

**Avaliação da atividade antioxidante e
antimicrobiana dos componentes fitoquímicos de
Physalis angulata associados a sistema polimérico**

Camila Cristina Baccetti Medeiros

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara - SP
2021

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos componentes fitoquímicos de *Physalis angulata* associados a sistema polimérico

Camila Cristina Baccetti Medeiros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara - SP
2021

M488a

Medeiros, Camila Cristina Baccetti.

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos componentes fitoquímicos de *Physalis angulata* associados a sistema polimérico / Camila Cristina Baccetti Medeiros. – Araraquara: [S.n.], 2021.

107 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. *Physalis angulata*. 2. Extratos vegetais. 3. Compostos Fitoquímicos. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Concentração mínima inibitória. 6. Nanoemulsão. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da atividade antimicrobiana dos componentes fitoquímicos de *Physalis angulata* associados a sistema polimérico frente a microrganismos

AUTORA: CAMILA CRISTINA BACCETTI MEDEIROS

ORIENTADORA: ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. ANA HELENA JANUÁRIO (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade de Franca - UNIFRAN

Prof. Dr. EDVÂNIO RAMOS RODRIGUES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Centro Universitário da Fundação Educacional Guaxupé - UNIFEG

Araraquara, 28 de dezembro de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu filho, Joaquim, que me deu o título capaz de ressignificar todos os outros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que com sua infinita sabedoria foi um verdadeiro guia nessa minha jornada.

Ao meu marido e maior entusiasta, Raphael, por me acompanhar em cada dia dessa trajetória me dando todo o suporte necessário para que eu alcançasse essa conquista.

Aos meus pais, Marcos e Elaine, por serem os pilares da minha formação como ser humano e por se esforçarem tanto para prover minha educação.

À minha irmã, Beatriz, por estar ao meu lado e por fazer valer meus desejos mesmo quando eu não soube me expressar.

Aos meus cunhados, Catarina e Luciano, pelos incentivos, sábios ensinamentos e pelas vibrações.

À Maria Leonor que me fez enxergar o mestrado como uma alternativa e por ser a minha parceira de todos os momentos.

Ao Professor Fabiano, Professora Ana Helena, Professor André, Professor Marlus e Jonatas, Professora Ana Marisa e Samanta por me receberem em seus laboratórios e pela partilha.

Aos meus colegas do laboratório BiotecFar que tornaram a execução da minha pesquisa mais alegre.

Ao Rodrigo, colega de pós-graduação e técnico do laboratório, que gentilmente compartilhou seus conhecimentos comigo e por me acalmar com sua paciência e positividade nos momentos de angústia.

Ao Winner, por se tornar meu confidente e me fazer enxergar a química com um olhar mais simpático.

À Professora Rose, a quem tenho a honra de ter como orientadora, por me acolher como sua aluna, me mostrar o caminho a seguir e confiar no meu potencial até nos momentos mais difíceis. A paixão com que conduz suas aulas e o laboratório me contagiou.

A Banca examinadora pelas contribuições valiosas a esse trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, o meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Physalis angulata é uma espécie com propriedades farmacológicas que são associadas à presença de metabólitos secundários específicos denominados fisalinas. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de inibição de crescimento de microrganismos de interesse em Saúde Pública e a atividade antioxidante dos extratos etanólico e clorofórmico das partes aéreas de *P. angulata*. Para atingir os objetivos foram obtidos os extratos etanólico e clorofórmico e suas frações, além de realizar a triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas de *P. angulata*. Análises de CCD apontam para a presença de ergosterol, possivelmente vitanolídeos. O perfil cromatográfico em CLAE-UV expõe a presença de um mesmo tipo de composto nos extratos e frações, sugerindo que esses sejam os responsáveis pela atividade biológica. Resultados obtidos na triagem fitoquímica apontam a presença de flavonoides, taninos, alcalóides, terpenos e glicosídeos cardiotônicos que justificam o EC₅₀ de 127,11 µg/mL do extrato etanólico e 415 µg/mL do extrato clorofórmico apresentado nos testes de atividade antioxidante. O extrato clorofórmico demonstrou as melhores concentrações inibitórias mínimas (CIM) sendo 0,62 mg/mL para o fungo filamentoso *Microsporum canis*, 1,25 mg/mL para a levedura *Candida albicans*, 2,50 mg/mL para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* e 5,00 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. A fração metanol obtida do extrato clorofórmico apresentou os melhores resultados para bactérias, variando de 0,62 a 1,25 mg/mL, enquanto a fração Hexano-Acetato (6:4) foi melhor para fungos, com CIMs variando de 0,07 a 1,25 mg/mL. Apesar dos resultados apresentados com os patógenos planctônicos, o extrato clorofórmico, a fração Hexano-Acetato (6:4) e a fração metanol não apresentaram atividade anti-biofilme de *Candida albicans*. Os extratos, a fração metanol e Hexano-Acetato (6:4) foram incorporadas em nanoemulsão e tiveram seu desempenho biológico avaliado, porém não demonstraram atividade contra bactérias e fungos e a atividade contra fungos filamentosos não foi melhor do que os resultados obtidos sem incorporação na nanopartícula. Apesar dos valores obtidos nos testes com a nanoemulsão,

ajustes na formulação e no tempo do experimento podem trazer dados relevantes sobre a capacidade antimicrobiana da *P. angulata*.

Palavras-chave: *Physalis angulata*; Extratos vegetais; Compostos Fitoquímicos; Atividade antimicrobiana; Concentração mínima inibitória; Nanoemulsão.

ABSTRACT

Physalis angulata is a species with proven pharmacological properties that are associated with the presence of specific metabolites called physalins. Based on that, this study aims to analyze the growth inhibition capacity of microorganisms of interest in Public Health and the antioxidant activity of ethanolic and chloroformic extracts from aerial parts of *P. angulata*. To achieve the objectives, the ethanolic and chloroformic extracts and their fractions were obtained, in addition to performing the phytochemical screening of the main classes of secondary metabolites present in the aerial parts of *P. angulata*. CCD analyzes point to the presence of ergosterol, possibly vitanolides. The HPLC-UV chromatographic profile exposes the presence of the same type of compound in extracts and fractions, suggesting that these are responsible for the biological activity. Results obtained in the phytochemical screening indicate the presence of flavonoids, tannins, alkaloids, terpenes and cardiotonic glycosides that justify the EC₅₀ of 127.11 µg/mL for the ethanol extract and 415 µg/mL for the chloroform extract presented in the tests of antioxidant activity. The chloroform extract showed the best minimum inhibitory concentrations (MIC) being 0.62 mg/mL for the filamentous fungus *Microsporum canis*, 1.25 mg/mL for the yeast *Candida albicans*, 2.50 mg/mL for *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis* and 5.00 mg/mL for *Pseudomonas aeruginosa*. The methanol fraction obtained from the chloroform extract showed the best results for bacteria, ranging from 0.62 to 1.25 mg/mL, while the Hexane-Acetate (6:4) fraction was better for fungi, with MICs ranging from 0.07 at 1.25 mg/mL. The extracts, the methanol and Hexane-Acetate (6:4) fraction were incorporated into a nanoemulsion and had their biological performance evaluated, but they do not demonstrate better activity against bacteria and fungi and the activity against filamentous fungi than the results obtained without incorporation in the nanoparticle. Despite the values obtained in the tests with the nanoemulsion, adjustments in the formulation and time of the experiment can bring relevant data about the antimicrobial capacity of *P. angulata*.

Keywords: *Physalis angulata*; Plant extracts; Phytochemical Compounds; Antimicrobial activity; Minimum inhibitory concentration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 <i>Physalis angulata</i>	13
2.2 metabólitos especializados nos vegetais.....	15
2.2.1 Terpenos	16
2.2.2 Compostos fenólicos	16
2.2.3 Substâncias nitrogenadas	18
2.2.4 Glicosídeos cardiotônicos.....	19
2.2.5 Derivados de ácidos graxos	19
2.2.6 Policetídeos aromáticos	20
2.3 Identificação fitoquímica de metabólitos especializados	20
2.4 Extração e caracterização de metabólitos especializados	24
2.4.1 Extração	24
2.4.2 Partição do extrato	26
2.4.3 Cromatografia em camada delgada	27
2.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	28
2.5 Metabólitos especializados de <i>Physalis angulata</i>	29
2.5.1 Extratos, frações e compostos da <i>Physalis angulata</i>	30
2.5.2 Atividades biológicas das partes aéreas de <i>Physalis angulata</i>	31
2.6 Nanoemulsão	37
3. OBJETIVOS.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Material Vegetal	39
4.2. Caracterização das classes de metabólitos secundários	40
4.2.1. Flavonóides	40
4.2.1.1. Reação de Shinoda	40
4.2.1.2. Reação de Taubock	40
4.2.1.3. Reação de Pew	40
4.2.1.4. Reação do cloreto férrico	41
4.2.1.5. Reação do cloreto de alumínio.....	41
4.2.2. Taninos.....	41
4.2.2.1. Reação com acetato de chumbo	41

4.2.2.2. Reação com gelatina.....	41
4.2.2.3. Reação com sais de ferro.....	41
4.2.3. Glicosídeos cardiotônicos.....	42
4.2.3.1. Reação de Legal	42
4.2.3.2. Reação de Pesez	42
4.2.4 Terpenos	42
4.2.4.1. Formação de anel espumoso	42
4.2.4.2. Reação de Liebermann-Buchard.....	43
4.2.5. Alcalóides	43
4.2.5.1 Reações com reagentes Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand ...	43
4.2.6. Antraquinonas	43
4.2.6.1 Reação de Borntrager	43
4.3. Extração	44
4.3. Partição do extrato	44
4.4. Cromatografia em Camada Delgada.....	45
4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	46
4.6. Atividade antioxidante	47
4.7. Microrganismos	48
4.8. Atividade antimicrobiana	48
4.9. Biofilme.....	51
4.10. Nanoemulsão	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Caracterização das classes de metabólitos secundários	53
5.2 Extração	54
5.3 Fracionamento	55
5.4. Cromatografia em Camada Delgada.....	55
5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	56
5.6 Atividade Antioxidante	67
5.7 Atividade antimicrobiana	72
5.8 Análise das Nanoemulsões	81
5.9 Biofilme.....	83
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - À esquerda: 1 – Ramo de floração e frutificação; 2 – Corola aberta mostrando os estames; 3 – Fruto. À direita: A – Planta; B – flor; C – Fruto; D – Fruto maduro de <i>Physalis angulata</i>	14
Figura 2 - Estruturas químicas dos diversos tipos de fisalinas relatados na literatura.	29
Figura 3 - Frações da partição líquido-líquido do extrato clorofórmio.....	45
Figura 4 - Modelo da montagem da placa para realização do CIM.	49
Figura 5 - Modelo da montagem da placa para realização do CIM com nanoemulsão.....	50
Figura 6 - Estágios de redução da resazurina (esquerda) para resorufina (meio) e dihidroresorufina (direita).	51
Figura 7 - Perfil cromatográfico por CLAE do extrato clorofórmico nos diversos comprimentos de onda.	56
Figura 8 - Perfil cromatográfico por CLAE da fração Hexano-Acetato 6:4 nos diversos comprimentos de onda.....	60
Figura 9 - Perfil cromatográfico por CLAE da fração metanol nos diversos comprimentos de onda.	63
Figura 10 - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical DPPH.....	68
Figura 11 - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido gálico pelo método de inibição do radical DPPH.....	68
Figura 12 - Curva analítica da atividade antioxidante da rutina pelo método de inibição do radical DPPH.....	69
Figura 13 - Curva analítica da atividade antioxidante da quercetina pelo método de inibição do radical DPPH.....	69
Figura 14 - Curva analítica da atividade antioxidante do extrato clorofórmico das partes aéreas de <i>P. angulata</i> pelo método de inibição do radical DPPH	70
Figura 15 - Curva analítica da atividade antioxidante do extrato etanólico das partes aéreas de <i>P. angulata</i> pelo método de inibição do radical DPPH.	70

Figura 16 - Aspecto visual das formulações. Na sequência: nanoemulsão branca, nanoemulsão extrato etanólico, nanoemulsão da fração metanol, nanoemulsão do extrato clorofórmico e nanoemulsão fração Hexano-Acetato (6:4).....	81
Figura 17 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de <i>Candida albicans</i> em contato com Anfotericina B em diferentes concentrações.....	84
Figura 18 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de <i>Candida albicans</i> em contato com Fluconazol em diferentes concentrações.....	84
Figura 19 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de <i>Candida albicans</i> em contato com extrato clorofórmico de <i>P. angulata</i> em diferentes concentrações.	85
Figura 20 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de <i>Candida albicans</i> em contato com fração Hexano-Acetato (6:4) do extrato clorofórmico de <i>P. angulata</i> em diferentes concentrações.....	86
Figura 21 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de <i>Candida albicans</i> em contato com fração Metanol do extrato clorofórmico de <i>P. angulata</i> em diferentes concentrações.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Testes fitoquímicos utilizados na identificação de classes de metabólitos especializados de espécies vegetais.	21
Tabela 2 - Metabólitos secundários vegetais extraídos por solventes.	26
Tabela 3 - Resultados das reações fitoquímicas das partes aéreas de <i>P. angulata</i> .53	
Tabela 4 - Quantidade de picos, tempo de retenção e área dos picos do extrato clorofórmico em 4 comprimentos de onda.	58
Tabela 5 - Quantidade de picos, tempo de retenção e área dos picos da fração Hexano-Acetato 6:4 em 4 comprimentos de onda.	62
Tabela 6 - Quantidade de picos, tempo de retenção e área dos picos da fração metanol em 4 comprimentos de onda.	65
Tabela 7 : Comparativo das amostras em CLAE-UV em comprimento de onda de 230nm	66
Tabela 8 - Comparativo das amostras em CLAE-UV em comprimento de onda de 250 nm.	66
Tabela 9 - Comparativo das amostras em CLAE-UV em comprimento de onda de 300 nm.	66
Tabela 10 - Atividade antioxidante dos padrões e extratos das partes aéreas de <i>P. angulata</i>	71
Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (mg/mL) dos extratos, frações e nanoemulsões de <i>P. angulata</i> para bactérias.....	73
Tabela 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) (mg/mL) dos extratos, frações e nanoemulsões de <i>P. angulata</i> frente às leveduras.....	74
Tabela 13 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) (mg/mL) dos extratos, frações e nanoemulsões de <i>P. angulata</i> frente à fungos dermatófitos.....	75
Tabela 14 - Valores de tamanho, IPd e potencial Zeta das nanoemulsões nos dias 1, 7 e 30	82

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Rendimento do extrato	44
Equação 2: Volume morto	45
Equação 3 -Índice de retenção.....	46
Equação 4: cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH	47
Equação 5: Cálculo do EC50	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHI	Ágar infusão de cérebro coração
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC50	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
EDL	Espalhamento dinâmico da luz
IPD	Índice de polidispersão
IPP	Isopentenil difosfato
mAU	Unidade de mili-absorbância
MEP	Metileritritol fosfato
MEV	Ácido mevalônico
NE	Nanoemulsão
nm	Nanômetros
R _f	Índice de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
TR	Tempo de retenção
XTT	Sal de tetrazol XTT

1. INTRODUÇÃO

A tradição do uso de plantas medicinais no Brasil se iniciou com as práticas indígenas de tratamento de doenças e enfermidades. Ao longo dos séculos, esses costumes foram enriquecidos através da incorporação de conhecimentos populares portugueses e africanos e se enraizaram através da passagem informal da sabedoria de geração para geração (CASTRO; FIGUEIREDO, 2020).

O Brasil tem as condições oportunas para o investimento em pesquisa e no desenvolvimento de produtos a partir de seu rico patrimônio natural e cultural, uma vez que dispõe da maior diversidade genética vegetal do mundo e forte tradição do uso de plantas medicinais (MAZIERO, 2017).

Uma das espécies utilizadas na medicina popular brasileira é a *Physalis angulata* L. que tem registros do uso de sua seiva para dores de ouvido e o uso de seu chá para icterícia. No estado da Paraíba, as infusões das folhas são usadas como sedativo e contra inflamações da bexiga, baço e rim. No estado do Pará, o chá da raiz é utilizado no tratamento de hepatite, anemia, infecção de urina, pedras nos rins e dor de estômago (RENGIFO-SALGADO; VARGAS-ARANA, 2013).

Essa planta é um arbusto rústico de origem amazônica, que cresce em solo poroso e rico em matéria orgânica, sob a influência do clima tropical ou subtropical. Se caracteriza por produzir um fruto pequeno, arredondado e alaranjado, o qual é envolto por sépalas em formato de balão que ficam pendurados em seus galhos. Possui diversos nomes populares, entre os mais conhecidos estão Camapu, Bucho-de-rã e Balão-rajado (ISMAIL; ALAM, 2001; JANUÁRIO *et al.*, 2002; PONTES, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2018).

Embasadas nas aplicações populares de *P. angulata*, pesquisas têm sido realizadas para corroborar, através de métodos científicos, a existência e o potencial de ação de seus ativos. Ao longo dos últimos anos, foi investigada a ação anti-inflamatória (CHECON, 2011), antiprotozoária e antiviral (OLIVEIRA *et al.*, 2016), anti moluscicida (SANTOS *et al.*, 2003), antitumoral (GUIMARÃES *et al.*, 2010), imunomoduladora (BEILINTANI, 2002) e antimicrobiana (PIETRO *et al.*, 2000).

Uma das funcionalidades relevantes para exploração dessa espécie é a atividade antioxidante. Os compostos antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, pois eles são capazes de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Estudos como o de Silva (2013) investigaram o potencial antioxidante dos frutos de *P. angulata*, mas há poucos registros da utilização de outros fragmentos desse vegetal.

As partes aéreas da *P. angulata* tiveram seu potencial antimicrobiano revelado por Pietro *et al.* (2000) e Januário *et al.* (2002), quando testada a concentração mínima inibitória do extrato clorofórmico e os produtos obtidos do fracionamento desse extrato contra espécies de *Mycobacterium* sp. Os bons resultados obtidos nessa linha de pesquisa, justificam a continuidade da investigação da ação antimicrobiana das partes aéreas desse vegetal em relação a outros organismos patógenos em suspensão e em biofilmes, assim como, a identificação, isolamento e pesquisa do potencial biológico dos compostos fitoquímicos dessas partes da planta. Além da avaliação de seu comportamento associado a um sistema polimérico de nanoemulsão.

