

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

THAIS EMBOABA DE OLIVEIRA

**Avaliação do potencial biológico de extratos obtidos de folhas de
Spondias purpurea L. (Anacardiaceae)**

ARARAQUARA – SP

2017

THAIS EMBOABA DE OLIVEIRA

**Avaliação do potencial biológico de extratos obtidos de folhas de
Spondias purpurea L. (Anacardiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

ARARAQUARA – SP

2017

0484a

Oliveira, Thais Emboaba de.

Avaliação do potencial biológico de extratos obtidos de folhas de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) / Thais Emboaba de Oliveira. – Araraquara: [S.n.], 2017.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.

1. *Spondias purpurea*. Atividade antimicrobiana. 2. Seriguela. 3. Anacardiaceae. 4. Atividade antioxidante. 5. Morfologia. 6. Citotoxicidade. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae).

AUTORA: THAIS EMBOABA DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dra. ANA HELENA JANUÁRIO
Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas / Universidade de Franca - UNIFRAN



Prof. Dra. TAIS MARIA BAUAB
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 30 de outubro de 2017

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus amados pais,
Wladimir (in memoriam) e Beatriz,
pelo apoio e amor incondicional.*

*Agradecimento especial à minha
Orientadora, Profa. Dra. Rosemeire C.
L. R. Pietro, pelo apoio, compreensão,
pelos ensinamentos transmitidos e por ter
permitido que esse trabalho fosse realizado,
mostrando-se sempre ser uma professora e
pesquisadora dedicada e uma pessoa de grande
valor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Wlademir (*in memoriam*) e Beatriz, pela compreensão e dedicação que sempre tiveram comigo e com minhas irmãs. Obrigada por terem nos dado a melhor educação e o maior amor.

Às minhas irmãs, Eliana e Fernanda, pelo apoio e carinho.

Ao meu esposo, Matheus, por toda compreensão e apoio, pelo companheirismo e por sempre incentivar o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu cunhado, Guto, por me apoiar a realizar este projeto e pelos conhecimentos em cromatografia.

À Profa. Dra. Janete e ao Benedito, técnico do laboratório de fitoquímica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), por terem me auxiliado no preparo do material vegetal.

Ao Prof. Dr. Luis Vítor, por emprestar seus equipamentos e transmitir conhecimentos na área de Botânica.

À doutoranda Vanessa Greatti, por ter me acompanhado nas etapas deste trabalho com dedicação e paciência. Obrigada por todo o conhecimento transmitido, por toda atenção e amizade.

Ao Rodrigo Sorrechia, por sempre ajudar os alunos com muita prestatividade.

Ao doutorando Fernando Oda, por ter me ajudado com seus conhecimentos em cromatografia e farmacognosia.

À Cláudia, do laboratório de proteômica, por ter me ajudado com os ensaios de citotoxicidade.

Ao Professor Dr. Júlio Lombardi, pela atenção e registro da exsicata.

À Dra. Sylvia pelo apoio em todas as fases do trabalho.

A todos os docentes que contribuíram com todo o conhecimento que adquiri ao longo desses anos.

Aos funcionários e colegas de laboratório que contribuíram com meu aprendizado.

Aos meus colegas de trabalho, Lucas e Fernanda, por terem me apoiado a realizar este projeto.

A todos os meus amigos que estão ao meu lado em todos os momentos, que me apoiam e que trazem mais alegria à minha vida.

À secretaria de pós-graduação, aos funcionários, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

RESUMO

Spondias purpurea L. (Anacardiaceae) é uma planta original do México e América Central, podendo ser encontrada no Brasil, especialmente na região Nordeste. Apresenta potencial atividade antimicrobiana, porém estudos mais detalhados são necessários para esclarecer tal atividade. Foram realizados estudos farmacognósticos para identificação de compostos e para compreender o potencial biológico dessa espécie, foi traçado um perfil cromatográfico dos mesmos em CLAE-DAD. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela Concentração Inibitória Mínima utilizando a técnica de microdiluição em placa de 96 poços dos extratos etanólico 100%, hexânico e diclometânico de folhas secas de *S. purpurea* frente a bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Também foi realizada a avaliação da atividade antioxidante dos extratos pelo método DPPH. Com a finalidade de avaliar a segurança de tais extratos, foi realizado um estudo de citotoxicidade frente a células HaCat, J774 e HepG2. Os resultados mostraram que os extratos não apresentaram atividade frente às bactérias na concentração máxima avaliada de 5,0 mg/mL, no entanto, mostraram ação fungistática frente espécies de *Candida* e dermatófitos. O extrato etanólico 100% apresentou atividade antioxidante de 88% e não apresentou citotoxicidade significativa frente às células mencionadas anteriormente.

Palavras-chave: *Spondias purpurea*. Seriguela. Anacardiaceae. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Spondias purpurea L. (Anacardiaceae) is an original plant from Mexico and Central America, that can be found in Brazil, especially in the Northeast region. It has potential antimicrobial activity, but there is a need for more detailed studies to clarify this activity. Pharmacognostic studies were carried out to identify compounds and to understand the biological potential of this specie. A chromatographic profile of the extracts was performed in CLAE-DAD, in order to evaluate the safety of these extracts. An evaluation of antimicrobial activity by Minimum Inhibitory Concentration using the 96 - well plate microdilution technique of 100% ethanolic, hexanic and dichloromethanic extracts of *S. purpurea* dried leaves against bacteria, yeasts and filamentous fungi was carried. An evaluation of the antioxidant activity by the DPPH method was also performed. A study of cytotoxicity against HaCat, J774 and HepG2 cells was done. The results showed that the extracts have no activity against the bacteria at the maximum concentration evaluated of 5,0 mg/mL, however, they showed fungistatic action against *Candida* species and dermatophyte. The 100% ethanolic extract presented antioxidant activity of 88% and did not show significant cytotoxicity against the cells previously mentioned.

Keywords: *Spondias purpurea*. Seriguela. Anacardiaceae. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas imparipinadas da espécie <i>S. purpurea</i>	18
Figura 2. Flores da espécie <i>S. purpurea</i>	18
Figura 3. Fruto da espécie <i>S. purpurea</i>	19
Figura 4. <i>Spondias purpurea</i>	19
Figura 5. Folhas de <i>S. purpurea</i> secas e pulverizadas.	30
Figura 6. CIM ilustrativo realizado para o microrganismo	39
Figura 7. Reação de redução da resazurina a resorufina e diidroresorufina.	40
Figura 8. Curva analítica da solução padrão de ácido gálico	45
Figura 9. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato EtOH 100% de folhas de <i>S. purpurea</i> diluído em metanol 95% (v/v).....	46
Figura 10. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato EtOH 70% de folhas de <i>S. purpurea</i> diluído em metanol 95% (v/v).....	47
Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato hexânico folhas de <i>S. purpurea</i> diluído em metanol 95% (v/v).....	47
Figura 12. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato DCM de folhas de <i>S. purpurea</i> diluído em metanol 95% (v/v).....	48
Figura 13. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do padrões de ácidos fenólicos: Ácido cafeico (A), ácido gálico (B) e ácido elágico (C), diluídos em metanol 95% (v/v).	49
Figura 14. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do padrões de flavonóides, quercetina(A) e rutina (B), diluídos em metanol 95% (v/v).	50
Figura 15. Sobreposição dos perfis cromatográficos representados nas figuras 9 e 10.	51
Figura 16. Espectro na região do ultravioleta do extrato EtOH 100% no tempo de retenção 23,61 (A) minutos e do padrão quercetina (B), obtidos por meio de CLAE-DAD.....	52
Figura 17. Atividade anti-radicalar percentual dos extratos obtidos de <i>S. purpurea</i> .56	
Figura 18. Percentual de viabilidade de células HaCat em presença de extrato EtOH 100% de <i>S. purpurea</i>	58
Figura 19. Percentual de viabilidade de células HaCat em presença de extrato.....	58

Figura 20. Percentual de viabilidade de células HaCat em presença de extrato diclorometânico <i>S. purpurea</i>	59
Figura 21. Percentual de viabilidade de células J774 em presença de extrato EtOH 100% de <i>S. purpurea</i>	60
Figura 22. Percentual de viabilidade de células J774 em presença de extrato hexânico de <i>S. purpurea</i>	60
Figura 23. Percentual de viabilidade de células J774 em presença de extrato diclorometânico de <i>S. purpurea</i>	61
Figura 24. Percentual de viabilidade de células HepG2 em presença de extrato EtOH 100% de <i>S. purpurea</i>	62
Figura 25. Percentual de viabilidade de células HepG2 em presença de extrato hexânico de <i>S. purpurea</i>	62
Figura 26. Percentual de viabilidade de células HepG2 em presença de extrato diclorometânico de <i>S. purpurea</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens fúngicas avaliadas neste trabalho	37
Tabela 2. Linhagens bacterianas avaliadas neste trabalho	37
Tabela 3. Ensaios de controle de qualidade de <i>S. purpurea</i>	43
Tabela 4. Reações de identificação classe de substâncias nas folhas de <i>S. purpurea</i>	44
Tabela 5. Fenóis totais (FT) do extrato EtOH 100% de folhas de <i>S. purpurea</i>	45
Tabela 6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de folhas de <i>S. purpurea</i>	53
Tabela 7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de folhas de <i>S. purpurea</i>	54
Tabela 8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de folhas de <i>S.</i> <i>purpurea</i>	55
Tabela 9. Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrões e extratos de <i>S. purpurea</i> pelo método de DPPH.	56
Tabela 10. Viabilidade celular de células HaCat frente aos extratos EtOH 100%, hexânico e DCM obtidos de folhas pulverizadas de <i>S. purpurea</i>	57
Tabela 11. Viabilidade celular de macrófagos murinos J774 frente aos extratos etanólico, hexânico e DCM obtidos de folhas pulverizadas de <i>S. purpurea</i>	59
Tabela 12. Viabilidade celular de células tumorais de fígado HepG2 frente ao extratos etanólico, hexânico e DCM obtidos de folhas pulverizadas de <i>S. purpurea</i>	61

ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI - *Brain-Heart Infusion*

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjo de Diodos

CLUE- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DCM - Diclorometano

DMSO - Dimetil sulfóxido

DP - Desvio Padrão

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EFS - Extração em Fase Sólida

EtOH 100% - Extrato etanólico 100%

EtOH 70% - Extrato etanólico 70%

MO - Microrganismo

PDA - *Potato Dextrose ágar*

PDB - *Potato Dextrose Broth*

VB - Viabilidade Celular

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Revisão da Literatura.....	17
2.1. <i>Spondias purpurea</i>	17
2.1.1. Atividade biológica.....	20
2.1.2. Composição química	21
2.2. Busca por novos antimicrobianos	21
2.3. Doenças Infecciosas	23
2.3.1. Doenças fúngicas	23
2.3.2. Doenças bacterianas	26
2.4. Citotoxicidade	28
3. Objetivo geral.....	29
3.1. Objetivos específicos	29
4. Materiais e Métodos.....	30
4.1. Obtenção do material vegetal e identificação da planta	30
4.2. Análise farmacognóstica das folhas de <i>S. purpurea</i>	30
4.2.1. Determinação do pH.....	30
4.2.2. Determinação da densidade aparente não compactada	31
4.2.3. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho – INFRATEST	31
4.2.4. Teor de cinzas totais.....	31
4.2.5. Testes de identificação de taninos.....	32
4.2.6. Identificação de saponinas	33
4.2.7. Determinação do teor de fenólicos totais.....	33
4.2.7.1. Reações colorimétricas de identificação	34
4.2.7.1.1. Reação de Shinoda (reação de cianidina)	34
4.2.7.2. Reação de Taubock (reação oxalato-bórica)	34
4.2.7.3. Reação com cloreto férrico	35
4.2.8. Extração e identificação de antraquinonas	35
4.2.8.1. Antraquinonas livres.....	35
4.2.8.1.1. Reação de Borntrager	35
4.2.8.2. Glicosídeos antraquinônicos	35

4.2.8.2.1. Reação de Borntrager	36
4.2.9. Extração e identificação de alcaloides	36
4.3. Obtenção dos extratos	36
4.4. Microrganismos e Manutenção	37
4.5. Determinação da atividade antimicrobiana	38
4.6. Análise do perfil cromatográfico	40
4.7. Avaliação de atividade antioxidante	41
4.8. Avaliação da Citotoxicidade	41
5. Resultados	43
5.1. Rendimento dos extratos de <i>S. purpurea</i>	43
5.2. Avaliação farmacognóstica e de <i>S. purpurea</i>	43
5.2.1. Identificação de grupos ativos	44
5.2.2. Determinação de fenóis totais	44
5.3. Análise cromatográfica (CLAE-DAD)	46
5.3.1. Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos	46
5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana	53
5.5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos	55
5.6. Avaliação da citotoxicidade	57
6. Discussão	64
7. Conclusões	69
Referências	70

1. Introdução

Plantas são utilizadas para diversas finalidades desde a antiguidade. Em muitas comunidades, o tratamento das mais diversas enfermidades se restringe ao uso dessas substâncias (SILVA et al., 2014). Ainda na atualidade, em muitos locais, não somente em comunidades específicas, são utilizadas para fins terapêuticos diversos. De acordo com Meléndez e Capriles (2006), estima-se que apenas 1,0% das espécies de plantas encontradas no planeta Terra foram estudadas com finalidades farmacológicas. Com o aumento da resistência microbiana causado pelo uso indiscriminado de antibióticos e mutação genética natural dos microrganismos, se faz necessária a busca por novas substâncias bioativas que possam contribuir com o tratamento de doenças ocasionadas por microrganismos diversos.

O gênero *Spondias* pertence à família *Anacardiaceae*. As espécies mais estudadas pertencentes a esse grupo são *Spondias mombin* e *Spondias tuberosa*, que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças como desordens infecciosas e inflamações (SILVA et al., 2014). *Spondias purpurea* L., popularmente denominada “Seriguela”, faz parte desse grupo. Essa planta cresce em climas tropicais, subtropicais e temperados sendo originária do México e América Central. No Brasil, ela é encontrada especialmente no Nordeste, embora também seja encontrada em outras regiões do país como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro entre outras regiões (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015; ALENCAR, et al., 2015).

Na medicina popular ela é utilizada, especialmente na forma de chá, que é realizado com as folhas frescas e o mesmo também é preparado por decocção a partir do caule. Seu uso está relacionado ao desconforto gastrointestinal (flatulências) e dores de estômago. Também há relatos de utilização contra infecções bucais e cáries (ALENCAR, et al., 2015). No Brasil, é usada para o tratamento de diarreia e ainda há relatos de que essa planta é utilizada para tratar diabetes e colesterol (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015). Estudos fitoquímicos realizados com as cascas e com o fruto dessa espécie apontaram a presença de compostos fenólicos, ácidos orgânicos e compostos voláteis, porém não há muita informação no que diz respeito às folhas e demais partes dessa planta. Trata-se de uma espécie ainda pouco explorada que, devido ao seu uso medicinal popular e importância econômica, deve ser mais profundamente estudada (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015).

Assim, este trabalho teve o objetivo de estudar a atividade biológica de extratos de folhas secas de *S. purpurea*.

2. Revisão da Literatura

2.1. *Spondias purpurea*

O gênero *Spondias* pertence à família *Anacardiaceae* que compreende aproximadamente 77 gêneros e 600 espécies, variando entre árvores e arbustos. A *Spondias purpurea* L., popularmente denominada de diversas formas tais como “Seriguela” e “Ciriguela”, faz parte desse grupo. Essa planta cresce em climas tropicais, subtropicais e temperados, sendo originária do México e América Central. No Brasil, ela é encontrada especialmente no nordeste, embora também seja encontrada em outras regiões do país como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro entre outras (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015; ALENCAR et al., 2015).

S. purpurea pode ser considerada uma planta de crescimento rápido, sendo capaz de crescer em solos pouco férteis, não necessitando de cuidados específicos para seu cultivo (PIMENTA-BARRIOS; RAMÍREZ HERNÁNDEZ, 2003; ARSHADI et al., 2015). Trata-se de uma árvore caducifólia, que perde suas folhas em épocas mais frias do ano. Suas folhas são imparipinadas, apresentando assim, número ímpar de folíolos com bainha (Figura 1). Seu tamanho pode variar, em média, de 3 a 10 metros de altura (Figura 4). Possui flores pequenas (Figura 2), as quais podem apresentar grande variação de coloração, como cor-de-rosa, roxo e branco esverdeado. Seus frutos apresentam superfície lisa e possuem formato ovoide (Figura 3) que também possuem cores variando entre o verde, amarelo, laranja e vermelho. Apresenta sabor doce e levemente ácido (SILVA, MELO, 2013). Trata-se de um fruto muito apreciado especialmente no Nordeste do Brasil, comprovando-se pelo aumento do consumo dos frutos *in natura* e processados (MARTINS et al., 2003). O tamanho dos frutos pode variar de acordo com a fase de colheita no ano (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2000). A fase de maturação na qual a coloração do fruto se encontra predominantemente amarela, é a melhor fase para realizar a medição de massa, volume, comprimento e diâmetro do fruto. No entanto, para finalidades alimentícias e, conseqüentemente, comerciais, a melhor fase é a de coloração avermelhada, a qual apresenta maior concentração de vitaminas. As variações botânicas ocorrem de setembro a outubro, podendo ocorrer outros tipos de variações em fases mais úmidas e mais secas do ano (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015).

