uma espinheira-santa da Mata Atlântica. **Rev Bras PI Med**. Botucatu. 2008; 10(4):43-50. [\[Link\]](#)
16. Coulaud-Cunha S, Oliveira RS, Waissmann W. Venda livre de *Sorocea bomplandii* Bailon como Espinheira Santa no município de Rio de Janeiro- RJ. **Rev Bras Farmacog**. Curitiba. 2004; 14(supl. 0): 51-53. ISSN: 0102-695X. [\[CrossRef\]](#)

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 02/11/2017 | Aceite: 19/03/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Leal-Costa MV, Teodoro FS, Barbieri C, Santos LFU, Sousa AL. Avaliação da qualidade das plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campos dos Goytacazes-RJ. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(2): 127-134. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/581>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit

DOI 10.5935/2446-4775.20180013

Oliveira, Mariana S. de¹; Gontijo, Sávio L.¹; Teixeira, Marina S.²; Teixeira, Karina I. Rosa²; Takahashi, Jacqueline A.³; Millan, Rubén Dario Sinisterra³; Segura, María Esperanza Cortés^{2*}.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP: 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Restauradora, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP: 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil.

*Correspondência: mecortes@yahoo.com

Abstract

In this study, we isolated and characterized dichloromethane and hexane extracts, complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), of *Schinus terebinthifolius* fruits. Such complexation may be useful in the formulation of herbal medicines, by improving solubility, or increasing stability by reducing the loss of volatile compounds. The cytotoxicity in osteoblasts, antifungal against *Malassezia furfur* and antitumor activities were evaluated in Caco-2 cells. The antifungal activity of the extracts and the essential oil *in natura* or complexed with HP- β -CD against the fungus *M. furfur* was evaluated by agar diffusion methods and quantitatively by inhibitory concentration (IC). All samples inhibited fungus growth and, when complexed with HP- β -CD, the reduced IC was by 50%. Osteoblast cell viability was not affected by the presence of extracts and oil. The antitumor activity of the extract in dichloromethane was evaluated using Caco-2 cells. The results demonstrated significant reduction in cell viability in the presence of the extract, which makes it a promising candidate for cancer treatment.

Keywords: *Schinus terebinthifolius*, antifungal, antitumor, cyclodextrin, *Malassezia furfur*.

Introduction

Brazil has some of the best prospects for economic exploration of biodiversity, with the largest number, estimated between 10 and 20%, of animal and plant species in the world. About 25,000 plant species used worldwide for the production of medicines, including those obtained by synthesis from natural products, as well as herbal medicines (1). The fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi, known as “aroeira-vermelha”, used as a condiment (2). However, besides food use, several parts of the plant have been subject of drug development research due to pharmacological properties such as antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant.

Fungal infections are more prominent due to the increased number of immune compromised are patients, who are more likely to get infections. Accordingly, antimicrobial resistance considered a major public health problem (3). The genus *Malassezia* comprises yeasts associated with various pathological conditions, including infections such as tinea versicolor, or dermatoses such as seborrhea dermatitis and atopic dermatitis. The most commonly used antifungal agents in the treatment of these infections are triazoles, such as ketoconazole, itraconazole and fluconazole. However, there are *Malassezia* strains resistant to these drugs. Besides, resistance is not the only problem; many of these products are cosmetically unpleasant, while others requires strict regular application, and are associated with recurrences of ringworm and other various adverse effects to the patient (4).

In addition to the antifungal activity associated with active substances from *S. terebinthifolius*, there are some reports about their mutagenic activity in cancer cells (5-6). Although cancer incidence is growing worldwide, anticancer drugs currently available have several limitations. Most drugs act on both cancer and healthy cells throughout of the organism, causing a series of adverse effects, such as leukopenia, renal failure, and liver, kidney, and lung toxicity. Another major problem in anticancer therapy is acquired drug resistance (7). The increasing number of infections and the emergence of microorganisms resistant to existing drugs, as well as low specificity and efficiency, make the search for new antifungal and antitumor agents important in improving the therapeutic arsenal.

Complexing plant extracts with cyclodextrins can be useful in the formulation of herbal medicines, by improving solubility, facilitating the incorporation of the extracts, or increasing stability by reducing the loss of volatile compounds (8,9,10). The cyclodextrins and their derivatives can bind a wide variety of molecules, resulting in improved bioavailability, stability and solubility. The aim of this study was to evaluate the antitumor and antifungal activity of extracts and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits, isolated or associated/included in hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), and to determine the chemical composition of the extracts and essential oil.

Materials and methods

Materials

Hydroxypropyl- β -cyclodextrin was purchased from Cerestar (Milwaukee, WI, USA). Nystatin (NYS) disks (100 IU) were purchased from CECON (São Paulo, Brasil). Dulbecco's phosphate buffered saline, trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), fetal bovine serum (FBS) and the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) kit were purchased from Gibco (NY, USA). The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) kit was purchased from Invitrogen (USA). Sodium dodecyl sulfate (SDS)-10% HCl was purchased from American Bioanalytical (Natick, MA, USA). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) for cell culture and Neutral Red solution were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). High Glucose DMEM was purchased from LGC (São Paulo, Brasil). *Malassezia furfur* (ATCC 14522) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The human intestinal Caco-2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (CCL-1 NCTC clone 929). All other materials and solvents were of analytical grade.

Plant materials and preparation of the crude extracts

The dried ripe fruits of *S. terebinthifolius* were crushed in order to obtain smaller particles (almost a powder), whereby 100 g were macerated sequentially with 500 mL of hexane and dichloromethane. Each extraction was performed for 7 days at room temperature. All extracts filtered through filter paper and concentrated under vacuum using a rotary evaporator. The extracts produced yields of 5.5% (hexane) and 7.6% (dichloromethane). The essential fruit oil, obtained through the technique of steam distillation, was purchased commercially (LAZLO).

Microencapsulation process

Preparations containing HP- β -CD, the essential oil and extracts were made by freeze-drying. Ratios of 5:95 w/w HP- β -CD and the samples were dispersed on top of 0.5% Tween 80 in distilled water, agitated by magnetic stirring for 15min, frozen and lyophilized. The products obtained were oily. Analyses were recorded for cyclodextrins and supramolecular complexes in order to evaluate the complexation allowing comparison between different systems [\(11\)](#).

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

The chemical compositions of *S. terebinthifolius* extracts obtained from different extraction solvents were analyzed using a Shimadzu 14 B Chromatograph (model QP5050A). The samples were dissolved in chloroform and injected in a BP-5 column (dimensions: 30 m x 0.25mm), at initial temperature of 50°C for 1 min and, subsequently, increasing 3°C/min to a final temperature of 200°C, with the following parameters: injector split 1/50, equipped with Flame Ionization Detector (FID) detector, an injection volume of 1 μ L, and H₂ flow of 2.7 mL/min. Identification of volatile components was performed by comparison of their mass spectra to the spectra existing in the database of equipment, literature data and the Kovats Index. To determine the Kovats index, a mixture of alkanes (C₁₀-C₁₈) was used under the same conditions [\(12\)](#).

Gas chromatography (GC)

Identification of the volatile constituents of essential oil before and after the microencapsulation process was accomplished by GC using a HP5890 Chromatograph. The samples were dissolved in chloroform and injected in a column BP-1 (dimensions: 30m x 0.32mm), initial temperature of 50°C for 1min and subsequently gradient of 3°C/min to a final temperature of 200°C, injector split 1/50, FID detector, injection volume 1 μ L and H₂ flow of 2.7mL/min.

Antifungal activity determination by disk diffusion test

To evaluate the antimicrobial potential of the extracts, antimicrobial assays were performed in triplicate using the disk diffusion test [\(13\)](#). The inoculum was obtained from recent cultures of microorganisms (between 20 - 24 h at 30°C) by preparing standardized suspensions at 0.5 McFarland scale (10⁵ UFC/mL). The fungal suspension (0.5 mL) was added to 10mL sterile culture medium (36g/L malt extract, 36g/L peptone, 15g/L agar, 10g/L Tween 80, 5g/L glycerol). Subsequently, the medium was poured in Petri dishes under a laminar flow hood. Simultaneously, 20 μ L of each sample were added to 6 mm diameter paper disks. The disks containing the samples were placed on the solidified medium. In addition, disks containing the antifungal drug nystatin (100 IU) were placed on plates as a positive control. The susceptibility of the fungus was

determined after 18 h incubation at 30°C. Results were obtained by measuring the diameter of inhibition zones formed around the disks. Analysis of antifungal activity of all extracts are expressed in millimeters and analyzed by Analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey test ($p < 0.05$).

Broth Microdilution Test

The inhibitory concentration (IC) was determined by broth micro dilution (14). Initially, each sample was diluted two-fold with dimethyl sulfoxide (DMSO) and later held the same serial dilutions (from 31.25 to 4000 µg/mL) in appropriate medium (36g/L malt extract, 36g/L peptone, 10g/L Tween 80,5g/L glycerol) using sterile 96 well microtiter plates, and then inoculated with 100 µL *M. furfur*, including controls for growth, sterility, and DMSO. The plates were incubated at 30°C for 24h. After the incubation period, the absorbance was read in a UV-visible spectrophotometer at a wavelength of 595nm.

Cell culture

Osteoblasts (OB) were isolated from the calvaria of 1 - 4 days old neonatal male Wistar rats obtained from the animal facility of the Institute of Biological Science, UFMG. The calvaria was dissected and freed from the soft tissue, cut into small pieces and rinsed in sterile phosphate-buffered saline (PBS) without calcium and magnesium. The calvaria pieces were incubated with 1% trypsin-EDTA for 5 min, followed by four sequential incubations with 2% collagenase at 37°C for 40 min each. The supernatant of the first collagenase incubation, which contains a high proportion of periosteal fibroblasts, was discarded. Subsequent digestions produced a suspension of cells with a high proportion of osteoblasts. After centrifugation at 200g for 10min, each pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic. Cells were grown in a controlled humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. After reaching confluence, cells were used for experiments on the 3rd passage and seeded at a density of 10⁵ cells/mL in 96 well plates.

The human intestinal Caco-2 cell line was cultured in High Glucose DMEM with 4.5g/L glucose, 2mM L-glutamine, 2.2M sodium pyruvate, 10mM HEPES buffer, 2mM non-essential amino acids, 2.0g/L sodium bicarbonate, and 100U/mL amphotericin-gentamicin containing 10% FBS. The medium was changed, and cells sub-cultured after they reached confluence, as seen under the phase contrast microscope. Single cell suspension was obtained after trypsinization, and the cells were counted in a hemacytometer (Reichert, Buffalo, NY, USA). Cells were allowed to attach to the plates for 48h in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C.

Cellular viability and cytotoxicity assays

The assessment of viability and cell proliferation in the presence of extracts and the essential oil was performed using the MTT and Neutral Red (NR) test. Additionally, we assessed the metabolic activity of cells through the BCIP-NBT assay to quantify alkaline phosphatase production. All quantitative results were obtained from hexaplicate samples. Data are expressed as mean ± SD. Statistical analysis was carried out using ANOVA and Bonferroni's post-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Aliquots of extracts and essential oil in different concentrations were placed in contact with osteoblasts. The plates were incubated for 24h, followed by a determination of cell viability by the MTT assay. Approximately 10µL MTT (5mg/mL) was added to each well. Four hours later, cell morphology was analyzed by inverted

optical microscopy, and formazan crystals were dissolved with SDS-10% HCl. After incubation for 14h, optical density measurements were performed at 570nm.

The NR Assay was conducted on cells were plated in 96 well plates (1.5×10^5 cells/well). After 48h incubation, cells were treated with extracts and essential oil in different concentrations in phenol red-free medium for 24h. After treatment, the cells were rinsed with PBS, and then incubated with Neutral Red solution in serum-free DMEM (100µg/mL) at 37°C for 2h. After the incubation, fixing solution was added for 2min and the dye taken up by the cells was extracted by adding 200µL basic methanol (49% v/v methanol in water, 2% acetic glacial acid) to each well. After 15min, the plate was analyzed with the Multi Skan Spectrum (Thermo Scientific) using an excitation wavelength of 540nm and emission wavelength of 630nm. Data were reported as percent of untreated controls. The values are expressed as mean \pm SD obtained from five independent experiments carried out in hexaplicate (15).

Alkaline phosphatase detection was conducted using a BCIP/NBT kit. The osteoblast cells were plated in 96 well plates (1.5×10^5 cells/well) and, after 48h of incubation, the cells were exposed to the test suspensions, rinsed with PBS, and then incubated with an alkaline phosphatase substrate (1% BCIP/1.5% NBT solution) at 37°C for 2h. After the incubation, SDS-10% HCl was added for overnight incubation, and then the plate was analyzed with the Multi Skan Spectrum UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) using an excitation wavelength of 595nm. Data is reported as percent of untreated controls. The values are expressed as mean \pm SD obtained from five independent experiments carried out in hexaplicate (16).

Results and discussion

Characterization of extracts

The characterization of the dichloromethane and hexane *S. terebinthifolius* extracts were performed by GC, considering as standard the essential oil of the ripe fruits. The hexane and dichloromethane extracts and pure essential oil were characterized using GC/MS. (TABLE) 1 shows the compounds identified in the essential oil from the *S. terebinthifolius* fruits, and the percentage of these compounds found in hexane (HE) and dichloromethane (DE) extracts.

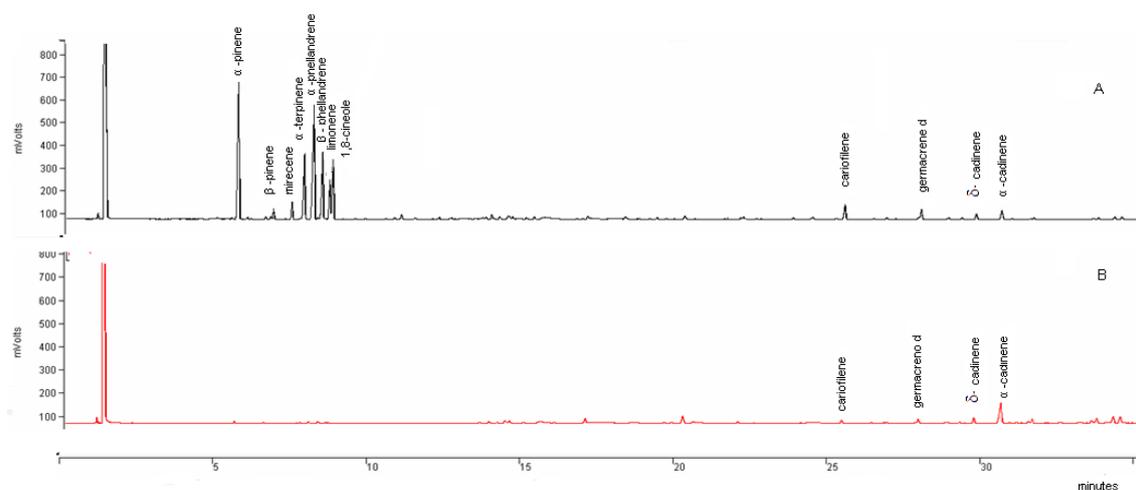
TABLE 1: Chemical constituents essential oil (EO), hexane extract (HE), dichloromethane extract (DE) and from *Schinus terebinthifolius* with the percentage (%) of content and Kovats Index (KI)*.

Compound	% EO	% HE	% DE	KI*
α -pinene	23.41	1.11	9.45	936
Camphene	0.28	-	-	956
β -pinene	1.06	-	3.69	980
Myrcene	2.08	-	-	984
α -terpinene	20.34	-	4.93	1022
Limonene	5.46	-	-	1031
α -phellandrene	9.89	-	-	1032
1,8-cineole	8.22	3.73	14.07	1033
β -phellandrene	10.18	11.73	24.72	1050
Terpinolene	0.65	-	-	1086
terpinen-4-ol	0.26	-	-	1177
caryophyllene	2.43	11.90	3.61	1418

germacrene D	1.70	13.66	4.72	1481
δ -cadinene	0.90	1.40	1.28	1536
α -cadinene	1.78	-	-	1552
Elemol	0.32	-	-	1582

The essential oil (EO) contained high percentages of monoterpenes. A similar composition, including a predominance of monoterpene compounds was identified (17). The characterization of the EO: HP- β -CD microcapsules was performed as described (18) using GC. The volatile constituents of the essential oil before (FIGURE 1-A) and after (FIGURE 1-B) microencapsulation were identified by GC analysis. When the profile of volatiles of the EO: HP- β -CD microcapsules (FIGURE 1-B) were analyzed, several interesting aspects were observed. There was a decrease of peak areas corresponding to α -pinene, β -pinene, myrcene, α -phellandrene, α -terpinene, β -phellandrene, limonene, caryophyllene and 1,8-cineole, compared to the peaks in the free essential oil chromatogram. This decrease suggests that the expected interaction of HP- β -CD with some components of essential oil decreases their availability and consequently, the intensity of corresponding peaks in the chromatogram. On the other hand, for the EO: HP- β -CD microcapsules, an increase in the peak areas for δ -cadinene and α -cadinene was observed. In the pure oil, only α -cadinene was detected. As these aromatic compounds were already separated by enantioselective GC using HP- β -CD derivatives as the stationary phase (19).

FIGURE 1: Gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) volatile profile of *S. terebinthifolius* essential oil before (A) and after (B) microencapsulation in hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD).



Antifungal activity

The antifungal activity of essential oil and extracts of *S. terebinthifolius* was evaluated by disk diffusion (TABLE 2) and microdilution (TABLE 3). The results obtained in microdilution test correlated with inhibition zone test (DE = 20.6mm, EO = 18.8mm, HE = 17.8mm). The most active extract was that obtained with dichloromethane, followed by the essential oil and hexane extract (IC₅₀ = 250, 500, or 1000 μ g/mL, respectively).

TABLE 2: Inhibition zone (mm) of hexane extract (HE), dichloromethane extract (DE) and essential oil (EO) and Nystatin (NYS) of *Schinus terebinthifolius* on *Malassezia furfur*.

Sample	Inhibition zone (mm)
Hexane extract (HE)	17.8 ± 0.4
Dichloromethane extract (DE)	20.6 ± 0.8
Essential oil (EO)	18.8 ± 0.8
Nystatin NYS	22.3 ± 0.5

TABLE 3: Inhibitory concentration (IC) of hexane extract (HE), dichloromethane extract (DE), essential oil (EO), hexane extract with 5% HP-β-CD (HE: HP 5%), dichloromethane extract with 5% HP-β-CD (DE: HP 5%), and the essential oil with 5% HP-β-CD (EO: HP 5%) on *Malassezia furfur*.

Sample	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₀ (µg/mL)
HE	1000	4000
DE	250	1000
EO	500	4000
HE:HP 5%	500	2000
DE:HP 5%	125	500
EO:HP 5%	250	2000

The dichloromethane extract was the best fungicide in this study, followed by the hexane extract and the essential oil. This was most likely due to the intermediary polarities of dichloromethane, which can extract higher number of intermediary polarity compounds, which may be involved in the fungal inhibition by the sample, compared to hexane which can extract mostly non-polar components. In addition, decomposition of components could occur during the distillation process due to the high experimental temperatures.

As a result, the antifungal properties may decrease slightly compared to the dichloromethane extract. These results are consistent with those obtained [\(20\)](#), in their study of the antifungal activity of essential oil and extracts of flowers of *Melodorum fruticosum*. In that study, the dichloromethane extract of the flowers of *M. fruticosum* also showed higher antifungal activity than the hexane extract and essential oil.