Diante do exposto, o presente trabalho apresenta a pesquisa das principais classes de metabólitos secundários de *P. angulata*, assim como a avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólico e clorofórmico das partes aéreas desse vegetal e pesquisa da ação antimicrobiana dos extratos etanólico e clorofórmico e as frações obtidas a partir do extrato clorofórmico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As plantas são importantes fontes de compostos biologicamente ativos e sua utilização é uma das práticas mais remotas empregadas na prevenção, tratamento e cura de doenças (ALMEIDA JUNIOR, 2013).

Simões e Schenkel (2002), relatam que um dos primeiros registros fitoterápicos datam de 2.838-2.698 a.C. Quando, o Imperador Chinês *Shen Nung* catalogou 365 espécies, entre ervas medicinais e venenos. Já em 1.500 a.C., manuscritos egípcios relacionaram 811 prescrições ao uso de 700 plantas. Algumas dessas plantas, ainda são utilizadas tanto na medicina popular como em indústrias farmacêuticas, como o *Panax spp* (Ginseng),

Ephedra spp, *Cassia spp* (Chuva de ouro) e *Rheum palmetum L.* (Ruibarbo chinês).

Mais tarde, os gregos e romanos utilizaram e aprimoraram os conhecimentos fitoterápicos dos chineses e egípcios. Como exemplo, a história preserva a coletânea "*Corpus Hippocraticum*", a qual engloba as práticas médicas de variados autores gregos e que, entre outras situações, relaciona diversas enfermidades ao seu tratamento com recurso vegetal (BRAGA, 2011).

No início da era cristã, Plínio descreveu os benefícios do uso de plantas em oito dos trinta e sete capítulos da sua obra "*História Natural*". Já o grego Pendamius Dioscorides escreveu o livro "*De Materia Medica*" que foi utilizado durante 15 séculos por gregos, romanos e pelos povos conquistados por eles. Das 1000 drogas descritas no livro, cerca de 600 eram plantas, como *Cannabis sativa* (Cânhamo), *Conium maculatum* (Cicuta), *Colchicum autumnale* (Cólquico) e anestésicos à base de ópio e de *Mandragora officinarum* (Mandrágora). Com o passar do tempo, esses conhecimentos se tornaram a base da medicina tradicional europeia (ALVES, 2013).

Com a queda do Império Romano, a Igreja Católica se estabeleceu como uma poderosa instituição. Centralizou toda a produção científica e combateu as práticas de uso de plantas e ervas medicinais para o tratamento de doenças, declarando que sua utilização estava atrelada a feitiços, bruxarias e artifícios demoníacos, passíveis de punições. Devido a essa visão, o pouco avanço no estudo de plantas foi limitado aos estudiosos religiosos e seus registros dados como propriedades da Igreja (BERNARDELLI; FILHO, 2011).

Somente no século XIII, com o Início do Renascimento e com o surgimento das Escolas de Salerno e Montpellier que a exploração oficial de plantas com fins terapêuticos foi retomada. A partir da invenção da imprensa, em 1484 foi possível imprimir o primeiro livro sobre o cultivo de plantas medicinais, com base em escritos gregos. Em 1533, a pesquisa de fitoterápicos ganhou grande incentivo, com a criação da primeira cátedra de Botânica na Escola de Medicina de Pádua. Em 1542, foi divulgada a primeira farmacopeia impressa que contava com uma lista de 300 plantas com uso medicinal (BRAGA, 2011).

No século XV, com o início das Grandes Navegações e a busca por rotas comerciais marítimas para a Índia, os europeus tiveram contato com

novos territórios, povos e culturas. Foi dentro desse contexto que os portugueses chegaram ao Brasil e se encantaram com a flora local, como relata Pedro Vaz de Caminha em sua carta para o Rei Dom Manuel e tantas outras crônicas, cartas e textos confeccionadas por jesuítas e naturalistas portugueses (BERNARDELLI; FILHO, 2011).

A exploração da biodiversidade brasileira permitiu, não só a adaptação dos colonizadores, mas também a elaboração de uma grande base de dados de espécies vegetais. Em 1587, o colonizador Gabriel Soares de Souza escreveu o "Tratado Descritivo do Brasil", onde dedicou um capítulo às propriedades medicinais das árvores e outro para as ervas. Poucos anos antes, o jesuíta Fernão Cardim escreveu "Tratados da Terra e gente do Brasil", abordando o uso terapêutico dos recursos brasileiros (CARNEIRO, 1994).

Um dos mais importantes divulgadores da flora brasileira foi o jesuíta José de Anchieta. Ele viveu no Brasil entre 1553 e 1597 e, durante todo esse período, listou muitas espécies vegetais e a sua utilização prática. Apesar de não ser botânico, era versado em práticas de curas e por isso, os costumes locais de utilização de plantas medicinais não passaram despercebidos por ele. Uma das espécies nativas brasileiras que ganhou destaque nos registros do jesuíta foi a *Physalis angulata*. Uma planta que apresenta um pequeno fruto alaranjado com uma casca ao seu redor. Além de ser classificada como uma fruta cítrica e como fonte de nutrientes, também era utilizada como princípio narcótico pouco ativo, calmante e tônico fixo (GIORGETTI, 2009; MADALENO, 2016).

2.1 *Physalis angulata*

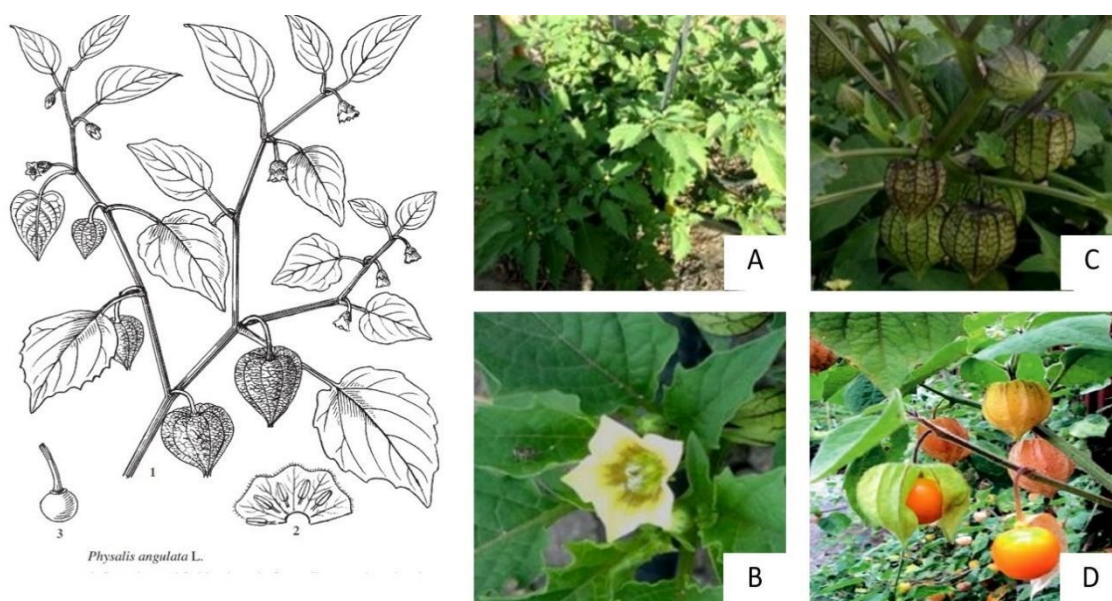
Physalis angulata é uma herbácea originária dos Andes e característica das Américas, mas que também pode ser encontrada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes dos demais continentes terrestres. Por ter alto grau percentual de germinação de suas sementes e alto grau de adaptação, desenvolve-se em diversos ambientes, como terrenos baldios e solos resolvidos da lavoura (ZIMMER, 2019)

No Brasil, é conhecida como "Camapu", "Mullaca" e "Juá de capote", sendo encontrada desde o Norte até o Sul do país. É uma das espécies mais famosas do gênero *Physalis*, o qual faz parte da família *Solanaceae*. Como é

possível visualizar na figura 1, é caracterizada por ser um arbusto ramificado de até 70 centímetros de altura, com talo principal herbáceo e piloso, com folhas aveludadas e triangulares, e fruto do tipo baga que é envolvido pelo cálice acrescente e inflado (SILVA, 2005; RUFATO *et al.*, 2013).

Quando maduro, o fruto tem sabor cítrico e é rico em vitaminas A e C, fósforo e ferro, além de alcalóides, fitoesteróides, carotenóides e compostos bioativos funcionais. O fruto de *P. angulata* pode ser consumido *in natura*, em saladas ou em produtos como, geleias, bebidas lácteas, iogurtes, licores, sorvetes, sendo mais conhecida por decorar doces e bolos (RUFATO *et al.*, 2013). Além de seus benefícios nutricionais, apresenta atividade antioxidante (LIMA *et al.*, 2009), efeito citotóxico em células cancerígenas (LIMA, 2019) e efeito antidiabético (CONTRERAS *et al.*, 2020).

Figura 1 - À esquerda: 1 – Ramo de floração e frutificação; 2 – Corola aberta mostrando os estames; 3 – Fruto. À direita: A – Planta; B – flor; C – Fruto; D – Fruto maduro de *Physalis angulata*



Fonte: VIDAL, 2008; HONG KONG HERBARIUM, 2021

Assim, como o fruto, as partes aéreas da *P. angulata* também apresentam atividades biológicas. Os conhecimentos populares paraibanos relatam que as infusões das folhas dessa espécie podem ser utilizadas como sedativos, contra inflamações da bexiga, baço, rim e contra icterícia (RENGIFO-SALGADO; VARGAS-ARANA, 2013). Além da comprovada ação anti-inflamatória (CHECON, 2011), também são atribuídos os efeitos antiprotozoário e antiviral (OLIVEIRA *et al.*, 2016), anti moluscicida (SANTOS *et al.*, 2003), antitumoral (GUIMARÃES *et al.*, 2010), imunomoduladora

(BEILINTANI, 2002) e antimicobacteriana (PIETRO *et al.*, 2000). Todas as atividades biológicas descritas estão relacionadas à presença de metabólitos especializados presentes na estrutura da *P. angulata*.

Assim, como o fruto, as partes aéreas da *P. angulata* também apresentam atividades biológicas. Os conhecimentos populares paraibanos relatam que as infusões das folhas dessa espécie podem ser utilizadas como sedativos, contra inflamações da bexiga, baço, rim e contra icterícia (RENGIFO-SALGADO; VARGAS-ARANA, 2013). Além da comprovada ação anti-inflamatória (CHECON, 2011), também são atribuídos os efeitos antiprotozoário e antiviral (OLIVEIRA *et al.*, 2016), anti moluscicida (SANTOS *et al.*, 2003), antitumoral (GUIMARÃES *et al.*, 2010), imunomoduladora (BEILINTANI, 2002) e antimicobacteriana (PIETRO *et al.*, 2000). Todas as atividades biológicas descritas estão relacionadas à presença de metabólitos especializados presentes na estrutura da *P. angulata*.

2.2 Metabólitos especializados nos vegetais

A sobrevivência dos vegetais só é possível devido os processos metabólicos primários e secundários. O primeiro diz respeito aos processos vitais do vegetal, ou seja, aqueles que englobam as funções estruturais, plásticas e de armazenamento de energia que resultam em carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; ALMEIDA, 2017).

As vias metabólicas secundárias estão relacionadas à adaptação do vegetal aos fatores bióticos e abióticos de seu habitat, podendo ser atrativos de polinizadores, repelentes de insetos, proteção contra herbívoros, patógenos, radiação UV, poluição e estresse hídrico, na sinalização intraespecífica, na alelopatia, entre outras funções. São sintetizados em tipos celulares especializados e suas concentrações sofrem a influência de muitos fatores ambientais, como: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos. Os metabólitos especializados são alvo de pesquisas sobre o seu potencial farmacológico na terapêutica humana, apesar de seu isolamento e purificação serem processos

árduos (SIMÕES *et al.* 2003; PEREIRA; CARDOSO, 2012; SILVA, 2013; REZENDE *et al.* 2017).

Esses compostos são formados a partir de produtos da fotossíntese e são originados de quatro vias metabólicas: via do acetato-malonato, do ácido mevalônico (MEV), do metileritritol fosfato (MEP) e do ácido chiquímico. Apesar da relevância da via metabólica, os metabólitos especializados são classificados de acordo com características estruturais e propriedades químicas, podendo ser divididos em terpenos, substâncias fenólicas, substância nitrogenadas, glicosídeos cardiotônicos, derivados de ácidos graxos e policetídeos aromáticos (SIMÕES *et al.* 2003; ZANON, 2006; REZENDE *et al.* 2017).

2.2.1 Terpenos

Os terpenos formam a maior e mais diversa classe de metabólitos especializados. São constituídos por substâncias derivadas do isopentenil difosfato (IPP) e seu dímero dimetilalil difosfato (DMAPP). O IPP e DMAPP se originam através de duas vias: pela via MEV, no citosol da célula vegetal e com a utilização do Acetil-CoA como substrato, e pela via MEP, que ocorre nos plastídios com a utilização de derivados glicolíticos. A justaposição sucessiva dessas duas moléculas e a quantidade carbonos presentes no esqueleto da molécula final definem o tipo de terpeno formado: Monoterpenos são formados por 10 carbonos, sesquiterpenos por 15 carbonos, diterpenos por 20 carbonos, triterpenos por 30 carbonos, tetraterpenos por 40 carbonos e politerpenos por mais de 40 carbonos (SIMÕES *et al.* 2003; REZENDE *et al.* 2017).

Entre os representantes mais famosos dos terpenos estão os óleos essenciais e as saponinas. Nas plantas, realizam a função de atrair agentes polinizadores, de repelir insetos, auxiliar no crescimento vegetal e na defesa contra patógenos. No âmbito das pesquisas são associados à efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano, antiespasmódico, anticancerígeno, imunoestimulantes e citotóxico (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

2.2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos incluem substâncias com, pelo menos, um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila. São divididos entre fenilpropanóides, taninos, ligninas e lignanas,

flavonóides e estilbenos. Alguns desses compostos são derivados da rota do ácido chiquímico que utiliza o ácido 3-dehidrochiquimico como precursor. Esse ácido se forma a partir da eritrose 4-fosfato, que é um produto da rota das pentoses fosfatadas da fotossíntese, com um produto da glicólise chamado ácido fosfoenolpirúvico. A polimerização de moléculas de ácido 3-dehidrochiquimico originam os taninos que são classificados em hidrolisáveis e condensados, de acordo com o grau de polimerização. Atuam contra a herbivoria, tornando o material vegetal pouco palatável e com menor valor nutricional. Na literatura, os taninos são relacionados às ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (SIMÕES *et al.* 2003; REZENDE *et al.* 2017).

Seguindo a via de biossíntese do ácido 3-dehidrochiquimico nos plastídios, é formado o ácido chiquímico que sintetiza o aminoácido aromático chamado fenilalanina. Ao se formar, esse aminoácido migra para o citosol do retículo endoplasmático, onde tem uma molécula de amônia dissociada de sua estrutura, formando o ácido cinâmico. Que por sua vez, sofre hidroxilação e se torna ácido cumárico. Ambos os ácidos e seus subseqüentes, como ácido caféico e cumarinas, são considerados compostos fenólicos simples, também chamados de fenilpropanóides e são a base da formação de compostos fenólicos mais complexos (SIMÕES *et al.* 2003; BORGES; AMORIM, 2020).

Os fenilpropanóides têm papel na defesa contra insetos, fungos e herbívoros, também atuam como substâncias alelopáticas que afetam o crescimento de outros vegetais nas suas proximidades em resposta à escassez de recursos ambientais ou à competição com outras plantas. Na literatura, os fenilpropanóides foram relacionados à ação antimicrobiana e antioxidante. Quando ocorre a polimerização desses compostos fenólicos simples, surgem os representantes da classe das lignanas e ligninas que são componentes da parede celular de tecidos de suporte e condução, conseqüentemente, confere rigidez e resistência mecânica às partes aéreas dos vegetais e viabilizam transporte de nutrientes das plantas através de vasos condutores (SIMÕES *et al.* 2003; REZENDE *et al.* 2017; BORGES; AMORIM, 2020).

Enquanto os taninos, os fenilpropanóides, as ligninas e lignanas são formados por via única do ácido chiquímico, os flavonoides e estilbenos tem sua biossíntese mista ocorrendo no citosol e no retículo endoplasmático. A fenilalanina, que é formada e desaminada pela via do ácido chiquímico, é

hidroxilada e se liga a um Acetil-CoA, formando a molécula coumariol-CoA. Essa molécula se liga a três unidades de malonil-CoA, vindas da via acetato-malonato, formando uma estrutura com 15 carbonos chamada chalcona, reconhecida como a primeira classe de flavonoides. A isomerização da chalcona dá origem à flavanona e partir desse ponto são formadas as demais classes de flavonoides. Elas diferem por pequenas alterações na estrutura carbônica, pelo número e a pela disposição dos substitutos hidroxilados. Além das chalconas e flavanonas, os flavonoides podem ser divididos em flavonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e diidroflavonóis (SIMÕES *et al.* 2003; MACHADO *et al.*, 2008; REZENDE *et al.* 2017).

Nas plantas, os flavonóides são responsáveis pela cor das espécies, além de serem associados à atração de polinizadores, repelentes de insetos, à proteção contra raios ultravioletas, proteção contra microrganismos patógenos, ação antioxidante, ação alelopáticas e inibição enzimática. Enquanto na farmacologia, são associados com a ação antioxidante, anti-inflamatória e inibição do ciclo celular (MACHADO *et al.*, 2008).

Além das chalconas, o malonil-CoA dá origem aos estilbenos. Essa classe de compostos fenólicos tem como representante o resveratrol. Essa substância está presente em cascas de frutas vermelhas e roxas e está associada à ação antioxidante e anti-inflamatória (MACHADO *et al.*, 2008).

2.2.3 Substâncias nitrogenadas

Os metabólitos especializados nitrogenados formam uma classe bastante heterogênea. A principal característica de seus membros é a presença de um ou dois átomos de nitrogênio em sua estrutura, os quais conferem caráter alcalino a seus compostos. Possuem biossíntese mista, pois são formados a partir de aminoácidos aromáticos, da via do ácido chiquímico, e alifáticos, vindos da via do ácido tricarboxílico. Os compostos nitrogenados mais conhecidos são os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (SIMÕES *et al.* 2003; REZENDE *et al.* 2017).