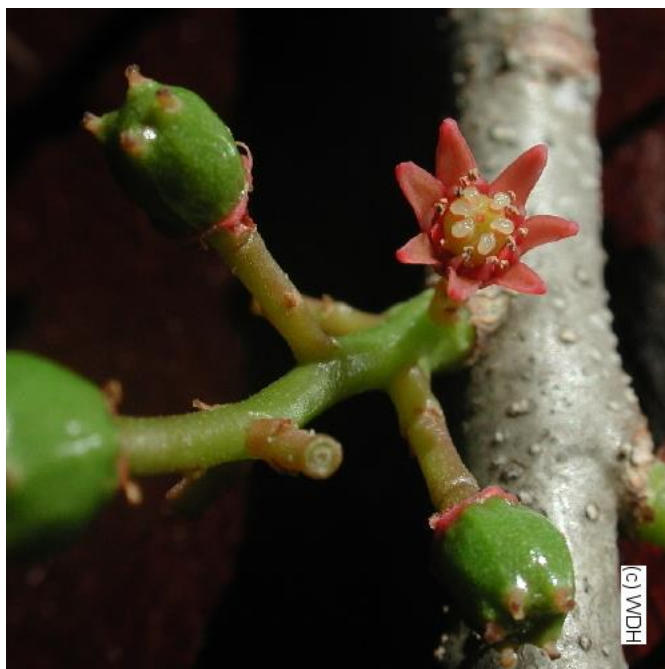
A reprodução dessa espécie se dá por brotação, estratificação, cortes (mudas), entre outros. Isso ocorre devido ao núcleo do fruto ser, em sua maioria, estéril (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015).

Figura 1. Folhas imparipinadas da espécie *S. purpurea*



Fonte: *The Virtual Field Herbarium*

Figura 2. Flores da espécie *S. purpurea*



Fonte: *The Virtual Field Herbarium*

Figura 3. Fruto da espécie *S. purpurea*



Fonte: *The Virtual Field Herbarium*

Figura 4. *Spondias purpurea*.



Fonte: Autoria própria (Foto tirada em São Carlos- SP)

Essa espécie apresenta tanto importância econômica quanto importância na medicina popular de muitas regiões. Economicamente, se destaca na comercialização do fruto e seus derivados como sucos, geleias, sorvetes, compotas e licores (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015). O processamento industrial dos frutos gera uma porcentagem considerável de resíduos provenientes das cascas, caroços e bagaço. Devido à produção desse resíduo agroindustrial ser considerável (30 a 40 %), estudos apontaram que na constituição do resíduo existem ácidos fenólicos, ácido ascórbico e carotenoides em quantidades expressivas, fazendo com que tal resíduo possa ser útil para a extração de compostos antioxidantes naturais (SILVA; MELO, 2013).

Na medicina popular a *S. purpurea* é utilizada, especialmente na forma de chá preparado com as folhas frescas ou por decocção a partir do caule. Seu uso está relacionado ao desconforto gastrointestinal (flatulências) e dores de estômago. Também há relatos de utilização contra infecções bucais e cáries (ALENCAR et al., 2015). No Brasil, é usada para o tratamento de diarreia e ainda há relatos de que essa planta é utilizada para tratar diabetes e colesterol (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015).

2.1.1. Atividade biológica

Foi estudada a atividade antimicrobiana das partes aéreas *S. purpurea* e também seus frutos contra bactérias e fungos. Esses estudos mostraram que o extrato etanólico de *S. purpurea* foi considerado promissor, embora mais estudos sejam necessários para comprovar tal atividade (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015).

Existem relatos de atividade antiparasitária (PEREIRA et al., 2015) e antiulcerogênica, estes resultados foram obtidos em estudos realizados com extrato etanólico. Pesquisas realizadas com o fruto mostraram grande potencial antioxidante desta espécie (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015).

2.1.2. Composição química

Estudos realizados em integrantes da família *Anacardiaceae* mostraram a presença de diversas substâncias, entre elas produtos do metabolismo secundário de plantas, os quais podem apresentar grande potencial biológico (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015). Estudos fitoquímicos realizados em *S. purpurea* (folhas, casca e fruto) mostraram a presença de polissacarídeos, terpenos, componentes voláteis e flavonoides, ainda que não tenham sido realizados muitos estudos da composição química dessa planta (MARISCO; PUNGARTNIK, 2015). Das cascas, também foram identificados ácidos fenólicos e flavonol-O-glicosilados, O-glicosídeos de quercetina, canferol, canferídeo e raminetina (SILVA et al., 2014).

Dos compostos presentes nesta espécie, destaca-se a presença de flavonoides por se tratarem de uma classe de metabólitos secundários de papel muito importante, uma vez que tais compostos são relacionados a uma gama diversa de ações biológicas em plantas. Destas ações, destacam-se a defesa, a coloração das flores e proteção UV, além de outras funções que também estão relacionadas a essas substâncias. Tais metabólitos secundários são considerados importantes quimiotaxonômicos. Também possuem atividades antioxidantes, as quais são responsáveis por vários benefícios à saúde humana (PEREIRA et al., 2015)

Em uma análise dos compostos fenólicos presentes nos frutos da seriguela em cromatografia gasosa, foi possível identificar duas cetonas, quatro álcoois, sete aldeídos, nove ésteres e cinco hidrocarbonetos terpênicos (CEVA-ANTUNES et al., 2006). Um estudo mais recente com os frutos da *S. purpurea* identificou alguns compostos por CLUE com detector de arranjo de diodos - espectrometria de massas por ESI *electrospray*, entre eles análogos de quercetina, canferol e ácido gálico (ENGELS et al., 2012).

2.2. Busca por novos antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias que têm a capacidade de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. Possuem fundamental importância para o tratamento de diversas doenças que acometem os seres humanos e animais. Em sua grande maioria são substâncias sintéticas, mas há também as de origem natural.

Em um cenário em que as doenças infecciosas representam a segunda maior causa de mortes no mundo, a busca por novas substâncias com novos mecanismos de ação e segurança para o paciente é de fundamental importância. Além de acometerem grande parte da população mundial, também há o fato da resistência dos microrganismos crescerem em ritmo acelerado, fazendo tal busca ser de extrema importância. Neste contexto, as plantas são promissoras, pois podem apresentar em sua biossíntese compostos que agem como antimicrobianos naturais contra possíveis patógenos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O aumento da resistência microbiana aos antibióticos está levando ao surgimento de, cada vez mais, bactérias multidroga resistentes (*MDR*) e, ainda, as de resistência extrema às drogas (*XDR*), as quais conferem um quadro de grande preocupação, uma vez que o tratamento às infecções com tais microrganismos é muito difícil. Outro problema que vem aumentando é o de infecções bacterianas ou fúngicas persistentes em pacientes que passaram por algum procedimento de implantes ou que entraram em contato com equipamentos médicos contaminados com microrganismos que formaram um biofilme, que consiste na forma de vida sésil bacteriana em superfícies sólidas, em que as mesmas se multiplicam recobertas por uma matriz de biofilme (autoprodução), cuja composição é, entre outros itens, bactérias intercelulares, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos liberados extracelularmente. Tais microrganismos representam uma grande preocupação para a medicina (SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016).

Além disso, o aumento da resistência fúngica também vem sendo relatado. Os medicamentos utilizados como os “azóis” estão se tornando cada vez menos eficazes, resultando no insucesso dos tratamentos (NIGAM, 2015). *Candida albicans* é considerado o fungo patogênico mais frequente em humanos. Trata-se da causa mais comum de infecções vaginais e micoses profundas. O uso de antifúngicos para o tratamento dessas doenças vem levando à resistência desses microrganismos, especialmente aos “azóis”, devido a isso, a busca por novas substâncias antifúngicas para o tratamento de infecções por *Candida* é de extrema importância (ZIDA et al., 2016).

2.3. Doenças Infecciosas

Doenças infecciosas representam grande importância no quadro de mortalidade mundial. Essas não acometem apenas seres humanos, mas também os animais. Atualmente, tais doenças representam a segunda maior causa de óbitos no mundo e a terceira causa em países desenvolvidos (NUSSBAUM et al., 2006). Diversas são as causas de resistência microbiana, sendo que, não só o abandono do tratamento pode levar a tal resistência como também o fato da globalização que permite que um mesmo indivíduo esteja em vários locais em um curto período de tempo e que leve consigo novos microrganismos que podem, pela promiscuidade bacteriana, trocar material genético entre diferentes espécies. Além disso, há também o fato de que, muitas vezes, a doença é diagnosticada tardiamente ou erroneamente, o que colabora com a resistência dos microrganismos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). A resistência microbiana é caracterizada pela capacidade do microrganismo crescer em meio com um ou mais compostos que normalmente inibiriam seu crescimento (ALENCAR et al., 2015). Quando microrganismos se tornam resistentes a antimicrobianos, reduz-se a opção de tratamento para as doenças que os mesmos causam, sendo necessária a busca por novos medicamentos que tratem tais doenças (WHO, 2015).

2.3.1. Doenças fúngicas

As doenças infecciosas podem ser ocasionadas por diferentes tipos de microrganismos. Doenças que tem como agente causador os fungos são muito comuns e de difícil tratamento. Devido a isso, medicamentos foram desenvolvidos ao longo do tempo para combater tais doenças. A maioria desses medicamentos é de origem sintética e apresenta considerável toxicidade. Doenças fúngicas, em geral, apresentam tratamento de longa duração que são abandonados pelos pacientes fazendo com que ocorra a seleção dos microrganismos mais resistentes. Além de acometer seres humanos, as doenças fúngicas também tem importância agrícola, causando grande prejuízo a esse setor. Nesse contexto, produtos naturais podem representar uma alternativa na busca por novas substâncias antifúngicas com eficácia e maior segurança (FENNER et al., 2006).

A exposição dos pacientes a tratamentos imunossupressores, pacientes portadores de doenças imunossupressoras como o HIV, bebês prematuros, transplantados entre outros motivos, levam a um aumento da frequência de doenças oportunistas. Candidíase, Aspergilosis, Criptococose, entre outras, são causas frequentes de complicações clínicas em pacientes imunocomprometidos. A candidíase é a principal causa de morte entre pacientes com leucemia sendo *Candida* a levedura mais frequente em pacientes que estão na unidade intensiva de saúde (UTI) (ZARRIN; MAHMOUDABADI, 2009). O gênero *Candida* desperta grande preocupação, devido ao crescente número de pacientes internados que são acometidos por esta contaminação. Tem demonstrado crescente resistência aos antifúngicos utilizados como os azóis, além de causarem complicações no quadro clínico do paciente (WHALEY; ROGERS, 2016). Estudos recentes avaliando *Candidas* isoladas de pacientes de unidade de terapia intensiva na Polônia mostraram grande variabilidade genética das amostras avaliadas (MALEK et al., 2016).

Existem aproximadamente 200 espécies de *Candida*, no entanto, a maioria delas não está envolvida com doenças a seres humanos. Ainda que existam outras espécies causadoras de doenças, 90% das infecções sistêmicas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. Depois da *C. albicans*, as demais são as espécies mais encontradas em pacientes com imunodeficiência (ZARRIN; MAHMOUDABADI, 2009).

A espécie mais comum pertencente ao gênero *Candida* é a *C. albicans*, mas outras espécies têm sido mais frequentemente encontradas durante as duas últimas décadas. Há diferença na prevalência das espécies de acordo com localização geográfica. Ainda que em menor frequência, comparada a outras espécies, infecções causadas por *C. tropicalis* têm crescido globalmente. *C. krusei* tem tido um aumento em sua resistência ao antifúngico fluconazol e tem sido reconhecida como um patógeno multi-droga resistente (MDR). Isso ocorre devido à diminuição de sua sensibilidade a 5-fluorocitosina e anfotericina B (MALEK et al., 2016).

C. glabrata é uma espécie que pode ser encontrada na microbiota do intestino humano. Embora esteja presente na microbiota, essa espécie surgiu como um dos principais agentes causadores de infecções de mucosas e infecções sistêmicas. Tais infecções representam uma taxa de mortalidade de 40 a 70% especialmente em pacientes imunocomprometidos, sendo considerada uma taxa alta (AL-YASIRI et

al., 2016). De acordo com diferentes estudos, essa taxa de mortalidade está associada não somente a *C. glabrata*, mas a espécies de *Candida* em geral (REZAZADEH et al., 2016). Com exceção aos seres humanos, a *C. glabrata* é um comensal comum de diversas espécies de pássaros, incluindo pássaros de estimação. Muitos estudos apontam que os pássaros são disseminadores de diversos microrganismos patogênicos como fungos, bactérias, vírus e parasitas (AL-YASIRI et al., 2016). Alguns estudos demonstraram que a *C. glabrata* foi considerada um agente causador de pneumonias, especialmente em pacientes ambulatoriais (YAZICI et al., 2016).

Outra espécie muito encontrada em pacientes imunodebilitados é a *Candida parapsilosis*. Existem estudos que apontam que esse microrganismo está associado a endocardites. Aproximadamente de 2 a 5 % das endocardites possuem fungos como agente causador (SILVA-PINTO et al., 2015).

Dentre os tratamentos existentes para as candidíases, o principal é realizado com fluconazol, uma substância com considerável hepatotoxicidade (ZARRIN; MAHMOUDABADI, 2009). O uso intensivo de fluconazol como tratamento antifúngico em humanos está associado ao aumento de cepas fluconazol-resistentes em isolados clínicos (AL-YASIRI et al., 2016). De acordo com Rezazadeh et al. (2016), as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* demonstram susceptibilidade ao fluconazol, porém, as espécies que mostraram maior resistência a esse antifúngico foram a *C. krusei* e a *C. glabrata*.

Além das candidíases, as dermatofitoses apresentam grande importância no quadro de doenças infecciosas, atingindo tanto o homem quanto os animais. Alguns fungos causadores de dermatofitoses são *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*. Há dados que relatam que tais doenças estão entre as zoonoses mais comuns do mundo, afetando mais de 20-25% dos indivíduos (PINHEIRO; MOREIRA; SIDRIM, 1997; CURADO et al., 2016). As dermatofitoses são infecções que acometem pelos, cabelos e camadas queratinizadas da pele e são causadas por fungos filamentosos queratinolíticos e queratinofílicos. Trata-se de um problema endêmico em muitos países, afetando não só cães, gatos e seres humanos, mas também animais de laboratório como os ratos e camundongos (DEBNATH et al., 2015).

Animais de estimação podem ser carreadores de esporos de dermatófitos do gênero *Microsporum*. Tais esporos não conseguem invadir a pele sadia do animal,

no entanto, em casos de imunossupressão, deficiência nutricional, ambientes com temperaturas elevadas e úmidas, trauma na pele, entre outros, podem levar ao desenvolvimento de lesões (DEBNATH et al., 2015).

Os antifúngicos mais comumente utilizados para o tratamento das dermatofitoses em animais de estimação (cães e gatos) são itraconazol, griseofulvina e terbinafina. Estudos realizados mostraram que *M. canis* e *T. mentagrophytes* apresentaram sensibilidade diante dos antifúngicos cetoconazol, itraconazol e anfotericina B, no entanto, o mesmo não foi observado para os antifúngicos fluconazol e miconazol (DEBNATH et al., 2015).

2.3.2. Doenças bacterianas

Não só doenças fúngicas representam importância médica, mas também as causadas por diversos outros microrganismos, tais como as bactérias. A resistência bacteriana tem sido alvo de muitos estudos até o presente momento, devido à facilidade de ocorrência pela promiscuidade bacteriana, que consiste em troca de material genético entre diferentes espécies, tornando-as cada vez mais resistentes aos antibióticos já existentes, tendo grande impacto para a sociedade (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; WHO, 2015).

De acordo com Lara et al. (2009), as bactérias multidroga resistentes (MDR), definição dada a microrganismos resistentes a antibióticos comumente utilizados para o tratamento dessas doenças, expõem os pacientes a tratamentos com mais de dois tipos diferentes de antibióticos, sendo menos efetivo, mais tóxico e mais caro, além de aumentar significativamente o tempo de permanência desses pacientes em hospitais e elevar a taxa de mortalidade dos infectados por essas bactérias.