Assessing the antifungal activity of the compounds prepared with HP-β-CD, the dichloromethane extracts, essential oil and hexane extract had IC₅₀ of 125, 250 and 500 µg/mL, respectively. This increase in the activity can be attributed to the interaction between HP-β-CD and the components of the extracts or the essential oil, with a possible formation of an inclusion complex, as complex formation alters the physicochemical characteristics of the substrate, such as solubility and stability.

Cellular Viability

The cellular viability of osteoblasts in the presence of extracts and essential oil of *S. terebinthifolius* was evaluated by MTT (**FIGURE 2**) and NR (**FIGURE 3**) assays. The MTT assay showed that the essential oil (at 150, 250 and 450 µg/mL; **FIGURE 2**) did not cause reduction on cell viability significantly compared to control. Similar results were obtained with the NR (**FIGURE 3**).

FIGURE 2: Percentage of cellular viability of osteoblasts in the presence of different concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of *S. terebinthifolius* essential oil (EO), hexane (HE) and dichloromethane (DE) extracts by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT).

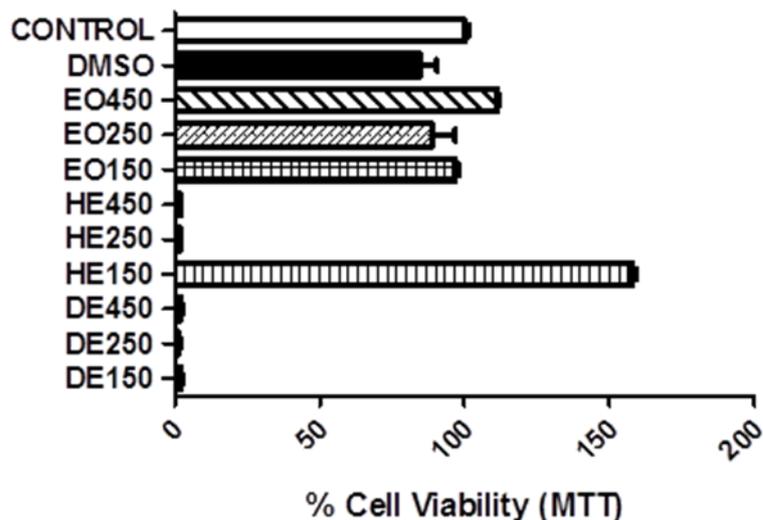
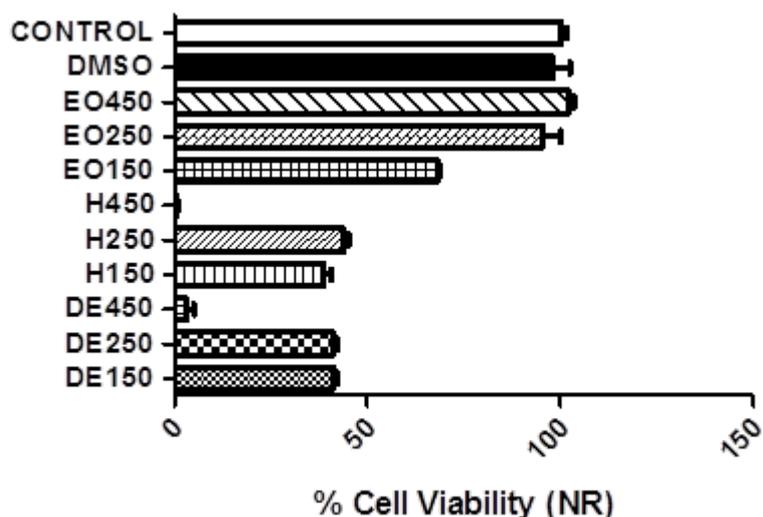
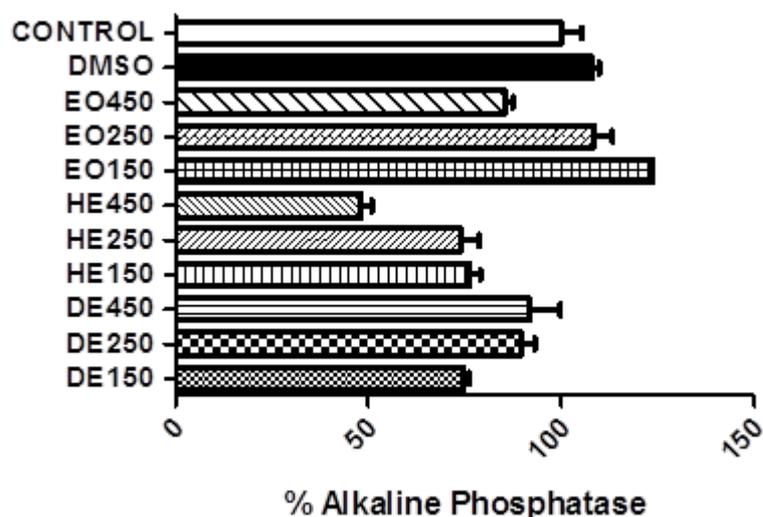


FIGURE 3: Percentage of cellular viability of osteoblasts by Neutral Red (NR), in the presence of different concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of *S. terebinthifolius* essential oil (EO), hexane (HE) and dichloromethane (DE) extracts.



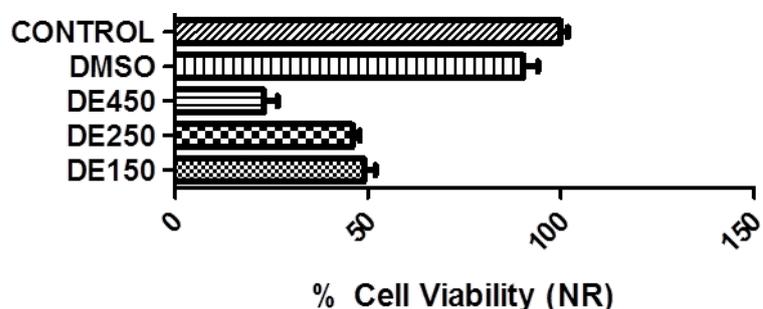
The production of alkaline phosphatase was assessed using the BCIP-NBT test (**FIGURE 4**). This assay showing that, in the presence of essential oil, the cells remained viable and functional. For the dichloromethane and hexane extracts, there was significant reduction in cell viability, by both MTT (**FIGURE 2**) and NR (**FIGURE 3**), at concentrations above $250\mu\text{g/mL}$. However, data from the alkaline phosphatase assay showed that the dichloromethane extract was more compatible with cell viability than the extract prepared with hexane (**FIGURE 4**).

FIGURE 4: Percentage of production of alkaline phosphatase in the presence of different concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of *S. terebinthifolius* essential oil (EO), hexane (HE) and dichloromethane (DE) extracts.



The antitumor activity of the dichloromethane extract in Caco-2 cells was assessed using the NR assay (**FIGURE 5**). The antiproliferative activity of the dichloromethane extract was dose-dependent. However, the extract inhibited cell growth by 50% even at the lowest concentration tested (150 $\mu\text{g/mL}$). Obtained similar results with dichloromethane extract of *S. terebinthifolius* leaves with human colon carcinoma (HCT-8), melanoma (MDA-MB-435) and leukemia (HL-60) cell lines (21). At 150 $\mu\text{g/mL}$, the extract showed cytotoxicity on osteoblasts (MTT and NR assays) and did not affect cell function (alkaline phosphatase). These data indicate the non-existence of a selectivity of the cytotoxic effect shown by the dichloromethane extract, since the extract did reduce cell viability in osteoblast cultures at the same dose at which cell death was observed in the Caco-2 cells.

FIGURE 5: Percentage of cellular viability of Caco-2 cells in the presence of different concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of *S. terebinthifolius* dichloromethane extract (DE) evaluated by Neutral Red (NR) method.



Conclusions

From the analysis of the results, it can be concluded that extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits in dichloromethane and hexane, complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), present antifungal

activity against the fungus *Malassezia furfur*. All samples inhibited their growth, and when complexed with HP- β -CD, the inhibitory concentration was reduced by 50%.

These data indicate the not existence of a selectivity of the cytotoxic effect shown by the dichloromethane extract, since the extract did reduce cell viability in osteoblast cultures at the same dose at which cell death was observed in the Caco-2 cells.

Acknowledgements

The authors would like to thank National Institute of Science and Technology Nanobiofar/CNPQ (INCT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References

1. Braga S. **O uso sustentável da biodiversidade amazônica**. In: Velloso JPR, Albuquerque RC. Amazônia vazia de soluções? Desenvolvimento moderno baseado na biodiversidade. Rio de Janeiro: José Olympio, 2002, p. 87-100. ISBN: 9788503007146.
2. Ennigrou A, Casabianca H, Laarif A, Hanchi B, Hosni K. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. **S Afr J Bot**. 2017; 108: 407-415. ISSN: 0254-6299. [[CrossRef](#)].
3. Jindal AK, Pandya K, Khan ID. Antimicrobial resistance: A public health challenge. **Med J Armed Forces India**. 2015; 71 (2): 178-181. ISSN: 0377-1237. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
4. Lima EO, Belém LF, Filho VC, Corrêa R, Nunes RJ, Andricopulo A, Silva VE. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. **Rev Bras Cienc Farm**. 2002; 38 (4): 443-450. ISSN: 1809-4562. [[CrossRef](#)].
5. Bendaoud H, Romdhane M, Souchard JP, Cazaux S, Bouajila J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **J Food Science**. 2010; 75 (6): C466-C472. ISSN: 1750-3841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
6. Suffredini IB, Paciencia MLB, Varella AD, Younes RN. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**. 2007; 78 (3): 223-226. ISSN: 0367-326X. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
7. Cheng YY, Hsieh CH, Tsai TH. Concurrent administration of anticancer chemotherapy drug and herbal medicine on the perspective of pharmacokinetics. **J Food Drug Anal**. 2018. In Press. ISSN: 1021-9498. [[CrossRef](#)].
8. Stojanov M, Nielsen HM, Larsen KL. Cyclodextrins: Efficient biocompatible solubilizing excipients for bromhexine liquid and semi-solid drug delivery systems. **Int J Pharm**. 2012; 422 (1-2): 349-355. ISSN: 0378-5173. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].

9. Ciobanu A, Landy D, Fourmentin S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. **Food Res Int.** 2013; 53 (1): 110-114. ISSN: 0963-9969. [[CrossRef](#)].
10. Hill LE, Gomes C, Taylor TM. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. **LWT - Food Sci Technol.** 2013; 51 (1): 86-93. ISSN: 0023-6438. [[CrossRef](#)].
11. Cortés ME, Sinisterra RD, Avila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha RG. The chlorhexidine: β -cyclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. **J Incl Phenom Macrocycl Chem.** 2001; 40 (4): 297-302. ISSN: 1573-1111. [[CrossRef](#)] [[Link](#)].
12. Adams RP. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry.** 5th ed. Gruver: Texensis Publishing, 2017. ISBN 978-0-9981557-2-2.
13. Alonso CA, Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Torres C, et al. Antibioqramj: A tool for analysing images from disk diffusion tests. **Comput Methods Programs Biomed.** 2017; 143: 159-169. ISSN: 0169-2607. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
14. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2014; 79 (2): 198-204. ISSN: 0732-8893. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
15. Shamsuria O, Fadilah AS, Asiah AB, Rodiah MR, Suzina AH, Samsudin AR. *In vitro* cytotoxicity evaluation of biomaterials on human osteoblast cells CRL-1543; hydroxyapatite, natural coral and polyhydroxybutarate. **Med J Malaysia.** 2004; 59 (B):174-5. ISSN: 0300-5283. [[PubMed](#)].
16. Panferov VG, Safenkova IV, Varitsev YA, Zherdev AV, Dzantiev BB. Enhancement of lateral flow immunoassay by alkaline phosphatase: a simple and highly sensitive test for potato virus X. **Mikrochim Acta.** 2018; 185 (1): 25. ISSN: 1436-5073. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
17. Cavalcanti A, Souza AM, Silva LCP, Santos PD, Sanches MN, Chaves DSDA, et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Rev Bras Farmacogn.** 2015; 25 (4): 356-362. ISSN: 0102-695X. [[CrossRef](#)].
18. Del Toró-Sánchez CL, Ayala-Zavala JF, Machi L, Santacruz H, Villegas-Ochoa, MA, Alvarez-Parrillaand E, González-Aguilar GA. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules. **J Incl Phenom Macrocycl Chem.** 2010; 67 (3-4): 431–441. ISSN: 1573-1111. [[CrossRef](#)].
19. Bicchi C, Blumberg L, Cagliero C, Cordero C, Rubiolo P, Liberto E, et al. Development of fast enantioselective gas-chromatographic analysis using gas-chromatographic method-translation software in routine essential oil analysis (lavender essential oil). **J Chrom A.** 2010; 1217 (9): 1530-1536. ISSN: 0021-9673. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
20. Pripdeevch P, Chukeatirote E. Chemical compositions, antifungal and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Melodorum fruticosum* L. flowers. **Food Chem Toxicol.** 2010; 48 (10): 2754–2758. ISSN: 0278-6915. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].

21. Mesquita ML, Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J Ethnoph.** 2009; 123 (3): 439-445. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 27/11/2017 | Aceite: 21/04/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Oliveira MS, Gontijo SL, Teixeira MS, Teixeira KIR, Takahashi JA, Millan RDS, Segura MEC. Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2018; 12(2): 135-146. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/588>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

Efeitos alelopáticos de extratos vegetais de *Hancornia speciosa* Gomes, na germinação de *Lactuca sativa* L.

Allelopathic effects of plant extracts of *Hancornia speciosa* Gomes on germination of *Lactuca sativa* L.

DOI 10.5935/2446-4775.20180014

Uhlmann, Lidiane Andressa Cavalcante¹; Oliveira, Rafael José²; Santos, Marcio Galdino^{2,3}.

¹Universidade Federal do Tocantins – UFT, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, Campus de Porto Nacional, Rua 03, s/n, Jardim dos Ipês, 77500-000, Porto Nacional, TO, Brasil.

²Universidade Federal do Tocantins – UFT, Curso de Ciências Biológicas, Campus de Porto Nacional, Rua 03, s/n, Jardim dos Ipês, 77500-000, Porto Nacional, TO, Brasil.

³Universidade Federal do Tocantins – UFT, Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente, Campus de Palmas, Av. NS 15, Quadra 109 Norte, Plano Diretor Norte, 77001-090, Palmas, TO, Brasil.

*Correspondência: andressabio@mail.uft.edu.br

Resumo

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) é uma fruteira, conhecida como mangabeira, com ampla distribuição no Brasil e muito utilizada na medicina popular, por suas propriedades anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antidiabéticas e antimicrobianas. Entretanto, nenhum estudo foi realizado com objetivo de avaliar o potencial alelopático dessa espécie. Nesse sentido, esse estudo objetivou investigar a atividade alelopática de *H. speciosa*, a partir do extrato aquoso de folhas secas sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. O experimento foi conduzido no município de Porto Nacional, Tocantins, Brasil, no período de agosto/2015 a julho/2016. Folhas de mangabeira coletadas em três áreas de Cerrado foram trituradas, até obter-se um pó que posteriormente foi diluído em água destilada, resultando no extrato aquoso com concentrações de 10%, 7,5%, 5,0%, e 2,5% m/v, sendo a água destilada utilizada como testemunha. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, após a análise do delineamento, nos efeitos dose, local e interação dose *versus* local, os graus de liberdade de dose foram desdobrados em polinômios ortogonais. Pode-se verificar que o extrato aquoso de folhas de *H. speciosa* apresentou efeito alelopático negativo sobre as sementes de *L. sativa*, pois retardou a germinabilidade e aumentou o tempo médio de germinação, enquanto que o índice de sincronia não foi fortemente influenciado.

Palavras-chave: Mangabeira. *Hancornia speciosa*. Atividade alelopática. Padrões vegetacionais. Cerrado.

Abstract

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) is a fruit tree known as mangabeira with wide distribution in Brazil and widely used in folk medicine, due to its anti-inflammatory, antihypertensive, antidiabetic and antimicrobial properties. However, no study was carried out to evaluate the allelopathic potential of this species. In this sense, this study aimed to investigate the allelopathic activity of *H. speciosa*, from the aqueous extract of dry leaves on the germination of *Lactuca sativa* L. The experiment was carried out in the municipality of Porto Nacional, Tocantins, Brazil, from August/2015 to July/2016. Mangabeira leaves collected in three Cerrado areas were ground until a powder was obtained which was later diluted in distilled water, resulting in the aqueous extract with concentrations of 10%, 7.5%, 5.0%, and 2.5% m/v, the distilled water being used as a control. A completely randomized design was used, after analysis of the design, dose, site and dose-local interaction, dose degrees of freedom were deployed in orthogonal polynomials. It can be verified that the aqueous extract of leaves of *H. speciosa* presented a negative allelopathic effect on the seeds of *L. sativa*, as it delayed the germinability and increased the average time of germination, whereas the synchrony index was not strongly influenced.

Keywords: Mangabeira. *Hancornia speciosa*. Allelopathic activity. Vegetative patterns. Cerrado.

Introdução

Alelopatia é definida como uma interferência química, que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra, podendo provocar efeito direto ou indireto, benéfico ou danoso ⁽¹⁾. É um importante mecanismo ecológico, pois atua estimulando ou suprimindo o desenvolvimento e o crescimento de outras plantas, influenciando na dominância, sucessão das plantas, formação de comunidades, vegetação clímax, manejo e produtividade de culturas ^(2,3).

Compostos químicos que participam da atividade alelopática dos vegetais são denominados aleloquímicos, provêm do metabolismo secundário e estão relacionados a mecanismos de defesa das plantas, contra ataques de microrganismos e insetos, que vêm sendo adquiridos ao longo de um processo de evolução ^(4,5). Os aleloquímicos estão presentes em todos os tecidos das plantas e sua produção pode ser regulada por diversos fatores ambientais, como temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de água e nutrientes ^(6,7), e são liberados no meio ambiente por meio da lixiviação foliar, decomposição de resíduos vegetais, volatilização, exsudação radicular e incorporação dos compostos no solo ⁽⁸⁾. Quando liberados no ambiente podem ser absorvidos por outras plantas, influenciando no processo de germinação, crescimento e desenvolvimento por ações em processos fisiológicos ^(9,10).

Diversos aleloquímicos podem ser utilizados como herbicidas naturais, em substituição aos compostos sintéticos de uso corrente na agricultura, com destaque para os alcaloides, benzoxazinonas, derivados do ácido cinâmico, coumarinas e compostos cianogênicos ^(11,12,13). Além disso, os aleloquímicos são uma importante fonte de novos medicamentos, haja vista que compostos fenólicos e flavonoides possuem propriedades antioxidantes, antimicrobianas e citotóxicas ^(14,15). Dessa forma, pesquisas no âmbito da alelopatia podem ser uma alternativa interessante e viável para obtenção de novas substâncias que venham atender às necessidades atuais e futuras da medicina, agricultura, farmacologia e meio ambiente, reduzindo ou eliminando a contaminação, preservando os recursos naturais e garantindo o oferecimento de produtos com qualidade ^(16,17).