Os alcalóides formam o grupo mais numeroso dos compostos nitrogenados, podem ser formados pelos aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptofano/triptamina, ornitina/arginina e histidina, os quais se unem ao acetato. São exemplos de alcaloides a morfina, codeína e colchicina. Os glicosídeos

cianogênicos possuem um resíduo de açúcar com um grupamento nitrila, são armazenados em vacúolos de diversos lugares da planta, quando ela sofre uma lesão, os glicogênios são liberados, decompostos por enzimas hidrolíticas vegetal, foram o ácido cianídrico, o qual é venenoso para o herbívoro e fitopatógenos. Os glucosinolatos, são responsáveis pelo sabor picante de alguns vegetais, possuem açúcar, nitrogênio e enxofre em sua estrutura. São armazenados em vacúolos, quando liberados, são hidrolisados e formam isotiocianatos e nitrilas, os quais são tóxicos e repelentes de herbívoros (SIMÕES *et al.* 2003; BORGES; AMORIM, 2020).

Os compostos nitrogenados são encontrados nas flores e folhas de plantas mais velhas e atuam como defensivos químicos, causando efeitos no sistema nervoso do herbívoro, como alucinógenos ou venenos. As aplicabilidades humanas são hipertensivas e hipotensivas, estimulantes do sistema nervoso central e vermífica (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

2.2.4 Glicosídeos cardiotônicos

O grupo dos glicosídeos cardiotônicos é formado por substâncias que possuem um anel esteróide, chamado genina, ligado a um anel lactona e à um açúcar. São compostos formados a partir do metabolismo do colesterol, onde sua cadeia lateral sofre sucessivas clivagens oxidativas entre hidroxilas, com posterior adição e lactonização do malonil-CoA, vindo da via MEV. Quando o anel lactona tiver 23 carbonos, o glicosídeo será chamado de cardenolídeo, enquanto com 24 carbonos será bufadienolídeo (SIMÕES *et al.* 2003; PEREIRA; NASCIMENTO, 2017).

Atuam na defesa da planta contra herbívoros, uma vez que ingerida em grandes quantidades causa intoxicação. Os glicosídeos cardiotônicos, atuam no controle da bomba sódio/potássio dos músculos cardíacos, por isso que são utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca (BOTELHO, 2018)

2.2.5 Derivados de ácidos graxos

São substâncias sintetizadas pela via do acetato-malonato, a partir da condensação de unidades de malonil-CoA e Acetil-CoA no interior dos plastídeos. As moléculas formadas são transportadas para o retículo endoplasmático, onde sofrem diversas reações de alongamento pela ação de enzimas do complexo ácido graxo sintase e formam os ácidos graxos de

cadeia longa. Essas cadeias são as precursoras dos derivados de ácidos graxos, que ao serem descarboxiladas formam os alcanos, álcoois secundários e cetonas. Já quando as cadeias de ácidos graxos são reduzidas forma-se os álcoois primários e ésteres. Por fim, quando ocorre reações enzimáticas entre os alcanos ou a perda de hidroxilas dos ácidos graxos são formados os aldeídos. (SIMÕES *et al.* 2003; REZENDE *et al.*, 2017).

Essas substâncias são constituintes da cera cuticular, ou seja, fazem parte de um conjunto de substâncias hidrofóbicas que mantém as superfícies vegetais impermeáveis e restringem a perda de água dos tecidos através da transpiração, além de revestir órgãos aéreos, também é considerada uma barreira entre o meio interno e externo, confere proteção contra os raios UV, contra a entrada de patógenos e poluição (REZENDE *et al.*, 2017).

2.2.6 Policetídeos aromáticos

Os policetídeos aromáticos são metabólitos especializados sintetizados pela via do acetato-malonato, a partir da cadeia carbônica poli- β -cetoéster que sofre diversas ciclizações. Os diferentes tipos de policetídeos aromáticos são distribuídos de acordo com o tipo de molécula utilizada como iniciadora da extensão da cadeia carbônica do malonil-CoA. Uma das classes mais conhecidas desses compostos são as antraquinonas, as quais possuem o acetil-CoA como unidade iniciadora. Podem estar livres, na forma de agliconas ou geninas, ou unidas à glicídios e formando glicosídeos antraquinônicos (SIMÕES *et al.* 2003; SILVA, 2019).

São importantes para a planta, pois a protegem da ação de insetos e doenças, além de evitar que outras espécies cresçam no seu território. Em humanos, as antraquinonas são utilizadas como laxativos, por agirem irritando o intestino grosso, aumentando a motilidade intestinal e, conseqüentemente, diminuindo a reabsorção de água. Além de apresentar potencial mutagênico, sendo positivos testes em células de linfoma de camundongos (SILVA, 2019).

2.3 Identificação fitoquímica de metabólitos especializados

Os metabólitos especializados estão presentes nas plantas de formas distintas, sendo a sua existência um dos fatores que colaboram com a determinação das particularidades entre as famílias, gêneros, e até mesmo

entre as espécies vegetais. O conhecimento do perfil fitoquímico é importante para a compreensão da relação dos compostos bioativos com determinada espécie, como ferramenta de conferência da qualidade da amostra e para o direcionamento de posteriores testes, como métodos de extração e bioensaios (SIMÕES *et al.* 2003; BESSA *et al.*, 2014).

A determinação preliminar do perfil fitoquímico do indivíduo vegetal pode ser realizada através de testes simples e de baixo custo. A metodologia mais antiga e utilizada na fitoquímica é baseada na reação química entre os compostos que são esperados na amostra vegetal e reagentes conhecidos, sendo os detectores da determinada classe de metabólitos especializados. Dentre eles, os testes propostos por Souza *et al.* (2003), Simões *et al.* (2004), Souza (2007) e Silva *et al.* (2015) são utilizados, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1- Testes fitoquímicos utilizados na identificação de classes de metabólitos especializados de espécies vegetais.

Identificação	Teste	Princípio do teste
Terpenos (Saponinas)	Identificação de Saponinas	Formação de anel espumoso
Terpenos (Triterpenos)	Reação de Liebermann-Burchard	Colorimétrico
Flavonoides	Reação de Pew	Colorimétrico
	Reação de Shinoda	Colorimétrico
	Reação de Taubock	Fluorescência
	Reação do cloreto férrico	Colorimétrico
	Reação do cloreto de alumínio	Fluorescência
Taninos	Reação com gelatina	Precipitado
	Reação com acetato de chumbo	Precipitado
	Reação com sais de ferro	Colorimétrico
Alcalóides	Reações com reagentes Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand	Fluorescência
Glicosídeos cardiotônicos	Reação de Legal	Colorimétrico
	Reação de Pesez	Colorimétrico
Antraquinonas	Reação de Borntrager	Colorimétrico

As saponinas, uma das classes de terpenos, formam espuma quando em meio aquoso. Essa situação ocorre, porque constituintes das saponinas diminuem a tensão superficial da água, devido suas diferentes polaridades.

Portanto, a formação de espuma configura a presença de saponina no material vegetal estudado (SIMÕES *et al.* 2003; ROSA, 2016).

Outra classe de terpenos que pode ser identificada com a triagem fitoquímica é a dos triterpenos. Essas substâncias vegetais podem ser identificadas pela reação de Liebermann-Burchard, a qual em meio ácido permite à reação com o reagente evidenciando o núcleo esteroidal desses terpenos através da coloração castanha (SIMÕES *et al.* 2003; MESQUITA *et al.*, 2017).

Os flavonoides podem ser identificados pela união de testes que permitem o reconhecimento de variados tipos dessa classe na amostra vegetal. A reação com cloreto férrico se baseia na interação entre o íon férrico com hidroxilas fenólicas. Por esse motivo, esse teste não é específico para flavonoides, pois podem identificar outras substâncias fenólicas, como os taninos. Ainda assim, esse teste é utilizado como complemento na identificação das classes de flavonoides presentes na amostra. O resultado da reação é verde quando há interação com flavonas e isoflavonas, para flavonóis e flavanonas é verde-acastanhado e para chalconas é amarelo (SIMÕES *et al.* 2003; MACHADO *et al.*, 2008; PEDROSO; SILVA; FURLAN, 2009).

A complexação do íon Alumínio com as moléculas flavonoides formam moléculas estáveis e de coloração amarela, traduzindo o princípio da reação com Cloreto de Alumínio. Quanto maior a intensidade, mais flavonóides existem na amostra. Esse teste não sofre interferência de outros compostos fenólicos (SIMÕES *et al.* 2003; PEDROSO; SILVA; FURLAN, 2009).

A reação de Pew e de Shinoda são fundamentadas pela redução dos flavonoides amarelos em compostos antociânicos de outras colorações. Como a redução ocorre em meio ácido, o ácido clorídrico é utilizado para promover as condições necessárias às duas reações. Na Reação de Pew, o zinco metálico é utilizado como agente redutor. E se houver alteração para a coloração vermelha, significa que todos os tipos de flavonoides estão presentes na amostra. Na reação de Shinoda, o magnésio metálico é utilizado como agente redutor. E nesse caso, as flavonas são identificadas quando a reação se encerra com a coloração laranja, os flavonóis com a coloração vermelha e as flavanonas com coloração violeta. As chalconas e isoflavonas, por continuarem

com a coloração amarela, não são identificadas por esse teste (SIMÕES *et al.* 2003; HUBINGER, 2009; PEDROSO; SILVA; FURLAN, 2009)

A reação de Taubock é determinada pela reação do ácido bórico e ácido oxálico, que ao entrarem em contato com flavonóis, flavonas e chalconas, têm dois radicais de sua estrutura substituídos por compostos orgânicos. Assim, formam compostos borínicos que produzem fluorescência verde-amarelada. Essa reação não ocorre com isoflavonas e flavanonas (SIMÕES *et al.* 2003; HUBINGER, 2009).

Assim como os flavonóides, os taninos pertencem à classe dos compostos fenólicos. Eles são solúveis em água e possuem a capacidade de precipitar alcalóides, gelatinas e outras proteínas. Quando um tanino é submetido a um meio ácido, suas moléculas se alteram e se tornam mais abertas. Ao entrarem em contato com proteínas, como as da gelatina, formam pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos com sítios ativos da proteína. Assim, ocorre o aparecimento de compostos estáveis e insolúveis em água. Dessa forma, a reação com gelatina revela a presença de taninos quando há a formação de precipitados (SIMÕES *et al.* 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são formados pela esterificação da hidroxila do açúcar com tipos específicos de ácidos fenólicos, o ácido gálico e o elágico. São chamados de hidrolisáveis, porque suas ligações ésteres são passíveis de sofrerem hidrólises por ácido ou enzimas. Por isso, que em meio ácido e na presença de sais de metais, ocorre a hidrólise dos taninos e a interação com o íon metálico do sal, formando um precipitado branco. Ou seja, a reação com acetato de chumbo revela presença de taninos hidrolisáveis (SIMÕES *et al.* 2003; GODINHO *et al.*, 2015).

São considerados taninos condensados aqueles que são mais resistentes à hidrólise, devido a sua estrutura polimerizada. Os dois tipos de taninos, quando em contato com sais de ferro, reagem com o íon metálico do sal e tem tanto sua estrutura como sua coloração alterada. Dessa forma, em solução com cloreto férrico, os taninos hidrolisáveis desenvolvem a coloração azul e os condensados a coloração verde (SIMÕES *et al.* 2003; GODINHO *et al.*, 2015).

Para a identificação de alcalóides é comum a utilização de reagentes iodados, como o Mayer e Bouchardat, que são compostos por solução de

iodomercurato de potássio. O reagente de Dragendorff que é formado por iodo-bismuto de potássio. Todos são capazes de precipitar os alcalóides de soluções ácidas sob a forma de poliidetos complexos, com isso, as reações positivas de Dragendorff se tornam alaranjado, a de Mayer se torna branca e Bouchardat marrom. Para complementar os resultados também é utilizado o reativo de Bertrand que é um poliácido mineral complexo formado por ácido sílico-tungstico e que é capaz de precipitar alcalóides de em meio ácido ou neutro na forma de substâncias amorfas ou cristalinas. Ou seja, quando há formação de precipitados brancos, significa que há alcalóides na amostra (SIMÕES *et al.* 2003; SOARES *et al.*, 2016).

Os glicosídeos cardiotônicos podem ser identificados através da Reação de Legal e de Pesez, onde evidencia-se a presença do núcleo esteroidal do composto secundário quando o produto da reação se torna vermelho (SIMÕES *et al.* 2003; SOARES *et al.*, 2016).

As agliconas, que fazem parte da estrutura das antraquinonas, podem ser reveladas pela Reação de Borntrager. Essa reação baseia-se na solubilidade das antraquinonas nos solventes orgânicos imiscíveis com a água, com isso, os derivados desse tipo de composto secundário quando em solução alcalinas se tornam vermelhos ou rosa, dependendo da concentração de compostos antraquinônicos na amostra analisada (SIMÕES *et al.* 2003; SOARES *et al.*, 2016).

A triagem fitoquímica permite maior familiaridade às características das amostras trabalhadas e, por serem de fácil execução e de baixo custo, são realizadas para direcionar quais serão as próximas etapas da pesquisa. Ou seja, devem ser complementadas com testes mais específicos (SIMÕES *et al.* 2003; BESSA *et al.*, 2014).

2.4 Extração e caracterização de metabólitos especializados

2.4.1 Extração

Os metabólitos especializados são encontrados em baixas concentrações nos vegetais, por esse motivo a retirada da amostra biológica deve ser de forma eficaz e seletiva. Esse processo é denominado de extração e permite a exploração das atividades biológicas desses compostos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

As condições de plantio, de coleta e de estabilização do vegetal influenciam a disponibilidade e, conseqüentemente, a qualidade dos compostos bioativos de determinada amostra. Porém a obtenção dos metabólitos especializados não está relacionada somente às condições da planta, mas também pode ser influenciada pela metodologia de extração utilizada, o grau de processamento e o tamanho da partícula dos tecidos vegetais, o solvente utilizado, o tempo de extração, temperatura, polaridade e concentração do solvente (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Para a escolha de um método extrativo, é importante avaliar a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Para isso, existem processos como a maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua quente, extração assistida por microondas, ultra-som, fluido supercrítico e turbólise (COSTA, 1994; SIMÕES *et al.*, 2003).

Devido a simplicidade e custo reduzido, a maceração é muito utilizada como processo extrator. Essa técnica consiste em manter a amostra vegetal em contato com o líquido extrator por um período, que pode variar de três horas até três semanas, em temperatura ambiente e em ambiente fechado. É utilizada para fabricação de extratos sensíveis à degradação térmica e quando se quer manter as características sensoriais da planta. Por não esgotar a quantidade de compostos bioativos, é comum realizar a remaceração para aumentar a eficiência da técnica. Nesse caso, a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando apenas o líquido extrator. Normalmente, a maceração é utilizada como método preliminar para outras metodologias de extração e de fracionamento (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A determinação do solvente utilizado no processo deve considerar a classe de metabólitos que se pretende retirar da amostra. Uma vez que o solvente deve ter a mesma polaridade que a classe de metabólitos, ser volátil e não reagir com a amostra vegetal. Os solventes empregados em extrações vegetais estão listados na tabela 2 (COSTA, 1994; SIMÕES *et al.*, 2003).

Tabela 2 - Metabólitos secundários vegetais extraídos por solventes.

Solvente	Metabólitos secundários
Água	Saponinas, Taninos, Terpenos
Etanol	Alcalóides, compostos fenólicos, Flavonóides, Taninos, Terpenos
Metanol	Compostos fenólicos, Saponinas, Taninos, Terpenos
Clorofórmio	Flavonoides, Terpenos
Éter	Ácidos Graxos, Alcalóides, Cumarinas, Terpenos,
Acetona	Fenol, Flavonol

FONTE: (PANDEY; TRIPATHI, 2014)

Para obtenção final do extrato, o solvente é evaporado. A rotaevaporação é uma boa alternativa para situações que se pretende obter pequenas quantidades de extratos, uma vez que o rotaevaporador permite concentrar o extrato por evaporação de solvente, onde a amostra é continuamente agitada por rotação imposta pelo motor e os vapores de solventes liberados e posteriormente, condensados em um balão. Restando apenas o extrato (RODRIGUES *et al.*, 2016).

2.4.2 Partição do extrato

O extrato é definido como o concentrado de compostos bioativos da amostra vegetal que foram selecionados pela polaridade do solvente utilizado no processo de maceração. Apesar disso, são necessárias técnicas complementares para a segmentação das substâncias presentes nos extratos. A cromatografia é um processo físico de separação, onde os componentes a serem separados se distribuem em duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A primeira fase pode ser um sólido ou um líquido acomodado sobre um suporte sólido. Enquanto a segunda fase pode ser gasosa, líquida ou um fluído supercrítico. Em resumo, a fase móvel passa sobre a fase estacionária e, ao mesmo tempo, arrasta os diversos componentes da mistura (PERES, 2002).

A técnica mais antiga descrita é a cromatografia em coluna (CC), que separa os componentes entre a fase sólida e líquida, baseado na capacidade de adsorção e solubilidade. Em uma coluna de vidro preenchida com material adsorvente, a fase estacionária, o extrato é adicionado no topo da coluna e

separado pela gravidade com a ação dos solventes, chamado de fase móvel, que separam os compostos de acordo com a polaridade (SKOOG, *et al.*, 2008)

A escolha da fase móvel é feita de acordo com a série eluotrópica referente ao adsorvente que está sendo utilizado, seguindo a ordem crescente de polaridade. Quando um solvente puro não consegue separar determinados compostos do extrato, é comum utilizar uma mistura de solventes. Após a passagem pela coluna, o líquido é recolhido e rotaevaporado, levando à evaporação da fase móvel e a obtenção da fração de extrato desejada (SKOOG *et al.*, 2008).

2.4.3 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de separação líquido-sólido dos componentes de uma mistura, onde a fase móvel migra sobre uma camada delgada de adsorvente retido em uma superfície plana, a chamada fase estacionária. Ao percorrer a placa, o solvente arrastará mais os compostos que interagem menos com a fase estacionária e com isso, ocorrerá a separação dos componentes mais adsorvidos (WAGNER; BRADT, 1986; COLLINS, 2010; MARQUES; BORGES, 2012; PERES, 2020).

Os compostos mais apolares passam pela coluna com velocidade maior do que os polares, pois os últimos têm mais afinidade com a fase estacionária que é polar. Enquanto os solventes muito polares podem eluir todos os componentes ao mesmo tempo e não haverá separação. Com isso, a escolha do solvente é determinante para o sucesso da técnica (WAGNER; BRADT, 1986; COLLINS, 2010; MARQUES; BORGES, 2012; PERES, 2020).