Existem diversas espécies de bactérias patogênicas, sendo uma de grande importância médica a *Escherichia coli*. Trata-se de uma espécie comumente encontrada na microbiota normal do intestino, porém, em situações adversas, como baixa imunidade, pode gerar infecções ao hospedeiro, sendo a diarreia, o tipo mais comum de doença. Devido a isso, é uma bactéria muito utilizada como indicador de contaminação fecal. A *E. coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo. Estão dispostas em seis grupos diferentes, são eles: *E. coli* enteroagregante (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* de adesão difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enterotoxigênica

(ETEC) (VARELA; LAVALLE; ALVARADO, 2015). De acordo com Fleckenstein et al.,2010, a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) causa diarreia severa sendo responsável por uma alta taxa de mortalidade infantil.

Outra espécie de bactéria importante é a espécie *Bacillus subtilis*, uma bactéria Gram-positiva encontrada no solo que resiste a condições ambientais desfavoráveis (temperaturas altas, osmolaridade, fontes de carbono baixas, entre outros) (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004). Tais condições fazem com que o microrganismo entre em condição de crescimento lento, formando endósporo, que é uma estrutura extremamente resistente a condições ambientais adversas. Devido a essa capacidade, ela é utilizada como agente de biocontrole em testes de esterilização por óxido de etileno e a vapor (LANNA FILHO et al.,2010)

Embora essa espécie, normalmente, não esteja associada a doenças, a mesma tem sido associada a gastroenterites em crianças que receberam alimentos contaminados (ABDOU et al.,2007).

Outra bactéria que apresenta grande importância médica, especialmente no que diz respeito à utilização de alimentos crus, é a *Salmonella* sp. Esta pode ser relacionada a infecções alimentares. A resistência desse microrganismo a antibióticos comercializados atualmente tem representado uma grande preocupação (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012).

Outra bactéria de grande importância estudada nesse trabalho é *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva que está amplamente distribuída na natureza e a maioria das pessoas possui essa bactéria em seu organismo de forma assintomática, sendo a mucosa nasal o principal habitat dessa bactéria. Apresenta-se como anaeróbio facultativo, mesófilo, com temperatura ótima de crescimento na faixa de 30-37°C. Está envolvida em uma grande variedade de infecções, sendo a maioria delas adquiridas por pacientes em ambiente hospitalar. Apresentar grande patogenicidade e fácil transmissão, além de elevada capacidade em desenvolver resistência a diversos antibióticos (GUSHIKEN et al., 2016). As chamadas *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) representam um grande problema para a sociedade, no que diz respeito à sua grande incidência e dificuldade de tratamento. Essas possuem a capacidade de produção de lactamases ou penicilases que são enzimas capazes de hidrolisar o anel lactâmico das penicilinas, tornando-os inativos (KLEVENS et al.,2007)

Devido ao exposto, o estudo de novas substâncias antimicrobianas se faz necessário devido, tanto a resistências de microrganismos às substâncias já existentes, quanto à busca por substâncias eficazes e mais seguras para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos.

2.4. Citotoxicidade

Em muitas regiões ainda se observa a compra e venda de produtos naturais com a propaganda de que por se tratar de uma fonte natural de tratamento, a segurança está garantida, o que é um grande equívoco, uma vez que a maioria das plantas não apresenta sua composição química completamente caracterizada. A bioatividade de uma planta pode ser oriunda do efeito sinérgico entre os diferentes componentes que ela apresenta. Para que se tenha a utilização segura de plantas medicinais, é necessário que a mesma tenha passado por estudo de controle de qualidade, caracterização de composição química e toxicidade (VEIGA Jr; PINTO; MACIEL, 2005; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

No Brasil, produtos naturais com finalidades medicinais são utilizados em larga escala, muitas vezes sem comprovação farmacológica. Trata-se do tipo de tratamento de enfermidades variadas mais acessível para cerca de 80% da população. A toxicidade de plantas medicinais é um tema de grande importância para a saúde pública. Efeitos adversos, aumento da ação frente a outras substâncias (sinergismo) e adulterações são alguns dos problemas do uso irracional de substâncias naturais (PINHO et al., 2009; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Devido a esses problemas, se faz necessária a avaliação toxicológica de plantas para que se tenham produtos seguros ao uso da população.

Por todos os motivos apresentados anteriormente, especialmente no que diz respeito ao aumento da resistência microbiana nos últimos anos, este trabalho visa pesquisar bioativos potenciais de origem vegetal, sendo a *Spondias purpurea* a planta de escolha.

3. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial bioativo de extratos de folhas de *S. purpurea*.

3.1. Objetivos específicos

- Análise farmacognóstica das folhas de *S. purpurea*;
- Preparo dos extratos;
- Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínima;
- Determinação da Concentração Inibitória e Fungicida Mínima;
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos;
- Análise do perfil cromatográfico dos extratos;
- Avaliação da citotoxicidade.

4. Materiais e Métodos

4.1. Obtenção do material vegetal e identificação da planta

As partes aéreas da *S. purpurea* foram coletadas na cidade de São Carlos - SP. Foi confeccionada uma exsicata para que a planta fosse devidamente identificada. Tal exsicata foi registrada sob o número HRCB 66391, no herbário da Universidade Estadual Paulista – UNESP- Instituto de Biociências de Rio Claro – Departamento de Botânica, pelo Professor Dr. Júlio A. Lombardi.

O material vegetal coletado foi seco em estufa de circulação de ar a 40 ± 1 °C e, posteriormente, pulverizado em moinho de facas tipo Willye – TE-648.

Figura 5. Folhas de *S. purpurea* secas e pulverizadas.



Fonte: Autoria própria

4.2. Análise farmacognóstica das folhas de *S. purpurea*

A análise farmacognóstica foi realizada segundo os procedimentos descritos na Farmacopeia Brasileira (1988, 2010), Costa (1994) e Simões et al. (2007).

4.2.1. Determinação do pH

Para a determinação do pH da droga vegetal, foi preparada uma infusão (solução aquosa a 1 %) da droga vegetal. Em um erlenmeyer foram inseridos 99 g de água e o mesmo foi levado à chapa de aquecimento elétrico até ebulição, durante o tempo de 5 minutos. Posteriormente, pelo processo extrativo de infusão, a água fervida foi vertida sobre o 1,0 g do vegetal e o recipiente foi tampado com auxílio de vidro de relógio, ficando em infusão por 15 minutos. Após 15 minutos, a infusão foi

filtrada com auxílio de algodão e recolhida em erlenmeyer. Após resfriar, a verificação do pH foi realizada com auxílio de peagâmetro e confirmada com auxílio de papel indicador universal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988)

4.2.2. Determinação da densidade aparente não compactada

Uma proveta de 100 mL foi pesada e, posteriormente preenchida com o vegetal para nova pesagem. A densidade aparente foi determinada com os dados de volume e massa, de acordo com o seguinte cálculo:

Densidade aparente não compactada = (peso da proveta cheia – peso da proveta vazia) / 100

4.2.3. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho – INFRATEST

A perda por dessecação foi realizada em balança com infravermelho. Foram pesados 4 g de vegetal pulverizado (granulação: 32 mesh) na balança INFRATEST. O material foi aquecido a aproximadamente 110 °C por uma hora. O teste foi realizado em triplicata (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.4. Teor de cinzas totais

Inicialmente, os cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 450 °C por 30 minutos. Posteriormente, os mesmos foram resfriados em dessecador com sílica gel por 20 minutos e suas massas (taras) foram determinadas em balança analítica. Em cada cadinho foram adicionados cerca de 4,0 g do vegetal triturado, os quais foram incinerados (levados ao estado de carvão em chapa elétrica) e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla utilizando o seguinte gradiente de temperatura: 30 min a 200 °C, 60 min a 400 °C e 90 min a 600 °C. Posteriormente, os cadinhos foram deixados em dessecador por 15 minutos e, na sequência, pesados. A técnica foi repetida até massa constante. O resultado foi expresso em porcentagem em massa de cinza do material vegetal (% , m/m) e representa a média de três determinações (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.5. Testes de identificação de taninos

Primeiramente foi preparado um decocto adicionando 5,0 g do vegetal pulverizado a 100 mL de água deionizada fervente em um béquer tampado com vidro de relógio (mantido sob fervura por 15 minutos). Posteriormente, a solução extrativa foi filtrada em funil com papel de filtro, recolhendo em béquer e deixou-se esfriar até temperatura ambiente.

4.2.5.1. Reação de gelatina

Foram misturados 2 mL da solução extrativa (aquosa) com 2 gotas de HCl diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado confere um resultado positivo.

4.2.5.2. Reação com sulfato de quinina (alcaloide)

Foram adicionados 2 mL da solução extrativa, 1 gota de solução de ácido clorídrico 10 % e 15 gotas de solução de sulfato de quinina a 0,1 % em ácido sulfúrico 0,1 M em um tubo de ensaio. A formação de precipitado branco confere um resultado positivo

4.2.5.3. Reação de sais de ferro

Foram misturados 2 mL da solução extrativa com 10 mL de água destilada e 2 a 4 gotas de solução de FeCl_3 a 1% em metanol. O surgimento de coloração azul representa a presença de taninos hidrolisáveis ou verde de taninos condensados.

4.2.5.4. Reação de acetato de chumbo

Foram misturados 2 mL da solução extrativa com 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. A formação de precipitado esbranquiçado confere a presença de taninos hidrolisáveis ao vegetal.

4.2.6. Identificação de saponinas

Dois gramas do material vegetal pulverizado foram aquecidos juntamente com 25 mL de água destilada por 5 minutos em ebulição (decocção). Esfriou-se e filtrou-se com algodão para um tubo de ensaio. O tubo foi agitado vigorosamente durante 15 segundos e posteriormente deixado em repouso por 15 minutos. Se o anel de espuma formado persistir após o acréscimo de gotas de HCl diluído, o resultado é positivo para o teste.

4.2.7. Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada por meio de espectrofotometria de absorção no visível utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o teor de compostos fenólicos totais expressos como ácido gálico em extrato etanólico 100% (EtOH 100%) de *S. purpurea* (SINGLETON, ROSSI, 1965).

Primeiramente foi preparada uma solução do extrato EtOH 100% (3,0 mg/mL). Foram pesados 30,0 mg do extrato EtOH 100% seco e o mesmo foi solubilizado com cerca de 5,0 mL de metanol. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com metanol, lavando o béquer que continha a solução.

Após adição dos reagentes para o ensaio de determinação de fenólicos totais, a concentração final do extrato foi de 30 µg/mL. O preparo da solução para obtenção da curva analítica foi realizado preparando uma solução mãe de 10,0 mg de ácido gálico solubilizado em 2,5 mL de metanol. Depois disso, a solução foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL e o volume foi completado com metanol, lavando o béquer que continha a solução.

Depois de preparada a solução mãe, foi realizada uma diluição seriada adicionando 2,5 mL de solução mãe a um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume sendo completado com metanol. A diluição seriada foi realizada até completar 5 soluções de concentrações diferentes, incluindo a solução mãe. Sendo as concentrações obtidas: 2,000 mg/mL (Solução mãe), 1,000 mg/mL, 0,500 mg/mL, 0,250 mg/mL, 0,125 mg/mL.

Após adição dos reagentes para o ensaio de determinação de fenólicos totais, as concentrações finais de ácido gálico foram de 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL. Para a

realização da leitura espectrofotométrica pelo método de *Folin-Ciocalteu* foram preparadas as seguintes soluções: com auxílio de pipeta adicionou-se 0,1 mL das soluções de ácido gálico (padrões), do extrato (amostra) ou de metanol (branco) ao balão volumétrico de 10,0 mL e 0,5 mL de solução do reagente de Folin-Ciocalteu, agitando em seguida; aguardou-se 8 min. Foi adicionada 1,5 mL de solução de carbonato de cálcio 20% e o volume foi completado com metanol. Aguardou-se 2 horas e as leituras fotométricas foram realizadas em triplicata em 760 nm. Os valores foram anotados e uma curva de calibração de ácido gálico foi construída. O teor de fenólicos totais equivalentes a ácido gálico no extrato EtOH 100% foi calculado a partir da curva de calibração obtida.

4.2.7.1. Reações colorimétricas de identificação

4.2.7.1.1. Reação de Shinoda (reação de cianidina)

Uma alíquota de 2 mL da solução extrativa foi colocada em tubo de ensaio e, em seguida, foi adicionado um fragmento de magnésio metálico juntamente com gotas de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento de coloração rósea ou vermelha acompanhada de desprendimento de hidrogênio (H₂) confere um resultado positivo.

4.2.7.2. Reação de Taubock (reação oxalato-bórica)

Uma alíquota de 5 mL da solução extrativa foi evaporada em banho-maria em tubo de ensaio até a secura. O resíduo foi resfriado e umedecido com 5 gotas de acetona. Alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico foram adicionados e o tubo foi levado novamente ao aquecimento em banho-maria para secar. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e transferido para outro tubo de ensaio. A solução obtida foi exposta a luz UV (365 nm). A fluorescência amarelo-esverdeada confere um resultado positivo.

4.2.7.3. Reação com cloreto férrico

Uma alíquota de 2 mL da solução extrativa foi adicionada em tubo de ensaio e 4 gotas de solução metanólica de cloreto férrico a 2%. A solução foi diluída com 5 mL de água deionizada para visualizar o resultado. A coloração verde, amarela ou violácea, dependendo do tipo de flavonoide, confere resultado positivo para o teste.

4.2.7.4. Reação com cloreto de alumínio

Quatro áreas diferentes de pedaço de papel de filtro foram umedecidas com 2 gotas da solução extrativa. Sobre duas manchas, foi adicionada uma gota de solução etanólica de cloreto de alumínio a 5%.

O resultado foi visualizado sob luz UV (365 nm). Caso haja intensificação da fluorescência ou fluorescência verde-amarelada, trata-se de resultado positivo para o teste.

4.2.8. Extração e identificação de antraquinonas

4.2.8.1. Antraquinonas livres

A solução extrativa foi preparada da seguinte maneira: 1,0 g da droga vegetal pulverizada com 10,0 mL de éter etílico foi agitada em um béquer e posteriormente a solução foi filtrada em um funil comum com papel de filtro para tubo de ensaio. O material vegetal retido no papel de filtro não foi descartado.

4.2.8.1.1. Reação de Borntrager

Uma alíquota de 1,0 mL de amônia diluída foi adicionada ao tubo de ensaio contendo a solução extrativa e foi agitada. A formação de camada aquosa rósea confere resultado.

4.2.8.2. Glicosídeos antraquinônicos

Uma alíquota de 20 mL de água deionizada foi adicionada ao pó residual seco do item 01 em béquer, que foi levado a fervura por 5 minutos em banho-maria, em seguida foi resfriado e filtrado.

4.2.8.2.1. Reação de Borntrager

Foi adicionado ao filtrado 10 mL de ácido clorídrico SR e 3 mL de água oxigenada 30% e fervido por 5 minutos (hidrólise dos glicosídeos). Após esfriar, a solução extrativa hidrolisada foi filtrada em funil comum com papel de filtro para funil de separação e realizou-se duas etapas de partição líquido-líquido com 5 mL de éter etílico cada. As fases etéreas obtidas foram unidas em tubo de ensaio, na qual adicionou-se 2 mL de amônia diluída e foi agitada. A camada aquosa torna-se rósea quando o resultado é positivo.

4.2.9. Extração e identificação de alcaloides

5,0 g de droga vegetal pulverizada foram inseridas em um gral e alcalinizada com volume de solução de carbonato de sódio a 10 % suficiente para intumescer o material vegetal. O material vegetal foi transferido para erlenmeyer (125 mL) e 50,0 mL de clorofórmio foram adicionados para realizar a extração, agitando com auxílio de bastão de vidro por cerca de 5 minutos. A solução extrativa foi filtrada com funil comum e papel de filtro e o filtrado foi recolhido diretamente em um funil de separação. 10 mL de solução de ácido clorídrico 2 % foram adicionados à solução extrativa e agitou-se, cuidadosamente, o funil de separação, deixando em repouso até separação completa das fases.

A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa ácida foi recolhida em béquer, a qual contém os alcaloides na forma de sal. Essa fase foi utilizada para fazer as reações de caracterização com os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand, colocando uma gota do reagente ao lado de outra da solução extrativa aquosa ácida em uma lâmina de microscópio e depois juntando-as. A formação de precipitado/turvação da solução extrativa, confere resultado positivo aos testes.