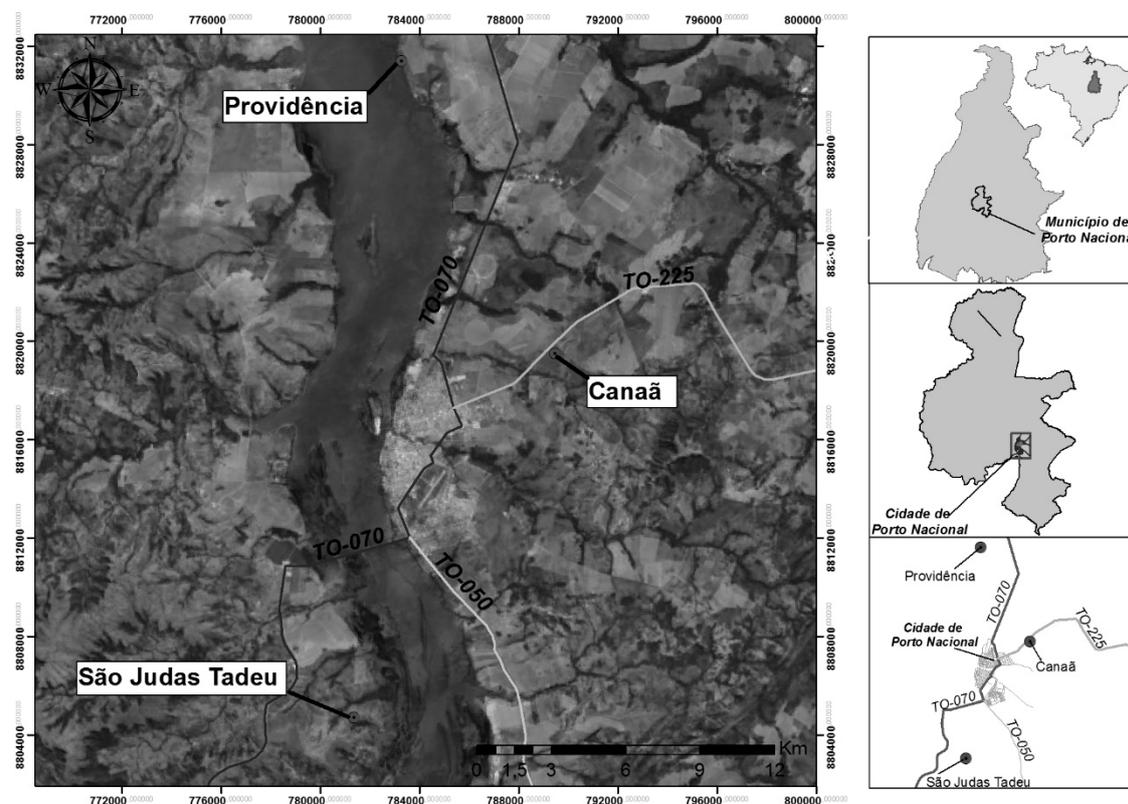
Nesse contexto, o Cerrado surge como uma área relevante para estudos alelopáticos, uma vez que é a savana tropical mais rica do planeta, com mais de 12.000 espécies de plantas (18) e uma área prioritária para a conservação em nível global, devido a sua elevada biodiversidade e crescente taxa de conversão dos seus ambientes naturais provocados principalmente pela agricultura (19). No entanto, em uma revisão sobre bioatividade de plantas do Cerrado, observou-se que apenas 0,61% haviam sido estudadas (20). Apesar dos poucos estudos desenvolvidos do ponto de vista fitoquímico, a maioria encontrou efeitos alelopáticos significativos, sugerindo que a alelopatia desempenha um papel importante na ecologia do Cerrado (20,21,22).

Dentre as diversas espécies do Cerrado, a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutadeira pertencente à família Apocynaceae, nativa do Brasil e está presente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste. Planta perenifólia de clima tropical, seus frutos possuem aroma e sabor agradável, e a frutificação ocorre entre outubro e dezembro (23), sendo muito utilizada pela agroindústria do Nordeste. Seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou processados na forma de sorvete, suco, geleia, doces e licor (24). Além de ser conhecida pelo seu uso culinário, a *H. speciosa* é amplamente reconhecida pelas suas propriedades bioativas, demonstrando atividade anti-hipertensiva, antidiabética, anti-obesidade, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica, gastroprotetora, vasodilatadora e cicatrizante (25-36). Entretanto, nenhum estudo foi realizado com objetivo de avaliar o efeito alelopático dessa espécie. Nesse sentido surge a necessidade de estudos basais que contemplem o potencial alelopático dessa espécie. No presente estudo avaliou-se o efeito alelopático exercido pelo extrato aquoso de folhas de *H. speciosa* sobre a germinação de sementes de *Lactuca sativa* L.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido no município de Porto Nacional, região central do Estado do Tocantins, entre agosto/2015 e julho/2016. Para obtenção do extrato, foi realizada a coleta de folhas de *H. speciosa* em três áreas independentes de Cerrado: na fazenda Canaã (10°40'17,6"S 48°20'53"W), Providência (10°33'25,15"S; 48°24'45,84"W) e São Judas Tadeu (10°48'09"S e 48°25'28"W) para averiguar a existência de influência local no comportamento alelopático do extrato da *H. speciosa* (FIGURA 1). As exsiccatas encontram-se depositadas no herbário do Tocantins, sob registro HUEFS n° 237031. O clima da região é definido como tropical de classificação climática de Köppen e Geiger como sendo de savana com chuva de verão (Aw). Apresenta temperatura média de 26,1°C (variando 3,0°C durante o ano), sendo o mês de setembro o mais quente (27,9°C de temperatura média) e julho o mais frio (24,9°C). A pluviosidade anual média de 1622 mm, com o mês mais seco (junho) com uma média de quatro mm, e o mais chuvoso (março) com 262 mm (37).

FIGURA 1: Localização das fazendas Canaã, Providência e São Judas Tadeu, município de Porto Nacional – TO, onde realizaram-se as coletas de folhas de *Hancornia speciosa* para elaboração dos extratos.



No mês de coleta foram realizadas análises físico-químicas do solo e determinação da clorofila *a* e clorofila *b*, segundo metodologia própria (38-39). Os dados meteorológicos foram obtidos pela estação meteorológica do município de Porto Nacional - TO e fornecido pelo Instituto Nacional de Meteorologia (40).

A preparação do extrato realizou-se seguindo uma metodologia adaptada (41), utilizada nos bioensaios de germinação. Folhas de *H. speciosa* sadias foram retiradas de forma assistemática, de dez matrizes pré-selecionadas de cada área. As folhas foram secas em estufa a 45°C durante período de 60 horas ou até peso constante, trituradas separadamente obtendo-se um pó, posteriormente agrupado numa única amostra por local e disperso em água destilada na proporção de 100 g para 1 L para resultar no extrato aquoso bruto (10% m/v).

O uso de extrato aquoso é recomendado em estudos alelopáticos porque reflete mais de perto o que aconteceria sob condições naturais (19). O extrato bruto foi filtrado com auxílio de uma bomba elétrica de vácuo acoplada a um Kitassato com funil de Buchner, coberto com uma camada de papel de filtro qualitativo. O extrato resultante foi recolhido em um bquer e a partir do extrato bruto foram realizadas as diluições de 10%, 7,5%, 5,0% e 2,5% m/v, sendo a água destilada utilizada como testemunha, resultando em cinco tratamentos.

Para o bioensaio de germinação a espécie escolhida como receptora foi *L. sativa* (alface), pois apresenta maior sensibilidade aos efeitos de aleloquímicos, é resistente a uma ampla faixa de pH e é considerada indicadora de atividade alelopática, sendo frequentemente usada em testes de laboratório (41,42,43). As sementes de *L. sativa* (Grand Rapids TBR), com 82% de germinação e pureza de 99,0% foram adquiridas

no comércio local. Adotaram-se quatro repetições de 50 sementes por placa de Petri contendo duas folhas de papel filtro embebidas em 10 mL de água destilada ou extrato correspondente. Todo material experimental foi previamente autoclavado e, durante a manipulação dos materiais, as mãos e as bancadas passaram por um processo de assepsia com o uso de etanol 70%. A semeadura ocorreu em capela de fluxo contínuo a fim de evitar contaminações. O experimento foi conduzido em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura controlada a 25°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 5 (três locais: Canaã, Providência, São Judas Tadeu, e cinco concentrações: 0% (controle), 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0%). As contagens dos diásporos germinados foram realizadas a cada 12 horas e, após o sétimo dia de experimento, o intervalo de contagem passou a ser de 24 horas até a estabilização da germinação, sendo este o intervalo mais recomendado para bioensaios de germinação. Adotou-se a protrusão de qualquer parte do embrião como critério de germinação (42).

Os dados obtidos foram submetidos aos cálculos de (i) germinabilidade (G) que corresponde a porcentagem de sementes em que o processo de germinação chega ao final, por meio do crescimento intraminal que resulta na protrusão (ou emergência) de um embrião vivo (44,45); (ii) tempo médio de germinação (T) que é a média ponderada do tempo que cada semente levou para germinar (44,45); e o (iii) índice de sincronia (I) proposto para medir a sincronização de sementes, detectando o número de vezes em que as sementes germinam independente de quando isso ocorre, onde valores próximos de 1 representam que a germinação de todas as sementes ocorre ao mesmo tempo e valores próximos de 0 quando pelo menos duas sementes podem germinar, uma de cada vez (44,45). Além disso, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo o efeito de doses desdobrado em contrastes ortogonais. Para a obtenção dos pressupostos da análise de variância foi realizado o teste de homogeneidade de Hartley e normalidade de Shapiro-Wilk; os dados foram transformados para análise, sendo a porcentagem de germinação transformada em arco seno da raiz quadrada de $x/100$ (46,47) e por Box-Cox para as variáveis, tempo médio e índice de sincronização.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa no efeito alelopático entre os locais analisados e na interação dose *versus* local, pois todos os p-valores foram maiores que 0,05 (TABELA 1) indicando que, independentemente de onde foram coletadas as folhas de *H. speciosa*, o efeito alelopático no experimento foi igual.

Segundo a literatura (1,48), fatores abióticos tais com radiação solar, nutrientes minerais, temperatura e estresse hídrico, podem ser utilizados como parâmetros para indicar diferenças nas biossínteses de compostos aleloquímicos. Portanto, esses fatores, desconsiderando os fatores bióticos e antrópicos, principalmente herbívora e queimadas, podem promover variações genéticas em populações naturais e resistência perante as pressões ambientais, sendo o fator preponderante para a seleção natural. Assim, as plantas que ocorrem em um gradiente ambiental podem variar quanto à constituição genética e atividade fisiológica, embora pertencendo a mesma espécie, e podem responder de modo muito diferente às tensões ambientais. Entretanto, as análises preliminares de solo e clorofila não demonstraram diferenças significativas entre os locais, os fatores de nutrientes minerais e a radiação solar. Também, pelo fato dos

acessos estarem na região central do Estado do Tocantins, convergem para as mesmas condições de umidade e temperatura. Além disso, pode-se considerar o descarte de fatores genéticos, pois a *H. speciosa* é planta endêmica do Cerrado, e todos os acessos foram realizados com indivíduos endêmicos em locais que não possuem diferenças latitudinais. Estes fatos corroboram para uma explicação plausível com os resultados em não haver diferença significativa no efeito alelopático entre os locais analisados.

TABELA 1: Valores do teste F, teste t, p-valor e o grau de liberdade (GL) para os caracteres analisados: G (germinabilidade), T (tempo médio de germinação) e I (índice de sincronização) de diásporos de *Lactuca sativa* submetidos a diferentes doses de extrato foliar de *Hancornia speciosa*. O símbolo (t) significa que os dados utilizados na análise são dados transformados. Valores significativos são representados em negrito. Os parâmetros do modelo $y_{ij} = b_0 + b_1 \cdot \text{dose} + b_2 \cdot \text{dose}^2$ e o seu respectivo coeficiente de determinação, em porcentagem (R^2), são apresentados.

Fontes de variação	G (t)			T (t)			I (t)		
	GL	F	p	GL	F	p	GL	F	p
Regressão linear	1	101,9058	< 0,0001	1	179,5956	< 0,0001	1	6,3417	0,0154
Regressão quadrática	-	-	-	-	-	-	1	8,168	0,0064
Desvio de regressão	3	1,4490	0,2412	3	4,4194	0,0083	2	1,1293	0,3322
Doses	4	26,5635	< 0,0001	4	48,2103	< 0,0001	4	4,1921	0,0057
Local	2	0,0920	0,9123	2	1,7411	0,1869	2	0,1246	0,8831
Local x Doses	8	0,9876	0,4583	8	1,4384	0,2071	8	0,6321	0,7465
Resíduo	45			45			45		
Parâmetros do modelo	Coef.	t	p	Coef.	T	p	Coef.	t	p
b0	60,170	30,122	< 0,0001	4,4763	133,587	< 0,0001	5,0146	8,988	< 0,0001
b1	-3,293	-10,095	< 0,0001	0,0733	13,401	< 0,0001	0,5357	2,026	0,0487
b2	-	-	-	-	-	-	-0,0725	-2,858	0,0064
R ² (%)	95,91			93,20			86,53		
Média geral	43,7052			4,8430			4,9761		
Coeficiente de variação (%)	20,44			3,09			41,27		

Nesse estudo os parâmetros analisados indicam efeitos alelopáticos inibitórios significativos no processo de germinação de *L. sativa* em função das concentrações de extrato aquoso de folhas secas de *H. speciosa* testado ($p < 0,05$). Ao analisar a germinabilidade das sementes de *L. sativa*, foi observado um decréscimo linear significativo na porcentagem de germinação com o aumento na concentração do extrato (**FIGURA 2A**). Logo, os efeitos mais expressivos da inibição ocorreram na concentração de 10% (m/v), germinando apenas 18% das sementes. Observou-se, ainda, que à medida que a concentração do extrato se tornava mais diluída a porcentagem de germinação aumentava gradativamente, chegando a 71% de germinação quando a concentração do extrato era de 0% (m/v). Assim, a cada aumento de 1% na concentração do extrato houve uma redução de 5,23% no processo de germinação. Com frequência, em estudos alelopáticos, a germinabilidade é um índice muito utilizado, embora na maioria das vezes não demonstra

um resultado expressivo. O que mais se observa são efeitos significativos de extratos sobre o tempo médio e velocidade de germinação e nenhuma diferença na germinabilidade em relação ao controle (42,49,50). No entanto, nesse estudo foram identificados resultados relevantes no processo de germinabilidade. As mudanças nesse parâmetro podem ser apenas fatores secundários decorrentes de interações que ocorrem em níveis celulares e moleculares, pois os aleloquímicos podem alterar estruturas citológicas, hormonais, as membranas e sua permeabilidade, a absorção de minerais, transcrição e tradução do DNA, respiração, conformação de enzimas e receptores entre outros (10,51).

O tempo médio de germinação também apresentou uma variação linear e significativa (**FIGURA 2B**), nesse caso havendo um acréscimo do tempo médio de germinação com respeito à concentração do extrato. Quando as sementes estavam embebidas no controle o tempo médio para a germinação foi de 86 horas, enquanto que para a concentração de 10,0% o tempo médio para a germinação das sementes foi 193 horas. Ou seja, a cada 1% de aumento na dose do extrato houve um aumento de aproximadamente 10 horas no tempo médio de germinação, levando a conclusão que o extrato induziu atraso na emergência do embrião das sementes de *L. sativa*. Dessa forma, corrobora com a ideia de que os aleloquímicos promovem efeitos prejudiciais no processo de germinação e crescimento, reduzindo a porcentagem de sementes germinadas, atrasando a germinação que muitas vezes impossibilitam a continuidade de seu desenvolvimento (44,52).

Resultados semelhantes foram encontrados ao testar o efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação de *L. sativa*, verificando que o extrato aquoso exerceu efeito significativo sobre o processo de germinação. Houve decréscimo linear na porcentagem de germinação, na velocidade média de germinação e na velocidade de germinação. Por outro lado, houve aumento linear no tempo médio de germinação (41). Em bioensaios realizados com extratos foliares das espécies *Peltophorum dubium* e *Psychotria leiocarpa*, igualmente constataram que os extratos causaram atraso na germinação dos aquênios *L. sativa*, o que foi visualizado nas alterações do tempo médio de germinação (53), assim como observado em nossos estudos.

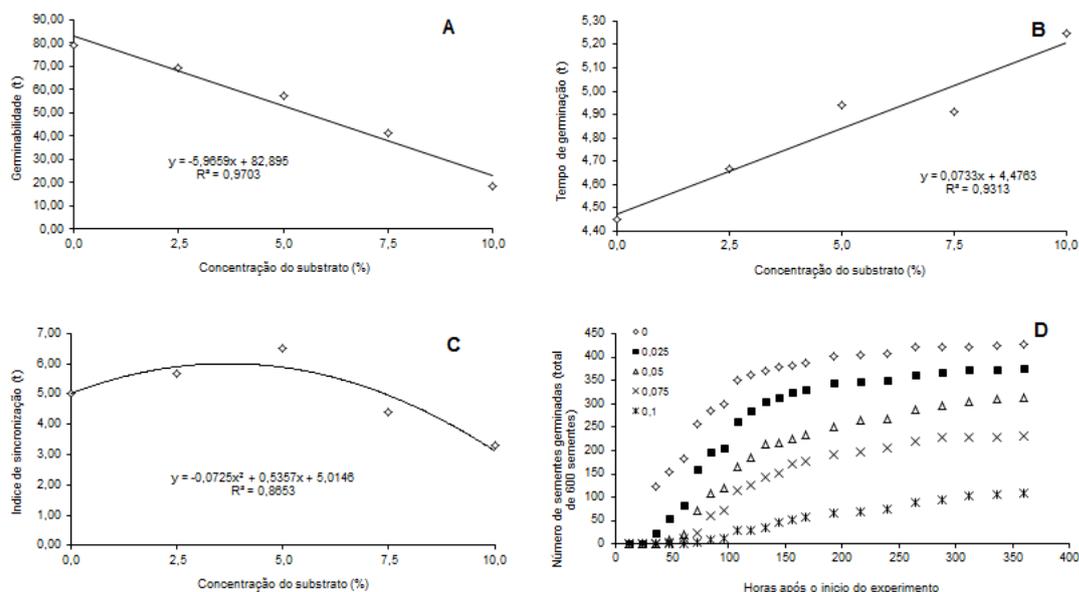
Nos bioensaios de atividade alelopática com extrato aquoso de *Araucaria angustifolia* na germinação de *L. sativa*, observou-se um decréscimo linear nos valores de porcentagem de germinação, ocasionando inibição em torno de 80% da germinação das sementes nas concentrações de 5,0% e 7,5% (m/v), o que pode ser explicado pela presença de componentes aleloquímicos (54).

Em um estudo de atividade alelopática com onze espécies nativas do Cerrado sobre a germinação de *L. sativa* e *Sesamum indicum*, observou-se que todos os extratos aquosos a 10% (m/v) atrasaram a germinação das espécies receptoras, sendo *Davilla elliptica*, *Diospyros hispida*, *Kielmeyera coriacea*, *Miconia albicans*, *Piptocarpha rotundifolia* e *Schefflera vinosa* as espécies que demonstraram maiores efeitos alelopáticos (55). Esse resultado apoia a hipótese de que, sob condições de estresse abiótico e biótico, pode ocorrer um aumento na atividade alelopática das plantas (56). No caso específico do Cerrado, podemos considerar o estresse hídrico, ao qual o solo deste domínio é submetido durante a estação seca ou o fogo, outro elemento característico, que ao danificar as plantas induz a produção de aleloquímicos (57,58). O aumento da produção de aleloquímicos pode proporcionar uma maior inibição nas plantas concorrentes / receptoras e caracterizar um importante mecanismo de defesa da planta (59). Esse resultado favorece a ideia de que a atividade alelopática é um mecanismo fundamental nas interações ecológicas do Cerrado (21).