Além da escolha dos solventes, a escolha do revelador também é um ponto crítico do processo. Uma vez que ao final da secagem da placa cromatográfica, os compostos separados podem não ser visíveis. Para solucionar essa situação, é utilizado um revelador no final da técnica. Entre os mais utilizados estão: luz ultravioleta, vapor de iodo, anisaldeído, ninhidrina, ácido fosfomolibdico, vanilina e permanganato de potássio (WAGNER; BRADT, 1986; COLLINS, 2010; MARQUES; BORGES, 2012; PERES, 2020).

A CCD é um processo considerado rápido, eficiente e de baixo custo, podendo estabelecer a identidade de compostos, determinar o número de componentes de uma mistura, direcionar a escolha do solvente para uma

cromatografia em coluna e assegurar a identidade de um composto (WAGNER; BRADT, 1986; COLLINS, 2010; MARQUES; BORGES, 2012; PERES, 2020).

2.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica empregada na separação de componentes de uma mistura. É utilizada para identificar, quantificar e purificar compostos de determinada amostra. Na CLAE, a fase móvel e a estacionária são escolhidas de modo que os componentes da amostra analisada se comportem de formas distintas entre as fases, uma vez que elas são imiscíveis. Os compostos que interagem fortemente com a fase estacionária movem-se mais lentamente na fase móvel e, por isso, são eluídos posteriormente aos componentes com baixa interação com a fase estacionária. Essa retenção seletiva dos componentes da amostra resulta em migrações diferenciadas dos compostos de interesse, o que permite a identificação destes (COLLINS *et al.*, 1983; CIOLA, 1998; PACHECO *et al.*, 2015).

Diferente da cromatografia líquida clássica, a coluna da CLAE é fechada e a vazão da fase móvel é controlada por bombas, que permitem uma vazão contínua, sem pulsos. As válvulas de injeções permitem a injeção de diferentes quantidades de amostras no sistema. A fase móvel deve ser um solvente que solubiliza a amostra sem qualquer interação química entre amostra e fase móvel, enquanto a fase estacionária (coluna) deve ser compatível com o detector, possuindo polaridade adequada para permitir a separação dos componentes da amostra. Vários detectores podem ser colocados na saída da coluna, estes devem apresentar ampla faixa de aplicação, proporcionando identificação e quantificação contínua da amostra. O detector mais empregado é o ultravioleta, sendo também usado o detector de fluorescência, índice de refração, eletroquímicos e outros (COLLINS *et al.*, 1983; CIOLA, 1998; PACHECO *et al.*, 2015).

Muito utilizada na caracterização de extratos vegetais, a CLAE é de fácil execução, grande exatidão e versatilidade, a possibilidade de análise de misturas complexas com alta resolução, permite a coleta dos componentes de uma mistura em frações separadas para posterior tratamento e a

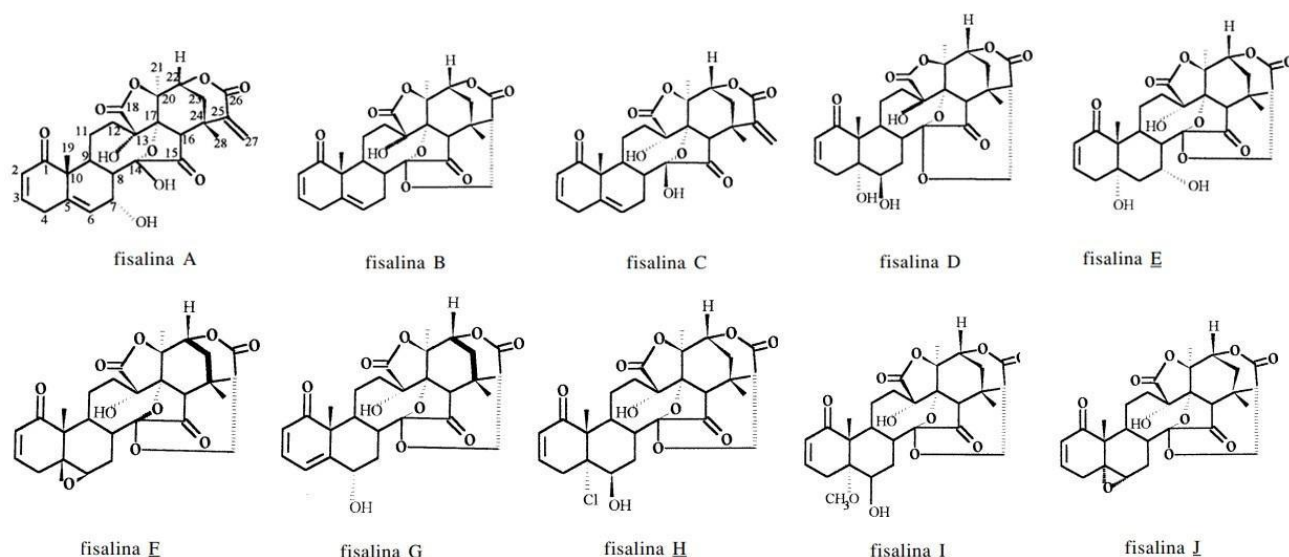
disponibilidade de sistemas automatizados (COLLINS *et al.*, 1983; CIOLA, 1998; PACHECO *et al.*, 2015).

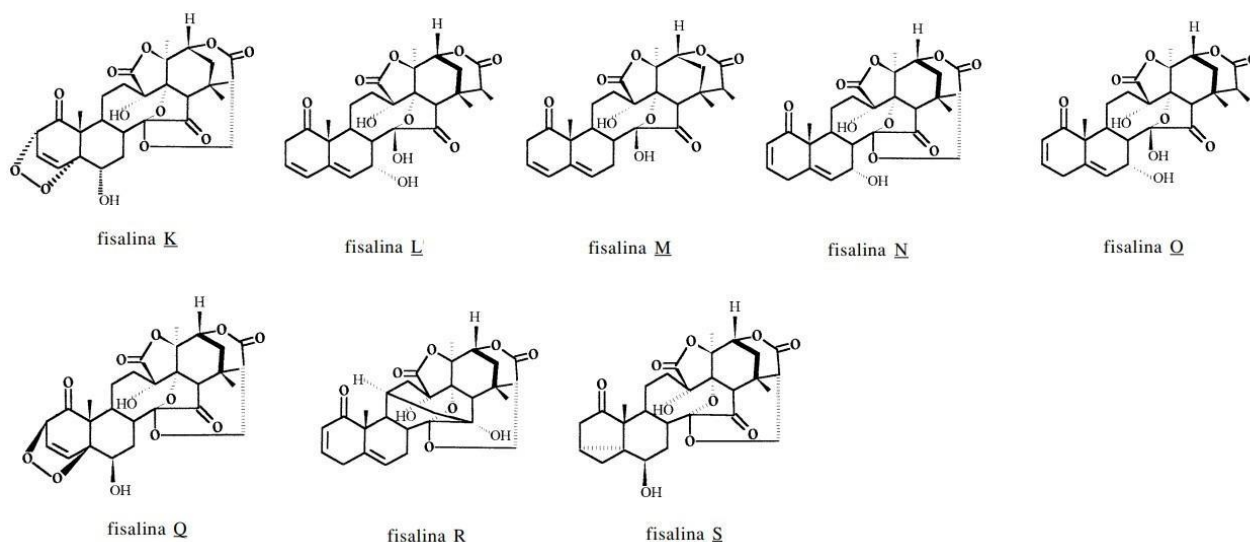
2.5 Metabólitos especializados de *Physalis angulata*

Os membros da família *Solanaceae* produzem um grupo específico de substâncias denominadas vitaesteróides. São terpenos, derivados da rota do ácido mevalônico, classificados como triterpenos e mais especificamente, como esteróides. Os vitaesteróides são compostos bioativos, caracterizados como lactonas esteroidais que reproduzem o esqueleto intacto do ergostano, sendo sua maioria polioxigenados. Devido à grande variedade estrutural, os vitaesteróides, são classificados em vitanolidos, vitafisalinas, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas e fisalinas (FERREIRA, 2018).

As fisalinas são moléculas complexas que apresentam uma segunda lactona fundida ao anel D. São derivados esteroidais do tipo 13,14-seco-16,24 ciclo ergostano, carbonilados em C-15. Dentro da classificação das fisalinas, existem uma grande variedade de estruturas, conforme é visto na Figura 2, que incluem compostos com anéis octacíclicos, nonacíclicos, decacíclicos ou undecacíclico (TOMASSINI *et al.*, 2000).

Figura 2 - Estruturas químicas dos diversos tipos de fisalinas relatados na literatura.





Fonte: Tomassini *et al.*, 2000

Os registros científicos apontam que os indivíduos do gênero *Physalis* são reconhecidos pela produção de fisalinas, além de apresentarem compostos bioativos comuns à outras espécies vegetais, como os alcaloides, flavonoides, fenilpropanóides e triterpenóides e esteróides (ALAMINO, 2011; TOMASSINI *et al.*, 2000).

O perfil fitoquímico das partes aéreas de *Physalis angulata* realizado por Pontes (2015), identificou a presença de compostos fenólicos totais, flavonoides e saponinas, reforçando os achados de Medina-Medrano *et al.* (2015), que também comparou as concentrações desses compostos em diferentes partes da *P. angulata*. Ainda, Ferreira (2018) encontrou esteróides, terpenóides e taninos, principalmente, nas amostras de folhas.

2.5.1 Extratos, frações e compostos da *Physalis angulata*

Ao pesquisar determinada espécie vegetal é comum que testes sejam realizados a fim de encontrar qual o extrato mais adequado para extrair os compostos desejados de acordo com o objetivo do trabalho. Assim também acontece com a *P. angulata* que tem registros de diversos extratos na literatura, como Lopes *et al.* (2006) que trabalhou com extrato aquoso e etilenoglicólico de raízes e extrato aquoso, propilenoglicólico e etanólico do fruto para pesquisar a atividade antimicrobiana e fototóxica dessa planta. Pontes (2015) preparou extratos hidroalcolico e etanólico das partes aéreas da *P. angulata* para avaliar seu o potencial antimicrobiano e modulador da resistência a antibióticos. Enquanto Medina-Medrano *et al* (2015) pesquisou os

compostos fenólicos e o potencial antioxidante do extrato metanólico de folhas, frutos e cálices da *P. angulata*.

Aprofundando as técnicas químicas, Januário *et al.* (2002) utilizou clorofórmio na extração das partes aéreas de *P. angulata* com posterior fracionamento utilizando hexano, acetato de etila, acetato e metanol como eluentes. Três das frações obtidas foram escolhidas para serem recromatografadas e possibilitarem a chegada à fisalinas B e D puras. Alves (2010) realizou a extração de caule de *P. angulata* com etanol, o qual foi partido com diferentes concentrações da mistura de Hexano/Acetato de etila e finalmente, sendo possível a identificação de fisalinas D e K foram identificadas por ressonância magnética nuclear (RMN). Anos mais tarde, Silva *et al.* (2018) utilizou o extrato metanólico das partes aéreas de diferentes espécies de *Physalis* como base para a partição clorofórmica que resultasse em frações enriquecidas em fisalinas. Após análise em CCD, CLAE e RMN, foram identificadas fisalinas D e G em determinadas das frações através da comparação dos espectros no UV.

2.5.2 Atividades biológicas das partes aéreas de *Physalis angulata*

Aos longo dos anos, estudos com *P. angulata* têm demonstrado importantes propriedades biológicas, relacionadas à atividades calmante e depurativa (PIO CORRÊIA, 1984), atividade antitumoral (CHIANG *et al.* 1992; ISMAIL; ALAM, 2001; SHU *et al.*, 2004; MAGALHÃES, 2005; ALVES *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009), atividade neuromuscular (MELO; AFIATPOUR, 1985), atividade imunomodulatória (LIN *et al.*, 1992; SOARES *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010), atividade anti-inflamatória (CHOI; HWANG, 2003; BASTOS *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2010), atividade antimicrobiana (PIETRO *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2005; OSHO *et al.*, 2010; GOUVEIA *et al.*, 2020), atividade tripanocida (NAGAFUJI *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2008) e atividade antileishmania (GUIMARÃES *et al.*, 2010; DA SILVA, 2015; DA SILVA, B. J. . *et al.*, 2016; DA SILVA, *et al.*, 2018).

Essas atividades têm sido relacionadas com a diversidade de metabólitos especializados presentes nessa espécie, como flavonoides,

alcaloides e terpeno, mais especificamente, os vitaesteróides (RENGIFO-SALGADO; VARGAS-ARANA, 2013).

2.5.2.1 Atividade antioxidante

Compostos antioxidantes são aqueles capazes de retardar a velocidade de oxidação, por meio de inibição de radicais livres e/ou complexação de metais. Os compostos antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, pois eles são capazes de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Extratos vegetais têm seu potencial antioxidante relacionado à concentração de compostos fenólicos e do perfil de acumulação destes nos tecidos vegetais. A concentração é influenciada por condições ambientais, idade e estágio fenológico, enquanto o perfil fenólico é mais estável e varia entre os diferentes grupos de vegetais, seguindo uma tendência específica para cada espécie (MEDINA-MEDRANO *et al.*, 2015).

Uma técnica fácil, precisa, rápida, simples e econômica utilizada para detectar a presença de compostos antioxidantes em extratos vegetais é o método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, também chamado de DPPH. O DPPH é uma molécula instável e bastante reativa, que possui cor púrpura devido a localização do elétron livre. Ao entrar em contato com uma substância antioxidante, recebe um átomo de hidrogênio e se torna estável. Com isso, a coloração da molécula altera de roxo escuro para violeta claro ou amarelo, diminuindo o valor de absorbância do radical DPPH (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Cobaleda-Velasco *et al.* (2017) relacionou a capacidade antioxidante ao perfil fitoquímico de diferentes partes de *P. angula* em diferentes estágios de desenvolvimento em extrato etanólico. As amostras com maiores concentrações de compostos fenólicos, apresentaram maior capacidade de neutralizar os radicais DPPH. Em um mesmo momento de desenvolvimento, notou-se que há diferenças de acúmulo de compostos fenólicos entre os tecidos dessa planta e, dependendo do tecido analisado, há diferenças significativas entre suas etapas de crescimento, como o EC₅₀ de 1,02 g/mL

encontrado em caules no estágio 2 de desenvolvimento que aumentou para 1,08 g/mL em caules no estágio 3.

Assim como, Silva *et al.* (2020) utilizou folhas, casca e fruto de *P. angulata* para relacionar a concentração de compostos fenólicos com a atividade antioxidante. Os autores concluíram que folhas têm 130 mg/mg de extrato de compostos fenólicos, sendo 14 mg a mais que a casca e 27 mg que as folhas. Os resultados da atividade antioxidante foram proporcionais, isto é, as folhas inibiram 57,68% dos radicais, as cascas 45,78% e os frutos 39,48% na concentração de 1,25 g/mL de extrato.

As folhas de *P. angulata* foram utilizadas por Fawole *et al.* (2013) para comparar as atividades antioxidantes dos extratos aquoso e etanólico, através do método DPPH, e concluiu que o último se apresentou com a melhor porcentagem de inibição, de 9,58 na concentração de 0,025 g/mL. Resultados compatíveis foram obtidos por Kusumaningtyas; Laily; Limandha (2015) que concluíram que o extrato etanólico, na concentração 4311 mg/mL, tem maior capacidade para neutralizar os radicais DPPH que o extrato aquoso na concentração 1575 mg/mL. Já Susanti *et al.* (2015) comparou as atividades dos extratos aquoso, etanólico e aquoso subcrítico e conclui que o melhor EC50 (102,318) foi encontrado no último extrato. Muito antes, o extrato metanólico também apresentou atividade antioxidante, na mesma metodologia, conforme relatado por Silva *et al.* (2005).

2.5.2.2 Atividade antimicrobiana

Ao ser exposto a algum tipo de microrganismo patogênico, o ser humano pode desenvolver enfermidades. É considerável a diversidade de agentes causadores de doenças, suas particularidades e estratégias específicas para sobreviver e se replicar no hospedeiro.

As bactérias do gênero estafilococos, como a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, são uma das principais causadoras de infecções respiratórias, urinárias e sanguíneas em todo o mundo. A notável capacidade dessas bactérias adquirirem resistência aos antibióticos limita as opções de terapia e, conseqüentemente, pode aumentar a morbidade e mortalidade do paciente (PEREIRA *et al.*, 2010). A *Pseudomonas aeruginosa* é encontrada em abundância em diversos ambientes e se o paciente estiver com a imunidade

comprometida pode causar infecções cutâneas, respiratórias, oculares e urinárias (STRATEVA; YORDANOV, 2009). Assim, como a *P. aeruginosa*, o *Bacillus subtilis* é considerado um patógeno oportunista principalmente de ambientes hospitalares. A dificuldade em se combater essa bactéria se dá pela capacidade de formar endósporos desidratados, permitindo a sobrevivência em ambientes livres de nutrientes (MCKENNEY *et al.*, 2013). Já a *Escherichia coli* não forma endósporos e, dependendo da configuração do genoma, seu estilo de vida pode variar de comensalismo a patogenicidade. Elas são importantes agentes entéricos e extraintestinais, sendo responsáveis por significativos surtos de infecções (JUHAS *et al.*, 2014).

Entre as leveduras patogênicas, as causadoras de candidíase são as mais conhecidas. Geralmente se manifestam de forma superficial em pacientes saudáveis, afetando a pele, boca ou vagina. No entanto, em pessoas idosas, pacientes com doenças graves ou indivíduos com imunidade comprometida, as *Candidas* podem superar a resistência do sistema imunológico, alcançar órgãos internos e resultar em uma infecção disseminada séria, conhecida como candidíase disseminada ou candidíase invasiva. Entre as espécies encontradas em seres humanos, a *Candida albicans* é a mais comum tanto em condições saudáveis como em casos de doença. No entanto, estudos micológicos revelaram que, nas últimas duas décadas, o número de infecções causadas por espécies que não são *Candida albicans* tem aumentado significativamente, com as causadas pela *Candida parapsilosis* e *Candida kruzei* (HUAN; HSUEH, 2009; PAPON *et al.*, 2013).