4.3. Obtenção dos extratos

O material vegetal após pulverização foi submetido à extração com os solventes etanol, hexano e diclorometano, separadamente, na proporção 1:10 (m/v) pela técnica de maceração durante sete dias, seguida de filtração, concentração em evaporador rotativo a 40°C, obtendo-se os extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico (DCM) brutos (ALENCAR et al., 2015). Posteriormente, nas mesmas

condições e proporções, foi feito o extrato hidroetanólico 70% (EtOH 70%) com a finalidade de análise do perfil cromatográfico do mesmo.

4.4. Microrganismos e Manutenção

Culturas dos fungos e bactérias pertencentes ao cepário do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica foram utilizadas no presente estudo. As cepas fúngicas foram mantidas em meio solidificado PDA (batata-dextrose-água) e submetidas a repiques periódicos a cada 30 dias. As linhagens bacterianas foram mantidas em água Mueller-Hinton.

As linhagens utilizadas nesse estudo estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Linhagens fúngicas avaliadas neste trabalho

Espécie	Registro/Origem
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 750
<i>Trichophyton rubrum</i>	TR1-isolado clínico
<i>Microsporum canis</i>	Isolado clínico

Tabela 2. Linhagens bacterianas avaliadas neste trabalho

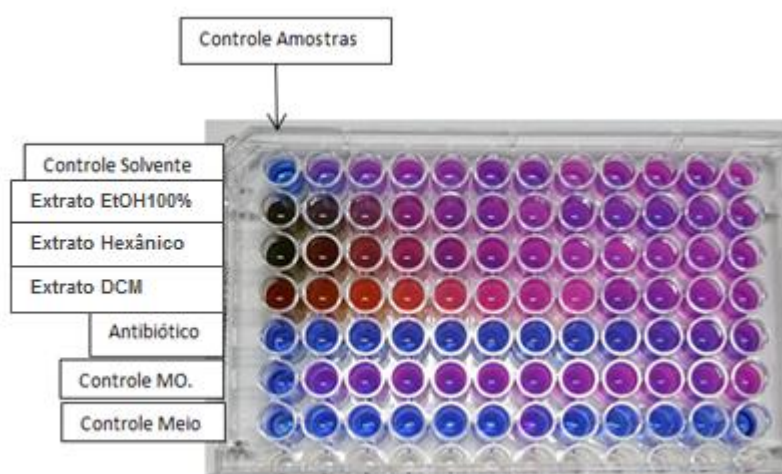
Espécie	Registro/Origem
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Salmonella setubal</i>	ATCC 19196
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372

4.5. Determinação da atividade antimicrobiana

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a metodologia segundo o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) norma M7-A9 para bactérias (CLSI, 2012), norma M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008a) e M38-A2 para fungos filamentosos (CLSI, 2008b). Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Em todos os poços foram colocados 100 µL de BHI para bactérias e RPMI para fungos. Os extratos foram diluídos na concentração de 1:5 (extrato:meio de cultura) em BHI ou RPMI a partir da solução estoque de 200 mg/mL, de modo que fosse obtida uma avaliação na faixa de 5000 µg/mL a 4,88 µg/mL. Foram pipetados 100 µL de cada uma destas soluções nos respectivos poços da primeira coluna da microplaca (linhas 1 a 3). Um poço foi utilizado para adição de 100 µL de DMSO:Tween 80 em BHI ou RPMI (1:5; v/v) para controle do solvente e em outro poço foram colocados 100 µL da solução de ampicilina na concentração de 12,5 µg/mL para bactérias e anfotericina B e fluconazol nas concentrações de 16 e 64 µg/mL, respectivamente, para *Candida* spp e fungos filamentosos. Foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL do poço anterior para o poço subsequente. Uma linha foi utilizada para controle positivo do crescimento bacteriano e para controle negativo de esterilidade do meio. Em outra coluna foram colocados 100 µL da solução teste dos extratos para controle microbiológico destes. A todos os poços, exceto os de controle de esterilidade do meio e microbiológico dos extratos, foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland, e os fungos/leveduras na concentração de 1×10^4 células/mL para leveduras ou 1×10^3 células/mL para fungos. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C para bactérias, 35,5 °C para leveduras por 24 horas e fungos filamentosos por 7 dias a 28°C. Em seguida, foram realizadas subculturas de cada microplaca, utilizando ágar Müeller Hinton para bactérias, ágar Sabouraud dextrose para leveduras e ágar PDA para fungos filamentosos em placa de Petri de 12 cm de diâmetro, para determinação do valor da concentração bactericida ou fungicida mínima. As placas de Petri foram incubadas por 24 horas a 37 °C para bactérias e 35,5 °C para leveduras, e por 7 dias a 28°C para fungos filamentosos. A concentração bactericida ou fungicida mínima foi observada pela ausência ou presença de crescimento microbiano.

Após a realização das subculturas de cada microplaca, foi realizada a revelação das mesmas pela adição de 30 μ L de uma solução aquosa de 0,01 % de resazurina, e foi determinada como concentração inibitória mínima a menor concentração que inibiu o crescimento microbiano. Os testes foram realizados em triplicata. Na Figura 6 pode ser observado um esquema ilustrativo da determinação da CIM.

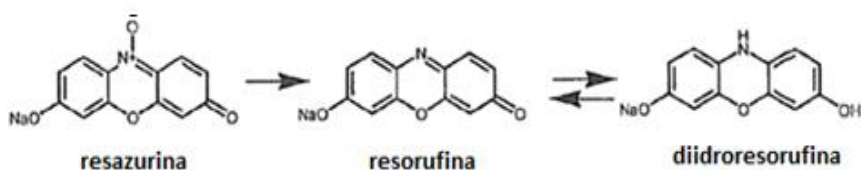
Figura 6. CIM ilustrativo realizado para o microrganismo *S. aureus* após revelação com resazurina.



Fonte: Autoria própria

A reação de resazurina, conversão da mesma em resorufina, mediada pela desidrogenase, está representada pela Figura 7, a qual mostra as fórmulas estruturais de resazurina - azul e não fluorescente, o qual é convertido por redução em resorufina - rosa e altamente fluorescente e por nova redução em diidroresorufina - incolor e não fluorescente (UNKRIG et al., 2012; O'BRIEN et al., 2000; GUERIN et al., 2001).

Figura 7. Reação de redução da resazurina a resorufina e diidroresorufina.



Fonte: Guerin et al., 2001.

4.6. Análise do perfil cromatográfico

4.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O pré-tratamento das amostras foi realizado por extração em fase sólida (EFS) em cartucho de extração Oasis® HLB (1cc/30mg), condicionado primeiramente com 1 mL de metanol grau HPLC 100% da marca Hoyneywell, seguido de 1 mL de água ultrapura. Foram dissolvidos 20 mg de cada extrato em 1,5 mL de fase móvel e aplicado no cartucho, em seguida foi adicionado 1 mL de metanol 5% em água, posteriormente eluido com 1 mL de metanol. Em seguida foram filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®).

Os padrões (ácido cafeico, ácido gálico, ácido elágico, rutina e quercetina) foram diluídos em fase móvel na concentração de 0,5 mg/mL, em seguida foram filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®).

O perfil cromatográfico foi avaliado utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu modelo 20A, com *loop* de injeção de 20 µL, bomba quaternária LC-20AT, sistema de controle CBM-20A, detector UV/VIS de comprimento de onda variável SPD-M20A. A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm) da marca Kromasil®, em forno com temperatura de 40°C. O gradiente exploratório empregado no sistema binário água (A) metanol (B), variou a concentração do metanol de 5 a 100% durante sessenta minutos, com vazão de 1,0 mL/min (SNYDER; DOLAN, 1996).

4.7. Avaliação de atividade antioxidante

O potencial de atividade antioxidante dos extratos de *S. purpurea* foi determinado baseado na atividade sequestradora de radicais livres da solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (SCHERER; GODOY, 2009).

Como padrões antioxidantes para a realização do teste, foram utilizados a quercetina, rutina, ácido gálico, e vitamina C na concentração de 250 µg/mL em metanol e diluições dos extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico de folhas pulverizadas de *S. purpurea* na concentração de 250 µg/mL. A 1 mL das soluções de amostra foram adicionados 2,5 mL da solução de DPPH 0,004% em metanol. Essas soluções foram agitadas em agitador mecânico e mantidas em local escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi utilizada uma solução de 1 mL de metanol e 2,5 mL de solução de DPPH como controle negativo. Como branco, foi utilizado o metanol puro. Posteriormente, a leitura foi realizada a 517 nm, em espectrofotômetro Bel Photonics, modelo UV – M51, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A atividade anti-radicalar foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH, segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ Redução do DPPH} = [(Ad - Aa) \times 100] / Ad$$

Sendo: Ad = absorvância da solução de DPPH (controle negativo); Aa = absorvância da amostra.

Os resultados foram expressos através da porcentagem de descoloração do DPPH, pela média de três determinações, mais ou menos os desvios padrões. Para a análise estatística, foi realizada a análise de variância (ANOVA) com $p < 0,05$.

4.8. Avaliação da Citotoxicidade

Para a realização da avaliação de citotoxicidade foi incubada uma suspensão queratinócitos humanos HaCaT em microplaca de 96 poços com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

Após a formação de tapete celular, foi removido o meio e novo meio foi adicionado. Amostras do extrato EtOH 100%, hexânico e diclorometânico de *S. purpurea* foram adicionadas em concentrações finais de 0,07 mg/mL a 10,00 mg/mL, incubando, novamente, a 37 °C por 24 h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, foi adicionado o corante Alamar Blue diluído e a microplaca foi incubada em estufa sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C para leitura espectrofotométrica em 570 e 600 nm, após 5 a 24 horas. Foram realizados testes de controle do solvente, controle negativo e controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata (OHNO; MIYAJIMA; SUNOUCHI, 1998; O'BRIEN et al., 2000; JEONG; HUH; SHING, 2015).

Para a realização da avaliação de citotoxicidade dos extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico frente a células tumorais de fígado, HepG2, e macrófagos murinos, J774, uma suspensão de tais células foi incubada em microplaca de 96 poços com meio específico, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as culturas foram fixadas com ácido tricloroacético 50% por 1 hora e coradas durante 30 minutos com Sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (p/v) dissolvido em ácido acético a 1%. Foram realizadas quatro lavagens com ácido acético a 1% para a remoção do corante que não se ligou, já o corante ligado à proteína foi extraído com Tris base [tris (hidroximetil) aminometano 10 mM para determinar a densidade óptica. A medida espectrofotométrica da absorvância foi realizada em um comprimento de onda de 565 nm e 690 nm. (SKEHAN et al., 1990)

Os cálculos de viabilidade celular foram realizados com o *software* Gen5™ *Data Analysis*.

4.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média de três determinações ± os desvios padrões dos valores obtidos, utilizando o programa Microsoft Excel 2010® e apresentados na forma de tabelas e gráficos. Análises estatísticas foram feitas por análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelos testes paramétricos de Tukey, com $p < 0,05$, utilizando o *software* Minitab®.

5. Resultados

5.1. Rendimento dos extratos de *S. purpurea*

Os extratos obtidos de folhas de *S. purpurea* apresentaram os rendimentos 8,72%, 11,02%, 2,84%, 3,62% para os extratos EtOH 100%, EtOH 70%, hexânico e diclorometânico, respectivamente.

5.2. Avaliação farmacognóstica e de *S. purpurea*

Os testes de controle de qualidade realizados com as folhas secas e pulverizadas de *S. purpurea* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaios de controle de qualidade de *S. purpurea*

Análise	Resultado $\pm$ DP
Densidade aparente (g/mL)	23,17 $\pm$ 0,19
pH	4,12 $\pm$ 0,01
Cinzas totais	6,94 % $\pm$ 0,07
Perda por dessecação	10,2 % $\pm$ 0,15

DP: desvio padrão

5.2.1. Identificação de grupos ativos

A triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Reações de identificação classe de substâncias nas folhas de *S. purpurea*

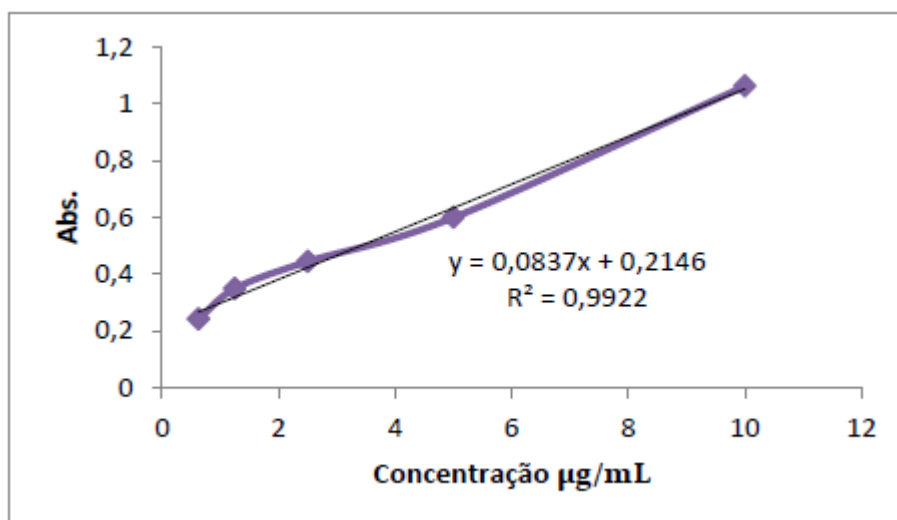
Grupos ativos	Reação	Resultado
Saponinas	Formação de espuma	+
Taninos	Gelatina	+
	Quinina	-
	Sais de Ferro	+
	Acetato de chumbo	+
Alcaloides	Dragendorff	+
	Bouchardat	+
	Mayer	+
	Bertrand	+
Antraquinonas	Livres	-
	Borntrager	-
Flavonoides	Cianidina	-
	Cloreto férrico	+
	Cloreto de alumínio	+
	Reação de Taubock	-
Fenóis totais		+

(-) Negativo (+) positivo

Foi caracterizada a presença de alcaloides, flavonoides, taninos, fenóis e saponinas.

5.2.2. Determinação de fenóis totais

A determinação de fenóis totais para o extrato EtOH 100% de folhas de *S. purpurea*, foi obtida por meio de curva analítica (Figura 8) de ácido gálico construída a partir das médias das absorvâncias encontradas, conforme Tabela 5.

Figura 8. Curva analítica da solução padrão de ácido gálico

O valor do coeficiente de correlação linear, $R^2=0,9922$, foi próximo a 1,0, o que confere a linearidade para o método. A absorvâncias obtidas para a amostra de extrato etanólico foram aplicadas na fórmula dada pela curva analítica acima, sendo possível verificar que a concentração de fenóis média no extrato é de 2,071 µg/mL em solução extrativa equivalentes a ácido gálico.

O teor médio de fenóis totais no extrato etanólico foi de aproximadamente 6,9% (69,03 mgEAG/g) como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Fenóis totais (FT) do extrato EtOH 100% de folhas de *S. purpurea*

Concentração (µg/mL)	Absorvância (± DP)	CFT (mgEQAG/g) ± DP	TFT (%)
30	0,388 ± 0,011	69,05 ± 4,523	6,9 ± 0,452

CFT: concentração de fenóis totais (mgEQAG/g), mg de equivalentes em ácido gálico para gramas de extrato; TFT: teor de fenóis totais (%), DP: desvio-padrão.

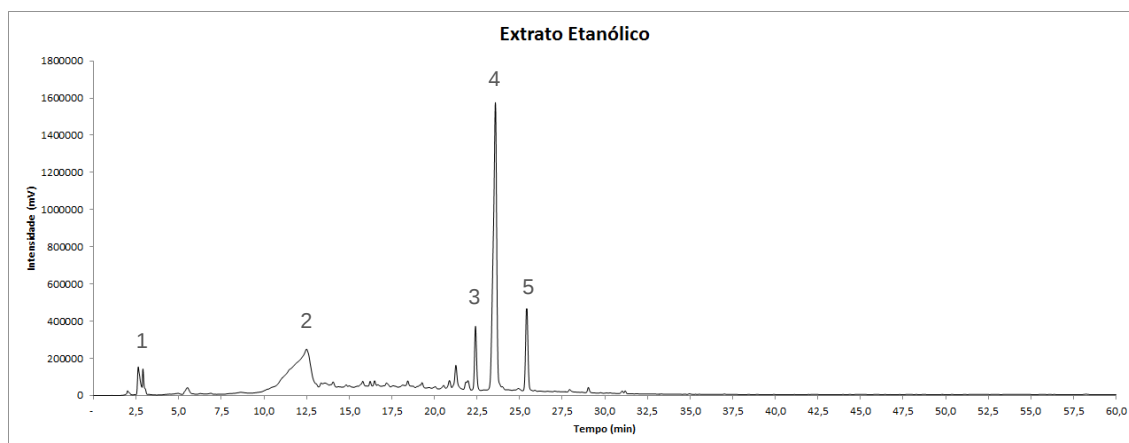
5.3. Análise cromatográfica (CLAE-DAD)

5.3.1. Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos

Foram realizadas diversas análises por CLAE-DAD para cada extrato, em diferentes comprimentos de onda e estão apresentadas nas figuras 09, 10, 11 e 12 as melhores condições encontradas.