O atraso na germinação pode significar uma desvantagem para as sementes em campo, pois estas ficarão expostas por mais tempo a patógenos como fungos, fatores ambientais e predação. Outra desvantagem é que sementes que demoram a germinar irão competir com plantas já pré-estabelecidas em crescimento (60). Esse fator tem um significado ecológico, pois plantas que germinam mais lentamente podem apresentar tamanho reduzido (61) e, conseqüentemente, podem ser mais suscetíveis a estresses ambientais e terem menor chance na competição por recursos (21).

Além da germinabilidade e do tempo médio de germinação o índice de sincronia é um parâmetro que demonstra o nível de organização ou desordem das reações químicas no processo de germinação (10,46). Na interpretação do índice de sincronização, quanto menor for o seu valor mais sincronizado será a germinação, independentemente do número total de sementes germinadas (46). No presente estudo o maior valor para o índice de sincronização correspondeu a aproximadamente 3,7% de concentração do extrato, decaindo com o aumento da mesma (FIGURA 2C). A perda da sincronia de germinação representa heterogeneidade na fisiologia dos aquênios de *L. sativa* (45), autenticando que a ação dos aleloquímicos interfere no padrão de sincronia da germinação de sementes submetidas a tais compostos (43). Resultados semelhantes também foram encontrados em bioensaios de germinação com extrato aquoso de *Persea americana* Mill. sobre *L. sativa* pois as sementes mostraram-se mais sincrônicas nas concentrações mais baixas do extrato (62). O comportamento do número total de sementes germinadas em cada concentração do extrato no decorrer das horas está representado graficamente e corrobora para os resultados anteriormente relatados (FIGURA 2D).

FIGURA 2: Efeito da concentração do substrato de *Hancornia speciosa* sob a germinabilidade (A) de *Lactuca sativa*, tempo médio de germinação (B), índice de sincronização (C) e número total de sementes germinadas em relação ao tempo (em horas) após o início do experimento (D). Os valores apresentados nos gráficos A, B e C são dados transformados.



Os efeitos alelopáticos resultam da ação de várias substâncias que atuam em conjunto, visto que, em geral, os aleloquímicos são encontrados em baixas concentrações no meio ambiente (59,63-65). Além disso, extratos vegetais são misturas que podem conter substâncias de várias classes como terpenos, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, aminoácidos não proteicos, dentre outras, compostos que estão

envolvidos nos efeitos alelopáticos de inibição de metabolismo das plantas alvo e, que apresentam efeitos complexos sobre as espécies testadas. Assim sendo, análises químicas mais detalhadas são necessárias para esclarecer quais desses compostos seriam os responsáveis pelo efeito alelopático ⁽⁶⁰⁾.

Os ensaios de fitotoxicidade podem ser utilizados para direcionar o isolamento e a identificação dos compostos responsáveis por esta atividade ^(6,65). No entanto, para comprovar que o extrato aquoso de folhas secas de *H. speciosa* apresenta efeito alelopático e testar seu uso potencial como agente químico natural, sugerimos outras abordagens experimentais para uma maior compreensão dos resultados obtidos. Estudos a campo devem ser realizados para confirmar se este potencial alelopático, como processo inibitório, se expressa em condições naturais.

Conclusão

Os ensaios de atividade alelopática realizados com extrato aquoso de folhas secas de *Hancornia speciosa* sobre a germinação de *Lactuca sativa* indicam que não houve diferença de locais de coletas no efeito alelopático do extrato. Porém, o mesmo apresentou efeito alelopático negativo sobre as sementes de *L. sativa*, pois retardou significativamente a germinabilidade, ao passo que houve acréscimo considerável no tempo médio de germinação, enquanto que o índice de sincronia não foi fortemente influenciado. Conclui-se que houve um retardo no processo de germinação das sementes de *L. sativa* sob o efeito do extrato aquoso de *H. speciosa*, em laboratório.

Futuros estudos de análises fitoquímicas são promissores para o entendimento e identificação das substâncias alelopáticas, além da determinação das porcentagens de concentração destas nos acessos estudados.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo acadêmico (PIBIC) e a Fundação Universidade Federal do Tocantins (UFT).

Referências

1. Rice EL. **Allelopathy**. 2ª ed. New York: Academic Press. 422p. 1984. ISBN: 10:0125870558.
2. Novaes P. **Alelopatia e bioprospecção em *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata***. 2011. São Carlos, SP. Tese de Doutorado [Programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais]. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos. [\[Link\]](#).
3. Teasdale JR, Rice CP, Guimei C, Ruth WM. Expression of allelopathy in the soil environment: soil concentration and activity of benzoxazinoid compounds released by rye cover crop residue. **Plant Ecol**. 2012 May; 213:1893–905. ISSN: 1385-0237. [\[CrossRef\]](#).
4. Nishimura H, Mizutani J. Identification of allelochemicals in *Eucalyptus citriodora* and *Polygonum sachalinense*. In: Inderjit; KMM Dakshini, FA Einhellig (eds.). **Allelopathy - organisms, processes and applications**. DC: American Chemical Society. Washington, 1995 p. 74-85. [\[Link\]](#).

5. Medeiros ARM. Alelopatia: importância e suas aplicações. **Horti Sul**. 1990;1(3):27-32. ISSN: 0103-3700. [\[Link\]](#).
6. Macías FA, Molinillo JMG, Varela RM, Galindo JCG. Allelopathy: a natural alternative for weed control. **Pest Manag Sci**. 2007;63(4):327-48. ISSN: 1526-498X. [\[CrossRef\]](#).
7. Gatti AB, Perez SCJGA, Lima MIS. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Bot Bras**. 2004; 18(3):425-30. ISSN: 0102-3306. [\[CrossRef\]](#).
8. Weir TL, Park SW, Vivanco JM. Biochemical and physiological mechanisms mediated allelochemicals. **Curr Opinion in Plant Bio**. 2004 Ago; 7(4):472-9. ISSN: 1369-5266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
9. Einhellig FA. The physiology of allelochemical action: clues and views. In: Reigosa M, Pedrol N. **Allelopathy from molecules to ecosystems**. Vigo: Universidade de Vigo, 2002; p.1-23. [\[Link\]](#).
10. Ferreira AG. Interferência: competição e alelopatia. In: Ferreira AG, Borghetti F. (eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre Artmed Editora. 2004. p. 251-64. ISBN: 8536303832.
11. Belz RG, Hurlle K. A novel laboratory screening bioassay for crop seedling allelopathy. **J Chem Ecol**. 2004; 30(1):175-98. ISSN: 0098-0331. [\[Link\]](#).
12. Qiming X, Haidong C, Huixian Z, Daqiang Y. Allelopathic activity of volatile substance from submerged macrophytes on *Microcystin aeruginosa*. **Acta Ecol Sinica**. 2006; 26(11):3549-54. ISSN: 1872-2032. [\[CrossRef\]](#).
13. Waller GR, Feug MC, Fujii Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: Inderjit I, Dakshini KMM, Foy C L. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 75-98. [\[Link\]](#).
14. Sofi FR, Raju CV, Lakshmisha IP, Singh RR. Antioxidant and antimicrobial properties of grape and papaya seed extracts and their application on the preservation of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) during ice storage. **J Food Sci Technol**. 2016; 53 (1):104-17. ISSN: 0975-8402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
15. Amin MU, Khurram M, Khattak B, Khan J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complement Altern Med**. 2015; 15:59. ISSN: 1472-6882. [\[CrossRef\]](#)[\[PubMed\]](#).
16. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**. 2016; 79(3):629-61. ISSN: 0163-3864. [\[CrossRef\]](#)[\[PubMed\]](#).
17. Souza Filho APS, Alves SM. Potencial alelopático de plantas acapu (*Vouacapoua americana*): efeitos sobre plantas daninhas de pastagem. **Planta Daninha**. 2000; 18(3):453-41. ISSN: 1806-9681. [\[CrossRef\]](#).
18. Klink CA, Machado RB. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conserv Bio**. 2005; 19:707-13. ISSN:1523-1739. [\[CrossRef\]](#).

19. Mittermeier RA, Fonseca GAB, Rylands AB, Brandon K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade** 2005; 1(1):14-21. ISSN: 1808-3773. [[Link](#)].
20. Novaes P, Molinillo JMG, Varela RM, Maciás FA. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. **Phytochem Rev**. 2013 May; 12:839–55. ISSN: 0031-9422. [[CrossRef](#)].
21. Gatti AB, Perez SCJGA, Ferreira, AG. Avaliação da atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de espécies de cerrado. **Rev Bras Bio**. 2007; 5(Supl 02):174-6. ISSN: 0034-7108. [[Link](#)].
22. Silva GB, Martim L, da Silva CL, Young MCM, Ladeira AMP. Allelopathic potential of Cerrado native arboreous species. **Hoehnea**. 2006; 33:331–8. ISSN: 2236-8906. [[CrossRef](#)].
23. Venturini Filho WG. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher. 2010.
24. Nascimento RSM, Cardoso JA, Cocozza FDM. Caracterização física e físico-química de frutos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) no oeste da Bahia. **Rev Bras Eng Agríc Ambient**. 2014 Aug; 18(8):856–60. ISSN: 1807-1929. [[CrossRef](#)].
25. Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, Souza Brito ARM, Hiruma-Lima CA. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **J Ethnopharmacol**. 2008; 120:161-8. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
26. Hirschmann GS, Arias AR. A survey of medicinal plants of Minas Gerais. Brazil. **J Ethnopharmacol**. 1990;29:159-72. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
27. Grandi TMS, Trindade JA, Pinto MJF, Ferreira LL, Catella AC. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot Bras**. 1989;3(2):185-224. ISSN: 0102-3306. [[CrossRef](#)].
28. Rodrigues VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande de Minas Gerais. **Cienc Agrotec**. 2001; 25(1):102-23. ISSN: 1981-1829. [[Link](#)].
29. Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS, Fernandes PD. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **J Ethnopharmacol**. 2011;135:530-7. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
30. Ferreira HC, Serra CP, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **J Ethnopharmacol**. 2007;109:161-4. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)].
31. Ferreira HC, Serra CP, Endringer DC, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**. 2007;14:473-8. ISSN: 0944-7113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
32. Endringer DC, Valadares M, Campana PRV, Campos JJ, Guimarães KG, Pezzuto JM, Braga FC. Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets in vitro. **Phytother Res**. 2010;24:928-33. ISSN: 1099-1573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

33. Geller FC, Teixeira MR, Pereira AB, Dourado LP, Souza DG, Braga FC, Simões CMO. Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* leaves. **Phytother Res.** 2015;12:1887-93. ISSN: 1099-1573. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)].
34. Silva GC, Braga FC, Lima MP, Pesquero JL, Lemos VS, Cortes SF. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **J Ethnopharmacol.** 2011;137:709-13. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
35. Pereira AC, Pereira AB, Moreira CC, Botion LM, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **J Ethnopharmacol.** 2015;161: 30-5. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
36. Santos UP, Campos JF, Torquato HFV, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, Souza KP, Santos EL. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. **PLoS One.** 2016 Dec;11(12): e0167531. ISSN: 1549-1277. [[CrossRef](#)].
37. Climate-data.org. 2017. *Dados climáticos para cidades mundiais*. Retrieved January 19. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 25 mai. 2018.
38. Donagema GK, Campos DVB, Calderano SB, Teixeira WG, Viana JHM. **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. [[Link](#)].
39. Oliveira RJ, Silva JEC, Chagas DB. Seasonal variation of chlorophyll and carotenoids in leaves of *Hancornia speciosa* in three central areas of the Cerrado of the state of Tocantins, Brazil. **J Agric Sci.** 2018;10(3):344-52. ISSN: 1916-9752. [[CrossRef](#)].
40. INMET - Instituto Nacional de Meteorologia, Bdmep - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. 2017. Disponível em: [[Link](#)]. Acesso em: 25 mai. 2018.
41. Grisi AB, Gualtieri SCJ, Ranal MA, Santana DG. Efeito alelopático do fruto de *Sapindus saponaria* na germinação e na morfologia de plântulas daninhas e de hortaliças. **Planta Daninha.** 2011; 29(2):311-22. ISSN: 1806-9681. [[CrossRef](#)].
42. Ferreira AG, Aquila MEA. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Rev Bras Fisiol Veg** 2000; 12:175-204. ISSN: 1806-9355. [[Link](#)].
43. Alves MCS, Filho SM, Innecco R, Torres SB. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesq Agropec Bras.** 2004; 39(11):1083-6. ISSN: 1678-3921. [[CrossRef](#)].
44. Ferreira AG, Borguetti F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 323 p. [[Link](#)].
45. Ranal MA, Santana DG, Ferreira WR, Mendes RC. Calculating germination measurements and organizing spread sheets. **Rev Bras Bot.** 2009; 32:849-55. ISSN: 1806-9959. [[CrossRef](#)].
46. Ranal MA, Santana DG. How and why to measure the germination process? **Rev Bras Bot.** 2006 Mar; 29:1-11. ISSN: 1806-9959. [[CrossRef](#)].

47. Pimentel GF. **Curso de estatística experimental**. 15ª ed. Piracicaba: ESALQ; 2009.
48. Inderjit, Dakshini KMM, Foy CL. **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. New York: CRC Press; 1999.
49. Carmo FMS, Borges LEE, Takaki M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Bot Bras** 2007;21(3):697-705. ISSN: 0102-3306. [[CrossRef](#)].
50. Sartor LR, Adami PF, Chini N, Martin TN, Marchesel JA, Soares AB. Alelopatia de acículas de *Pinus taeda* na germinação e no desenvolvimento de plântulas de *Avena strigosa*. **Ciênc Rural**. 2009; 39(6):1653-9. ISSN: 0103-8478. [[CrossRef](#)]
51. Rizvi SJH, Rizvi V. **Allelopathy: basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall; 1992. [[CrossRef](#)].
52. Magiero EC, Assmann JM, Marchese JA, Capelin D, Paladini MV, Trezzi MM. Efeito alelopático de *Artemisia annua* L. na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e leiteiro (*Euphorbia heterophylla* L.). **Rev Bras Plan Med**. 2009; 11(3):317-24. ISSN: 1516-0572. [[CrossRef](#)].
53. Maraschin-Silva F, Áquila MEA. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Rev Árvore**. 2006;30:547–55. ISSN: 0100-6762. [[CrossRef](#)].
54. Silveira BD, Hosokawa RT, Nogueira AC, Weber VP. Atividade alelopática de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Ci FI**. 2014 Mar;24(1):79-85. ISSN: 0103-9954 [[CrossRef](#)].
55. Gatti AB, Takao LK, Pereira VC, Ferreira AG, Lima MIS, Gualtieri SCJ. Seasonality effect on the allelopathy of cerrado species. **Braz J Biol**. 2014;74(3):64-9. ISSN: 1519-6984. [[CrossRef](#)].
56. Gross EM. Allelopathy of aquatic autotrophs. **CRC Crit Rev Plant Sci**. 2003;22(3):313-39. ISSN: 0735-2689. [[CrossRef](#)].
57. Oliveira PS, Marquis RJ. **The cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna**. Irvington: Columbia University Press. 2002. [[Link](#)].
58. Haridasan M. Nutrient cycling as a function of landscape and biotic characteristics in the cerrado of central Brazil. In: McClain ME, Victoria RL, Richey JE. **Biogeochemistry of the Amazon basin and its role in a changing world**. Oxford University Press; 2001. p.68-83. [[Link](#)].
59. Einhellig FA. An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: Inderjit I, Dakshini KMM, Foy CL (Ed.). **Principles and practices in plant ecology: allelochemical interactions**. Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 479-94. [[Link](#)].
60. Oliveira SCC, Gualtieri SCJ, Dominguez FAM, Molinillo JMG, Montoya RV. Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. **Acta Bot Bras** 2012 Mai;26(3):607-18. ISSN: 0102-3306. [[CrossRef](#)].

61. Jefferson LV, Pennachio M. Allelopathic effects of foliage extracts from four Chenopodiaceae species on seed germination. **J Arid Environ.** 2005 Oct;55:275-85. ISSN: 0140-1963. [[CrossRef](#)].
62. Borella J, Wandscheer DAC, Bonatti LC, Pastorini LH. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **R Bras Bioci.** 2009;7(3):260-5. INSS: 1980-4849. [[Link](#)].
63. Taiz L, Zeiger E. **Fisiologia vegetal.** 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2009. [[Link](#)].
64. Reigosa M, Gomes AS, Ferreira AG, Borghetti F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Bot Bras.** 2013; 27(4):629-46. ISSN: 0102-3306. [[CrossRef](#)].
65. Inderjit, Weston LA. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses? **J Chem Ecol.** 2000; 26(9):2111-8. ISSN: 1573-1561. [[CrossRef](#)].

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 10/01/2018 | Aceite: 26/06/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Uhlmann LAC, Oliveira RJ, Santos MG. Efeitos alelopáticos de extratos vegetais de *Hancornia speciosa* Gomes na germinação de *Lactuca sativa* L. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2018; 12(2): 147-160. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/596>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açazeiro

Isolation and antimicrobial activity evaluation of endophytic fungi of açazeiro

DOI 10.5935/2446-4775.20180015

Batista, Bárbara Nunes^{1*}; Raposo, Nádia Verçosa de Medeiros²; Silva, Ingrid Reis da³.

¹Universidade do estado do Amazonas. Escola Superior de Tecnologia, Av. Darcy Vargas, s/nº, Chapada. CEP: 69050-020, Manaus, AM, Brasil.

²Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior da Ciências da Saúde. Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, CEP: 69065-001, Manaus, AM, Brasil.

³Centro de Biotecnologia da Amazônia, Av. Governador Danilo Areosa, Distrito Industrial I, 69075-351, Manaus, AM, Brasil.

*Correspondência: barbara_sing@hotmail.com

Resumo

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior vegetal e são potenciais fontes de compostos, com capacidade de aplicação na indústria, agricultura e medicina, além de atuarem em simbiose com seus hospedeiros. Assim, o presente estudo teve como objetivo isolar fungos endofíticos de açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart) e avaliar seu potencial quanto à produção de substâncias antimicrobianas com técnica de difusão em disco, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klensiella pneumoniae* ATCC 700603. Para isso, foram coletadas amostras de folhas, caules e raízes de açazeiro para o isolamento dos fungos. Cinquenta fungos foram isolados, sendo possível identificar seis gêneros distintos: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* e *Aspergillus* sp. Dois fungos isolados (C₄ e R₁₃) apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*. Assim, os dados indicaram espécies produtoras de substâncias bioativas com forte potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. *Euterpe precatoria* Mart. Fungos endofíticos.

Abstract

The endophytic fungi are microorganisms that inhabit the plant interior and are potential sources of compounds, being able to be apply in industry, agriculture and medicine, besides acting in symbiosis with their hosts. Therefore, the present study aims to isolate endophytic fungi from açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart) and to evaluate the potential for the production of antimicrobial substances by disc diffusion technique against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klensiella pneumoniae* ATCC 700603. For this,

samples of leaves, stalk and roots of açazeiro were collected for the isolation of fungi. Fifty fungi were isolated, and it was possible to identify six different genus: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* and *Aspergillus* sp. Two fungi isolated (C4 and R13) presented antimicrobial activity against *S. aureus*. Thus, the data indicated species that produce bioactive substances of strong antimicrobial potential.

Keywords: Antimicrobial activity. *Euterpe precatoria* Mart.. Endophytic fungi.

Introdução

Popularmente conhecida como açai do Amazonas, açai-solitário ou Juçara, a *Euterpe precatoria* Mart. (Arecaceae) apresenta característica de estipe único, além de fornecer matéria prima para a construção de casas, confecção de biojoias e produção de alimentos⁽¹⁻²⁾.

As raízes do açazeiro são utilizadas no tratamento de doenças hepáticas e dores musculares, sendo potencial produtora de compostos de interesse biotecnológico como os antibióticos, uma característica que pode ter sido herdada pelos microrganismos que as habitam ^(3,4,5).

Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior das plantas sem causar danos ao hospedeiro, sendo as raízes sua principal porta de entrada ^(5,6). Relacionados a interação simbiótica, induzem proteção e desenvolvimento morfológico do hospedeiro, ambas estimuladas pela síntese de metabólitos como enzimas líticas pectinases, celulases e lipases, além de antimicrobianos, como os compostos sordaricina e coronamicina isolados de gênero *Xylaria* e *Streptomyces*, que apresentam atividade antifúngica contra *Candida albicans* e fungos pitiáceos, respectivamente^(7,8,9).

O mercado de novos compostos de atividade antimicrobiana a partir de endofíticos no Brasil é promissor, principalmente na Amazônia, onde existe grande diversidade de plantas e microrganismos ainda não estudados, o que inspira a pesquisa por novas substâncias antimicrobianas produtoras ⁽⁷⁾.

Neste sentido, dada a relevância do tema, este estudo teve como objetivo isolar e avaliar fungos endofíticos de açazeiro, quanto à produção de antibióticos frente a microrganismos patogênicos, a fim de ampliar o conhecimento a respeito dos fungos endofíticos presentes no açazeiro e possível potencial antimicrobiano.

Materiais e Métodos

Coleta e isolamento dos fungos do açazeiro

Mudas de *Euterpe precatoria* Mart., identificadas pelo doutor Valdely Ferreira Kinupp, do Instituto Federal do Amazonas – IFAM (número de depósito 16782 no herbário do IFAM), foram coletadas dos viveiros localizados na Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA) e CBA (Centro de Biotecnologia da Amazônia), enquanto as sementes foram fornecidas pela fábrica Waku Sese Amazônia, sendo posteriormente lavadas, com detergente neutro e água corrente, e submetidas ao processo de desinfecção superficial.

Pequenos fragmentos de folhas, caules, raízes e embriões de sementes foram desinfetados superficialmente com álcool 70% (durante 1 minuto) e hipoclorito de sódio a 2% (durante 3 minutos),

seguido de imersão durante 30 segundos em álcool 70%, e lavagem em água destilada esterilizada. Um ml da água de lavagem foi inoculada em placa como controle negativo ⁽¹⁰⁾.

Após a desinfecção superficial, os fragmentos foram inoculados em placas de petri (5 fragmentos em cada placa) contendo o meio Ágar Batata Dextrose (BDA) acrescido de ampicilina (50 mg/mL). As placas foram incubadas em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand ou Demanda Bioquímica de Oxigênio) sob temperatura de 28°C durante uma semana. Diariamente as placas foram analisadas quanto ao início do crescimento das colônias fúngicas e, ao observar o surgimento de colônias, estas foram cultivadas em placas com meio BDA e incubadas em B.O.D nas mesmas condições descritas anteriormente.

A frequência dos microrganismos foi determinada relacionando o número de fragmentos com o número do total de fragmentos multiplicado por 100 ⁽¹⁰⁾.

Preservação dos isolados

Após a purificação, os fungos foram armazenados em triplicata utilizando duas metodologias: método de Castellani e Óleo Mineral ⁽¹¹⁾. O método de Castellani consistiu na fragmentação em cubos de 1 cm³ da cultura fúngica em placa e adição de 10 cubos em frascos com água destilada esterilizada. No método com óleo mineral, o fungo foi cultivado, de forma estéril, em frascos com meio BDA – Batata Dextrose Agar com aplicação de uma camada de óleo mineral sobre a cultura do microrganismo. Em ambos os casos, os frascos puderam ser mantidos em temperatura ambiente.

Caracterização Macromorfológica e Micromorfológica de Fungos endofíticos

Após o crescimento nas placas, as colônias fúngicas foram caracterizadas e catalogadas através da macromorfologia, observação de características como superfície, cor do micélio e do verso da colônia, textura, pigmentação e estrutura da borda.

A micromorfologia foi analisada através do uso de placas de petri esterilizadas com duas lâminas cruzadas e um chumaço de algodão em seu interior, sendo em seguida adicionado meio BDA cortado em quadrados de 3 cm³ com bisturi em cada placa. Duas pequenas porções de micélio foram cultivadas equidistantes entre si sobre o meio BDA e uma lamínula foi posta sobre cada bloco de meio. O processo foi realizado em triplicata.

As placas foram incubadas em B.O.D. a 28°C e a cada 24 horas as lâminas foram observadas em lâmina de microscopia com uma gota azul de lactofenol e observadas na objetiva de 40X (aumento total de 400X), procurando identificar estruturas de reprodução sexuais e assexuais dos fungos. Os fungos que permaneceram em sua forma miceliana, não puderam ser identificados.

Inóculo das bactérias indicadoras

Foram utilizadas bactérias como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klensilla pneumoniae* ATCC 700603, cultivadas em caldo nutritivo *lysogeny broth* (LB) durante 16 horas, diluído com solução salina 0,9% padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1% + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1%), para 10⁸ UFC/mL.

Preparo do pré-inóculo

Foi feita a adição de pedaços de meio com isolados em frascos com 20 mL de meio BD líquido (batata dextrose) e incubado em shaker (INNOVA™ 4335) durante 14 dias a 28°C, 120 rpm. Deste cultivo foi feita a coleta de 1 mL do metabólito em microtubos, que foi centrifugado (Eppendorf 5417R) a 10000 rpm, 4°C. O sobrenadante, contendo os metabólitos de interesse, foi utilizado nos testes de atividade antimicrobiana (10).

Seleção de fungos endofíticos com potencial antimicrobiano

Na avaliação de potencial antimicrobiano foi utilizada a técnica de difusão em ágar, onde as bactérias indicadoras foram semeadas em placa de petri contendo meio LBA – lysogeny broth agar. Em seguida foram feitas perfurações no meio, seguidas da adição de 100 µl do extrato fúngico em cada poço. As placas foram incubadas a 35°C por 16h e então feita a medição do halo de inibição.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo composto de 5 tratamentos, sendo 3 repetições cada. Os resultados foram submetidos à análise de variância em programa Minitab® 17.3.1 (Copyright© 2003-2006 by Minitab Inc., USA), sendo submetidos ao teste de Tukey para as médias de índice, ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

Nenhuma das estruturas sofreu oxidação quanto aos tempos de imersão em álcool ou hipoclorito, porém observou-se um baixo número de fungos.

Isolamento de Fungos endofíticos

Foram isolados 50 fungos endofíticos das mudas de *E. precatoria* (tanto das amostras da UEA – Universidade do Estado do Amazonas quanto CBA – Centro de Biotecnologia da Amazônia) a partir de 150 fragmentos (50 fragmentos de folhas, 50 de raízes e 50 fragmentos de caule), porém, não foram isolados fungos de nenhum dos 50 embriões inoculados (TABELA 1). Foi observado que o número de fungos isolados de caule era maior (44%) em comparação aos de outras estruturas (30% dos fungos isolados de folhas e 26% isolados de raízes).

TABELA 1. Isolamento de Fungos endofíticos dos respectivos locais.

Local Coleta	Estrutura isolada (Código)	Mês	Localização	Número de isolados
Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA)	Caule (C ₁₁ a C ₂₆)	Setembro	3°08'17,7"S 59°59'02,1"W	16
	Folha (F ₁₁ a F ₁₆)			6
Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA)	Caule (C ₁ a C ₆)		6	
	Folha (F ₁ a F ₉)		9	
	Raiz (R ₁ a R ₁₃)		13	

Caracterização Macromorfológica e Micromorfológica de Fungos endofíticos

Na caracterização macromorfológica foi observado predominância da característica de coloração de micélio aéreo verde escuro e textura granulosa, seguido de isolados de coloração micelial aérea cinza e textura aveludada (**TABELA 2**). 16% dos isolados apresentaram estruturas reprodutivas que permitiram a caracterização micromorfológica e o agrupamento em seis gêneros: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* e *Aspergillus* sp.

TABELA 2. Características macromorfológicas dos isolados de açaizeiro.

Amostra	Coloração do micélio aéreo	Produção de pigmentos	Coloração micelial reversa	Textura colonia	Borda
F1	Cinza	Não	Preta	Algodonosa	Regular
F2	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F3	Marrom	Não	Creme	Pulverulenta	Regular
F4	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Regular
F5	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F6	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Regular
F7	Cinza	Não	Preta	Granulosa	Regular
F8	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Irregular
F9	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Irregular
F11	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F12	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F13	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
F14	Branco	Não	Creme	Cotonosa	Regular
F15	Branco	Não	Creme	Cotonosa	Irregular
F16	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Irregular
R1	Creme	Não	Creme	Membranosa	Regular
R2	Cinza	Não	Preta	Cotonosa	Regular
R3	Cinza	Não	Preta	Aveludada	Regular
R4	Branco	Não	Preto	Algodonosa	Irregular
R5	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R6	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R7	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R8	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R9	Marrom	Não	Preto	Aveludada	Regular

R10	Marrom	Não	Preto	Cotonosa	Regular
R11	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R12	Cinza	Não	Preto	Aveludada	Regular
R13	Verde escuro	Não	Creme	Pulverulenta	Irregular
C1	Branco	Não	Preta	Algodonosa	Regular
C2	Branco	Não	Branca	Algodonosa	Regular
C3	Branco	Não	Cinza	Membranosa	Irregular
C4	Branco	Não	Creme	Algodonosa	Regular
C5	Branco	Não	Creme	Membranosa	Regular
C6	Branco	Não	Creme	Cotonosa	Regular
C11	Branco	Não	Marrom	Algodonosa	Regular
C12	Branco	Não	Preta	Algodonosa	Regular
C13	Branco	Não	Preta	Algodonosa	Regular
C14	Branco	Não	Creme	Algodonosa	Irregular
C15	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C17	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C18	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C19	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C20	Branco	Não	Branco	Aveludada	Irregular
C21	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C22	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C23	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C24	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C25	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular
C26	Verde escuro	Não	Preta	Granulosa	Irregular

Isolado C₁

Característico do gênero *Colletotrichum*. O isolado apresentou na análise micromorfológica hifas hialinas septadas, conídios simples e grandes, além de apressórios (**FIGURA 1A**). Enquanto na análise macromorfológica, apresentou textura algodonosa, borda regular, coloração branca a cinza do micélio aéreo, sem produção de pigmentos e coloração preta micelial reversa (**FIGURA 1B**).

FIGURA 1. Micromorfologia - Apressórios (A) e Macromorfologia (B) do isolado C₁.**Isolado C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₂₂, C₂₃, C₂₅, C₂₆, F₂, F₈, F₁₁ e R₉.**

Característicos do gênero *Guignardia*, as amostras listadas apresentam na análise micromorfológica hifas septadas hialinas e apressórios (**FIGURA 2A**). Já na análise macromorfológica, apresentaram textura granulosa, borda irregular, coloração dos micélios aéreos verde escuro, sem produção de pigmentos e coloração micelial reversa preta (**FIGURA 2B**).

FIGURA 2. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra F₁₁.**Isolado F₃**

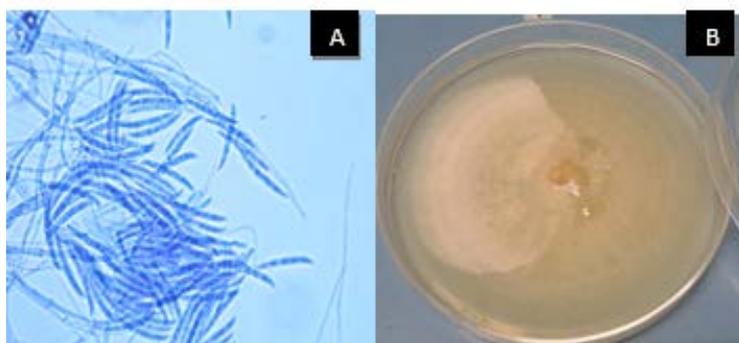
Característico do gênero *Penicillium*, o isolado F₃ apresentou na análise micromorfológica (**FIGURA 3A**) hifas hialinas e septadas, conidióforo isolado ramificado perto do vértice, terminando num grupo de fiáides e conídios hialinos globosos ou ovóides formando cadeias, os quais não foram ilustrados. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 3B**) observou-se textura pulverulenta, borda regular, coloração do micélio aéreo marrom, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 3. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra F₃.

Isolado R₁

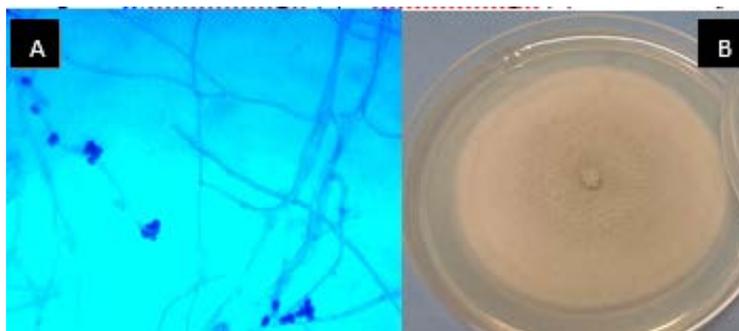
Característico do gênero *Fusarium*, o isolado apresentou na análise micromorfológica (**FIGURA 4A**) hifas septadas hialinas, macroconídios hialinos ligeiramente curvados na extremidade pontiaguda, geralmente em forma de canoa. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 4B**) apresentou micélio cotonoso, borda regular, coloração do micélio aéreo creme, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 4. Micromorfologia– Macroconídios(A) e Macromorfologia (B) da amostra R₁.

**Isolado R₂**

Característico do gênero *Ulocladium*, o isolado apresentou na análise micromorfológica (**FIGURA 5A**) hifas septadas, conidióforos simples ou ramificado, conídios escuros do marrom ao preto, liso ou áspero, e oval, com septos transversais e longitudinais. Enquanto que na análise macromorfológica (**FIGURA 5B**) apresentou textura cotonosa, borda regular, coloração do micélio aéreo cinza, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa preta.

FIGURA 5. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra R₂.

**Isolado R₁₃**

Característico do gênero *Aspergillus*, o isolado R₁₃ apresentou na análise micromorfológica hifas hialinas e septadas, conidióforo vertical simples, terminando em uma globosa e fiálide, além de conídios hialinos globosos ou ovoides em cadeias. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 6B**) apresentou, borda regular, textura pulverulenta, coloração do micélio aéreo verde escuro, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 6. Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra R₁₃.**Isolado C₄**

De gênero não classificado, o isolado C₄ apresentou na análise micromorfológica hifas hialinas septadas, conídios grandes e elípticos, com septos transversais ou longitudinais. Enquanto na análise macromorfológica (**FIGURA 7B**) apresentou textura algodoadosa, borda irregular, coloração do micélio aéreo branco, sem produção de pigmentos, coloração micelial reversa creme.

FIGURA 7: Micromorfologia (A) e Macromorfologia (B) da amostra C₄.**Avaliação dos isolados com atividade antimicrobiana**

Dos extratos fúngicos obtidos a partir dos 50 isolados, observou-se atividade antagonista de 4% dos isolados endofíticos (C₄ e R₁₃) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (**TABELA 3**).

TABELA 3: Atividade antagonista de 4% dos isolados endofíticos (C₄ e R₁₃).

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Klensilla pneumoniae</i> ATCC 700603
F1 c	-	-	-	-	-
F2 c	-	-	-	-	-
F3 c	-	-	-	-	-
F4 c	-	-	-	-	-
F5 c	-	-	-	-	-
F6 c	-	-	-	-	-
F7 c	-	-	-	-	-
F8 c	-	-	-	-	-
F9 c	-	-	-	-	-
F11 c	-	-	-	-	-

F12 c	-	-	-	-	-
F13 c	-	-	-	-	-
F14 c	-	-	-	-	-
F15 c	-	-	-	-	-
F16 c	-	-	-	-	-
R1 c	-	-	-	-	-
R2 c	-	-	-	-	-
R3 c	-	-	-	-	-
R4 c	-	-	-	-	-
R5 c	-	-	-	-	-
R6 c	-	-	-	-	-
R7 c	-	-	-	-	-
R8 c	-	-	-	-	-
R9 c	-	-	-	-	-
R10 c	-	-	-	-	-
R11 c	-	-	-	-	-
R12 c	-	-	-	-	-
R13 a	+++	-	-	-	-
C1 c	-	-	-	-	-
C2 c	-	-	-	-	-
C3 c	-	-	-	-	-
C4 b	++	-	-	-	-
C5 c	-	-	-	-	-
C6 c	-	-	-	-	-
C11 c	-	-	-	-	-
C12 c	-	-	-	-	-
C13 c	-	-	-	-	-
C14 c	-	-	-	-	-
C15 c	-	-	-	-	-
C17 c	-	-	-	-	-
C18 c	-	-	-	-	-
C19 c	-	-	-	-	-
C20 c	-	-	-	-	-
C21 c	-	-	-	-	-
C22 c	-	-	-	-	-
C23 c	-	-	-	-	-
C24 c	-	-	-	-	-
C25 c	-	-	-	-	-
C26 c	-	-	-	-	-

A atividade antimicrobiana foi classificada de acordo com o tamanho do halo de inibição: Inerte: (-) ausência de halo de inibição; Baixa: (+) diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm; Moderada: (++) diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm; Alta: (+++) diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm. Análise de variância ($\alpha=0,05$).

Apresentando frequência de isolamento de 33%, observou-se um baixo número de fungos no presente estudo. O resultado difere do descrito na literatura ⁽¹²⁾, isolando-se 59 fungos endofíticos de *Strychnos cogens*, planta medicinal amazônica, tendo frequência de isolados de folhas (66,6%) seguido de fungos isolados de raízes (15%), superior ao obtido no presente trabalho com fungos isolados de *Euterpe precatoria* Mart. Tais resultados demonstram variedade de planta para planta quanto ao número de fungos obtidos, espécie do hospedeiro e região de coleta do vegetal.

Além disso, o fato de não haver isolados dos embriões pode estar relacionado a menor possibilidade de contaminação, já que o embrião não tem contato direto com o ambiente externo até a germinação ⁽⁶⁾, indicando, também, sucesso na metodologia de desinfecção.

De acordo com as características macro e micromorfológicas foi possível classificar 32% dos isolados em seis gêneros distintos *Colletotrichum* sp. (2%), *Guignardia* sp. (22%), *Penicillium* sp. (2%), *Ulocladium* sp. (2%), *Aspergillus* sp. (2%) e *Fusarium* sp. (2%), enquanto o restante não apresentou esporulação ou estruturas que permitiam sua diferenciação, sendo um problema comum na micromorfologia de fungos endofíticos ⁽¹³⁾. O Gênero *Colletotrichum* sp. é descrito como colonizador de plantas como laranja, banana e feijão, além de ser um gênero predominante em isolamento assim como o gênero *Xylaria* sp., gênero frequente de palmeiras, enquanto no presente estudo não foi constatada a presença deste gênero, tornando possível o resultado das condições utilizadas no isolamento que podem não ter sido favorecido ^(14,15,16,17).

Assim como o gênero *Colletotrichum* sp., o gênero *Guignardia* sp. é frequentemente isolado de plantas, e conhecido por possuir espécies fitopatogênicas como a *Guignardia citricarpa*, que provoca doenças como a mancha preta de citrus em laranjeiras e limoeiros ⁽¹³⁾. No presente estudo, trabalhou-se com o gênero de maior frequência dentre os fungos isolados de caule, embora as mudas de açaizeiro não tenham apresentado os sintomas da mancha preta. Tal fato pode indicar a possibilidade da presença de espécie não patogênica, mas pertencente ao gênero, considerado um endófito.