Os fungos dermatófitos possuem a capacidade de crescer e se alimentar de estruturas ricas em queratina, como pele, unhas, cabelos, garras, chifres e penas. Nos hospedeiros com um sistema imunológico saudável, esses fungos geralmente causam lesões leves. No entanto, em indivíduos com um sistema imunológico comprometido, as infecções podem se tornar graves e se espalhar para outras partes do corpo. Apresentam distribuição mundial, sendo relevantes em veterinária e saúde pública, como os *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* (REZAEI-MATEHKOLAEI *et al.*, 2014).

Considerando a resistência dos microrganismos ao antimicrobianos existentes que os extratos vegetais surgem como potencial alternativa devido a

rica variedade de substâncias presentes nas plantas, como saponinas, taninos, alcalóides, flavonóides, sesquiterpenos, lactonas, terpenóides e ésteres. Alguns estudos, também, têm demonstrado que o efeito sinérgico entre estas substâncias têm intensificado as propriedades bioativas de extratos vegetais e consequentemente a ação sobre patógenos (MEDINA-MEDRANO *et al.*, 2015).

A determinação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais pode ser realizada por diferentes métodos, como aqueles realizados em caldo: método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de microdiluição e microdiluição. Os métodos de difusão em ágar ou em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de uma substância contra um patógeno. Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos vegetais, tem-se utilizado mais frequentemente o método de microdiluição em caldo (OSTROSKY, 2008).

Um dos métodos mais descritos na literatura, é o método de microdiluição que se revela um teste sensível e reprodutível quando segue as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), somente sendo necessário a atenção em determinados fatores para não reproduzir resultados errôneos, como meio de cultura adequado ao microrganismo utilizado, a forma de solubilização dos extratos e a concentração do inóculo (ROQUETE, 2018).

A propriedade antimicrobiana da *P. angulata* foi demonstrada em diversos momentos da literatura. Inicialmente, Lopes *et al.* (2006) através do método em difusão em ágar para *Staphylococcus aureus*, relatou que o extrato etanólico e glicólico dos frutos de *P. angulata* obtiveram halo de inibição de 11,17 mm e o extrato propilenoglicólico 12,16 mm. Osho *et al.* (2010) concluiu que o óleo de *P. angulata* possui atividades antifúngicas mais efetivas que as bacteriostáticas e que as partes aéreas são mais ativas que as radiculares.

Em 2015, partes aéreas de *P. angulata* foram extraídas em mistura hidroalcóolica a 70% e etanólica bruta, com posterior avaliação pela Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para *Streptococcus oralis* a concentração mínima inibitória foi de 1,0 mg/mL. Ao final do estudo, sugeriu-se que a capacidade antimicrobiana se dá pelos esteróides presentes na planta (PONTES, 2015).

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato clorofórmico de folhas de *P. angulata* através do método de diluição em tubo foi determinada por Ushie *et al.* (2019) que obteve resultados satisfatórios frente a *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Já, Dias *et al.* (2020) encontrou a concentração inibitória mínima de 50 mg/mL do extrato aquoso de folhas de *P. angulata* contra o *S. aureus* e de 10 mg/mL para *Listeria monocytogenes*.

A fim de reconhecer as propriedades e ações de cada substância da *P. angulata*, estudos buscam isolar e caracterizar quimicamente os seus componentes, como, os alcalóides (BASEY; MCGAW; WOOLLEY, 1992), flavonóides simples e glicosilados; ácidos graxos; carotenoides (ISMAIL; ALAM, 2001), componentes voláteis (RAMADAN; EL-GHORAB; GHANEM, 2015) e esteróis (JANUÁRIO *et al.*, 2002). Jin *et al.* (2012) afirmaram que os isolados de fisalinas, withangulatinas, fisangulinas, fisanolidas, entre outros compostos isolados de *P. angulata* possuem relevante atividade biológica.

Os fitoesteróis, especialmente as fisalinas B, F e G podem auxiliar na terapia de doenças alérgicas e autoimunes e atuam na prevenção da rejeição de transplantes, pois apresentam efeitos imunomoduladores (BEILINTANI, 2002). Essas mesmas fisalinas se mostraram importantes no combate à Leishmaniose, pois inibem o crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, agente transmissor da doença (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Silva *et al.* (2005), testaram um pool de fisalinas e obtiveram resultados satisfatórios nos testes antimicrobianos com o extrato etanólico de folhas frente a *Neisseria gonorrhoeae*. Os extratos aquoso e etanólico de *P. angulata* inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Pietro *et al.* (2000) elucidou o papel das fisalinas na atividade antimicrobiana, avaliando a ação do extrato clorofórmico e os produtos obtidos do fracionamento da planta frente a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, e *Mycobacterium malmoeense*, através de testes de concentração inibitória mínima. Os resultados mostraram que 500 µg/mL de extrato bruto de *P. angulata* causou inibição total do *Mycobacterium tuberculosis*, enquanto foram necessários 32 µg/mL da fração A1-29-12 para inibir 100% da atividade de *M. tuberculosis* e 325 µg/mL para o *M. avium*. Januário *et al.* (2002) afirmaram que a fisalina B é ótima na atividade antimicobacteriana, enquanto a fisalina D possui alta atividade citotóxica. Silva

et al. (2016) realizaram análises cromatográficas, de partes aéreas em extrato metanólico, de *Physalis angulata*, *Physalis peruviana* e *Physalis ixocarpa* e isolaram frações de fisalinas D e G em todas as espécies.

2.5.2.3 Biofilme

A formação de biofilme é uma adaptação dos microrganismos para sobrevivência em ambientes hostis ou para a colonização de novos nichos. Os biofilmes microbianos formam um sistema biológico constituído por comunidades de células agregadas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas produzidas pelas próprias células, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (DONLAN; COSTERTON, 2002).

O sistema biológico do biofilme forma uma comunidade heterogênea e que se dispõe em três dimensões. Os indivíduos se comunicam através da secreção de sinais químicos, permitindo que elas respondam fenotipicamente às mudanças ambientais. Dessa forma, exibem diferenças na expressão de moléculas de superfície, resistência a antibióticos, utilização de nutrientes e de fatores de virulência, tornando sua morte muito mais difícil. Por esses motivos, componentes originários de extratos vegetais vêm sendo explorados no intuito de buscar novas alternativas para tratamentos contra antimicrobianos (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

Bazana et al. (2020) obteve bons resultados ao testar o extrato etanólico de cálice de *Physalis peruviana* contra a inibição da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* nos estágios iniciais. Em relação à *P. angulata*, Vieceli (2021) demonstrou que o extrato etanólico de caule de *P. angulata* reduziu efetivamente a progressão da periodontite crônica em condições experimentais. Diante de resultados promissores, novos estudos na linha de pesquisa da ação de *P. angulata* contra biofilmes se fazem interessantes.

2.6 Nanoemulsão

A nanotecnologia é uma área de estudo recente que impacta as mais diversas áreas da sociedade, tendo como eixo o desenvolvimento de novos processos, produtos e materiais através da capacidade de manipular átomos e moléculas da grandeza de 1 a 100 nanômetros (NM). Essa nova técnica se apresenta mais vantajosa que as convencionais, pois permite o alcance da

estabilidade cinética, maior poder de absorção e/ou penetração, maior biodisponibilidade, o aumento da solubilidade em água para substâncias pouco solúveis (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; PORTO *et al.*, 2020).

Com constantes buscas por aperfeiçoamento de sistemas terapêuticos, a nanotecnologia se apresenta como alternativa para inovação de medicamentos. Uma vez que podem proteger o fármaco no sistema terapêutico contra as instabilidades do organismo e mantendo seus níveis plasmáticos em concentrações constantes. Dentre as técnicas nanotecnológicas, se destaca a categoria de nanoemulsão (NE) (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; PORTO *et al.*, 2020).

As NEs são sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis, sendo utilizado um tensoativo para a estabilização das fases aquosa e oleosa e obtenção de amostras homogêneas e estáveis. Dessa forma, são obtidas através da aplicação de altas intensidades de agitação, fundida em um dispersante quente em uma fase oleosa com o ativo pesquisado, com adição do tensoativo e, posteriormente, resfriamento. Na indústria, são utilizadas como veículos, pois apresentam vantagens na veiculação de ativos tanto hidrofílicos como lipofílicos na mesma formulação (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; BRUXEL *et al.*, 2012; PORTO *et al.*, 2020).

O uso de extratos vegetais ou derivados tem sido uma realidade tanto para a indústria alimentícia como para a farmacêutica, pois são fonte variada de compostos biologicamente ativos. Entretanto, alguns aspectos da matéria prima vegetal podem dificultar a sua aplicação e administração, como a baixa solubilidade em água, baixa absorção e biodisponibilidade. Pensando nisso, Silva (2018) desenvolveu nanoemulsão com extrato de *P. peruviana* e avaliação da estabilidade e citotoxicidade. Bazana *et al.* (2019) preparou, caracterizou e testou a atividade antioxidante da nanoemulsão do extrato etanólico de cálice de *P. peruviana*. Apesar dos dados registrados por Silva (2018) e Bazana *et al.* (2019), os estudos não foram estendidos para outras espécies de *Physalis*.

3. OBJETIVOS

Considerando os aspectos apresentados na revisão da literatura, o objetivo deste estudo foi analisar a atividade antioxidante de extratos e a

capacidade de inibição de crescimento de cepas de microrganismos de interesse na Saúde Pública na presença dos extratos, de frações enriquecidas de fisalinas e suas incorporações em nanoemulsões, a partir das partes aéreas de *P. angulata*. Os

objetivos específicos deste trabalho foram:

- Identificação das principais classes de metabólitos secundários das partes aéreas de *P. angulata*
- Obtenção dos extratos etanólico, clorofórmico e frações
- Determinação da atividade antioxidante dos extratos etanólico e clorofórmico
- Avaliação das atividades antimicrobianas dos extratos etanólico, clorofórmico e frações frente a fungos filamentosos, leveduras e bactérias
- Avaliação do potencial de inibição da formação de biofilme de *Candida albicans* com o extrato e frações de melhor atividade
- Realização de cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência
- Identificação das frações com melhores resultados nos testes antimicrobianos

Incorporação em nanoemulsão das frações que apresentaram melhores resultados nos testes antimicrobianos

- Avaliação das atividades antimicrobianas das nanoemulsões frente a fungos filamentosos, leveduras e bactérias

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado consistiu em partes aéreas de *Physalis angulata* previamente coletada, secada, identificada e enviada pelo Prof. Dr. Fabiano Guimarães do Instituto Federal Goiano, através da parceria firmada entre a Instituição e a Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Campus Araraquara. *P. angulata* está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio

Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob número de cadastro AD73F75.

4.2. Caracterização das classes de metabólitos secundários

A triagem fitoquímica preliminar, para a identificação das principais classes de metabólitos secundários das partes aéreas da *P. angulata*, foi realizada conforme as metodologias estabelecidas por Souza *et al.*(2003), Simões *et al.*(2004), Souza (2007) e Silva *et al.*(2015).

4.2.1. Flavonóides

Em um béquer, adicionou-se 3 gramas da planta moída a 20 mL de éter de petróleo. Agitou-se durante 10 minutos com aquecimento em Banho-Maria. Então, filtrou-se e secou-se o pó, e em seguida, colocou-se o pó em um béquer com 20 mL de metanol. Novamente, aqueceu-se em Banho-Maria por 10 minutos, filtrou-se a amostra e evaporou-se o filtrado até a secura. Por fim, obteve-se o extrato final, suspendendo a amostra obtida após a evaporação do filtrado com 10 mL de etanol.

4.2.1.1. Reação de Shinoda

Em um tubo de ensaio, colocou-se 1 mL do extrato final e adicionou-se um fragmento de magnésio metálico e gotas de ácido clorídrico concentrado. Aguardou-se o aparecimento de coloração laranja, vermelha ou violeta, a fim de determinar a positividade do teste.

4.2.1.2. Reação de Taubock

Em Banho-Maria, evaporou-se 3 mL do extrato final até a secura. Resfriou-se o resíduo, e após, umedeceu-se com algumas gotas de acetona. Então, adicionou-se alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Novamente, evaporou-se até a secura. Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de éter etílico e observou-se sob luz ultravioleta. Em seguida, aguardou-se o aparecimento de fluorescência verde-amarelada para determinar a positividade do teste.

4.2.1.3. Reação de Pew

Evaporou-se em Banho-Maria, 3 mL do extrato final até a secura. Ao resíduo, adicionou-se 3 mL de metanol, uma pequena porção de zinco

metálico e 3 gotas de ácido clorídrico concentrado. Aguardou-se o aparecimento da coloração vermelha para determinar a positividade do teste.

4.2.1.4. Reação do cloreto férrico

Em 1 mL do extrato final, adicionou-se algumas gotas de cloreto férrico a 2%. Aguardou-se a alteração da coloração da mistura para verde, verde-acastanhado ou amarelo, indicando a presença de determinadas classes de flavonóides.

4.2.1.5. Reação do cloreto de alumínio

Em um papel filtro, umedeceu-se duas diferentes áreas com o extrato final. Sobre uma delas, colocou-se uma gota de cloreto de alumínio 5% em etanol. Observou-se, sob luz ultravioleta, a intensificação da fluorescência amarelada para determinar a positividade do teste.

4.2.2. Taninos

Cozinhou-se 5 gramas da planta moída com 100 mL de água destilada estéril por 15 minutos. Filtrou-se, deixou-se esfriar e, em seguida, obteve-se o extrato final.

4.2.2.1. Reação com acetato de chumbo

Misturou-se 5 mL do extrato final com 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. Aguardou-se a formação de precipitado esbranquiçado, a fim de revelar a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.2.2. Reação com gelatina

Misturou-se 2 mL da solução extrativa com 2 gotas de ácido clorídrico diluído e solução de gelatina 2,5%. Aguardou-se a formação de precipitado, a fim de revelar a presença de taninos.

4.2.2.3. Reação com sais de ferro

Misturou-se 2 mL da solução extrativa com 10 mL de água destilada estéril, em seguida, adicionou-se 2 a 4 gotas de solução de cloreto férrico a 1% em metanol. Aguardou-se a coloração azul ou verde, a fim de identificar a presença de taninos hidrolisáveis e taninos condensados, respectivamente.

4.2.3. Glicosídeos cardiotônicos

Adicionou-se 5 gramas da moída à 50 mL de etanol:água (70:30, v/v). Aqueceu-se, suavemente, em Banho Maria por 10 minutos. Esfriou-se e filtrou-se. Complementou-se, com a mistura de etanol:água, até o volume de 30 mL. Adicionou-se 30 mL de água deionizada e 15 mL de solução de acetato de chumbo 10%. Agitou-se, repousou-se e filtrou-se. Adicionou-se 10 mL de solução de fosfato de ácido de sódio 10%, agitou-se, repousou-se e filtrou-se. Transferiu-se o filtrado para um funil de separação e extraiu-se o clorofórmio em duas etapas, utilizando 15 mL em cada etapa. Juntou-se as fases orgânicas, tratou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se até metade do volume. Dessa forma, obteve-se o extrato clorofórmico.

4.2.3.1. Reação de Legal

Evaporou-se 2 mL do extrato clorofórmico. Após, dissolveu-se 1 mL de piridina em 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 10% e 0,5 mL de solução de nitroprussiato de sódio 10%. Aguardou-se o aparecimento de coloração vermelha para determinar a positividade do teste.

4.2.3.2. Reação de Pesez

Evaporou-se 2 mL do extrato clorofórmico em um tubo de ensaio. Adicionou-se, ao resíduo, 1 mL do reagente de Pesez A e aqueceu-se aproximadamente a 100°C por 3 minutos. Esfriou-se e colocou-se o reagente de Pesez B. Observou-se a cor. Ferveu-se, novamente, a fim de observar, aparecimento de coloração vermelha ou não.

4.2.4 Terpenos

4.2.4.1. Formação de anel espumoso

Aqueceu-se, sob refluxo e durante 10 minutos, 2 gramas da planta moída com 10 mL de água destilada estéril. Esfriou-se e filtrou-se para um tubo de ensaio, completando-se para 10 mL o volume final. Agitou-se, durante 15 segundos, o tubo vedado no sentido do seu comprimento. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Verificou-se em seguida o aparecimento de um anel de espuma. Ao anel, adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico 2N (20%) e aguardou-se a persistência do anel de espuma para determinar a presença de saponinas.

4.2.4.2. Reação de Liebermann-Buchard

Utilizou-se o extrato clorofórmico obtido no item 4.2.3. Em um tubo de ensaio, evaporou-se 2 mL. Ao resíduo, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Aguardou-se a mudança e estabilização da coloração castanha, a fim de determinar a presença de triterpenos.

4.2.5. Alcalóides

4.2.5.1 Reações com reagentes Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand

Na primeira etapa, realizou-se a extração em meio alcalino. Para isso, utilizou-se 5 gramas da planta moída, homogeneizou-se e alcalinizou-se com carbonato de cálcio a 10%. Adicionou-se 25 mL de clorofórmio, homogeneizou-se, filtrou-se a mistura para um funil de separação através de papel previamente embebido em clorofórmio e agitou-se o filtrado com 7 mL de ácido clorídrico 2%.

Na segunda etapa, separou-se a camada superior para a realização das reações de caracterização (precipitação) com os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand, colocando-se uma gota do reagente ao lado de outra da solução ácida em uma lâmina de microscópio, unindo-as posteriormente. Observou-se a reação sob a luz ultravioleta. Aguardou-se formação de precipitado na reação de Mayer, coloração branca na reação de Mayer, marrom na de Bouchardat, laranja na de Dragendorff para determinar a presença de alcalóides na amostra.

4.2.6. Antraquinonas

Agitou-se 1 grama de planta moída com 10 mL de éter etílico e filtrou-se. À solução etérea, adicionou-se 1 mL de amônia diluída com agitação. Aguardou-se a formação de camada aquosa rósea para determinar a presença de antraquinonas.

4.2.6.1 Reação de Borntrager

Ao pó obtido no item 4.2.6, adicionou-se 20 mL de água e aqueceu-se à ebulição por 5 minutos. Após, resfriou-se e filtrou-se a solução. Ao filtrado, juntou-se 10 mL de HCl 1N e 3 mL de água oxigenada 30%. Novamente,

resfriou-se e filtrou-se a solução. Extraíu-se por duas vezes com 5 mL de éter etílico. Juntaram-se as fases etéreas e agitou-se com 3 mL de amônia diluída. Aguardou-se a formação de camada aquosa rósea para determinar a presença de antraquinonas tipo agliconas.