Podemos notar na Figura 9 que o extrato EtOH 100% apresentou 05 picos majoritários em 2,62 minutos (1), 12,49 minutos (2), 22,41 minutos (3), 23,61 minutos (4) e em 25,41 minutos (5).

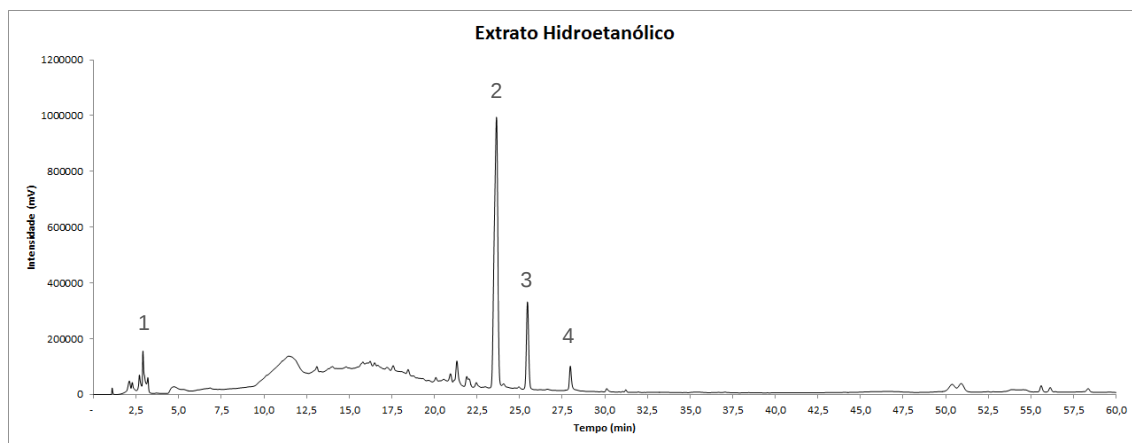
Figura 9. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato EtOH 100% de folhas de *S. purpurea* diluído em metanol 95% (v/v).



Coluna Kromasil® C-18 (250 x 4,6 mm x 5µm) HPLC (Shimadzu®, modelo LC-20 AT), vazão 1,0 mL / minuto, λ = 254 nm (analítico, gradiente exploratório 5-100% MeOH, 60 minutos)

O extrato EtOH 70% (Figura 10) apresentou 04 picos majoritários em 2,89 minutos (1), 23,64 minutos (2), 25,46 minutos (3) e em 27,97 minutos (4).

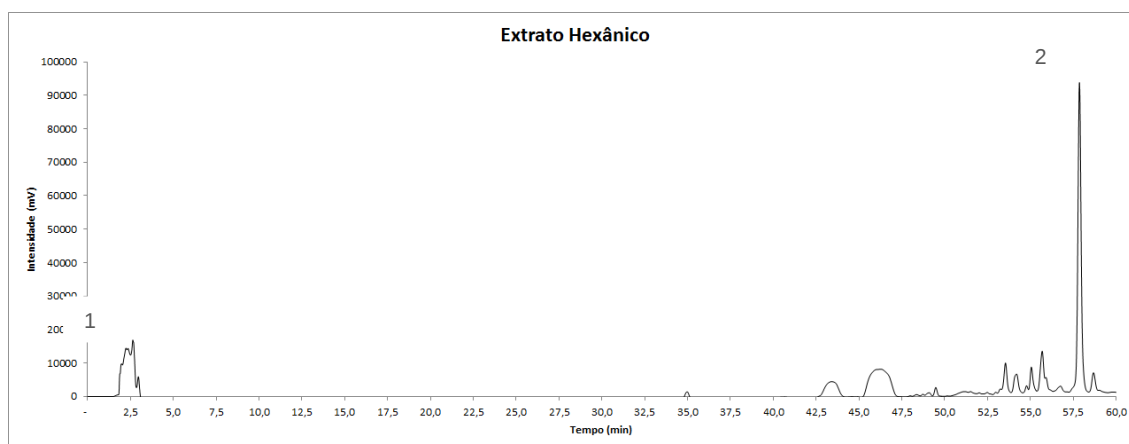
Figura 10. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato EtOH 70% de folhas de *S. purpurea* diluído em metanol 95% (v/v).



Coluna Kromasil® C-18 (250 x 4,6 mm x 5µm) HPLC (Shimadzu®, modelo LC-20 AT), vazão 1,0 mL / minuto, λ = 254 nm (analítico, gradiente exploratório 5-100% MeOH, 60 minutos)

O extrato hexânico (Figura 11) apresentou 02 picos majoritários em 2,54 minutos (1) e em 57,95 minutos (2).

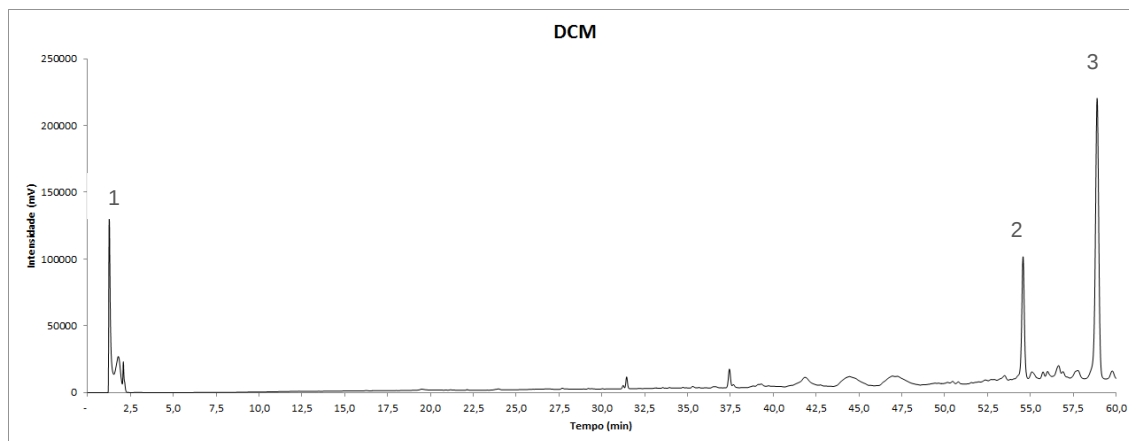
Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato hexânico folhas de *S. purpurea* diluído em metanol 95% (v/v).



Coluna Kromasil® C-18 (250 x 4,6 mm x 5µm) HPLC (Shimadzu®, modelo LC-20 AT), vazão 1,0 mL / minuto, λ = 254 nm (analítico, gradiente exploratório 5-100% MeOH, 60 minutos)

O extrato DCM (Figura 12) apresentou 03 picos majoritários em 1,35 minutos (1), 54,57 minutos (2), e em 58,89 minutos (3).

Figura 12. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do Extrato DCM de folhas de *S. purpurea* diluído em metanol 95% (v/v).

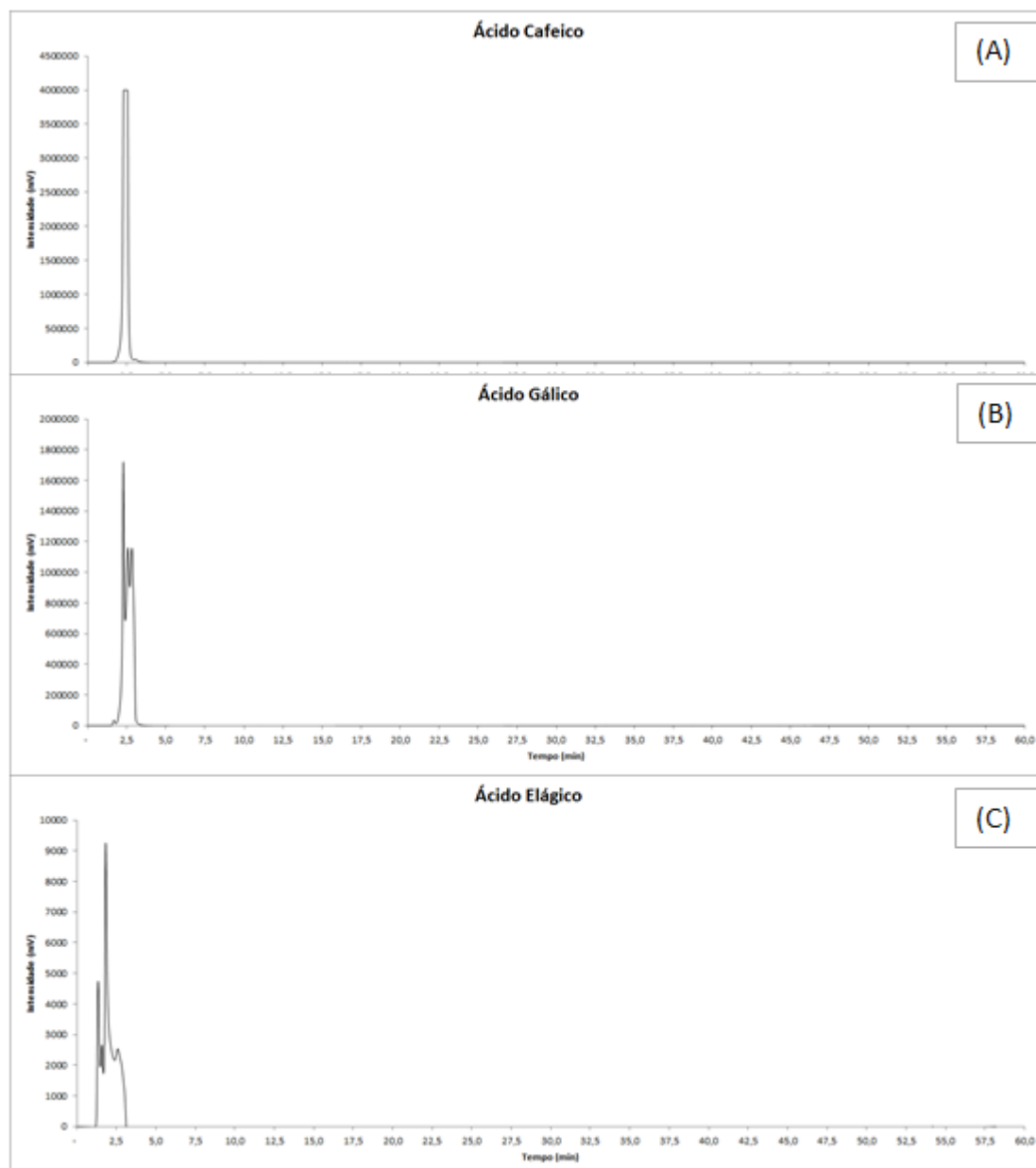


Coluna Kromasil® C-18 (250 x 4,6 mm x 5µm) HPLC (Shimadzu®, modelo LC-20 AT), vazão 1,0 mL / minuto, λ = 254 nm (analítico, gradiente exploratório 5-100% MeOH, 60 minutos).

5.3.2. Perfil cromatográfico dos padrões utilizados

As figuras 13 e 14 mostram os cromatogramas dos padrões utilizados para análise dos perfis cromatográficos dos extratos estudados neste trabalho. Na Figura 13 podemos observar os picos referentes a ácido cafeico, ácido gálico e ácido elágico nos tempos de retenção 2,41; 2,57 e 1,82 minutos, respectivamente.

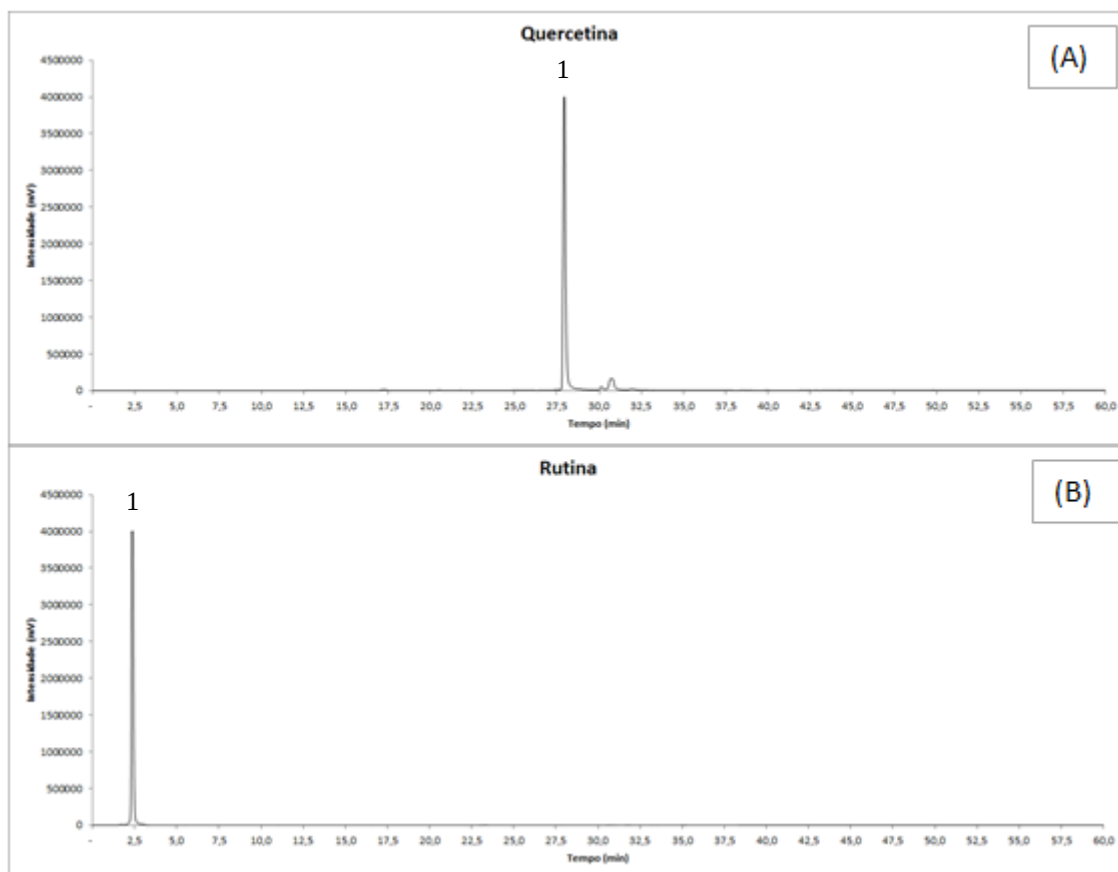
Figura 13. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do padrões de ácidos fenólicos: Ácido cafeico (A), ácido gálico (B) e ácido elágico (C), diluídos em metanol 95% (v/v).



Coluna Kromasil® C-18 (250 x 4,6 mm x 5µm) HPLC (Shimadzu®, modelo LC-20 AT), vazão 1,0 mL / minuto, λ = 254 nm (analítico, gradiente exploratório 5-100% MeOH, 60 minutos).

Na Figura 14 podemos observar os picos referentes a quercetina e rutina nos tempos de retenção 27,94 e 2,35 minutos, respectivamente

Figura 14. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD do padrões de flavonóides, quercetina(A) e rutina (B), diluídos em metanol 95% (v/v).