A quantidade de isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, obtida no presente estudo com açaizeiros, foram semelhantes aos obtidos ⁽¹⁸⁾, uma vez que os fungos endofíticos de *Annona* spp. foram isolados, obtendo-se a presença de 3,45% de *Aspergillus* e 6,9% de isolados pertencentes ao gênero *Penicillium*. Porém, o nível de isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* foi de 31,03%, acima do obtido no presente estudo, além das mudas de açaizeiro não terem apresentado sintomas da fusariose, doença característica do gênero em trigo e bananeira, o que pode indicar que o gênero não é patógeno para a espécie vegetal do presente estudo ⁽¹⁹⁾.

Apesar da quantidade reduzida, os isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são passivos de testes de indução metabólica como antibióticos e enzimas, pois são gêneros descritos como vantajosos na aplicação biotecnológica na síntese de penicilina com o *Penicillium notatum* e na aplicação da produção de queijos com *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* ⁽²⁰⁾.

Referente ao gênero *Ulocladium* sp., assim como no presente estudo, os resultados descritos foram semelhantes quanto a baixa quantidade de isolados do gênero a partir da planta medicinal *Hyoscyamus muticus* L ⁽²¹⁾ e, constatou-se que o gênero é endofítico ao realizarem o replantio da espécie, de modo asséptico, com o gênero. Assim, o gênero é passivo de testes quanto à síntese de metabólitos que influenciam no crescimento do hospedeiro, de forma simbiótica.

Nos ensaios de potencial antimicrobiano, apenas os endófitos R₁₃ e C₄, sendo o primeiro pertencente ao gênero *Aspergillus* enquanto o segundo não possui gênero identificado. Apesar da baixa frequência de isolados com bioatividade, as atividades foram consideradas de alta intensidade, com halo de inibição de 20 e 14 mm, respectivamente, frente a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com resultado interessante, pelo fato desta bactéria ser o patógeno causador do maior número de infecções hospitalares ⁽²²⁾.

Conclusão

O resultado contrastou com o descrito por Maria e colaboradores (2005) ⁽²³⁾, que testou endófitos do gênero *Aspergillus* sp. e constatou a inibição do crescimento de *Pseudomas aeruginosa* (11.1 ± 0.3 mm), *Enterococcus* sp. (11 ± 0.1 mm), *Salmonella typhi* (14.4 ± 0.9 mm), *Staphylococcus aureus* (11.3 ± 0.3 mm) e *Candida albicans* (12.3 ± 1.5 mm), enquanto no presente trabalho houve inibição apenas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pelos isolados R₁₃ e C₄. Porém, tal fato contribui para a continuação do estudo com estes isolados por apresentarem os maiores graus de inibição, permitindo estudos futuros que envolvam caracterização dos extratos, como também testes em outras condições com o restante dos isolados já que gêneros como *Penicillium* sp., apresentam espécies produtoras de antibióticos ⁽⁸⁾, como também a identificação de tais microrganismos de interesse a nível molecular contribuiria com o conhecimento dos endófitos presentes no açaizeiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e à Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA) pelo material e espaço concedido à pesquisa.

Referências

1. Gama MMB, Ribeiro GD, Fernandes CF, Medeiros IM. Açai (*Euterpe* spp.): características, formação de mudas e plantio para a produção de frutos. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2005. 6p. Embrapa Rondônia. **Circular Técnica**, 80. [\[Link\]](#).
2. Yuyama LKO, Aguiar JPL, Filho DFS, Yuyama K, Varejão MJ, Fávoro DIT, Vasconcellos MBA, Pimentel SA, Caruso MSF. Caracterização físico-química do suco de açai de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amaz.** Manaus. 2011; 41(4):545-552. ISSN: 0044-5967. [\[CrossRef\]](#).
3. Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. *In vitro* immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolívia. **Phytomedicine.** 2004; 11:516-522. ISSN: 1618-095X. [\[CrossRef\]](#).
4. Smith N. **Palms and people in the Amazon.** 1th ed. Florida: Springer International Publishing. 2015. 500 p. ISBN: 978-3-319-35718-8.
5. Pamphile JA, Costa AT, Rosseto P, Polonio JC, Pereira JO, Azevedo JL. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **Rev UNINGÁ.** 2017; 53(1):113-119. ISSN: 2318-0579. [\[Link\]](#).
6. Azevedo JL. **Microrganismos endofíticos.** In Ecologia microbiana (I.S. Melo & J.L. Azevedo, coords.). Editora Embrapa, CNPMA, Jaguariuna. 1998; p.117-137.
7. Neto PASP, Azevedo JL, Araújo WL. Microrganismos Endofíticos. **Biotec Ciên Desenv.** 2002; 29:62-77.

8. Orlandelli RC, Specian V, Felber AC, Pamphile JA. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev S Biol.** 2012; 7(3):97-109. ISSN:1980-0002. [\[Link\]](#).
9. Specian V, Orlandelli RC, Felber AC, Azevedo JL, Pamphile JA. Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest. Unopar Científica. **Cienc Biol Saude.** 2014; 16(4):345-351.
10. Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Kuklinskysobral J, Lacava PT. **Manual: Isolamento de Microorganismos Endofíticos.** Piracicaba: USP, 2002. 86p.
11. Romeiro RS. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas.** Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. [\[Link\]](#)
12. Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Belém Pinheiro ML, Sarquis IM, Pereira JO. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amaz.** 2004; 34(2):185-195. ISSN: 1809-4392. [\[CrossRef\]](#).
13. Santamaría J, Bayman P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microb Ecol.** 2005; 50:1-8. ISSN: 1432-184X. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
14. Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytol.** 2000; 147:617-630. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).
15. Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold AE. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fung Ecol.** 2010; 3:122-138. ISSN: 1754-5048. [\[CrossRef\]](#).
16. Chapla VM, Biasetto CR, Araujo AR. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Rev Virtual Quim.** 2013; 5(3):421-437. ISSN: 1984-6835. [\[CrossRef\]](#).
17. Gonzaga LL, Costa LE, Santos TT, Araújo EF, Queiroz MV. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **J Appl Microb.** 2014; 118:485–496. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
18. Silva RLO, Luz JS, Silveira EB, Cavalcante UMT. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Bot Bras.** 2006; 20(3):649-655. ISSN: 1677-941X. [\[CrossRef\]](#).
19. Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie, JF. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fung Diver.** 2010; 44:3-13. ISSN: 1560-2745. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).
20. Chavez R, Bull P, Eyzaguirre J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **J Biotech.** 2006; 4:413-433. ISSN: 0168-1656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
21. Abdel-Motaal FF, Nassar MSM, El-Zayat A, El-Sayed MA, Ito S. Antifungal activity of endophytic fungi isolatec from egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). **Pakistan J Bot.** 2010; 42(4):2883-2894. [\[Link\]](#).

22. Conde-Estévez D, Sorli L, Morales-Molina JA, Knobel H, Terradas R, Mateu-de Antonio J, Horcajada JP, Grau S. Differentiating clinical characteristics in bacteremia caused by *Enterococcus faecalis* or *Enterococcus faecium*. **Enferm Infecc Microb Clin**. 2009; 7:37-43. ISSN: 0213-005X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

23. Maria GL, Sridhar KR, Raviraja NS. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **J Agr Tech**. 2005; 1(1): 67-80. [[Link](#)].

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 01/01/2018 | Aceite: 09/05/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Batista BN, Raposo NVM, Silva IR. Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açaizeiro. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2018; 12(2):161-174. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/595>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*

Phytochemical profile and evaluation of antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of *Cecropia pachystachya* leaves

DOI 10.5935/2446-4775.20180016

Costa, Jéssica Caroline Freitas da^{1*}; Hoscheid, Jaqueline¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Toledo, Curso de Farmácia, Avenida da União, n° 500, Vila Becker, CEP: 85902-532, Toledo, PR, Brasil.

*Correspondência: jessica8.freitas@gmail.com; jaqueline.hoscheid@gmail.com

Resumo

Cecropia pachystachya conhecida popularmente como embaúba é uma árvore nativa das Américas Central e do Sul, utilizada na medicina popular para tratamento de infecções respiratórias, hiperlipidemias e antidiabética. Apesar de sua utilização, poucos estudos de caracterização e avaliação de suas atividades biológicas e farmacológicas são encontrados. Este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *C. pachystachya* e realizar análise fitoquímica preliminar dos extratos. Folhas secas e trituradas foram utilizadas para o preparo do extrato aquoso por infusão, e etanólico por turbo-extração. A triagem fitoquímica foi realizada por técnicas colorimétricas e precipitação, e a quantificação de compostos fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, demonstrando-se a presença de açúcares redutores, taninos, carboidratos em ambos os extratos, além de alcaloides e flavonoides no extrato aquoso, e saponinas e esteroides no extrato etanólico. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em Ágar por perfusão. O teor das substâncias fenólicas foi de 13,29 e 35,83 mg/mL para os extratos aquoso e etanólico respectivamente. Somente o extrato etanólico demonstrou atividade frente a *Staphylococcus aureus*. A utilização de etanol como solvente extrator potencializou a obtenção de metabólitos fenólicos, permitindo observar a atividade antimicrobiana do extrato frente à *S. aureus*.

Palavras-chave: Embaúba. Plantas medicinais. Atividade antibacteriana. *Staphylococcus aureus*. Triagem fitoquímica.

Abstract

Cecropia pachystachya, popularly known as "embaúba", is a tree native to Central and South America, used in folk medicine for treatment of respiratory infections, hyperlipidemia and antidiabetic. Despite its use, few studies of characterization and evaluation on its biological and pharmacological activities are available. Thus,

the present work aimed to evaluate the antimicrobial activity of the aqueous and ethanolic extracts obtained from *C. pachystachya* leaves and to carry out preliminary phytochemical analysis of the extracts. Dried and crushed leaves were used for the preparation of the aqueous extract, by infusion, and ethanolic by vortical extraction. Phytochemical screening was performed by colorimetric and precipitation techniques, and the quantification of total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu, demonstrating the presence of reducing sugars, tannins, carbohydrates in both extracts, as well as alkaloids and flavonoids in the aqueous extract, and saponins and steroids in the ethanolic extract. The evaluation of the antimicrobial activity in agar by perfusion. The content of phenolic compounds was 13.29 and 35.83 mg/mL for the aqueous and ethanolic extracts, respectively. Only the ethanolic extract showed activity against *Staphylococcus aureus* by diffusion technique. The use of ethanol as extracting solvent increased the phenolic compounds, allowing to observe the antimicrobial activity of the extract against *S. aureus*.

Keywords: Embaúba. Medicinal plants. Antibacterial activity. *Staphylococcus aureus*. Phytochemical screening.

Introdução

A família Urticaceae apresenta aproximadamente 1200 espécies, distribuídas em cerca de 50 gêneros, dentre eles o gênero *Cecropia*, que compreende cerca de 100 espécies, encontradas na América Tropical. Uma das espécies pertencentes a este gênero é a *Cecropia pachystachya* Trec., conhecida popularmente como embaúva, embaúba, imbaúba, umbaúba, árvore da preguiça, e como toré na região do Cariri-Cearense⁽¹⁾. É uma árvore de rápido crescimento, higrófito, característica de solos úmidos, ocorrendo em matas ciliares, bordas de florestas e clareiras⁽²⁾, utilizada na medicina tradicional para o tratamento de infecções respiratórias⁽³⁾, hiperlipidemias⁽⁴⁾ e antidiabética⁽⁵⁾.

Pesquisas já investigaram e relataram as atividades: ansiolítica, antidepressiva, antioxidante, cardiotônica, sedativa e anti-inflamatória para extratos aquoso e alcoólico de *C. pachystachya*⁽¹⁾. Em estudos com ratos, o extrato metanólico de folhas de *C. pachystachya* apresentou uma significativa atividade hipotensiva⁽⁶⁾, enquanto o extrato hidroalcoólico demonstrou inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis*⁽⁷⁾. Estas atividades farmacológicas podem estar relacionadas aos metabólitos encontrados em *C. pachystachya*⁽⁶⁻⁷⁾.

Estudos anteriores revelaram a presença de flavonoides como isovitexina, orientina, isorientina⁽⁸⁾, catequina, proantocianidinas⁽⁹⁾, alcaloides, cardenólídeos, saponinas, glicosídeos cardiotônicos e taninos em extratos da espécie em questão. As catequinas, procianidinas, flavonoides e ácido clorogênico, podem estar diretamente relacionados com as atividades cardiovascular, respiratória, gastrointestinal e sobre o sistema nervoso central⁽⁷⁾. Sabe-se que plantas que apresentam elevados teores de substâncias fenólicas apresentam diversas propriedades farmacológicas tais como: anti-alérgicas, anti-arteriogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas, antioxidantes, antitumoral e efeitos cardioprotetores e vasodilatadores^(10,11,12). Tal potencial farmacológico incentiva as pesquisas com *C. pachystachya*, uma vez que a investigação da constituição química da espécie é fundamental para a associação entre os compostos bioativos nela presentes e suas respectivas propriedades farmacológicas.

Staphylococcus aureus habita principalmente a mucosa naso-faríngea em humanos e animais, fazendo parte da microbiota normal, porém relacionada a casos de surtos de toxiose⁽¹³⁾. Além disso, *S. aureus* é um dos principais microrganismos que causam infecções cutâneas e doenças invasivas, como endocardite,

pneumonia e osteomielite. Já foram isoladas diversas amostras de *S. aureus* resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos como β -lactama, penicilinas e cefalosporinas⁽¹⁴⁾. Devido ao aumento do desenvolvimento da resistência aos medicamentos, a pesquisa de novos compostos antimicrobianos tem sido o foco de uma série de estudos, dessa forma, diversos extratos de plantas medicinais vêm sendo estudadas por serem consideradas fontes promissoras de compostos bioativos⁽¹⁵⁾.

Tão importante quanto à elucidação do perfil químico e a atividade biológica, é a escolha do método extrativo apropriado. A escolha de um método extrativo deve levar em consideração a seletividade dos componentes de interesse, recuperação do analito, volume do solvente orgânico, toxicidade do solvente, tempo de extração e custo⁽¹⁶⁾. O solvente extrator constitui um fator importante e deve ser avaliado em função da quantidade e dos metabólitos presentes na amostra⁽¹⁷⁾.

Visto que diferentes solventes apresentam seletividade diferenciada, resultados biológicos desiguais podem ser observados para um mesmo material vegetal quando exposto a solventes distintos. Assim, este estudo buscou realizar a análise fitoquímica preliminar e avaliação antimicrobiana dos extratos aquoso e etanólico obtidos de folhas de *C. pachystachya* frente a cepas catalogadas de *S. aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (NEWT 0028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Material e Métodos

Coleta do material vegetal

Folhas de *Cecropia pachystachya* foram coletadas em fase de pré-floração, em agosto de 2016, no município de Toledo – PR, Brasil, situado nas coordenadas geográficas: 24° 43'40 40" S e 53° 46'01 68" W. A identificação botânica da planta foi realizada pelo herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (exsicata nº: 3000).

Preparo dos extratos

As folhas foram secas em estufa de ar circulante a 40°C durante 7 dias, trituradas em moinho de facas até obtenção de um pó fino, e em seguida conservadas em recipiente fechado e ao abrigo da luz.

O extrato aquoso foi preparado por infusão seguida de maceração em água destilada a 100°C (1:10, p/v), que posteriormente foi reservado por 24 horas em recipiente fechado. Passado esse período, o infuso foi filtrado, congelado e liofilizado (LIO TOP, Brasil).

O extrato etanólico foi preparado por turbo de extração (METALÚRGICA SIEMSEN, Brasil), durante 15 minutos, utilizando-se como solvente etanol 96°GL (BIOTEC, Brasil). Posteriormente o extrato foi filtrado e levado em evaporador rotativo (FISATOM, Brasil) a 40°C, a fim de eliminar todo o solvente orgânico presente. O resíduo foi congelado e liofilizado.

Caracterização físico-química e fitoquímica preliminar

A partir dos extratos liofilizados foi realizada a triagem fitoquímica para avaliação da presença de açúcares redutores, alcaloides, antraquinona, carboidratos, esteroides, flavonoides, glicosídeos, saponinas e taninos

pelos métodos de precipitação e coloração⁽¹⁸⁾. O pH foi determinado à 20°C através de um potenciômetro calibrado (GEHAKA, Brasil), e a avaliação do total de extrativos foi realizada pelo método de resíduo seco.

Quantificação de compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu⁽¹⁹⁾, em espectrofotômetro a 750 nm (FEMTO CIRRUS 80, China). A curva de calibração foi realizada em triplicata, para cinco concentrações de ácido gálico em metanol (de 15,625 a 250 µg/mL), obtendo-se a equação da reta $y = 0,0011x + 0,016$, em que "x" representa a concentração de ácido gálico em µg/mL, e "y" a absorbância. A reta apresentou coeficiente de correlação $R^2 = 0,996$.

Posteriormente, cada extrato foi preparado e quantificado. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes a ácido gálico por mililitro de extrato (mg EAG/mL).

Avaliação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada em triplicata, pela técnica de difusão em ágar por perfusão (técnica de poços)⁽²⁰⁾, utilizando suspensões padronizadas, na concentração de 25% de transmitância (absorbância de 580nm), de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (NEWT 0028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), inoculadas à 1% em ágar Mueller Hinton⁽²¹⁾. Após o resfriamento, foram perfurados em cada placa cinco orifícios de 6 mm de diâmetro, impregnados com 20 µL dos extratos aquoso e etanólico, nas concentrações de 100 mg/mL⁽²²⁾, controle negativo (solução salina) e controle positivo (Amoxicilina e Sulfato de Neomicina, 10 mg/mL). As placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica (37±2°C) por 48 horas. Após incubação foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição (mm) com o auxílio de um paquímetro.

Resultados e Discussão

Neste estudo dois extratos foram preparados empregando solventes de diferentes polaridades e, posteriormente, avaliados quanto ao teor de extrativos e de substâncias fenólicas totais, bem como quanto à atividade antimicrobiana, pela técnica de difusão em ágar por perfusão.

Os resultados encontrados permitem observar o diferente potencial extrativo dos solventes etanol e água sobre folhas de *C. pachystachya* (**TABELA 1**). Diversos estudos vêm demonstrando a influência do solvente extrator sobre o teor de metabólitos secundários^(23,24,25).

TABELA 1. Teor de extrativos/sólidos totais, pH e compostos fenólicos totais dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *C. pachystachya*.

Compostos	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico
Teor de extrativos (%)	9,02	9,39
pH	5,0	3,4
Compostos fenólicos totais (mg EAG/mL)	13,29	35,83

A extração de determinadas substâncias também pode ser interferida pelo pH do líquido extrator. Para escolha do solvente ideal deve levar em consideração a sua toxidez, riscos, a disponibilidade e o custo do solvente. O método extrativo e o solvente extrator estão diretamente relacionados ao rendimento do extrato final, e também aos metabólitos extraídos. Dessa forma é preciso levar em consideração o que se deseja extrair, pois muitas substâncias são termossensíveis, enquanto outras podem sofrer modificações estruturais irreversíveis em altas temperaturas⁽²⁶⁾.

O etanol é um solvente capaz de extrair uma grande quantidade de constituintes de interesse, pois além do seu ponto de ebulição (78,3°C) ser favorável a posterior extração do solvente^(7,27), apresenta caráter anfífilico, permitindo a extração tanto de substâncias com características apolares quanto polares⁽²⁶⁾. Esse fato que pode justificar o maior teor de substâncias fenólicas no extrato etanólico.