4.3. Extração

As partes aéreas da *P. angulata* foram trituradas e em seguida, maceradas na proporção de 50 g/L de clorofórmio, sendo armazenadas em vidro âmbar, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, sem agitação, por 15 dias. Posteriormente, filtrou-se, a rota evaporou-se a 40°C e 80 rpm e secou-se o extrato em capela até a massa constante. Repetiu-se o procedimento utilizando álcool etílico absoluto.

O cálculo do rendimento total dos extratos clorofórmico e etílico, foram realizados de acordo com a equação 01.

$$Re = (P_{ext} / P_{partes\ aéreas}) \times 100$$

Equação 1: Rendimento do extrato

em que:

Re é o rendimento total do extrato (%);

P_{ext} é o peso do extrato seco (g);

P_{partes aéreas} é o peso das partes aéreas secas (g).

4.3. Partição do extrato

Utilizou-se uma coluna de fracionamento de 25 centímetros de altura e 6 centímetros de diâmetro, e sílica gel 60 mesh, como material adsorvente da cromatografia em coluna.

Calculou-se o volume morto da fase móvel, de acordo com a equação 02. Com o resultado da equação, descobriu-se a quantidade de solvente a ser utilizado no processo. Pesou-se a quantidade de adsorvente necessária para preencher 2/3 da coluna e secou-se o material em estufa a 110°C por 60 minutos.

$$V_m = \pi \times R^2 \times h \times 0,65$$

Equação 2: Volume morto

em que:

VM é o volume morto (mL);

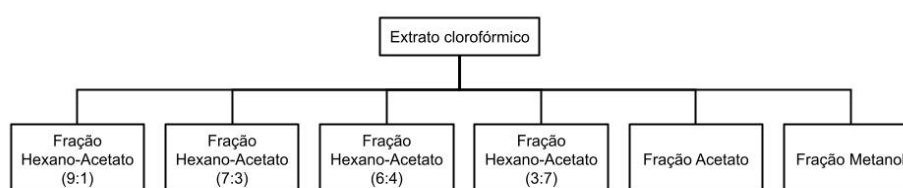
R é o raio da coluna (cm);

h é a altura da coluna que será ocupada pela sílica (cm).

Preparou-se a coluna, com o auxílio de um bastão de vidro, colocou-se uma camada de algodão no final da coluna e, em seguida, depositou-se delicadamente a sílica seca, batendo levemente durante o processo de preenchimento da coluna para o empacotamento correto. Para ambientação da coluna, utilizou-se o solvente hexano-acetato (9:1) na quantidade de volume morto determinada.

No almofariz, colocou-se o extrato clorofórmico, 10 gotas de clorofórmio e 2 gramas de sílica e misturou-se até a mistura soltar-se da parede do almofariz. Então, depositou-se o extrato no topo da coluna, adicionou-se 200 mL de hexano-acetato (9:1) e esperou-se o solvente percorrer a coluna, coletando-se a substância final obtida e reservando-a em um recipiente. Após, repetiu-se o procedimento utilizando como solvente hexano-acetato (7:3), hexano-acetato (6:4), hexano-acetato (3:7), acetato e metanol. Posteriormente, cada fração foi rotaevaporada a 80 rpm. Ao final, foram obtidas seis frações, conforme Figura 3.

Figura 3 - Frações da partição líquido-líquido do extrato clorofórmio



fonte: Elaborado pelo autor

4.4. Cromatografia em Camada Delgada

As análises foram baseadas em Wagner e Bladt (1986) com alterações. A CCD foi desenvolvida em placas pré-elaboradas de gel de sílica 60G (0,22 µm, F254, Macherey-Nagel®). As amostras foram previamente diluídas na concentração de 5mg/mL de metanol e aplicadas manualmente com tubo capilar. Após a montagem, a placa foi introduzida em uma cuba de vidro, a qual

já estava saturada com o vapor do solvente da fase móvel - Hexano/Acetato de etila (3:7). Aguardou-se a chegada do solvente até a extremidade superior da placa, retirou-se da cuba e esperou-se a sua secagem. A revelação foi realizada com uma mistura de 15 gramas de vanilina dissolvidas em 250 mL de etanol, à 0°C, e com a lenta adição de 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O mesmo procedimento foi realizado com a fase móvel Tolueno/Acetato de etila (3:7).

O índice de retenção (RF) foi calculado como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente. De acordo com a Equação 03.

$$RF = DC/DS$$

Equação 3 -Índice de retenção

em que:

DC é distância percorrida pelo componentes da mistura (cm);

DS é distância percorrida pelo eluente (cm);

4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

A amostra foi preparada para análise a partir da diluição de 2 mg em 1 mL de metanol a 95%, para otimizar o processo de solubilização a amostra foi colocada no banho ultrassônico por tempo necessário para total diluição. Então, foi realizado o “clean-up” com cartuchos C-18, os quais foram condicionados com metanol. Após a passagem da amostra pelo cartucho, elas foram filtradas em membrana de 0,45 milímetros.

A análise foi realizada de acordo com Januário *et al.* (2002) em equipamento Dionex UltiMate 3000 UHPLC focused®, enquanto a área do pico foi calculada pelo Chromeleon Version 6.80®. A análise cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna da marca Thermo Scientific, com dimensões 250x4,60, lote 9171, de fase reversa C-18 a 25 °C. A coluna foi ativada com metanol e condicionada com metanol 95%. O gradiente de eluição do solvente A (água) e do solvente B (metanol 95%) foi realizado de 5% para 95% em 45 minutos a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min. O comprimento de onda de detecção foi de 230, 250, 300 e 350 nm.

4.6. Atividade antioxidante

Avaliou-se o potencial antioxidante do extrato etanólico e clorofórmico através da medição da capacidade sequestrante de radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila, conhecido como DPPH, e de acordo com a metodologia de SPAGNOL (2014).

Espectrofotometricamente, testou-se em triplicata os padrões: ácido ascórbico nas concentrações de 0 a 6 µg/mL de metanol, ácido gálico nas concentrações de 0 a 26 µg/mL de metanol, rutina nas concentrações de 0 a 57 µg/mL de metanol e quercetina nas concentrações de 0 a 82 µg/mL de metanol. Paralelamente, testou-se em triplicata o extrato clorofórmico nas concentrações de 0 a 357 µg/mL de metanol e a o extrato etanólico nas 0 a 271 µg/mL de metanol.

Para cada substância testada, identificou-se 10 tubos de ensaios dispostos em escala crescente de concentração, de acordo com a faixa estipulada. Em cada tubo, adicionou-se 2,50 mL da solução de DPPH 0,004% em metanol e 1,0 mL da determinada amostra. Após, agitou-se e manteve-se em repouso no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. Em espectrofotômetro, no comprimento de 515 nm, leu-se a absorbância de cada amostra, somente após a calibração do equipamento, com solução branco de 1,0 mL de metanol e 2,50 mL de solução de DPPH.

Com os resultados das medições, calculou-se a média das absorbâncias das amostras como sendo a absorbância máxima, então mediu-se a porcentagem de inibição do radical DPPH de acordo com a equação 4.

$$\% \text{ inibição do radical DPPH} = \frac{\text{Abs}_{\text{máx}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{máx}}} \times 100$$

Equação 4: cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH

em que:

Abs máx. é a absorbância do DPPH em 515 nm na ausência de amostra (controle);

Abs amostra é a absorbância do DPPH em 515 nm na presença de amostra.

De posse da porcentagem de inibição, determinou-se a equação da reta e calculou-se o EC₅₀ das amostras (concentração efetiva), através da equação 5.

$$EC_{50} = 50 - b/a$$

Equação 5: Cálculo do EC50

em que:

b é Intercepção do eixo y;

a é Inclinação da reta.

4.7. Microrganismos

As cepas de *Bacillus subtilis* – ATCC 9372, *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* – ATCC 27853, *Escherichia coli* – ATCC 25922 e a cepa de campo *Pseudomonas aeruginosa* foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Miller Hinton, e incubadas à 37°C por 24 horas.

As leveduras *Candida albicans* - ATCC 64548, *Candida krusei* – ATCC 6258, *Candida parapsilosis* - ATCC 22019, assim como os fungos filamentosos, *Trichophyton rubrum* – INCQS 40004, *Trichophyton mentagrophytes* – INCQS 40051 e cepa de campo de *Microsporum canis* foram semeadas em Ágar Sabouraud, sendo as leveduras incubadas a 28 °C por 72 horas e os fungos filamentosos à 28°C por 7 dias.

4.8. Atividade antimicrobiana

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para bactérias seguiu as diretrizes da Norma M7-A11 do CLSI (2018). Para fungos filamentosos e leveduras, seguiu-se as Normas M27 do CLSI (2017) e M38 do CLSI (2017), respectivamente, para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Para a preparação do inóculo, suspendeu-se o microrganismo em 5 mL solução de cloreto de sódio 0,9%. Na suspensão bacteriana, atingiu-se 0,5 na escala de McFarland, na suspensão de fungos filamentosos obteve-se a concentração de 2×10^3 UFC/mL e na suspensão de leveduras trabalhou-se com a concentração de 2×10^4 UFC/mL. Então, acrescentou-se 100 µL do inóculo bacteriano em 9,9 mL de Caldo Muller Hinton, enquanto para fungos, adicionou-se 100 µL de inóculo a 9,9 mL Caldo RPMI. Preparou-se o Caldo Muller Hinton e RPMI de acordo com as especificações do fabricante.

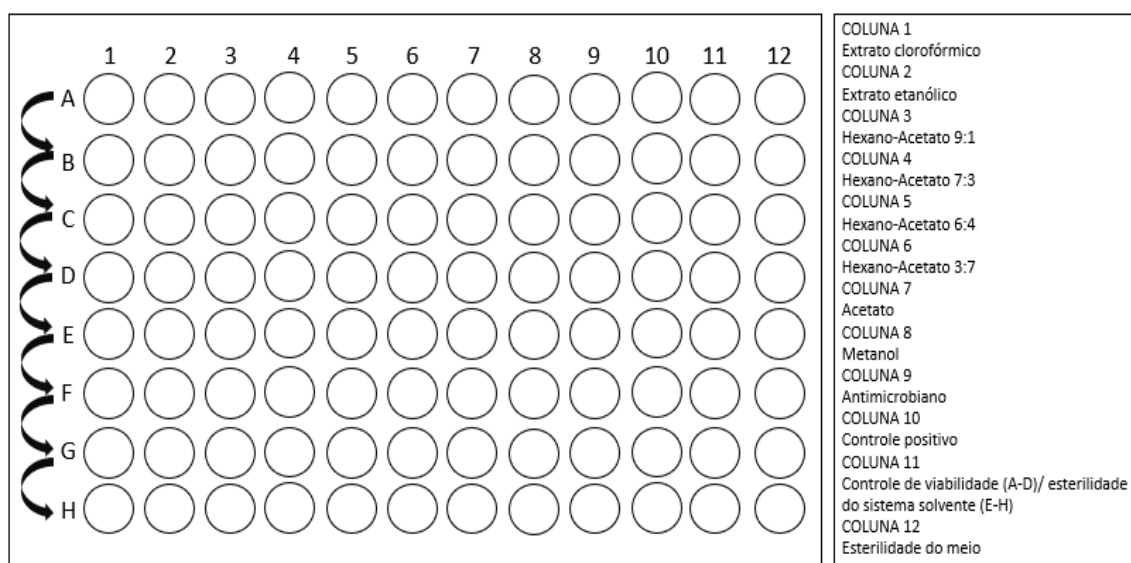
Aprontou-se solução estoque de Ampicilina na concentração de 500 µg/mL e Anfotericina B na concentração de 1,6 mg/mL. No momento do uso, dilui-se o antibiótico na proporção 1:10 em água destilada estéril e o fungicida na proporção de 1:25 em DMSO.

Para solução estoque dos extratos e frações, solubilizou-se 40 mg do determinado extrato ou fração com 100 µL de DMSO. No momento do uso, para o teste contra bactérias, adicionou-se 900 µL do Caldo Muller Hinton aos estoques de extratos e frações. Para os testes contra fungos, acrescentou-se 900 µL Caldo RPMI. Após, dilui-se na proporção 1:1 com o meio em questão e alcançou-se a concentração de 20 mg/mL.

A solução estoque de resazurina, foi preparada com 100 mg em 100 mL de água destilada estéril e no momento do uso, diluiu-se 1:10, para alcançar a concentração de 100 µL/mL de água.

Na placa de titulação estéril, determinou-se a utilização conforme a figura 4. Adicionou-se 100 µL do meio de cultura em todos os poços da coluna, de acordo com o microrganismo a ser testado. No primeiro poço da coluna, adicionou-se 100 µL do extrato/fração/antimicrobiano, homogeneizou-se, retirou-se 100 µL da mistura e transferiu-se para o segundo poço, repetindo o procedimento sucessivamente até finalizar a diluição seriada da coluna. Em seguida, acrescentou-se 100 µL do inóculo em cada poço.

Figura 4 - Modelo da montagem da placa para realização do CIM.



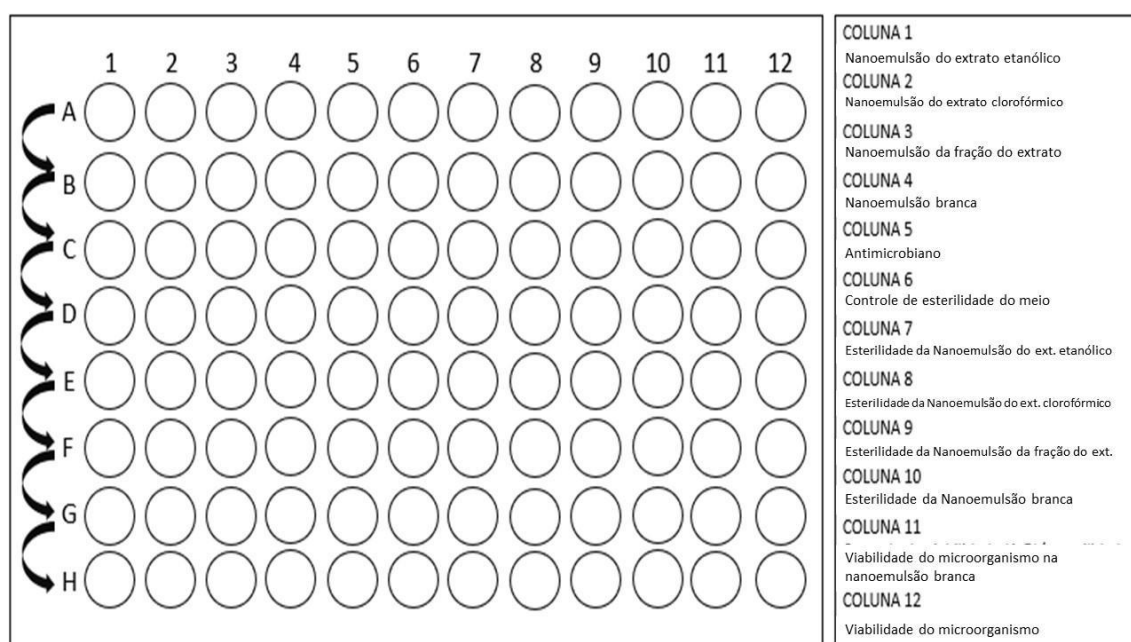
Fonte: Elaborado pelo autor

Para o controle positivo, pipetou-se 100 μ L do inóculo com 100 μ L do meio de cultura. Para o controle de viabilidade do sistema solvente, acrescentou-se 100 μ L do inóculo com 100 μ L do meio de cultura com 100 μ L do DMSO. Para esterilidade do sistema solvente, misturou-se 100 μ L do DMSO com 100 μ L de meio. Para controle da esterilidade do meio, pipetou-se 100 μ L do meio de cultura.

Utilizou-se uma placa para cada microrganismo testado e realizou-se triplicata para determinação de cada CIM.

Na fase do experimento em que foram utilizadas as nanoemulsões, a montagem da placa está representada na Figura 5. Para o controle da esterilidade do meio, foi pipetado somente o meio. Enquanto para o controle da esterilidade das nanoemulsões, foi pipetado o meio e a respectiva nanoemulsão. O controle positivo englobou o meio e o microorganismo e o controle da viabilidade da nanoemulsão foi feito a partir do meio, da nanoemulsão branca e o microrganismo.

Figura 5 - Modelo da montagem da placa para realização do CIM com nanoemulsão.



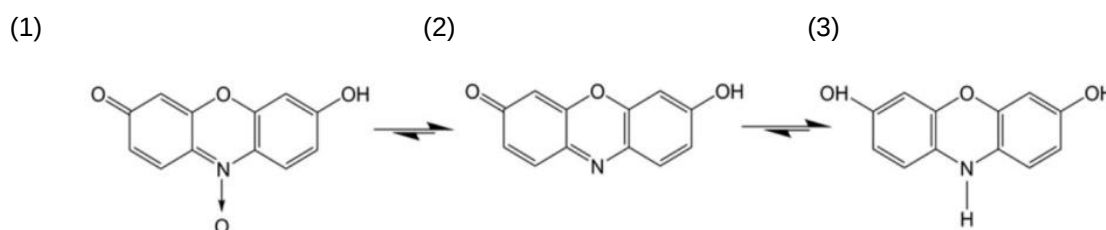
Fonte: Elaborado pelo autor

Após a montagem da placa com bactérias, incubou-se por 24 horas a 37°C. No caso de leveduras, incubou-se por 3 dias a 28°C e para fungos filamentosos, incubou-se por 7 dias a 28°C sob agitação de 125 rpm.

Após o período de incubação, realizou-se a transposição, via hastes estéreis de madeira, de cada poço da placa de 96 poços para as placas de Petri, contendo ágar Muller Hinton para bactérias e incubou-se as placas overnight a 37°C. Para fungos utilizou-se o ágar Sabouraud e incubou-se por 7 dias a 28°C. A Concentração Bactericida Mínima ou a Concentração Fungicida Mínima foi determinada observando-se o crescimento ou não dos microrganismos nos respectivos pontos de transposição no ágar.

Após a retirada das amostras para determinação de CBM e CFM, foram adicionados à placa, para leitura final da CIM, 20 µL de resazurina (0,01%) em cada poço da placa. Após o tempo necessário para cada replicação de cada microrganismo, isto é, uma hora para bactérias e 24 horas para leveduras e fungos filamentosos, foram observadas as mudanças de colocação da resazurina de azul para rosa, onde azul significa ausência de crescimento microbiano e rosa significa crescimento microbiano (O'BRIEN *et al.*, 2000). A conversão da resazurina em resorufina, mediada pela desidrogenase, pode ser representada pela Figura 6, que mostra as fórmulas estruturais de resazurina - azul e não fluorescente (1), o qual é convertido por redução em resorufina - rosa e altamente fluorescente (2) e por nova redução em dihidroresorufina - incolor e não fluorescente (3).