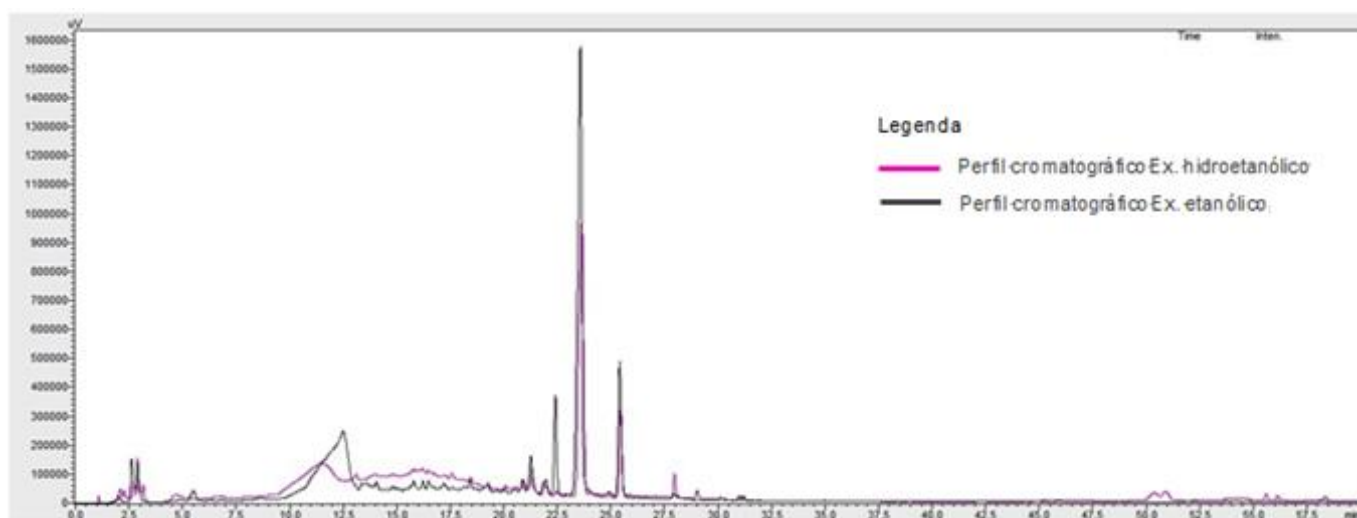


Coluna Kromasil® C-18 (250 x 4,6 mm x 5µm) HPLC (Shimadzu®, modelo LC-20 AT), vazão 1,0 mL / minuto, λ = 254 nm (analítico, gradiente exploratório 5-100% MeOH, 60 minutos).

5.3.3. Análise comparativa entre extratos EtOH 100% e EtOH 70%

Conforme mostra a figura 15, é possível observar semelhança entre os perfis cromatográficos dos extratos EtOH 100% e EtOH 70%.

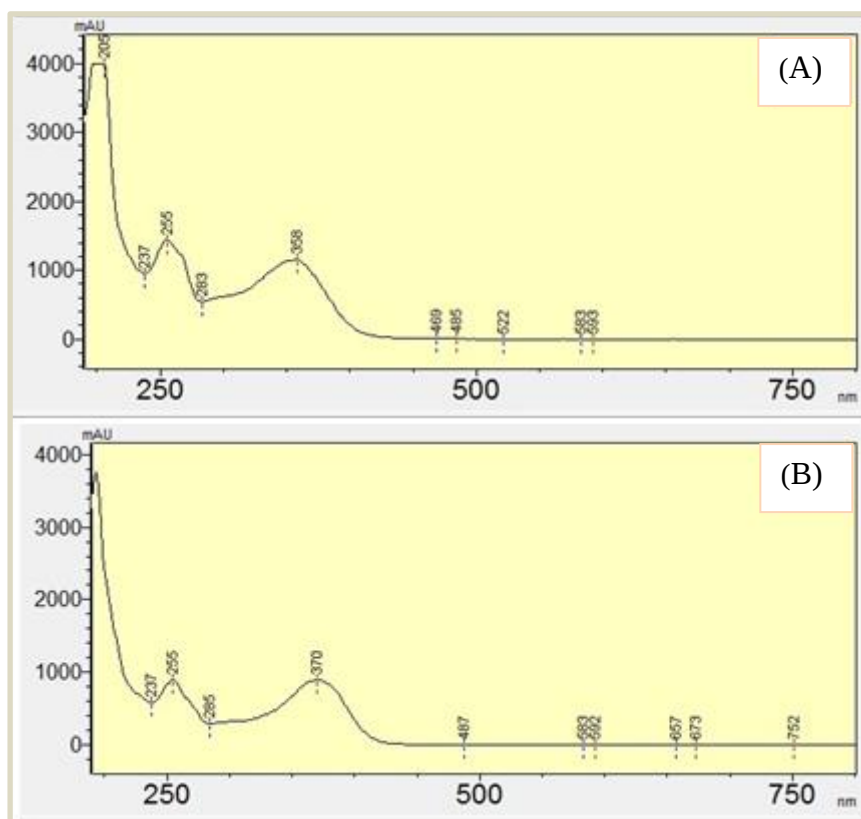
Figura 15. Sobreposição dos perfis cromatográficos representados nas figuras 9 e 10.



5.3.4. Varredura CLAE-DAD

Por meio da varredura CLAE-DAD dos picos obtidos no perfil cromatográfico do extrato EtOH 100%, foi possível identificar a presença de um pico (pico 4, tempo de retenção 23,61 minutos) semelhante ao espectro de flavonóides, conforme mostra a figura 16. Nos demais extratos, hexânico e diclorometânico, não foram encontrados picos com a mesma característica.

Figura 16. Espectro na região do ultravioleta do extrato EtOH 100% no tempo de retenção 23,61 (A) minutos e do padrão quercetina (B), obtidos por meio de CLAE-DAD.



5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos frente às linhagens bacterianas, de leveduras e dermatófitos estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de folhas de *S. purpurea*

	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. setubal</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Extrato	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
EtOH 100%								
Extrato hexânico	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
Extrato DCM	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
ampicilina	6,25	12,5	0,097	0,195	0,097	0,195	3,12	6,25

Resultados expressos em µg/mL. Extrato DCM: Extrato diclorometânico; Extrato EtOH 100%: Extrato etanólico 100%.

Pode-se observar na Tabela 6 que nenhum extrato de *S. purpurea* mostrou atividade antibacteriana até a concentração máxima avaliada para as cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. setubal*.

Tabela 7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de folhas de *S. purpurea*.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Extrato EtOH 100%	> 5000	> 5000	312,5	5000	78,125	5000	39	> 5000	> 5000	> 5000
Extrato hexânico	> 5000	> 5000	> 5000	5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
Extrato DCM	> 5000	> 5000	> 5000	5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000
fluconazol	50	50	640	320	80	320	40	5	10	10
anfotericina B	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,0625	0,125	0,25	0,25

Resultados expressos em µg/mL. Extrato DCM: Extrato diclorometânico; Extrato EtOH 100%: Extrato etanólico 100%.

Podemos observar na Tabela 7 que os melhores resultados de CIM foram obtidos para *C. glabrata* e *C. tropicalis* seguido de *C. krusei* para o extrato etanólico. No entanto, o mesmo não demonstrou atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os extratos hexânico e DCM não demonstraram atividade antimicrobiana frente às espécies de *Candida* estudadas neste trabalho.

Tabela 8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de folhas de *S. purpurea*

	<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>
	CIM	
Extrato EtOH 100%	> 5000	625
Extrato Hexânico	19,5	2500
Extrato DCM	> 5000	625
Fluconazol	32	5
Anfotericina B	0,125	0,0312

Resultados expressos em µg/mL. Extrato DCM: Extrato diclorometânico; Extrato EtOH 100%: Extrato etanólico 100%.

Podemos notar na Tabela 8, que frente a *T. rubrum* os extratos EtOH 100% e diclorometânico mostraram atividade inibitória moderada e o extrato hexânico mostrou atividade tanto frente a *T. rubrum*, quanto a *M. canis*.

5.5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

Testes de atividade antioxidante dos extratos de folhas pulverizadas de *S. purpurea* foram realizados. É possível observar que o extrato EtOH 100% apresentou percentual de atividade antioxidante semelhante aos percentuais encontrados para os padrões utilizados, conforme mostra a Tabela 9.

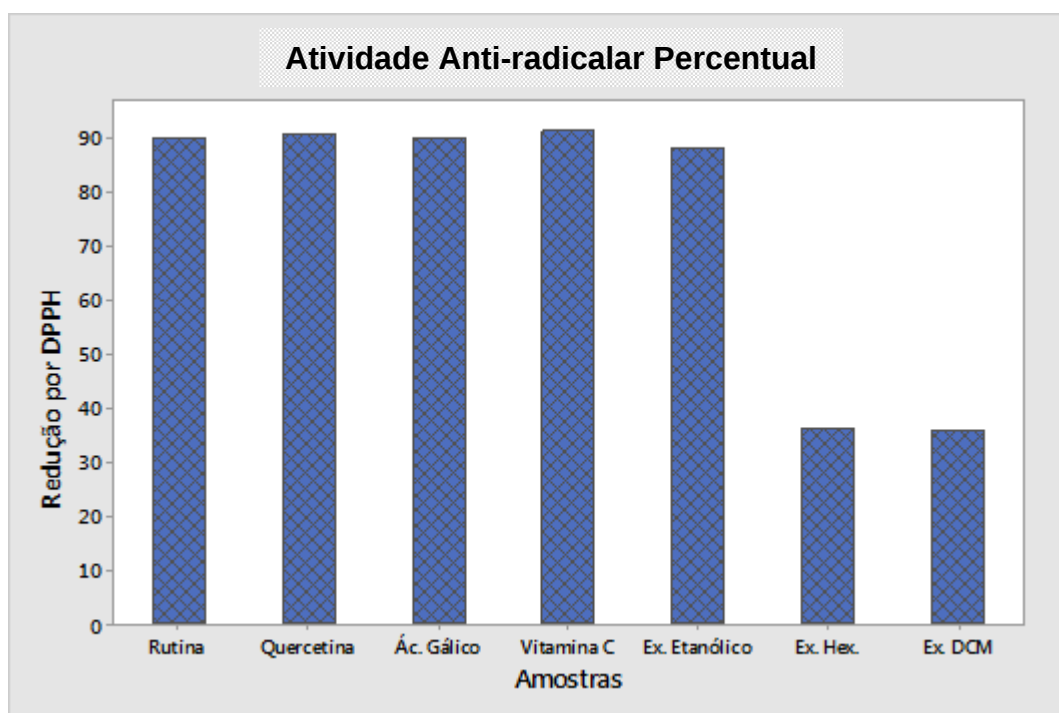
Tabela 9. Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrões e extratos de *S. purpurea* pelo método de DPPH.

Amostras	Abs. (Média)	Redução por DPPH (%) $\pm$ DP
Rutina	0,084 ^B	89,8 ^B $\pm$ 0,07
Quercetina	0,077 ^B	90,7 ^B $\pm$ 0,21
Ác. Gálico	0,084 ^B	89,8 ^B $\pm$ 0,07
Vitamina C	0,071 ^B	91,5 ^B $\pm$ 0,14
Ex. EtOH 100%	0,099 ^B	88,0 ^B $\pm$ 0,25
Ex. Hex.	0,524 ^A	35,3 ^A $\pm$ 2,93
Ex. DCM	0,532 ^A	35,8 ^A $\pm$ 2,44

Ex. EtOH 100%: Extrato etanólico 100%; Ex. Hex.: Extrato Hexânico; Ex. DCM: Extrato Diclorometânico. Análise estatística realizada pelo método de Tukey com $p < 0,05$. Os valores que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes. Análise realizada pelo Software Minitab®. DP: desvio padrão.

Os outros extratos apresentaram menor atividade antioxidante avaliando pelo método de DPPH, como mostra a Figura 17.

Figura 17. Atividade anti-radicalar percentual dos extratos obtidos de *S. purpurea* e dos padrões utilizados.



5.6. Avaliação da citotoxicidade

5.6.1. Viabilidade de células HaCat

Os extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico, estão apresentados, respectivamente, na Tabela 10 e nas figuras 18, 19 e 20. O extrato EtOH 100% não apresentou citotoxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 5,00 mg/mL, no entanto os extratos hexânico e diclorometânico apresentaram citotoxicidades relevantes.

Tabela 10. Viabilidade celular de células HaCat frente aos extratos EtOH 100%, hexânico e DCM obtidos de folhas pulverizadas de *S. purpurea*.

Células HaCat			
Concentração (mg/mL)	Ex EtOH 100% VC (%) $\pm$ DP	Ex Hexânico VC (%) $\pm$ DP	Ex DCM VC (%) $\pm$ DP
10,00	45	12	30
5,00	53	12	20
0,50	104	11	16
1,25	105	15	30
0,62	110	23	105
0,31	108	42	108
0,15	108	104	105
0,07	107	105	97

Ex. EtOH 100%: Extrato etanólico 100%; Ex. Hex.: Extrato Hexânico; Ex. DCM: Extrato Diclorometânico. VC: Viabilidade Celular. DP: Desvio Padrão

Figura 18. Percentual de viabilidade de células HaCat em presença de extrato EtOH 100% de *S. purpurea*.

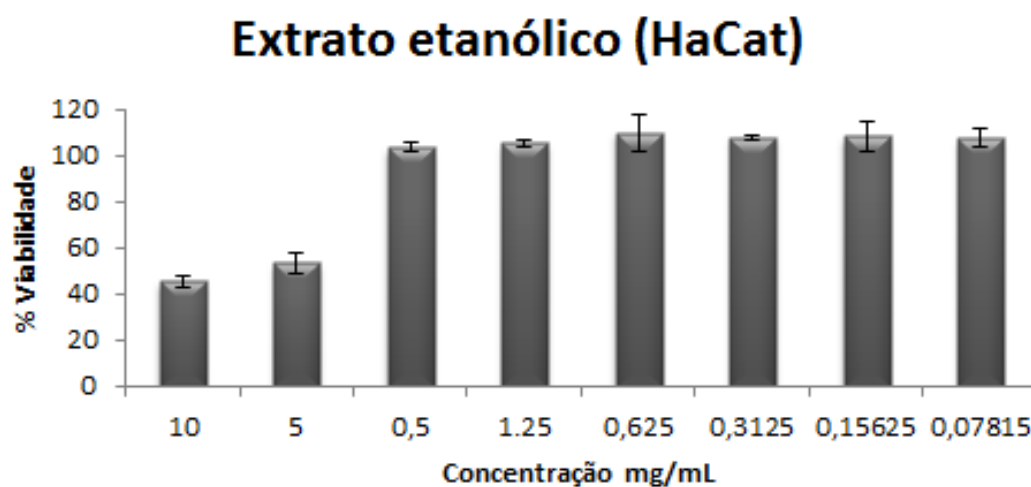


Figura 19. Percentual de viabilidade de células HaCat em presença de extrato hexânico *S. purpurea*

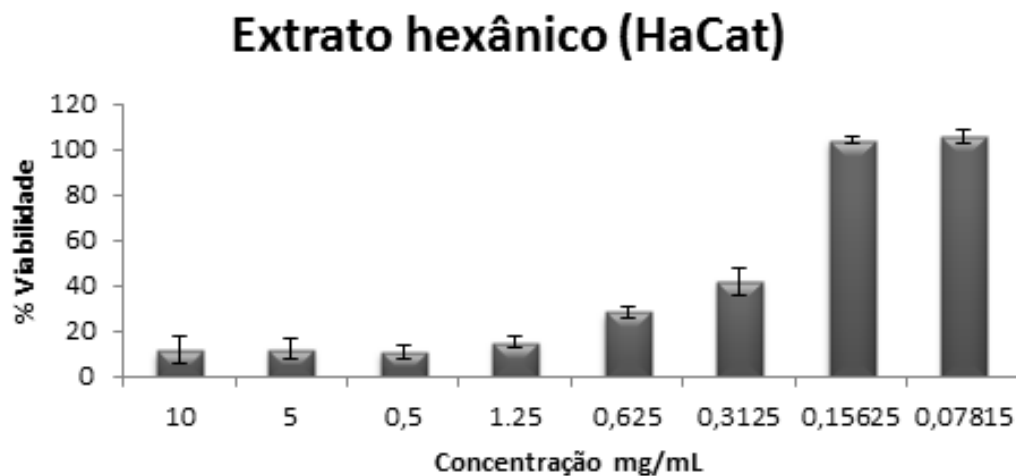
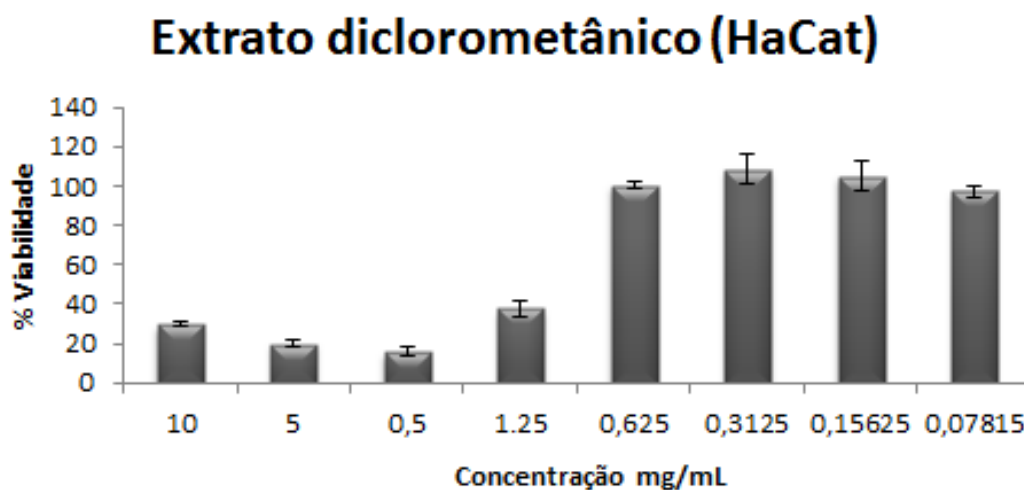


Figura 20. Percentual de viabilidade de células HaCat em presença de extrato diclorometânico *S. purpurea*.