A água é bastante utilizada como solvente extrator, pois apresenta diversas características interessantes, como a baixa toxidez, além disso, é conhecida por extrair substâncias com potencial atividade antimicrobiana, como os flavonoides⁽²⁸⁾. Além de apresentar vantagens relacionadas a aspectos econômicos e ambientais. Extratos aquosos já demonstraram alta seletividade, comportamento justificado pela polaridade, hidrofobicidade (não interage com substâncias polares) e capacidade de formação de micelas⁽²⁹⁾. Esta seletividade pode explicar o menor teor de extrativos encontrado para o extrato aquoso.

A triagem fitoquímica demonstrou a presença de açúcares redutores, taninos, carboidratos em ambos os extratos, além da presença de flavonoides e alcaloides no extrato aquoso, e, saponinas e esteroides no extrato etanólico (**TABELA 2**).

TABELA 2. Triagem fitoquímica dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *C. pachystachya*.

Compostos	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico
Carboidratos	+	+
Açúcares redutores	+	+
Taninos	+	+
Saponinas	-	+
Glicosídeos	-	-
Flavonoides	+	-
Esteroides	-	+
Antraquinonas	-	-
Alcaloides	+	-

Legenda: Parâmetros utilizados: positivo (+) e negativo (-).

Dentre os metabólitos secundários encontrados neste estudo destaca-se a presença de flavonoides, taninos, alcaloides e saponinas, corroborando com estudos anteriores^(7,9), e com os descritos para espécies pertencentes ao gênero *Cecropia*⁽³⁰⁾.

Embora a atividade farmacológica observada por um determinado extrato seja normalmente resultado do efeito sinérgico e conjugado, alguns metabólitos presentes nos extratos vegetais podem responder

majoritariamente pela atividade biológica⁽³¹⁾. Portanto, é importante destacar suas principais propriedades biológicas e farmacológicas para as classes de metabólitos encontradas neste estudo.

Os flavonoides são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas, agem como antioxidantes na inativação dos radicais livres⁽³²⁾, e destacam-se quanto a capacidade de agir sobre a inflamação e sobre o sistema imunológico, fornecendo um enorme potencial farmacológico⁽³³⁾. Plantas que contêm flavonoides apresentam significativa atividade antimicrobiana⁽³⁴⁾, a qual pode estar associada à sua solubilidade e a atribuição de grupos fenólicos hidroxilo, que apresentam afinidade com proteínas, atuando como inibidores de enzimas bacterianas, assim como intervindo em suas vias de síntese⁽³⁵⁾.

As atividades biológicas dos taninos estão relacionadas, principalmente, com sua propriedade adstringente⁽³⁶⁾. Os taninos demonstram importantes ações antimicrobianas e antifúngicas, além de serem utilizados no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismos, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas renais, problemas estomacais, além de processos infecciosos⁽³⁷⁾. A presença de compostos tânicos em *C. pachystachya* já foi relatada⁽³¹⁾. Estas substâncias são altamente reativos quimicamente, capazes de formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, originando complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas, nas quais se embasam os principais testes de detecção, bem como a atividade antimicrobiana do metabólito⁽³⁸⁾.

Diversos alcaloides são utilizados como venenos e alucinógenos, conhecidos pela sua ação sobre o sistema nervoso central⁽³⁹⁾. A presença de alcaloides pode ser relacionada a uma ampla gama de atividades biológicas investigadas. Muitos alcaloides indólicos agem nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos, por isso são utilizados como hipotensores, simpatolíticos, diuréticos, vasoconstritores periféricos, estimulantes respiratórios, anestésicos, agentes bloqueadores adrenérgicos, espasmogênicos intestinais, sedativos, relaxantes musculares e como antimicrobianos^(37,40).

As saponinas são metabólitos que apresentam propriedades detergentes e surfactantes. No organismo sofrem complexação com sais biliares e colesterol no trato gastrointestinal, impedindo sua completa absorção, além de possuírem ação antifúngica⁽⁴¹⁾, e ação citotóxica atuando contra células tumorais⁽⁴²⁾.

Apesar dos metabólitos encontrados em ambos os extratos apresentarem destacada atividade antimicrobiana, o extrato aquoso não apresentou atividade frente às cepas avaliadas na concentração e condição empregada. Todavia, o extrato etanólico apresentou uma pequena atividade frente à *S. aureus* (TABELA 3).

TABELA 3. Valores das médias dos halos inibitórios (mm) dos extratos frente aos microrganismos testados.

Microrganismo	Extrato Aquoso (100 mg)	Extrato Etanólico (100 mg)	Amoxicilina	Neomicina
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	28	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	7	43	25
<i>Escherichia coli</i>	-	-	29	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	18

As diferenças de atividade entre os extratos podem estar relacionadas às variações qualitativas e quantitativas nos metabólitos secundários presentes nos produtos de extração. No extrato etanólico foi

observada uma concentração superior de substâncias fenólicas totais, além da presença de saponinas que pode justificar a atividade do extrato frente à *S. aureus*.

O método de difusão em ágar pode sofrer influência de algumas variações como: composição do meio de cultura, presença de enzimas, densidade do inoculo, difusibilidade do extrato no meio de cultura, assim é possível que a baixa polaridade dos compostos diminua a velocidade de difusão destes no ágar, gerando um halo de difusão, proporcionalmente, menor em relação a substâncias mais polares⁽⁴³⁾. Assim, apesar da alta concentração de substâncias fenólicas presente nos extratos, outros interferentes podem ter influenciado no potencial antimicrobiano, levando a ausência e a pequena atividade frente às cepas e condições avaliadas.

Além disso, dentre os compostos fenólicos totais, apenas os taninos e flavonoides apresentam significativa atividade antimicrobiana, enquanto que outros metabólitos pertencentes ao grupo dos fenólicos, como as catequinas, fenóis simples e ácidos fenólicos, destacam-se frente à atividade antioxidante, neutralizando a atividade de radicais livre no organismo⁽³¹⁾. Dessa forma, o potencial antimicrobiano poderia ser melhorado através do fracionando dos extratos e isolamento dos metabólitos bioativos⁽²³⁾. Este trabalho encoraja a realização de outras pesquisas para avaliação de diferentes atividades biológicas de extratos e metabólitos secundários de folhas de *C. pachystachya*.

Conclusão

Neste trabalho foi possível demonstrar a grande variabilidade de metabólitos secundários presentes em folhas de *Cecropia pachystachya*. Diferenças quanto ao potencial extrativo dos solventes empregados também foram evidenciadas, fato que influenciou diretamente nos teores de fenólicos totais e na inibição do crescimento microbiano sobre *S. aureus*.

Referências

1. Souza DO, Tintino SR, Figueredo FG, Borges MCM, Braga MFBM, Felipe CFB, et al. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos. **Rev Cubana Plant Med.** 2014; 19 (1):121-132. ISSN: 1028-4796. [\[Link\]](#)
2. Martins ACF. **Diversidade funcional de espécies nativas utilizadas em programa de restauração ambiental.** Uberlândia; 2013. Mestrado [Programa de pós-graduação em biologia vegetal] – Universidade Federal de Uberlândia. [\[Link\]](#)
3. Da Silva MAB, Melo LVL, Ribeiro RV, Souza JPM, Lima JCS, Martins DTO. Ethnobotanical survey of plants used as antihyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. **Rev Bras Farmacogn.** 2010; 20 (4):549-562. ISSN: 0102-695X. [\[CrossRef\]](#)
4. Souza CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Bot Bras.** 2006; 20 (1):135-142. ISSN: 0102-3306. [\[CrossRef\]](#)

5. Rodrigues VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciênc Agrotecnol.** 2001; 25 (1):102-123. ISSN: 1413-7054. [\[Link\]](#)
6. Consolini AE, Migliori GN. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **J Ethnopharmacol.** 2005; 96 (3):417-422. ISSN: 0378-8741. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#)
7. Cruz EDEM, Silva ER, Maquiaveli CDOC, Alves ES, Lucon JFJR, Reis MB, et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry.** 2013; 89:71-7. ISSN: 0031-9422. [\[PubMed\]](#) [\[CrossRef\]](#)
8. Vanegas JB, Costa GM, Ortmann CF, Schenkel EP, Reginatto FH, Ramos FA, Aréolo-Ferro C, Castellanos L. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine.** 2014; 21 (5):670-675. ISSN: 0944-7113. [\[CrossRef\]](#)
9. Costa GM, Ortmann F, Schenkel EP, Reginatto FH. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **J Braz Chem Soc.** 2011; 22 (6):1096-1102. ISSN 0103-5053. [\[CrossRef\]](#)
10. Cupersmid L, Fraga APR, Abreu ES, Pereira IRO. Linhaça: composição química e efeitos biológicos. **e-Scientia.** 2012; 5 (2):33-40. ISSN: 1984-7688. [\[Link\]](#)
11. Pereira RJ, Cardoso MG. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J Biotec Biodivers.** 2012; 3 (4):146-152. ISSN: 2179-4804. [\[Link\]](#)
12. Rockenbach II, Silva GL, Rodrigues E, Kuskoski EM, Fett R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciênc Tecnol Aliment.** 2008; 28 (Supl.):238-244. ISSN: 0101-2061. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#)
13. Millezi AF, Baptista NN, Caixeta DS, Rossoni DF, Cardoso MG, Piccoli RH. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev Bras Plantas Med.** 2013; 15 (3):373-379. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#)
14. Gorwitz RJ, Moran DK, Allister SKM, Mcquillan G, Mcdougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. **J Infect Dis.** 2008; 197 (9):1226-1234. ISSN: 0022-1899. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Höfling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Braz J Microbiol.** 2013; 44 (3):839-848. ISSN: 1517-8382. [\[CrossRef\]](#)
16. Cotta JAO, Rezende MOO, Landgraf MD. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Quím Nova.** 2009; 32 (8):2026-2033. ISSN: 0103-5053. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#)

17. Jardini FA, Mancini JF. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Rev Bras Ciênc Farm.** 2007; 4 (1):137-147. ISSN 1516-9332. [[CrossRef](#)]
18. Goyal AK, Middha SK, Sen A. Evaluation of the DPPH radical scavenging activity, total phenols and antioxidant activities in Indian wild *Bambusa vulgaris* "Vittata" methanolic leaf extract. **J Nat Pharm.** 2010; 1 (1):34-39. ISSN: 2229-5119. [[ResearchGate](#)]
19. Singleton VL, Rossi Jr. JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vitic.** 1965; 16:144-158. ISSN: 0002-9254. [[Link](#)]
20. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Approved Standard M07-A8: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically.** 8th ed. Wayne: CLSI, 2009; 29 (2). ISSN: 2162-2914. [[Link](#)]
21. Trabulsi LR, Alterthum F. **Microbiologia.** 5^a ed. São Paulo: Atheneu, 2008. ISBN: 8573799811.
22. Barratto L, Lang KL, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB, Falkenberg M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Rev Bras Farmacogn.** 2008; 18 (4):577-582. ISSN: 0102-695X. [[CrossRef](#)]
23. Santos ÉS, Hoscheid J, Mata PTG. Antibacterial activity of crude ethanolic and fractionated extracts of *Punica granatum* Linn. fruit peels. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 2015; 36 (2):219-225. ISSN: 1808-4532. [[Link](#)]
24. Waltrich KK, Hoscheid J, Prochnau IS. Antimicrobial activity of crude extracts and fractions of *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe) flowers. **Rev Bras Plantas Med.** 2015; 17 (4):909-914. ISSN: 1516-0572. [[CrossRef](#)]
25. Sobota JF, Pinho MG, Oliveira VB. Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. **Rev Fitos,** 2016; 10 (1):1-93. ISSN: 2446-4775. [[CrossRef](#)]
26. Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD, Miguel OG. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev Bras Plantas Med.** 2016; 18 (1):230-239. ISSN: 1516-0572. [[CrossRef](#)]
27. Simões CMO. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6^a ed. Porto Alegre: UFRGS Ed. 2010. ISBN: 978-85-7025-927-1.
28. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: a review. **Intern Pharm Science.** 2011; 1 (1):98-106. ISSN: 2231-5896. [[Link](#)]
29. Silva FM, Jones JJ. Reações orgânicas em meio aquoso. **Quím Nova,** 2001; 24 (5):646-657. ISSN: 0100-4042. [[CrossRef](#)]

30. Tanae MM, Lima-Landman MT, De Lima TC, Souccar C, Lapa AJ. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**. 2007; 14 (5):309-313. ISSN:0944-7113. [\[CrossRef\]](#)
31. Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, Campos SL, Ribeiro LU, Quirino MS, Chagas Junior AF, Alves A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev Bras Plantas Med**. 2013; 15 (4):692-707. ISSN: 1716-0572. [\[CrossRef\]](#)
32. Marques TS, Pereira DTM, Abreu AS, Souza MAS. Determinação do perfil fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de extrato da espécie *Scleronema micranthum* da família Bombacaceae. **Rev Fitos**. 2016; 10 (4):375-547. ISSN: 2446-4775. [\[CrossRef\]](#)
33. Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev Virtual Quím**. 2009; 1 (3):242-244. ISSN: 1984-6835. [\[Link\]](#)
34. Desoti VC, Maldaner CL, Carletto MS, Heinz AA, Coelho MS, Piaty D, Tiunan TS. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arq Ciênc Saúde UNIPAR**. 2011; 15 (1):3-13. ISSN: 1415-076X. [\[Link\]](#)
35. Alcaraz LE, Blanco SE, Npuig O, Tomás F, Hferretti F. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J Theor Biol**. 2000; 205 (2):231-240. ISSN: 0022-5193. [\[CrossRef\]](#)
36. Duarte JL, Mota LJT, Almeida SSMS. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Ipê Amarelo). **Estação Científica UNIFAP**. 2014; 4 (1):33-43. ISSN: 2179-1902. [\[Link\]](#)
37. Oliveira NT, Almeida SSMS. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Biota Amazôn**. UNIFAP. 2016; 6 (1):20-25. ISSN 2179-5746. [\[Link\]](#)
38. Monteiro JM, Albuquerque UO, Araujo EL. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Quím Nova**. 2005; 28 (5):892-896. ISSN: 0100-4042. [\[CrossRef\]](#)
39. Oliveira VB, Freitas MSM, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira IJC. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Rev Bras Plantas Med**. 2009; 11 (1):92-99. ISSN 1516-0572. [\[CrossRef\]](#)
40. Pereira MM, Jácome RLRP, Alcântra AFC, Alves RB, Raslan DS. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Quím Nova**. 2007; 30 (4):970-983. ISSN: 0100-4042. [\[CrossRef\]](#)
41. Carvalho CA, Matta SLP, Melo FCS, Andrade DCF, Carvalho LM, Nascimento PC, Silva MB, Rosa MB. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus*Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Rev Eletrônica Farm**. 2009; 6 (1):51-57. ISSN: 1808-0804. [\[CrossRef\]](#)
42. Cunha AL, Moura KS, Barbosa JC, Santos AF. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas J**. 2016; 1 (2):175-181. ISSN: 2525-5215. [\[CrossRef\]](#)

43. Virtuoso S, Davet A, Dias JFG, Cunico MM, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd. Fabaceae (Leguminosae) bark. **Rev Bras Farmacogn.** 2005; 15 (2):137-142. ISSN: 0102-695X. [\[CrossRef\]](#)

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 03/11/2017 | Aceite: 18/03/2018 | Publicação: 05/07/2018

Como citar este artigo: Costa JCF, Hoscheid J. Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*. **Revista Fitos.** Rio de Janeiro. 2018; 12(2): 175-185. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/583>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

Revista Fitos, Rio de Janeiro, 2018; 12(1): 8-17 | e-ISSN: 2446-4775 | www.revistafitos.far.fiocruz.br

SANTOS, Regineide Xavier; JÚNIOR OLIVEIRA, Erasmo; MOTA, Emily S.; SILVA, Gabriele M. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de chás na cidade de Vitória da Conquista-Bahia. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, V.12, n.1, p.8-17, 2018

Pág.	Linha	Onde se lê	Leia-se
8	6 do Resumo	<i>Peptadenia macrocarpa</i>	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>
8	5 do Abstract	<i>Peptadenia macrocarpa</i>	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>
9	2 do 5ºparágrafo da Introdução	<i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul
10	7 do 5ºparágrafo da Introdução	<i>Piptadenia macrocarpa</i>	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>
11	2 da Tabela 1 de Resultados e Discussão	<i>Piptadenia macrocarpa</i>	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>
9	3 do 5ºparágrafo da Introdução	<i>Amburana cearenses</i>	<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C.Sm.
10	8 do 5ºparágrafo da Introdução	<i>Amburana cearenses</i>	<i>Amburana cearensis</i>

Observação: As alterações nomenclaturais não dizem respeito a mudança na identificação das espécies, apenas referem-se à substituição de nomes com grafia incorreta e/ou sinonímias observadas no texto. Cabe ressaltar que o uso de sinonímias não altera os resultados apresentados.

Revista Fitos, Rio de Janeiro, 2016; 10(2): 103-114 | e-ISSN: 2446-4775 | www.revistafitos.far.fiocruz.br

VILLAS BÔAS, Glauco de Kruse; GILLON, Chistiane. Contribuição ao debate sobre o papel da inovação em medicamentos a partir da biodiversidade. Revista Fitos, V. 10, n.2, p. 103 – 114, 2016

Pág.	Linhas	Onde se lê	Leia-se
105	8 do item 2.Histórico das RedesFito	Teorias de aprendizagem	Economia da informação, conhecimento e aprendizado
106	1-5 do 2º parágrafo do subitem 2.2. A inovação em medicamentos da biodiversidade.	De acordo com a Convenção da Diversidade Biológica (CDB, 1992) os medicamentos da biodiversidade seriam aqueles que se originam na diversidade genética de espécies e de ecossistemas.	Com base na Convenção da Diversidade Biológica (CDB, 1992) os medicamentos da biodiversidade são então aqueles que se originam da diversidade genética de espécies e ecossistêmicas presentes em uma região.
106	15 do 2º parágrafo do subitem 2.2. A inovação em medicamentos da biodiversidade	estão relacionadas ao nosso metabolismo	...estão relacionadas ao seu metabolismo
107	6 do 5º parágrafo do subitem 2.2. A inovação em medicamentos da biodiversidade	meio ambiental	ambiental
107	6-7 do 8º parágrafo do subitem 2.2. A inovação em medicamentos da biodiversidade	dimensões políticas, econômicas, farmacêuticas, meio ambientes, social e, principalmente em	dimensões política, econômica, farmacêutica, ambiental, social, incluindo

Revista Fitos

e-ISSN: 2446-4775 e ISSN: 1808-9569

Endereço: Av. Comandante Guarany, 447, Jacarepaguá, CEP 22775-903, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Telefone: 21- 3348.5598

E-mail: revistafitos@far.fiocruz.br.

A Revista Fitos publica artigos científicos originais sobre Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) em medicamentos da diversidade vegetal nas seguintes áreas do conhecimento: **Agroecologia, Botânica, Ciências Farmacêuticas** (Farmácia; Farmacotecnia; Análise e Controle de Medicamentos e afins); **Educação e Conhecimento; Etnociências** (Etnobotânica e Etnofarmacologia); **Engenharia de Medicamentos e Produtos Naturais; Farmacologia** (Farmacologia Clínica); **Política e Gestão** (Políticas Públicas; Política e Planejamento Governamental; Crescimento Econômico e Saúde Pública); **Química; Toxicologia** e outras.

São aceitos manuscritos em **português, inglês e espanhol**, nos seguintes formatos: artigo original de pesquisa, artigo de revisão, comunicação breve, monografia de plantas medicinais, perspectiva, resenha e carta.