Figura 6 - Estágios de redução da resazurina (esquerda) para resorufina (meio) e dihidroresorufina (direita).



Fonte: O'BRIEN *et al.*, 2000

4.9. Biofilme

O biofilme de *Candida albicans* foi realizado de acordo com Cobrado *et al.* (2017) com algumas modificações. Com 24 horas antes do início do experimento, a *Candida albicans* foi semeada em placas de Petri contendo o ágar Sabouraud.

Para a formação dos biofilmes foi utilizado o meio de cultura RPMI suplementado com MOPS e L-glutamina (2%). E para a realização do experimento o inóculo foi ajustado na concentração final de 1×10^6 células/mL em RPMI. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de inóculo em placas de 96 poços, as quais foram incubadas sem agitação à 37 °C por 48 h até a maturação do biofilme de *Candida albicans*. Após o período de consolidação do biofilme, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados três vezes com PBS para remoção das células planctônicas. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de meio de cultura RPMI contendo as amostras (concentração máxima de DMSO 1%) nas concentrações entre 1,95 e 1.000 μ g/mL.

Além das amostras, a placa contou com o controle positivo feito com o uso de Anfotericina B com concentração entre 0,0313 e 16 μ g/mL e Fluconazol com concentração entre 0,125 e 64 μ g/mL e o controle negativo. Após, as placas foram novamente incubadas sem agitação à 37 °C por 24h. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e lavado com PBS por três vezes. A redução do metabolismo com XTT em no mínimo de 50% foi comparada ao controle de crescimento do biofilme, que corresponde a 100%.

A utilização do XTT, de acordo com Cobrado *et al.* (2017), permite a avaliação

semi-quantitativa da atividade metabólica do biofilme. A utilização de 50 μ L da solução de XTT, com concentração de 1mg/mL, foi adicionada em PBS com 4 μ L de menadione (1 mM), seguido de incubação no escuro por 3 h a 37°C. Após incubação, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm.

A formação do biofilme foi avaliada com o teste ANOVA One-Way com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística será considerada com $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas serão realizadas com o software Graph Prism 5.0.

4.10. Nanoemulsão

As nanoemulsões (NE) foram preparadas de acordo com Bouchemal *et al.* (2004) com modificações. A fase oleosa composta de fosfatidilcolina de soja (0,4% p/v), triglicérides de cadeia média (1,8% p/v), polissorbato 80 (2,1% p/v)

e os extratos na concentração de 5 mg/ml. A fase aquosa foi composta por água q.s.p. 5 g. Ambas as fases foram aquecidas até 70°C e a fase aquosa foi adicionada gota a gota sobre a fase oleosa, formando então uma pré-emulsão. Esta foi sonicada por 5 minutos, com pulse on de 1 minuto e pulse of de 30 segundos, amplitude 35.

O diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersão (IPd) e potencial zeta foram obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (EDL) utilizando-se equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern, UK) A formulação foi diluída em água deionizada e as análises realizadas em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das classes de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes. A quantidade e qualidade destes compostos metabólicos sofrem influência direta do desenvolvimento vegetal, como, diluição, variação da biomassa, sazonalidade, período, índice pluviométrico, temperatura e altitude. Como representam uma importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas é importante o conhecimento do perfil fitoquímico da amostra vegetal estudada (RODRIGUES *et al.*, 2018). Os resultados obtidos nos testes de caracterização fitoquímica estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das reações fitoquímicas das partes aéreas de *P. angulata*.

Classe fitoquímica	Método	Resultado	Interpretação
Flavonóides	Reação de Shinoda	Coloração laranja avermelhado	Positivo
	Reação de Taubock	Fluorescência esverdeada	Positivo
	Reação de Pew	Coloração vermelho escuro	Positivo
	Reação do cloreto férrico	Coloração verde acastanhado	Positivo
	Reação do cloreto de alumínio	Amarelo	Positivo
Taninos	Reação com gelatina	Precipitado	Positivo
	Reação com acetato de chumbo	Sem formação de precipitado	Negativo

	Reação com sais de ferro	Coloração verde	Positivo
	Reação de Legal	Coloração marrom avermelhado	Positivo
Glicosídeos cardiotônicos Triterpenos	Reação de Liebermann-Buchard	Coloração castanho	Positivo
	Reação de Pesez	Coloração amarela	Negativo
Saponinas	Formação de anel espumoso	Sem espuma	Negativo
	Reação com reagente Dragendorff,	Laranja	Positivo
Alcalóides	Reação com reagente Bouchardat	Marrom	Positivo
	Reação com reagente Mayer	Branca	Positivo
	Reação com reagente Bertrand	Formação de Precipitado	Positivo
Antraquinonas	Reação de Borntrager	Sem mudança de coloração	Negativo

Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com os resultados, as partes aéreas da amostra analisada de *P. angulata* apresentaram flavonóides, especificamente os flavonóis e flavanonas, taninos condensados, glicosídeos cardiotônicos, alcalóides e terpenos da classe triterpenos.

Apesar da composição fitoquímica de um vegetal ser influenciada por diversos fatores considerados variáveis, o *screening* fitoquímico das partes aéreas de *P. angulata* realizado nesse estudo foi compatível com os encontrados por Pontes (2015), Medina-Medrano *et al* (2015) e Ferreira (2018) que relataram a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos e terpenos esteróides. A diferença de presença de saponinas encontradas Pontes (2015) e Medina-Medrano *et al* (2015) pode ser justificada pelas variações climáticas a que as amostras estiveram submetidas.

5.2 Extração

A extração permite a retirada dos metabólitos secundários vegetal através da utilização de solventes. De acordo com a triagem preliminar fitoquímica, determinou-se a utilização de etanol e clorofórmio como solventes

no presente estudo, pois ambos possuem solubilidade compatível com os metabólitos secundários alvo da extração, de acordo com a tabela 2.

A extração clorofórmica foi realizada 233 g das partes aéreas moídas de *P. angulata* e ao final foi obtido 95,29 g do extrato. Utilizando a equação de rendimento, o rendimento foi de 40,89%.

Enquanto extração etanólica foi realizada com 300 g do vegetal e, ao final, foi obtido 93,03 g de extrato. Com isso, o rendimento do extrato foi de 31,01%.

5.3 Fracionamento

A quantidade de extrato clorofórmico fracionada foi de 3 gramas e forneceu 503,06 mg da fração Hexano-Acetato (9:1), 312,31 mg da fração Hexano-Acetato (7:3), 181,4 mg da fração Hexano-Acetato (6:4), 472,50 mg da fração Hexano-Acetato (3:7), 223,6 mg da fração Acetato e 1193,1 mg da fração Metanol. Dessa forma, o rendimento das frações foi respectivamente de 17,44%, 10,81%, 6,22%, 16,36%, 7,74%, 41,33%.

5.4. Cromatografia em Camada Delgada

A utilização da vanilina sulfúrica como revelador da CCD foi utilizada para a identificação de terpenos e triterpenos, a classe de metabólitos secundários que as fisalinas fazem parte.

O perfil cromatográfico obtido tanto para a amostra do extrato clorofórmico quanto para as frações Hexano-Acetato (3:7), Hexano-Acetato (6:4), Acetato e metanol apresentou uma intensa zona cromatográfica esverdeada com R_f de aproximadamente de 0,31 que são compatíveis com os descritos por Alamino (2011) e que indicam a presença de fisalinas tanto no extrato como nas frações.

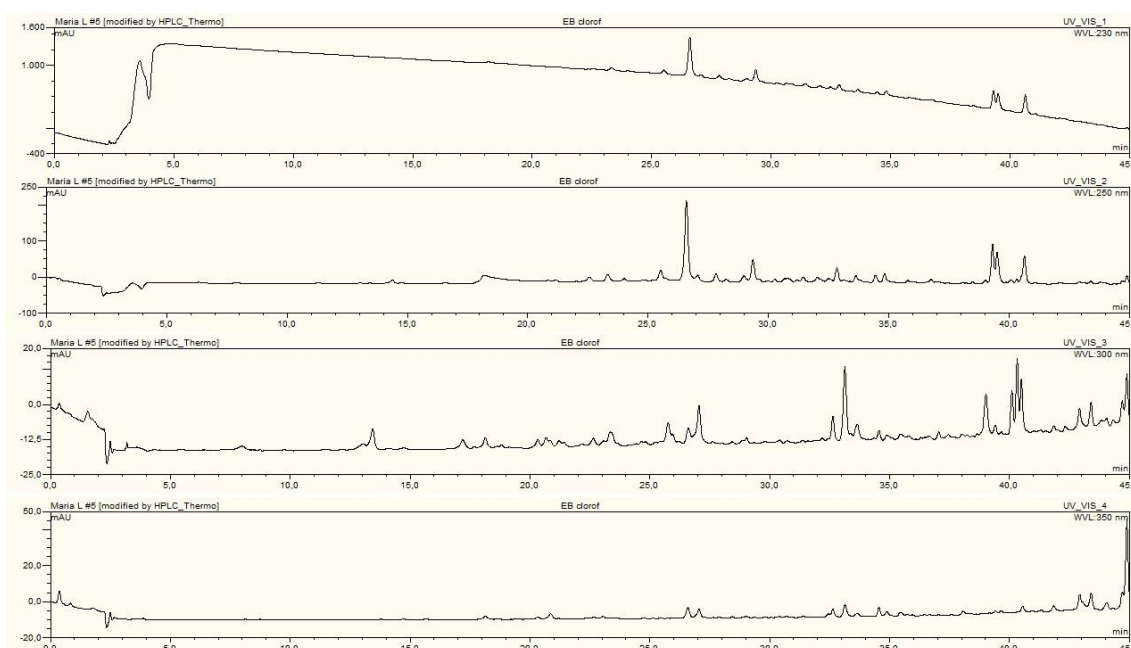
Os resultados obtidos com as placas cromatográficas somado aos resultados antimicrobianos foram os critérios utilizados para a escolha das amostras que foram analisadas em CLAE.

5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

Os perfis cromatográficos obtidos a partir das análises no CLAE se distribuem nos resultados do extrato clorofórmico, da fração Hexano-Acetato (6:4) e Metanol.

As cromatografias do extrato clorofórmico nos comprimentos de 230, 250, 300 e 350 nm se apresentam na figura 7. Na tabela 4, encontra-se a quantidade, o tempo de retenção (Tr) e a área de cada pico apresentado na figura 7.

Figura 7 - Perfil cromatográfico por CLAE do extrato clorofórmico nos diversos comprimentos de onda.



Fonte: CHROMELEON, VERSION 6.80®

O perfil cromatográfico do extrato clorofórmico no comprimento de onda de 230 nm apresentou 33 picos, com destaque para os picos nomeados como 9, 29, 27, 28,14, 8, 20, 23 que apresentaram respectivamente os valores de área 102,825 mAU*min, 42,2527 mAU*min, 39,4291 mAU*min, 37,6648 mAU*min, 28,3145 mAU*min, 12,2994 mAU*min, 11,5796 mAU*min e 10,1143 mAU*min. No comprimento de onda de 250 nm, dos 26 picos obtidos, se evidenciam os picos 8, 2, 23, 24,13 e 25 com áreas calculadas de 39,7795 mAU*min, 19,3969 mAU*min, 14,4132 mAU*min, 12,9155 mAU*min, 11,5848 mAU*min e 11,3364 mAU*min. Com 300 nm foram identificados 11 picos, sendo os maiores picos representados pelos números 4,7,8,5,2 e 6, os quais

apresentam as áreas 3,7804 mAU*min, 3,1988 mAU*min, 2,5885 mAU*min, 2,4603 mAU*min, 2,0678 mAU*min e 2,0141 mAU*min. Os 4 picos encontrados no comprimento de 350 nm se dispõe na seguinte ordem decrescente de área: Pico 4 com 4,2311 mAU*min, 2 com 1,9497 mAU*min, 3 com 1,5399 mAU*min e 1 com 1,1283 mAU*min.

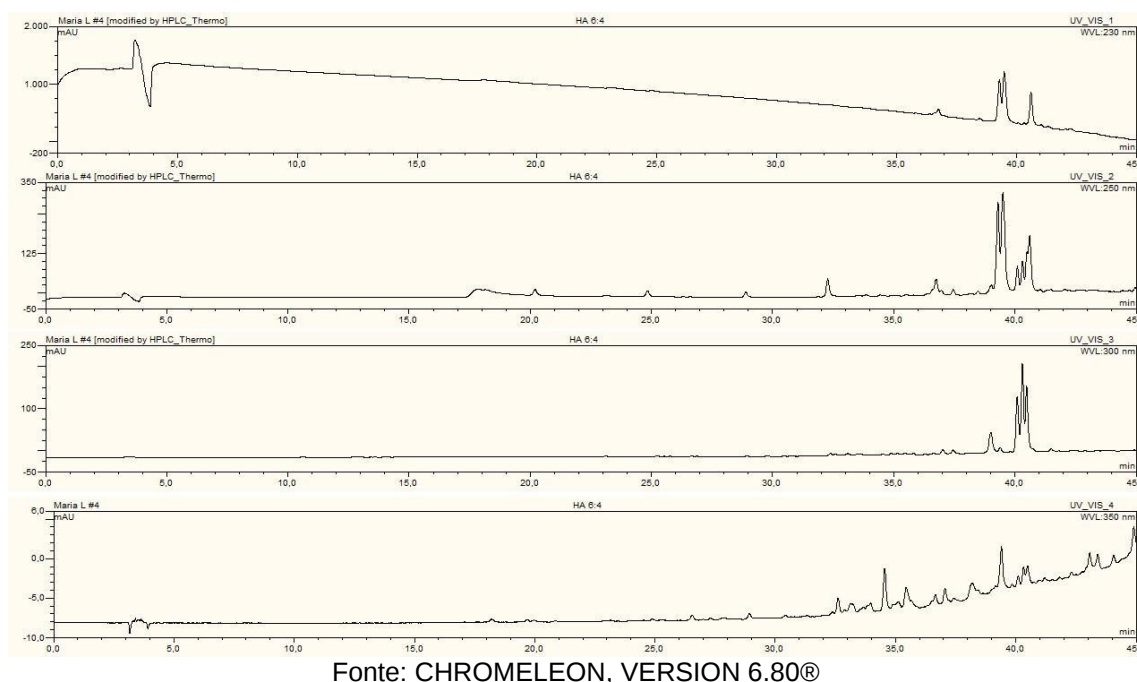
Entre os picos destacados no parágrafo anterior, os picos 9 do comprimento 230 nm e o e do comprimento de 250 nm apresentam o tempo de retenção de 26,6. Com tempo de retenção de 39,7 min existem o ponto 27 do comprimento 230 nm e o 23 do comprimento de 250 nm. O mesmo acontece com o ponto 28 do comprimento 230 nm e o 24 do comprimento 250 nm que possuem o tempo de retenção de 39,508 min. O ponto 4 comprimento 300 nm e o 1 do 350 nm têm em comum o tempo de retenção de 33,142 min.

28	39,508	37,6648
29	40,650	42,2527
30	41,058	2,0291
31	42,092	4,9322
32	43,558	3,4996
33	44,900	2,3606

Fonte: Elaborado pelo autor

As cromatografias da fração 6:4, obtida a partir do extrato clorofórmico, nos comprimentos de 230, 250, 300 e 350 nm são apresentados na figura 8. Na tabela 5, encontra-se a quantidade, o tempo de retenção e a área de cada pico apresentado na figura 8.

Figura 8 - Perfil cromatográfico por CLAE da fração Hexano-Acetato 6:4 nos diversos comprimentos de onda.



A fração Hexano Acetato 6:4 não apresentou nenhum pico relevante no comprimento de 350 nm, os picos apresentados no cromatograma possuem baixa unidade de absorvância e o que podem ser considerados como ruídos. Já o comprimento 230 nm teve 20 picos, o 250 nm teve 18 e o 300 nm teve 7. Entre os 20 picos do primeiro comprimento relatado, os picos 13,12, 16 e 10 apresentaram área maior de 10, com, respectivamente, 151,2203 mAU*min, 111,3241 mAU*min, 78,3555 mAU*min e 18,716 mAU*min. Já entre os 18 picos do segundo comprimento relatado, os picos 14,13,18,16, 15 e 7 são os com maiores áreas, respectivamente, 57,6336 mAU*min, 41,4441 mAU*min, 34,7798 mAU*min, 11,2934 mAU*min, 10,8178 mAU*min e 9,3667 mAU*min. Por fim, entre os 7 picos do último comprimento, 7,6,5 e 3 apresentam as maiores áreas, com 30,3387 mAU*min, 25,44 mAU*min, 17,0523 mAU*min e 9,4709 mAU*min.

Apesar de não estar entre os maiores picos do comprimento 300 nm, o pico 1 desse comprimento tem os mesmos 37,458 minutos de tempo de retenção que o pico 10 do comprimento de 250 nm. Entre os comprimentos de 230 e 250 nm existem dois pontos que compartilham o mesmo ponto de retenção: o pico 7 do comprimento 230 nm e 250 nm com 32,275 min. O pico 10 do comprimento de 230 nm com o pico 9 do comprimento 250 nm com tempo de retenção de 36,75 min.