5.6.2. Viabilidade de células J774

Os extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico, estão apresentados, respectivamente, na Tabela 11 e nas Figuras 21, 22 e 23. Os extratos EtOH 100% e DCM não apresentaram citotoxicidades significativas em nenhuma das concentrações estudadas, enquanto que o extrato hexânico não demonstrou citotoxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 1,25 mg/mL, conforme mostram os dados abaixo.

Tabela 11. Viabilidade celular de macrófagos murinos J774 frente aos extratos etanólico, hexânico e DCM obtidos de folhas pulverizadas de *S. purpurea*.

Células J774			
Concentração (mg/mL)	Ex EtOH 100% VC (%)	Ex Hexânico VC (%)	Ex DCM VC (%)
10,00	100	33	52
5,00	105	38	58
0,50	106	46	73
1,25	107	57	101
0,62	107	79	105
0,31	108	105	106
0,15	107	106	107
0,07	105	104	106

Ex. EtOH 100%: Extrato etanólico 100%; Ex. Hex.: Extrato Hexânico; Ex. DCM: Extrato Diclorometânico. VC: Viabilidade Celular

Figura 21. Percentual de viabilidade de células J774 em presença de extrato EtOH 100% de *S. purpurea*.

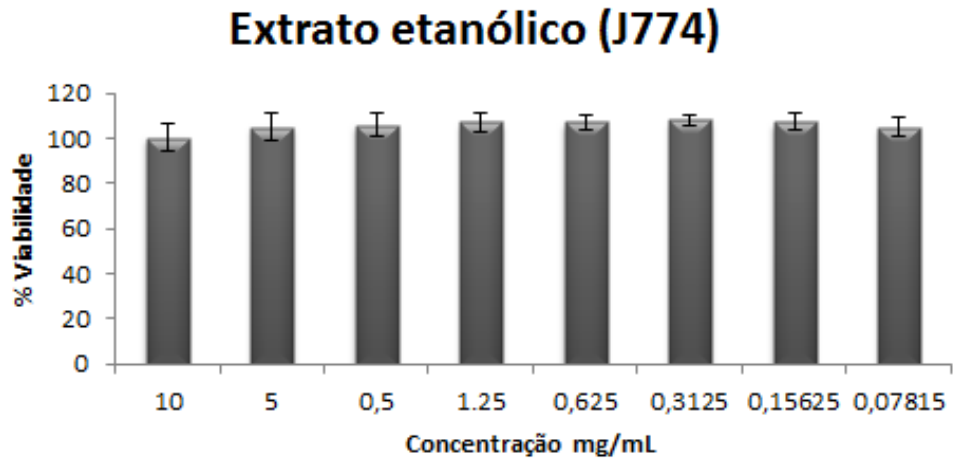


Figura 22. Percentual de viabilidade de células J774 em presença de extrato hexânico de *S. purpurea*.

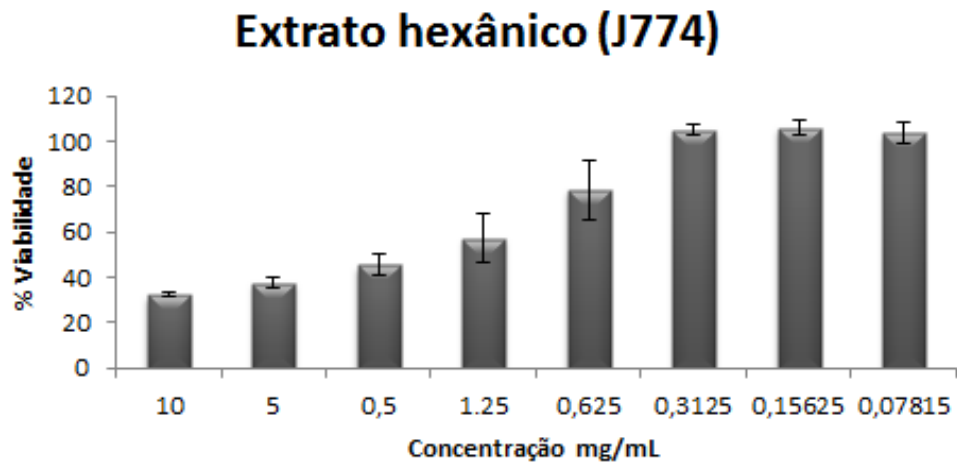
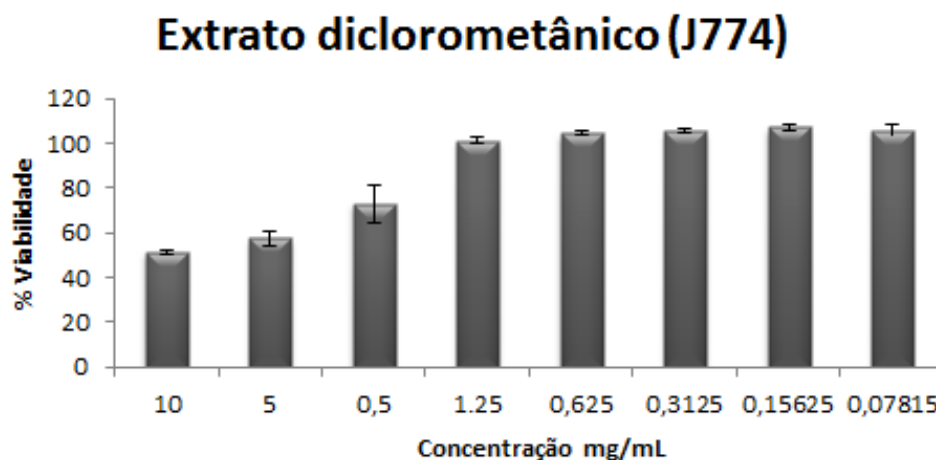


Figura 23. Percentual de viabilidade de células J774 em presença de extrato diclorometânico de *S. purpurea*.



5.6.3. Vialibidade de células HepG2

Os extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico, estão apresentados, respectivamente, na tabela 12 e nas figuras 24, 25 e 26. Pode-se observar que o extrato EtOH 100% não apresentou citotoxicidade significativa em nenhuma das concentrações estudadas. O extratos hexânico e DCM não apresentaram citotoxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 1,25 mg/mL.

Tabela 12. Viabilidade celular de células tumorais de fígado HepG2 frente ao extratos etanólico, hexânico e DCM obtidos de folhas pulverizadas de *S. purpurea*.

Células HepG2			
Concentração (mg/mL)	Ex EtOH 100% VC (%)	Ex Hexânico VC (%)	Ex DCM VC (%)
10	91	51	40
5	93	41	31
0,5	97	46	46
1,25	100	79	88
0,625	103	96	99
0,3125	104	99	100
0,15625	105	102	102
0,07815	102	101	99

Ex. EtOH 100%: Extrato etanólico 100%; Ex. Hex.: Extrato Hexânico; Ex. DCM: Extrato Diclorometânico. VC: Viabilidade Celular

Figura 24. Percentual de viabilidade de células HepG2 em presença de extrato EtOH 100% de *S. purpurea*.

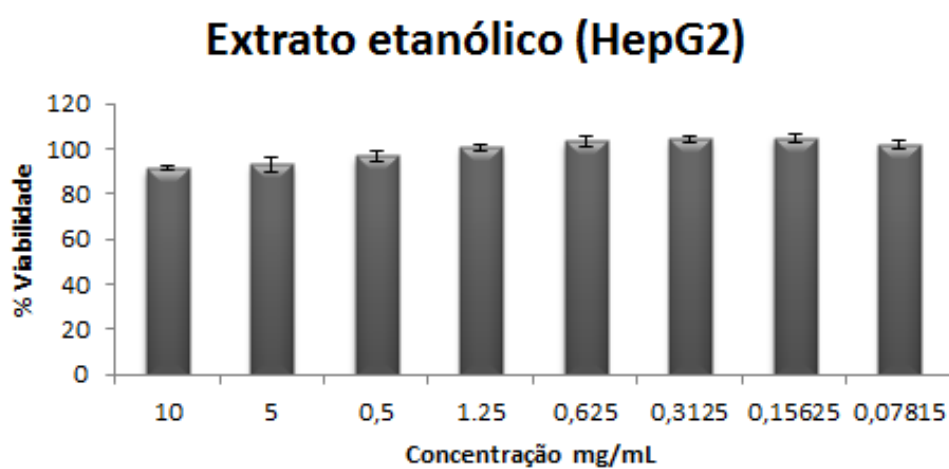


Figura 25. Percentual de viabilidade de células HepG2 em presença de extrato hexânico de *S. purpurea*.

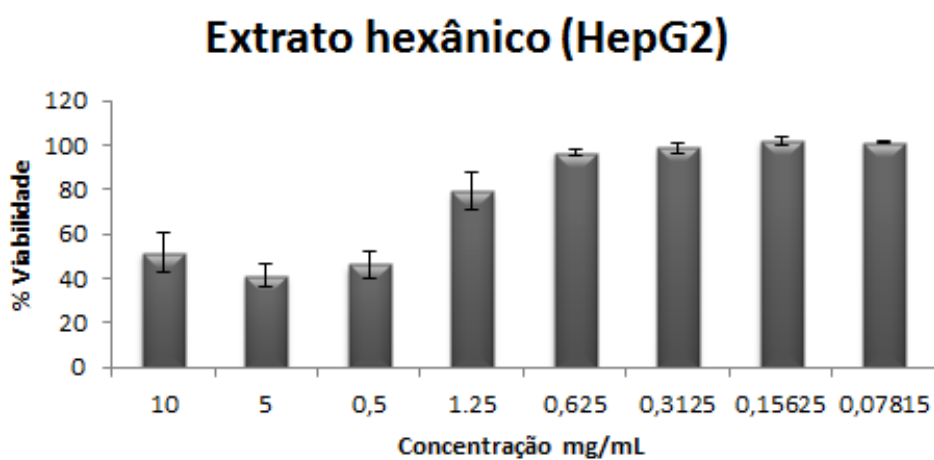
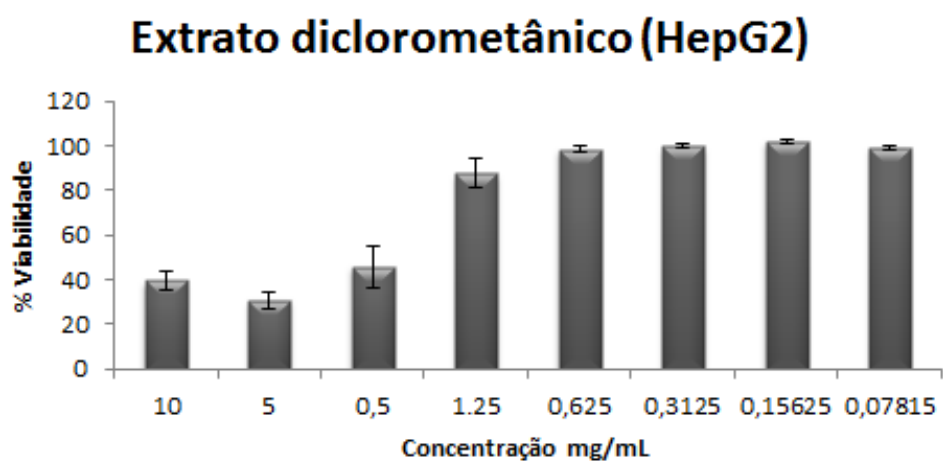


Figura 26. Percentual de viabilidade de células HepG2 em presença de extrato diclorometânico de *S. purpurea*.



6. Discussão

A família Anacardiaceae compreende diversos gêneros, dentre eles o gênero *Spondias*, o qual compreende diferentes espécies. A espécie estudada neste trabalho, *Spondias purpurea*, embora tenha alguns estudos relacionados que descrevem seu uso popular e apresentam alguns estudos de atividades biológicas e fitoquímicas, ainda são inconclusivos, sendo necessário mais estudos para que a espécie seja explorada e desta forma contribuir para a comunidade científica.

O estudo de plantas da mesma espécie tem fundamento na taxonomia vegetal, que sustenta a importância do conhecimento das espécies de plantas existentes no mundo. Essa ciência é muito antiga, uma vez que os vegetais foram as primeiras opções de tratamento de enfermidades na história humana (OGUNKUNLE, 2014). Grande parte dos medicamentos comercializados ao redor do mundo surgiu a partir de estudos desenvolvidos com base em conhecimento popular. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu oficialmente, no ano de 1978, a utilização de medicamentos fitoterápicos. Já no Brasil, os incentivos de fortalecimento da fitoterapia, surgiram na década de 80 com a criação de programas específicos nesta área (BRASIL, 2011). Diante desse cenário, e com a grande biodiversidade brasileira, estudos com plantas para verificação de diversas atividades biológicas são de extrema importância para a população.

O estudo de uma potencial droga vegetal, planta medicinal ou partes da mesma que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2011), deve apresentar alguns cuidados, como a identificação prévia da planta e estudos fitoquímicos para um melhor conhecimento das características químicas da mesma.

Neste trabalho foram preparados, a partir das folhas secas e pulverizadas de *S. purpurea*, extratos com solventes de polaridades distintas (etanol, hexano e diclorometano), permitindo verificar o melhor solvente de extração de compostos com o intuito de avaliar os potenciais biológicos da planta em estudo.

De acordo com estudos realizados por Engels et al.,(2012) foram identificados flavonoides e compostos fenólicos em cascas e frutos de *S. purpurea*. Tais compostos também foram identificados em folhas da planta. De acordo com os testes de identificação qualitativos realizados neste trabalho, foi possível observar que as folhas apresentam taninos condensados, flavonóis, chalconas, saponinas e

fenóis. Pelo método quantitativo, foi possível verificar a quantidades de fenóis totais presentes no extrato EtOH 100% obtido das folhas pulverizadas de *S. purpurea*.

Ainda com o intuito de elucidar a composição química de *S. purpurea*, foi realizada uma análise dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD dos extratos EtOH 100%, EtOH 70%, hexânico e diclorometânico. Foi possível identificar no extrato EtOH 100% um pico com espectro semelhante ao espectro de flavonoides, como mostra a Figura 16 (p. 52). No entanto, não foi possível identificar picos de características semelhantes para os extratos hexânico e diclorometânico. Foi realizada também, uma análise comparativa entre os extratos EtOH 100% e EtOH 70% para verificar a semelhança da composição química entre os dois extratos. Essa análise foi realizada, pois no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição de 2011, alguns extratos constituintes de formulações são hidroalcoólicos, sendo assim, tal comparação foi realizada para que pudesse ser verificada a semelhança entre ambos os extratos. A Figura 15 (p. 51) mostrou grande semelhança na composição química de ambos os extratos, o que torna possível sugerir que o potencial biológico de ambos também seja semelhante.

Com o aumento da resistência microbiana com o passar dos anos, esse tema tem se tornado cada dia mais importante, o que estimula pesquisadores a buscarem novas substâncias com potencial antimicrobiano para o desenvolvimento de novos medicamentos. Microrganismos como *S. aureus* e *E. coli*, vem representando um grande problema tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. O aumento da resistência de gram-negativas fundamenta-se em diversos fatores, entre eles ao uso irracional de antimicrobianos e à presença de genes móveis e plasmídeos que são facilmente dissemináveis (QUEIROZ et al, 2012).

Com relação à atividade antimicrobiana de *S. purpurea*, tem-se da literatura que as folhas apresentam atividade contra cepas de *E. coli* na concentração de 10 mg usando a metodologia de concentração inibitória mínima em disco (MICD) (Caceres et al., 1990b). Miranda-Cruz et al. (2012), verificaram que o extrato etanólico de folhas de *S. purpurea*, pelo método de difusão em ágar, apresentou atividade contra *Bacillus cereus*, já o extrato hexânico apresentou atividade tanto para *B. cereus* quanto para *S. aureus*. Nos testes realizados pelo método da concentração inibitória mínima, foi verificada atividade na concentração de 7,5 mg/mL, apenas para o *B. cereus*. Neste trabalho, foi observado que nenhum dos extratos apresentou atividade inibitória de crescimento bacteriano na concentração

proposta (5000 µg/mL), frente às cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*, pelo método de microdiluição em placa de 96 poços.