- **Artigos:** resultado de pesquisa experimental ou conceitual, respeitando fundamentação e metodologia científica, com o máximo de 6.000 palavras. Deverá ser estruturado com itens identificados com subtítulos de introdução, metodologia, resultados e/ou discussão e conclusão.
- **Revisão:** revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes, com o máximo de 8.000 palavras. A submissão de revisões está sujeita somente ao convite ou à consulta prévia pelo editor de área.
- **Comunicação Breve:** relato de resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados como revisão ou na estrutura de artigo, mas de forma sucinta, com o máximo de 1.700 palavras.
- **Perspectivas:** análises de temas conjunturais, de interesse imediato e sobre a importância do tema, em geral a convite da equipe editorial, com o máximo de 2.200 palavras.
- **Monografia de Plantas Medicinais:** visam agrupar, padronizar e sistematizar o conhecimento das características e propriedades das plantas medicinais para orientar registro nos órgãos de regulamentação. Texto contendo no máximo 3.500 palavras.
- **Resenhas:** resenha crítica de livro, dissertações, teses e outros, publicado nos últimos dois anos, com o máximo 1.200 palavras.
- **Cartas:** crítica a artigo publicado em números anteriores da Revista Fitos, com no máximo 700 palavras.

1. Informações gerais do manuscrito

- São publicados manuscritos científicos inéditos e originais e que não estejam em avaliação simultânea em nenhum outro periódico.
- Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro periódico, o manuscrito será desconsiderado.
- Todos os autores deverão preencher o termo de Cessão de Direitos Autorais, que deverá ser inserido no sistema.
- Todo conceito e opiniões expressos nos artigos, bem como a exatidão e a procedência das citações, são de exclusiva responsabilidade dos autores.
- Informar no formulário de submissão, qualquer conflito de interesse que envolva o manuscrito.
- Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado de auxílio à pesquisa.
- Caso não tenha recebido financiamento, os autores devem declarar esta informação.
- Caso o trabalho envolva estudos em humanos ou animais deverão estar acompanhados dos seus respectivos Pareceres do Comitê de Ética de Pesquisa, tanto em Seres Humanos, quanto em Animais.
- Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem, obrigatoriamente, estar acompanhados do número e entidade de registro do ensaio clínico.

2. Formatação do manuscrito

- Redigidos em Word do MS Office doc, docx ou Write do Libre Office.
- Não serão recebidos artigos em formatos fechados para edição como PDF ou similares.
- **Página A4**, margem de **2 cm** em cada um dos **quatro lados**, incluindo **figuras, quadros e tabelas**.
- Letra em fonte **Arial**, tamanho **12**.
- Espaçamento **duplo** entre linhas em todo o artigo, incluindo os resumos e referências.
- Texto **justificado**.
- No manuscrito submetido, não deverão conter os dados de autoria e afiliação, para atender à avaliação às cegas.

3. Estrutura do manuscrito

- Os subtítulos que identificam cada item do manuscrito deverão ser escritos em negrito com a 1ª letra da primeira palavra em maiúscula.
- Não serão aceitas notas de rodapé.
- Siglas devem ser escritas por extenso, quando aparecem a primeira vez, no resumo, no abstract e no restante do manuscrito.

4. Título

- Deverá ser apresentado no idioma do manuscrito (português, inglês ou espanhol) e em inglês.
- Deverá estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o escopo da Revista.
- Deverá ser escrito com o máximo de 120 caracteres, incluindo espaços.
- Somente a 1ª letra da primeira palavra do título deverá ser escrita em maiúscula.
- A versão do título em inglês deverá conter as mesmas características da apresentação do título original.

5. Resumo e abstract

- Só não se aplica a resenhas e cartas.
- Apresentação concisa dos pontos relevantes do trabalho em um único parágrafo, expondo metodologia, resultados e conclusão.
- Deverá conter o máximo 200 palavras.
- Os resumos no idioma original do manuscrito deverão ser inseridos apenas no formulário de submissão.
- Terminada a inserção do resumo no formulário, o responsável pela submissão deverá alterar o idioma do formulário e preencher os campos traduzidos.
- No abstract, evitar traduções literais. Quando não houver domínio do idioma, consultar pessoas qualificadas.

6. Itens em Artigos e Comunicação Breve

- Os manuscritos de artigo e de comunicação breve, em caráter de apresentação de resultado de pesquisa, devem apresentar os itens de Introdução, de Materiais e Métodos, de Resultados e/ou Discussão e de Conclusão.
- A introdução deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Deverá estar claro o referencial teórico adotado no texto. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências às publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas.
- No item Materiais e Métodos, a descrição deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho.
- Os Resultados deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes, deverão ser submetidos a uma análise estatística.
- A Discussão deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Resultados e Discussão poderão ser apresentados num único item.
- A conclusão deverá ser destinada ao desfecho do raciocínio do autor, ressaltando as consequências de seu argumento e as principais contribuições da pesquisa.

7. Figuras/Tabelas

- As figuras, tabelas, quadros e figuras ilustrativas (gráficos, fotografias, desenhos, mapas, estruturas químicas), deverão ser citados no texto, indicados em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, em negrito e entre parênteses, como exemplo (**TABELA 1, FIGURA 1...**).
- As tabelas, quadros e figuras deverão ser inseridas pelos próprios autores nos locais adequados, tão logo após a citação, e não no final do manuscrito.
- As **legendas** deverão ser informadas **acima das tabelas, quadros e figuras**.
- As informações inseridas nas tabelas e quadros deverão ser apresentadas com letra tamanho 10 e espaço simples.
- As tabelas não poderão conter linhas verticais nas laterais.
- Se os dados das tabelas, quadros e figuras não forem originais deverá ser informada a fonte sempre **abaixo**, tamanho 10, espaço simples.
- Os itens que compõem as figuras deverão estar legíveis e em boa resolução gráfica.
- Fotos com pessoas ou marcas identificáveis ou em lugares não públicos deverão ter autorização do uso de imagem.

8. Agradecimentos

- Este item é opcional e deverá vir antes das Referências.

9. Falas de sujeitos

- Deverão estar em itálico, tamanho 10, entre aspas, na sequência do texto. A fala não poderá estar identificada e sim codificada, entre parênteses, sem itálico.

10. Citações

- Todas as citações deverão estar referenciadas no texto.
- Deverão seguir o estilo Vancouver.
- Deverão ser identificadas por números em sequência de citação e entre parênteses.
- Em citações múltiplas, os respectivos números deverão ser separados por vírgula, no caso de mais de duas citações sequenciais.
- No texto, a citação deverá ser inserida no parágrafo entre aspas.
- Com mais de três linhas deverá aparecer em parágrafo independente com recuo de margem de 4 cm à esquerda, fonte 10, espaço 1, com ou sem aspas.

11. Referências estilo Medline e PubMed

- As referências citadas no texto deverão ser listadas ao final do artigo em ordem alfabética e alinhadas à margem esquerda do texto.

- Para instruções, consultar PATRIAS K, WENDLING D (Tech. Ed.). *Citing Medicine. The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers*. 2007. 2nd ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine no link <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>.
- Destacar em negrito: o título de livro, o nome da revista/periódico em artigo e o número em legislação.
- Todas as referências deverão ser apresentadas de modo correto e completo.
- A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).
- No caso de uso de software de gerenciamento de referências bibliográficas (EndNote, Zotero ou outros), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.
- As referências deverão ser acompanhadas de hyperlink. Consultar o próximo item.

12. Processo de Submissão

12.1 – Passo 1. Iniciar Submissão

- **Seção:** o autor deverá selecionar a seção correspondente ao formato de seu artigo.
- **Idioma da submissão:** o autor deverá selecionar o idioma principal de seu manuscrito.
- **Condições para submissão e Declaração de Direito Autoral:** para avançar no processo de submissão, o autor deverá estar de acordo com todas as condições apresentadas.

12.1 – Passo 2. Transferência do Manuscrito

- O autor deverá selecionar o arquivo e clicar sobre o botão **TRANSFERIR**.
- Em seguida, quando o manuscrito aparecer sob o título “Arquivo submetido”, o autor poderá clicar sobre **SALVAR E CONTINUAR**.

12.3 – Passo 3. Inclusão de Metadados

12.3.1 - Autores e afiliação

- Os dados de todos os autores deverão ser preenchidos **somente** no formulário de metadados da submissão, presente no passo 3 do processo de submissão do site da Revista Fitos (www.revistafitos.far.fiocruz.br), sendo dados obrigatórios: nome e sobrenome por extenso e e-mail.
- Preenchimento dos dados complementares dos autores: obrigatoriamente, número do ORCID ou ResearchID ou perfil no Google Acadêmico; e opcionalmente, Link do CV Lattes, Link do repositório Institucional, Link do site ou blog do grupo de pesquisa, Link do site do autor.
- Os demais autores deverão ser incluídos no mesmo formulário (Clicar no botão “incluir autor”)
- A ordem dos autores no formulário deverá corresponder à ordem de autoria do trabalho.
- As afiliações devem ser incluídas em hierarquias institucionais.
- Não colocar titulações e funções junto às afiliações.
- Em caso de duplo vínculo do autor, colocar somente o vínculo no qual a pesquisa foi desenvolvida.

- Em caso de cooperação, poderá colocar as duas instituições. Ressalta-se que a primeira deverá ser a de maior vínculo.
- Terminado o cadastramento de todos os autores, o responsável pela submissão deverá alterar o idioma do formulário e preencher os campos traduzidos.

12.3.2 - Título

- O título deverá ser inserido uma única vez para cada idioma no campo correspondente do Passo 3.
- Para alterar o idioma do formulário, vá ao topo da página e, no canto superior direito, selecione o idioma desejado e clique em SUBMETER.
- O procedimento deverá ser repetido para cada idioma.
- O título do artigo no formulário de submissão deverá corresponder ao título informado no manuscrito.
- Todas as características descritas no item 4 destas Instruções deverão ser observadas também no formulário de submissão.

12.3.3 - Resumo e abstract

- Os resumos em português, inglês e espanhol (Abstract) deverão ser inseridos apenas no formulário de submissão (Passo 3).
- O resumo deverá ser inserido uma única vez para cada idioma no campo correspondente.
- Para alterar o idioma do formulário, vá ao topo da página e, no canto superior direito, selecione o idioma desejado e clique em SUBMETER.
- O procedimento deverá ser repetido para cada idioma.
- Só não se aplica a resenhas e cartas.
- Apresentação concisa dos pontos relevantes do trabalho em um único parágrafo, expondo metodologia, resultados e conclusão.
- Deve conter no máximo 200 palavras.
- No abstract, evitar traduções literais. Quando não houver domínio do idioma, consultar pessoas qualificadas.

12.3.4 - Indexação:

- **Área e subárea do Conhecimento:** o autor deverá informar a que área pertence seu manuscrito: **Agroecologia, Botânica, Ciências Farmacêuticas** (Farmácia; Farmacotecnia; Análise e Controle de Medicamentos e afins); **Educação e Conhecimento**; **Etnociências** (Etnobotânica e Etnofarmacologia); **Engenharia de Medicamentos e Produtos Naturais**; **Farmacologia** (Farmacologia Clínica); **Política e Gestão** (Políticas Públicas; Política e Planejamento Governamental; Crescimento Econômico e Saúde Pública); **Química e Toxicologia**.
- **Palavras-chave:** Inserir de quatro (4) a oito (8) palavras-chave que representem o conteúdo do manuscrito e facilite a recuperação da informação. As palavras-chave deverão ser escritas em

português ou espanhol e inglês, fazendo a alteração de idioma do formulário, com a primeira letra em maiúscula e separadas por ponto.

12.4 – Passo 4. Transferência de Documentos Suplementares

- Arquivos suplementares contendo, por exemplo, figuras, tabelas, documentos com assinatura, etc, poderão ser transferidos nesta etapa.

12.5 – Passo 5. Confirmação da Submissão

- Para concluir a submissão do manuscrito pelo sistema da Revista Fitos, o autor deverá clicar sobre o botão CONCLUIR SUBMISSÃO.

Exemplos de referências

Artigo de Periódico

Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Rodrigues E, Tabach R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemao, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Rev Bras Farmacogn.** 2010; 20 (5): 140-146. ISSN: 1981-528X.

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood-leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. **Br J Cancer** 1996; 73:1006-12.

Se o número for suplementar ou especial, indique-os respectivamente pelos termos “Supl” ou “(nº esp.)” após o volume.

Artigo de periódico eletrônico

Autor. Título do artigo. Título da publicação seriada. [tipo de suporte]. Ano. Volume (n.º) [acesso dia, mês e ano]; paginação ou indicação de tamanho. Disponibilidade de acesso.

Clark SC. The industrial arts paradigm: adjustment, replacement or extinction?. *Journal of Technology Education* [online]. 1989 Fall [acesso 15 mar. 1995]; 1(1). Disponível em: URL: <http://scholar.lib.vt.edu/ejournals/JTE/v1n1/backup/clark.jte-v1n1.html>.

Artigo de jornal

Santos J. Alves dos. Por que luta Portugal na África. *O Estado de São Paulo* 1967 maio 28; p. 64.

Biblioteca climatiza seu acervo. *O Globo*, Rio de Janeiro, 1985 mar 4.; p.11, c.4.

Livro completo

Iverson C, Flanagan A, Fontanarosa PB, Glass RM, Glitman P, Lantz JC, et al. **American Medical Association Manual of Style: a guide for authors and editors**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. ISBN-13: 9780195176339.

Livro em formato eletrônico

Autoria. Título. [suporte]. Produtor. Edição. Versão. Local (cidade): Editora; ano [acesso dia, mês e ano]. Disponibilidade de acesso.

Killings DB, ed. Anglo-Saxon chronicle [on-line]. Berkeley, United States: Berkeley Digital Library; 1995 July [acesso em 03 nov. 1998] Disponível em: URL: <http://sunsite.berkeley.edu>.

Capítulo de livro

Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia básica**. 2ª ed. São Paulo: Elsevier; 2007. ISBN: 9788535254914.

Capítulo de livro cujo autor é o mesmo da obra

Ronan CA. **História ilustrada da Ciência da Universidade de Cambridge**. Rio de Janeiro: Zahar; 1983. p. 30-5. ISBN: 9788585061685.

Capítulo de livro - autor/colaborador

Zanella MT. **Obesidade e fatores de risco cardiovascular**. In: Mion Jr D, Nobre F, editores. Risco cardiovascular global: da teoria à prática. 2ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2000. p. 109-25.

Tese/Dissertação/Monografias

Autor. Título e subtítulo da tese. Localidade; ano de apresentação. Grau (tese, dissertação ou monografia) [Programa de Pós-Graduação em...] – Instituição onde foi apresentada.

Duque SS. Avaliação técnica de PCR na detecção de fatores de virulência *Escherichia coli* diarreio gênica empregando culturas fecais primárias. Rio de Janeiro; 2000. Mestrado [Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular] - Instituto Oswaldo Cruz.

Lima N. Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem. Campinas, 1991. Tese [Programa de pós-graduação em Ciências Agrárias] Universidade de Campinas.

Trabalho publicado em anais de eventos científicos

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, eds. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Anais do 4º Congresso Paulista de Saúde Pública; 1993 jul. 10-14; São Paulo, Brasil. São Paulo: Associação Paulista de Saúde Pública; 1995.

Trabalhos aceitos para publicação (no prelo)

Nascimento E, Mayrink W. Avaliação de antígenos de *Cysticercus cellulosae* no imunodiagnóstico cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. **Rev Inst Trop** 1984. (No prelo)

Trabalhos inéditos (submetidos à aceitação de uma editora, sem ter atingido a fase de publicação)

Silvestre P. Golpe de aríete: método gráfico. Belo Horizonte: Ed. UFMG; 1988. (Inédito)

Patente

Autor(s), seguido da expressão inventor (es); depositante. Título da patente. Sigla do País, seguido da expressão patente, e nº da mesma. Data de publicação da patente.

Paulo César da Fonseca, inventor. Produto Erlan LTDA., depositante. Ornamentação aplicada à embalagem. BR patente C.I.10-3-6. DI2300045. 12 set. 1983; 28 maio 1985.

Legislativa

Competência (país, estado ou cidade). Título. (especificação da legislação, número e data). Ementa. Título da publicação oficial. Local (cidade), data (dia, mês abreviado e ano). Seção, paginação.

Brasil. Ministério da Educação e Cultura. Secretaria da Cultura. **Portaria n.º 23**, de 26 de outubro de 1982. Modifica o Plano Nacional de Microfilmagem de Periódicos Brasileiros criado pela **Portaria DAC n.º 31**, de

11 de dezembro de 1978. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 1 dez. 1982; Seção 1, v.120, n.227, p.22438.

Base de Dados

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da saúde. Lilacs - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde. Disponível em: [\[Link\]](#) Acesso em: 27 ago. 2009.

Documentos de Associações/Organizações

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009. Influenza and other Influenza Viruses. 91p. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 28 ago. 2009.

6. Inserção de hiperlink

Cada referência bibliográfica deverá vir acompanhada dos hyperlinks das publicações ou citações de páginas da web. O grupo de link aceito é CrossRef, PubMed e Link, a ser apresentado nesta ordem, quando houver e com os termos entre colchetes.

Inserindo hyperlink [CrossRef]

Caso a referência citada possua o número DOI (Digital Object Identifier ou Identificador de Objeto Digital) o seu endereço terá o formato <http://dx.doi.org/númeroDOI>.

Souza MVN, Vasconcelos TA. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. UFF, **Quim Nova**. 2005; 28 (4): 28-678. [CrossRef]

No exemplo acima, a referência possui número DOI igual a 10.1590/S0100-40422005000400022.

Passo a passo: selecione apenas a palavra CrossRef (não inclua os colchetes), pressione Ctrl+K (MSWord para Windows) ou Command+K (MSWord para Mac OS) e cole o endereço <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000400022>. Por fim, a referência terá o seguinte formato:

Souza MVN, Vasconcelos TA. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. UFF, **Quim Nova**. 2005; 28 (4): 28-678. [\[CrossRef\]](#)

Inserindo hyperlink [PubMed]

Caso a referência possua, além do DOI, o número PubMed, este deve ter o formato: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/númeroPubMed>. O link PubMed pode ser obtido através do sítio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Orlikova B, Menezes JCJMDS, JI S, Kamat SP, Cavaleiro JAS, Diederich M. Methylenedioxy flavonoids: assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **Eur J Med Chem.** Sep 12; 84:173-80. 2014. [PubMed]

Passo a passo: selecione apenas a palavra PubMed (não incluir os colchetes), pressione Ctrl+K (MSWord para Windows) ou Command+K (MSWord para Mac OS) e cole o endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25016375>. Adicionalmente, esta referência também possui DOI, que é igual a 10.1016/j.ejmech.2014.07.003. A referência terá o seguinte formato:

Orlikova B, Menezes JCJMDS, JI S, Kamat SP, Cavaleiro JAS, Diederich, M. Methylenedioxy flavonoids: assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **Eur J Med Chem.** Sep 12; 84:173-80. 2014. [CrossRef] [PubMed]

Inserindo hyperlinks [Link]

As referências que não possuírem [CrossRef] nem [PubMed] e estiverem disponíveis online, coloque a expressão disponível em e o endereço do artigo no hyperlink da palavra [Link]. Ao selecionar não inclua os colchetes.

dos Santos SA, de Carvalho MG, Braz-Filho R. Produtos de Oxidação do Sesquiterpeno Laevigatina. Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Hidrogênio e Carbono-13. **Quim Nova.** 1995; 18(6): 525-528. [Link]

Antes de submeter o manuscrito é importante testar todos os hiperlinks das referências; passando o mouse por cima dos hiperlinks verifique se os endereços informados estão corretos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