Com relação à atividade antifúngica, pode-se verificar na literatura que foram realizados estudos frente a *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2002) e frente a cepas de *Fusarium oxysporum* (PIZANA; NECHA; GOMES, 2010). Ambos os estudos foram realizados com as folhas de *S. purpurea* e apresentaram resultados positivos na inibição dos microrganismos. No presente estudo foi avaliada a atividade de extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico frente a cepas de *Candida* sp e dermatófitos. Foi possível observar ação fungistática do extrato EtOH 100% frente à *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. No entanto, os demais extratos não apresentaram efeitos significativos, não sendo considerados ativos contra esses microrganismos. Ainda, nenhum extrato demonstrou atividade inibitória contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Com relação ao estudo realizado para as cepas de dermatófitos, *T. rubrum* se mostrou sensível aos extratos EtOH 100% e diclorometânico, sendo que o extrato hexânico também demonstrou atividade contra este microrganismo, ainda que menor. *M. canis* se mostrou sensível somente ao extrato hexânico. Serão necessárias mais análises para averiguar se a ação é considerada fungistática ou fungicida para estes microrganismos.

Os resultados apresentados mostraram que todas as cepas fúngicas estudadas apresentaram maior sensibilidade ao antifúngico anfotericina B do que ao fluconazol, comprovando a resistência aos azóis observada em estudos realizados com tais microrganismos (NIGAM, 2015; ZIDA et al., 2016). Neste contexto, os resultados apresentados neste trabalho são promissores em um quadro de resistência microbiana.

Zida et al. (2016) mostraram em sua revisão que no período de 1969 a 2015, a atividade de *S. purpurea* contra *C. albicans* ainda não havia sido estudada. Relataram também que as publicações de produtos naturais anti *C. albicans* aumentou de 2006 a 2015, indicando um esforço para encontrar drogas alternativas para o tratamento de doenças que tem como agente este microrganismo. Esses dados reforçam a importância deste trabalho.

De acordo com Marisco e Pungartnik (2015) há poucos estudos fitoquímicos relacionados às folhas de *S. purpurea*, no entanto para outras partes da planta, como os frutos, foram identificadas substâncias consideradas antioxidantes. Nosso

estudo de atividade antioxidante pelo método de DPPH demonstrou que o extrato EtOH 100% apresenta alta atividade, mostrando que as folhas também apresentam substâncias antioxidantes. Sugere-se que tal diferença de atividade antioxidante entre os extratos estudados neste trabalho, pode estar relacionada com a possível presença de flavonoides (metabólitos secundários que possuem atividade antioxidante) no extrato EtOH 100%, conforme observado na análise do perfil cromatográfico do mesmo (Figura 16, p. 52). Nos demais extratos, não foi possível observar picos de características semelhantes que sugiram a presença de tais substâncias.

Com relação a testes de citotoxicidade, a avaliação de porcentagem de viabilidade celular é uma das metodologias mais comuns e empregadas em trabalhos em que se deseja avaliar a citotoxicidade de um determinado composto (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014). Neste trabalho, foram realizados estudos de viabilidade celular para os extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico frente a linhagens celulares de macrófagos murinos (J774), queratinócitos humanos (HaCat) e células tumorais de fígado (HepG2).

Os testes iniciais de citotoxicidade frente a células HaCat mostraram que o extrato EtOH 100% não apresentou citotoxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 5,00 mg/mL, enquanto que o extrato hexânico não apresentou toxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 0,15 mg/mL e o extrato DCM não apresentou toxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 0,62 mg/mL. Os testes frente a células HepG2 mostraram que o extrato EtOH 100% não apresentou citotoxicidade significativa em nenhuma das concentrações analisadas, enquanto que o extrato hexânico e o extrato DCM não apresentaram toxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 1,25 mg/mL. Já os testes realizados com células J774 mostram que os extratos EtOH 100% e diclorometânico não apresentaram toxicidade significativa, enquanto que o extrato hexânico não apresentou toxicidade significativa em concentração igual ou inferior a 1,25 mg/mL. Testes realizados por Dantas (2002) para citotoxicidade de extratos de folhas de *S. purpurea* contra *Artemia salina* mostraram que os mesmos apresentaram LC₅₀ 823 µg/mL em exposição de 48 horas, enquanto que os ensaios de toxicidade aguda em camundongos realizado pela exposição ao extrato etanólico durante 14 dias na concentração de 2000 mg/kg, não apresentou sinais clínicos relevantes e morte dos animais, não sendo considerado tóxico.

Este trabalho mostrou que o extrato EtOH 100% foi promissor no que diz respeito à atividade antifúngica, antioxidante e por não apresentar citotoxicidade significativa frente às três linhagens celulares estudadas, permitindo concluir que as folhas de *S. purpurea* apresentam substâncias promissoras ao desenvolvimento de novos antimicrobianos.

Os estudos aqui realizados podem ter maiores verificações como, por exemplo, a análise dos extratos por espectrometria de massas. Ainda, um particionamento pode conduzir a frações ativas com perfil químico caracterizado.

7. Conclusões

- Folhas de *Spondias purpurea* apresentam compostos fenólicos em sua composição fitoquímica;
- Sugere-se que o extrato EtOH 100% apresenta flavonoides em sua composição, enquanto que os extratos hexânico e DCM não possuem;
- O extrato EtOH 100% apresenta atividade antioxidante;
- Os extratos não apresentaram atividade contra cepas bacterianas estudadas (*E. coli*; *S. aureus*, *S. setubal* e *B. subtilis*);
- O extrato EtOH 100% apresentou atividade fungistática contra cepas de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*;
- Os extratos EtOH 100%, hexânico e diclorometânico não demonstraram atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *C. parapsilosis*;
- Os extratos hexânico e diclorometânico não apresentaram atividades significativas contra *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*;
- Os extratos EtOH 100%, hexânico e DCM demonstraram potencial atividade fungistática frente aos fungos dermatófitos;
- O extrato EtOH 100% não apresentou citotoxicidade significativa frente às três linhagens celulares estudadas neste trabalho.
- Os extratos hexânico e diclorometânico, apresentaram citotoxicidade significativa frente às três linhagens celulares estudadas neste trabalho, em maiores concentrações.

Referências

- ABDOU, A. M.; HIGASHIGUCHI, S.; ABOUELEININ, A. M.; KIM, M.; IBRAHIM, H. R. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. **Food Control**, v.18, p.173-178, 2007.
- ALENCAR, L. C. B.; CHAVES, T. P.; SANTOS, J. S.; NOBREGA, F. P.; ARAUJO, R. M.; SANTOS, V. L.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D. Efeito modular do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus*, à Eritromicina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2015, v. 36, n.1, p. 11 - 116, 2015.
- AL-YASIRI, M. H.; NORMAND, A. C.; L'OLLIVIER, C.; LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; RABAUDET, S.; PIARROUX, R.; MAUFFREY, J. F.; RANQUE, S. Opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata* circulates between humans and yellow-legged gulls. **Scientific Reports**, n.6, 2016.
- ARSHADI, M.; FOROUGHIFARD, S.; GHOLTASH, J. E.; ABBASPOURRAD, A. Preparation of iron nanoparticles-loaded *Spondias purpurea* seed waste as an excellent adsorbent for removal of phosphate from synthetic and natural waters. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.452, p.69–77, 2015.
- BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v.134, p.307–319, 2004.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, K.H.; KANG, S.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 723, 2012.
- BAUTISTA-BANOS, S.; BARRERA-NECHA, L. L.; BRAVO-LUNA, L.; BERMUDEZ-TORREZ, K. Anti-fungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incident of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 20, n. 1, p. 8 - 12, 2002.

BAUTISTA-BANOS, S.; HERNANDEZ-LOPEZ, M.; DIAZ-PEREZ, J. C.; CANO-OCHOA, C. F. Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of 'ciruela' fruit (*Spondias purpureas* L.) during storage.

Postharvest Biology and Technology, n. 20, p. 99 - 106, 2000.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

CACERES, A.; CANO, O.; SAMOYA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 30, p. 55 - 73, 1990.

CEVA-ANTUNES, P. M. N.; RIBEIRO, H.; SILVA, A. S.; CARVALHO, C. P. S.; ANTUNES, O. A. C. Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). **LWT – Food Science and Technology**, n. 39, p. 436 - 442, 2006.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grows aerobically. Approved standard M7-A2. 9th edition. CLSI, Wayne, PA, 2012.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd edition. CLSI document M38-A2 CLSI, Wayne, PA, 2008b.

CLSI. Reference method for broth dilutions antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd edition, M27-A3. CLSI, Wayne, PA, 2008a.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**: farmacognosia experimental. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v. 3.

CURADO, F. M. L. M. J.; GAZOLLA A. P.; PEDROSO, R. C. N.; PIMENTA, L. P.; OLIVEIRA, P. F.; TAVARES, D. C. SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; PIETRO, R. C. L. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M.; SALES, J. F.; SILVA, F. G. Antifungal and citotoxicity activities of *Anacardium othonianum* extract. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 29, p. 450 – 456, 2016.

DANTAS, A. M. **Avaliação da toxicidade e atividade antiulcerogênica das folhas de *Spondias purpurea* L.** Universidade Federal da Paraíba, 2012. 221p.

DEBNATH, C.; MITRA, T.; KUMAR, A.; SAMANTA, I. Detection of dermatophytes in healthy companion dogs and cats in eastern India. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 20 - 14, 2016.

ENGELS, C.; GRATER, D.; ESQUIVEL, P.; JIMENEZ, V. M.; GANZLE, M. G.; SCHIBER, A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high performance liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, n. 46, p. 557 - 562, 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª. ed. São Paulo: Atheneu, 1988

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2010

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369 - 394, jul. - set. 2006.

FLECKENSTEIN, J. M.; HARDWIDGE, P. H.; MUNSON, G. P.; RASKO, D. A.; SOMMERFELT, H.; STEINSLAND, H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes and Infection**, n.12, p. 89 - 98, 2010.

GUERIN, T.F.; MONDIDO, M.; MCCLENN, B.; PEASLEY, B. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n.5, 2001.

GUIMARÃES, D. E.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667 - 679, 2010.

GUSHIKEN, C. Y.; MEDEIROS, L. B.; CORREIA, B. P.; SOUZA, J. M.; MORIS, D. V.; PEREIRA, V. C.; GIUFFRIDA, R.; RODRIGUES, M. V. P. Nasal carriage of resistant *Staphylococcus aureus* in a medical student community. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1501 - 1509, 2016

JEONG, S. I.; HUH, J. I.; SHIN, H. K. Cytotoxicity and sub-acute toxicity in Crl:CD (SD) rats of traditional herbal formula Ojeok-san. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 15-38, 2015.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; DUMYATTI, G.; TOWNES, J. M.; CRAIG, A. S.; ZELL, E. R.; FOSHEIM, G. E.; MCDOUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; FRIDKIN, S. K. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **Journal of American Medical Association**, v. 298, n. 15, p. 1763 - 1771, 2007.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p.12 - 20, 2010.

LARA, H. H.; AYALA-NUNEZ, N. V.; TURRENT, L. C. I.; PADILLA, C. R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 26, p. 615 - 621, 2010.

LEI, J.; YU, J.; YU, H.; LIAO, Z. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. **Food Chemistry**, n. 107, p. 1205 – 1209, 2008.

MALEK, M.; PALUCHOWSKA, P.; BOGUSZ, B.; BUDAK, A. Molecular characterization of *Candida* isolates from intensive care unit patients, Krakow, Poland. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2016.

MARISCO, G.; PUNGARTNIK, C. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): traditional uses, chemical composition and biological activities. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 2, 2015.

MARTINS, L. P.; SILVA, S. M.; ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. Desenvolvimento de frutos de cirigueleira (*Spondias purpurea* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 11-14, 2003.

MELLENDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, n. 13, p. 272 - 276, 2006.

MIRANDA-CRUZ, E.; ESPINOSA-MORENO, J.; CENTURION-HIDALGO, D.; VELAZQUEZ-MARTINEZ, J. R.; ALOR-CHAVEZ, M. J. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Thynantus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, n. 11; p. 354 - 361, 2012.

NIGAM P. K. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. **Our Dermatology Online**; v.6, n. 2, p. 212 - 222, 2015.

NUSSBAUM F. V.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HABICH, D. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? **Angewandte Chemie. International Edition.**, v. 45, p. 5072 – 5129, 2006.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, n. 267, p. 5421 – 5426, 2000.

OGUNKUNLE A. T. J. Properties, users' assessment and applicability of nine types of taxonomic keys in diagnosing some Nigerian species of *Ocimum* L., *Hyptis* Jacq. and *Ficus* L. **African Journal of Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 6 – 24, 2014

OHNO, Y; MIYAJIMA, A; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters** ,102–103, 569 – 573, 1998.

PEREIRA, C.; OLIVEIRA, L. L.; GONÇALVES, R.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; SAKURAGUI, C. M. phytochemical and phylogenetic analysis of *Spondias* (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 38, n.6, p.813-816, 2015.

PIMENTA-BARRIOS, E.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, B.C. Phenology, Growth, and Response to Light of Ciruela Mexicana (*Spondias purpurea* L., Anacardiaceae). **Economic Botany**, v. 57, n. 4, p. 481 – 490, 2003.

PINHEIRO, A. Q.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 287 - 294, jul. - ago. 1997.

PINHO, D. S.; STURBELLE, R. T.; MARTINO-ROTH, M. G.; GARCIAS, G. L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 165 - 170, 2009.

PIZANA, C.; NECHA, L.; GOMEZ, M. Evaluation of the fungicidal activity of leaves powders and extracts of fifteen mexican plants against *Fusarium oxysporum* f.sp. gadioli (Massey) Snyder and Hansen. **Plant Pathology Journal**, n. 9, p. 103 - 111, 2010.

QUEIROZ, G. M.; SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. p. 132-133, 2012.

REZAZADEH, E.; SABOKAR, A.; MOAZENI, M.; REZAI, M. S.; BADALI, H. Microdilution in vitro antifungal susceptibility patterns of *Candida* species, from mild cutaneous to bloodstream infections. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n.7, jul. 2016.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, n. 112, p. 654-658, 2009.

SILVA, G. A.; BRITO, N. J. N.; SANTOS, E. C. G; LOPEZ, J. A.; ALMEIDA, M. G. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 10, n. 1, p. 27 - 41, 2014.

SILVA, T. M.; MELO, E. A. Resíduo de ciriguela (*Spondias purpurea* L.): teor de fitoquímicos e potencial antioxidante. In: JORNADA DE PESQUISA ENSINO E EXTENSÃO - JEPEX 2013, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2013.

SILVA-PINTO, A.; FERRAZ, R.; CASANOVA, J.; SARMENTO, A.; SANTOS, L. *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. **Medical Micology Case Reports**, n.9, p. 37-38, 2015.

SIMÕES, M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D. T.; WARREN, J.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; R. BOYD, M. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal National Cancer Institute**, n. 82, p. 1107-1112, 1990.

SLOBODNÍKOVÁ, L.; FIALOVÁ, S.; RENDEKOVÁ, K.; KOVÁČ, J.; MUČAJI, P. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, 1717, 2016

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J.W. Initial experiments in high performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. **Journal of Chromatography A**, v. 721, p. 3 - 14, 1996.

SOUZA-MOREIRA, M. T.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, H.; SUZUKI, H.; NISHIYAMA, N. Development of the short time exposure (STE) test: an *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 760–770, 2008.

UNKRIG, V.; NORTMEYER, C.; HORN, C.; MARQUANT, M.; ONORIU LUNGU, M.; HOENES, J.; KOTZAN, H.; DREIBHOLZ, J. **On-board control for analytical elements**. United States Patent, Patent NO.:US 8,137,980 B2, Date of Patent: Mar. 20, 2012.

VARELA, Z. S.; LAVALLE, L. P.; ALVARADO, D. E. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. **Salud Uninorte**, v. 32, n. 1, 2016.

VEIGA V. F. J.; PINTO A. C.; MACIEL M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, p. 24-26, 2005.

WHALEY, S. G.; ROGERS, P. D. Azole Resistance in *Candida Glabrata*. **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, 2016.

WHO. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva: WHO, 2015. ISBN: 9789241509763.

YAZICI, O.; CORTUK, M.; CASIM, H.; CETINKAYA, R.; MERT, A.; BENLI, A. R. *Candida glabrata* pneumonia in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2016, artigo 4737321, 2016.

ZARRIN, M.; MAHMOUDABADI, A. Z. Invasive candidiasis; a review article. **Jundishapur Journal of Microbiology**, n.2, p. 1 - 6, 2009.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, 2016.