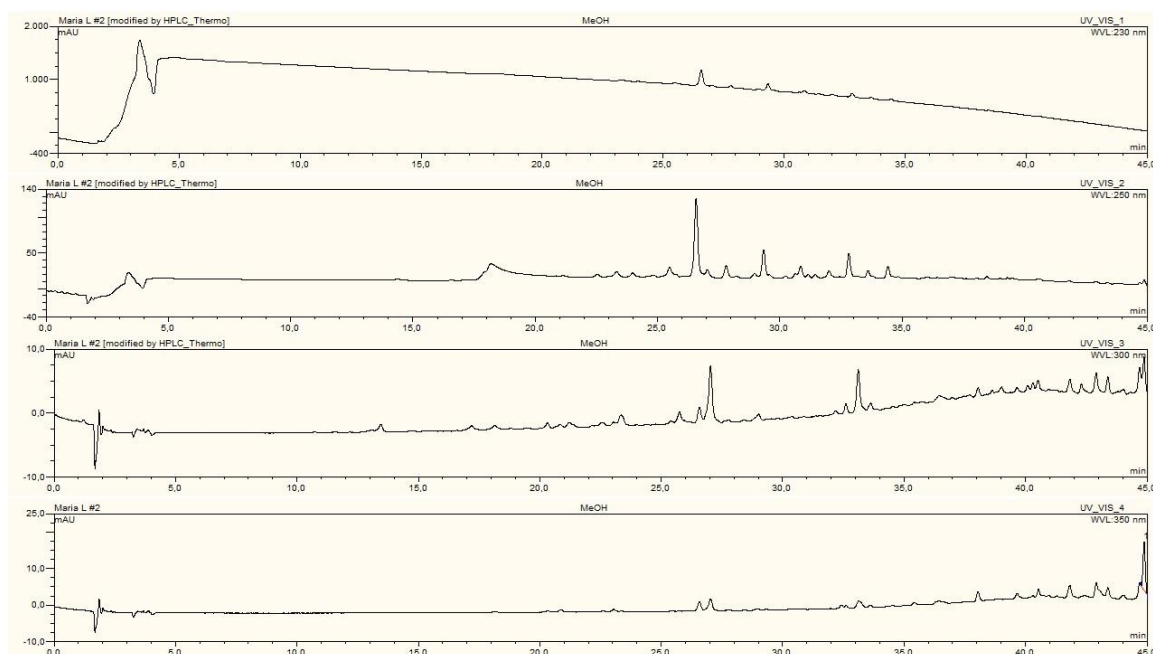
Tabela 5 - Quantidade de picos, tempo de retenção e área dos picos da fração Hexano-Acetato 6:4 em 4 comprimentos de onda.

Fração 6:4											
230 nm			250 nm			300 nm			350 nm		
Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)	Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)	Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)	Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)
1	17,742	9,4784	1	18,883	0,6405	1	37,033	1,7918	0	0	0
2	18,150	4,5817	2	18,158	0,8408	2	37,458	1,6983			
3	18,750	1,6393	3	20,200	6,9711	3	39,017	9,4709			
4	23,083	8,0889	4	23,118	1,1056	4	39,400	1,8274			
5	24,783	2,8824	5	24,842	2,9552	5	40,100	17,0523			
6	28,875	1,1347	6	28,892	2,7605	6	40,308	25,4400			
7	32,275	2,1812	7	32,275	9,3667	7	40,492	30,3387			
8	33,808	,15023	8	34,450	1,3011						
9	36,400	0,9093	9	36,750	6,9020						
10	36,750	18,7160	10	37,458	1,9752						
11	38,475	4,3806	11	38,483	1,2407						
12	39,300	111,3241	12	39,025	4,4551						
13	39,500	151,2203	13	39,308	41,4441						
14	40,083	1,2859	14	39,508	57,6336						
15	40,325	3,2646	15	40,108	10,8178						
16	40,617	78,3555	16	40,317	11,2934						
17	41,042	2,4633	17	40,508	1,8564						
18	41,325	3,5735	18	40,608	34,7798						
19	42,250	3,9010									
20	44,450	1,9551									

Fonte: Elaborado pelo autor

As cromatografias da fração metanol, obtida a partir do extrato clorofórmico, nos comprimentos de 230, 250, 300 e 350 nm são apresentados na figura 9. Na tabela 6, encontra-se a quantidade, o tempo de retenção e a área de cada pico apresentado na figura 9.

Figura 9 - Perfil cromatográfico por CLAE da fração metanol nos diversos comprimentos de onda.



Fonte: CHROMELEON, VERSION 6.80®

O comprimento de onda 350 nm apresentou um único pico com área de 1,3961 mAU*min. Enquanto o comprimento de onda 300 nm teve dois picos revelados, o primeiro com 1,5205 mAU*min e o segundo com 1,1108 mAU*min. Já os dois demais comprimentos apresentaram mais picos, o 230 nm com 19 e o 250 nm com 14. No comprimento de onda 230 nm, os picos 7, 11, 2, 16 e 9 possuem as maiores áreas com 50,1187 mAU*min, 16,3351 mAU*min, 16,2362 mAU*min, 11,1929 mAU*min e 6,9442 mAU*min. Já os picos 1,5,12, 9, 4 e 7 do comprimento 250 nm apresentam as maiores áreas com 23,6832 mAU*min, 20,3334 mAU*min, 5,4334 mAU*min, 5,3103 mAU*min, 3,7009 mAU*min e 2,8077.

Quando é feita a comparação entre os tempos de retenção dos comprimentos de onda, é possível observar que o pico 11 do comprimento 230 nm e o pico 9 do comprimento 250 nm tem 29,342 minutos de tempo de

retenção. O pico 16 do comprimento 230 nm e o pico 12 do comprimento 250 nm tem 32,187 minutos de tempo de retenção. O pico 6 do comprimento 230 nm e o pico 4 do comprimento 250 nm tem 25,492 minutos como tempo de retenção. E o pico 9 do comprimento 230 nm e o pico 7 do comprimento 250 nm tem 27,808 minutos de tempo de retenção.

Tabela 6 - Quantidade de picos, tempo de retenção e área dos picos da fração metanol em 4 comprimentos de onda.

Fração metanol											
230 nm			250 nm			300 nm			350 nm		
Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)	Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)	Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)	Nº pico	Tempo de retenção (minuto)	Área (mAU*min)
1	7,225	2,0756	1	18,192	23,6832	1	27,033	1,5205	1	44,883	1,3961
2	18,175	16,2362	2	23,325	1,9524	2	33,117	1,1108			
3	19,425	2,7680	3	23,983	1,1517						
4	23,308	6,4429	4	25,492	3,7009						
5	23,975	2,3361	5	26,575	20,3334						
6	25,492	8,4834	6	27,042	1,1456						
7	26,583	50,1187	7	27,808	2,8077						
8	27,042	2,4671	8	28,967	0,8349						
9	27,808	6,9442	9	29,342	5,3103						
10	28,967	1,8685	10	30,858	1,9080						
11	29,342	16,3351	11	32,008	1,9823						
12	30,225	1,4717	12	32,187	5,4334						
13	30,858	6,2826	13	33,608	1,0010						
14	31,442	2,3149	14	34,417	2,4621						
15	32,008	5,1480									
16	32,817	11,1929									
17	33,600	4,7902									
18	34,417	4,8745									
19	38,458	2,2441									

Fonte: Elaborado pelo autor

Os dados das tabelas 7,8 e 9 apresentam os tempos de retenção e a área de picos que foram identificados no extrato clorofórmico, na fração hexano-acetato (6:4) e na fração metanol em um mesmo comprimento de onda. Não foram encontrados Tr compatíveis entre as amostras analisadas no comprimento de onda de 350 nm.

Tabela 7 : Comparativo das amostras em CLAE-UV em comprimento de onda de 230nm

	Extrato clorofórmico	Fração Hexano-Acetato (6:4)	Fração Metanol
Tr (minuto)	Área do pico (mAU*min)	Área do pico (mAU*min)	Área do pico (mAU*min)
18,175	3,9263	-	16,2362
24,783	3,0422	2,8824	-
36,750	3,7243	18,716	-

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 8 - Comparativo das amostras em CLAE-UV em comprimento de onda de 250 nm.

	Extrato clorofórmico	Fração Hexano-Acetato (6:4)	Fração Metanol
Tr (minuto)	Área do pico (mAU*min)	Área do pico (mAU*min)	Área do pico (mAU*min)
23,325	3,4719	-	1,9524
34,450	3,1425	1,3011	-
39,508	12,9155	57,6336	-

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 9 - Comparativo das amostras em CLAE-UV em comprimento de onda de 300 nm.

	Extrato clorofórmico	Fração Hexano-Acetato (6:4)	Fração Metanol
Tr (minuto)	Área do pico (mAU*min)	Área do pico (mAU*min)	Área do pico (mAU*min)
40,100	2,0141	17,0523	-

Fonte: Elaborado pelo autor

A literatura relaciona a atividade biológica da *P. angulata* com a presença de fisalinas em sua composição, conforme relatos de Januário *et al.* (2002) e Pietro *et al.* (2000). A classe das fisalinas é formada por compostos lipofílicos, portanto com afinidades a solventes apolares como o clorofórmio

utilizado na extração e ao hexano utilização na partição do extrato clorofórmico. Dessa forma, sugere-se o encontro de fisalinas no extrato clorofórmico e nas frações com maiores quantidades de hexano, como a fração Hexano-Acetato (6:4).

As tabelas 7 e 8 indicam que a fração Hexano-Acetato (6:4) compartilha dois compostos encontrados no extrato clorofórmico. Enquanto a fração metanol, um composto polar, comunga de um único composto em comum.

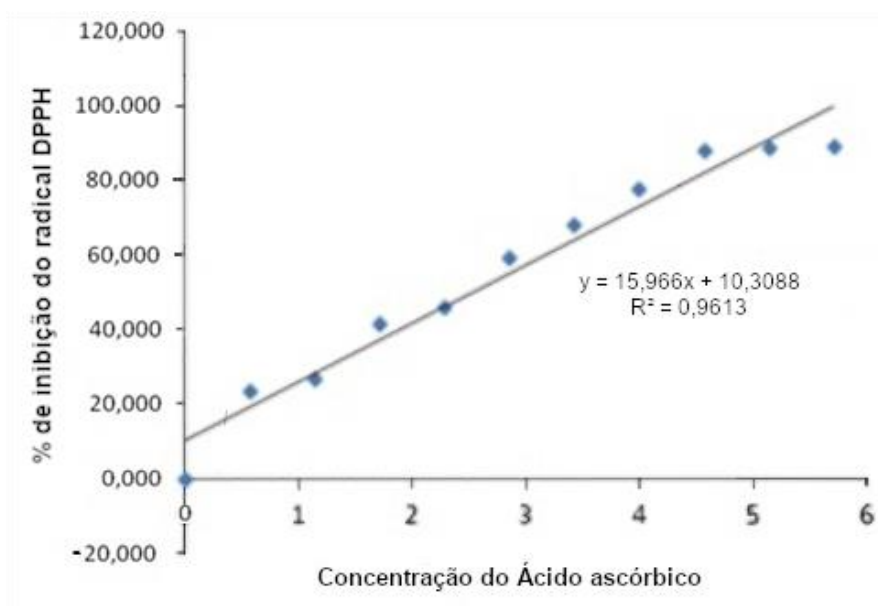
Ao estudar os perfis cromatográficos seria necessário a comparação com um padrão, realizado no mesmo equipamento e com as mesmas condições, para afirmar qual composto corresponde a determinado pico. Na ausência do padrão, análises RMN podem determinar a natureza química dos compostos. Nesse caso, registros da literatura auxiliam no entendimento dos resultados.

Camlofski (2014) relatou o encontro de flavonoide em frutos de *P. angulata* em perfil cromatográfico nos comprimentos de onda de 280 e 325 nm, como a rutina com pico próximo a 33 min e miricetina em torno de 36 min. E Souza (2012) caracterizou, em CLAE-UV nos comprimentos de onda de 225 e 310 nm, o tempo de retenção das fisalinas F, B, D e G a como de 55,5, 66,8, 38,5 e 39,67 min. Esses dados se aproximam do pico de 38,458 min da fração metanol em 230 nm, dos picos de 38,475 e 39,5 min em 230 nm, 39,5 min em 250 nm e do 39,4 min em 300 nm da fração Hexano-Acetato (6:4) e dos picos de 39,5 e 38,48 min em 230 nm e do 39,5 min em 250. Isso leva a crer que os vitaesteróides podem estar tanto no extrato como nas frações a partir do tempo 38 nos comprimentos de onda entre 200 e 300 nm.

5.6 Atividade Antioxidante

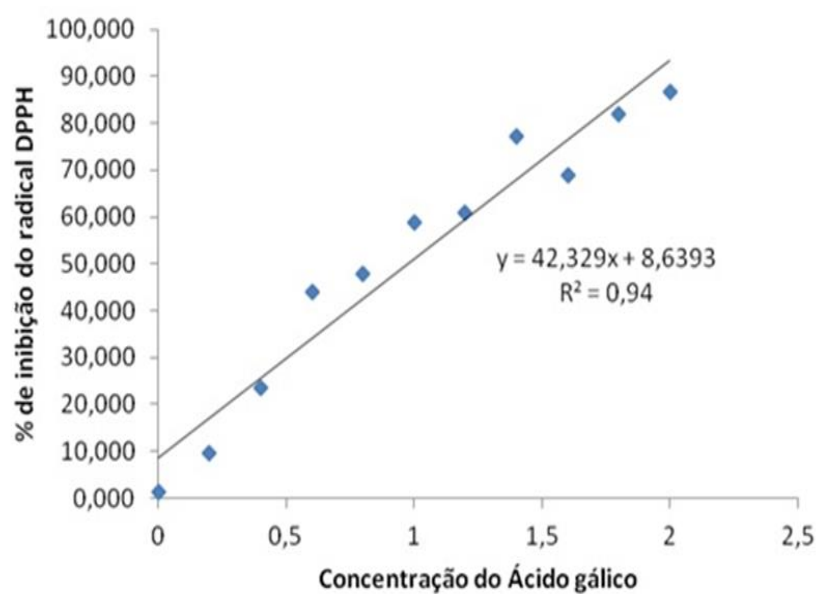
As concentrações dos padrões foram de 0 a 6 µg/mL para o Ácido ascórbico (Figura 10), para o Ácido gálico foi de 0 a 26 µg/mL (Figura 11), de Rutina foi de 0 a 57 µg/mL (Figura 12) e da Quercetina de 0 a 82 µg/mL (Figura 13). As concentrações do extrato clorofórmico testado foram de 0 a 357 µg/mL (Figura 14) e a do extrato etanólico foram de 0 a 271 µg/mL (Figura 15).

Figura 10 - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical DPPH.



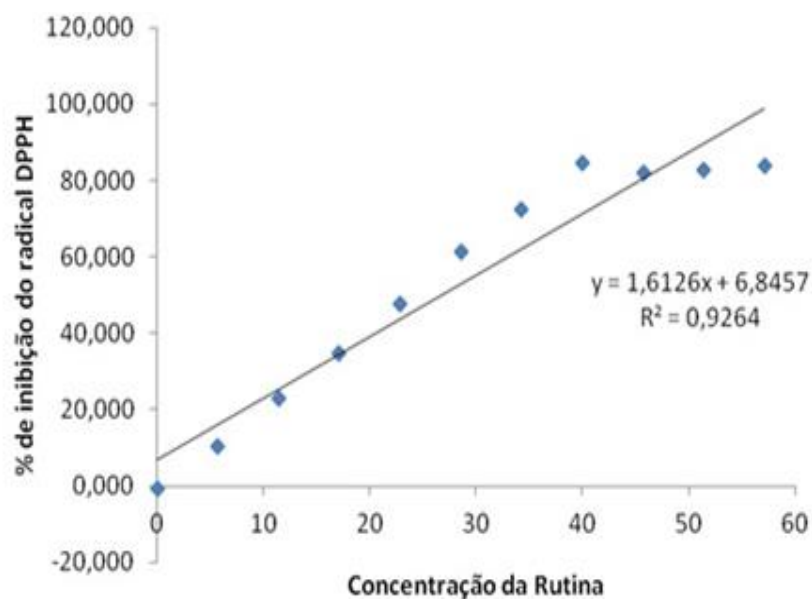
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 11 - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido gálico pelo método de inibição do radical DPPH.



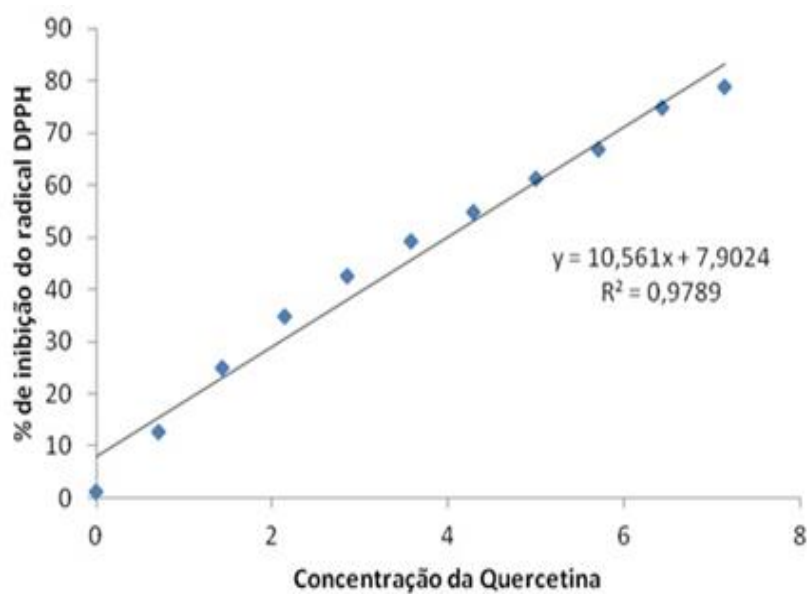
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 12 - Curva analítica da atividade antioxidante da rutina pelo método de inibição do radical DPPH.



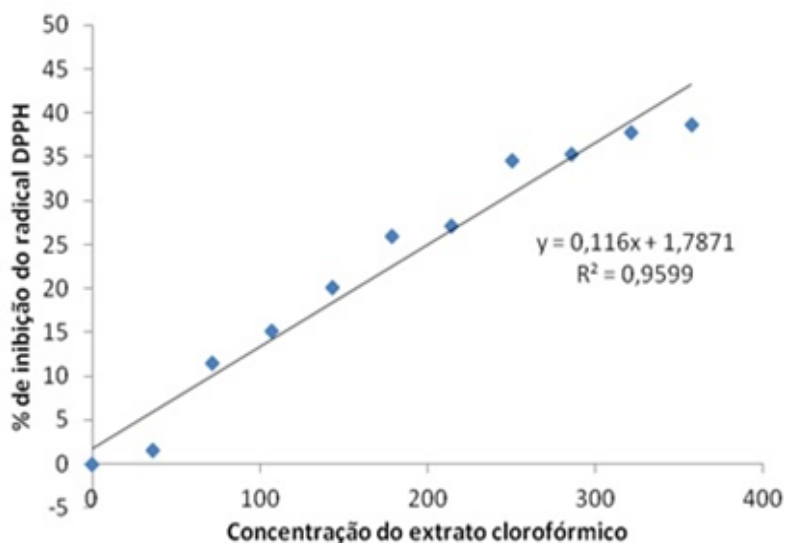
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 13 - Curva analítica da atividade antioxidante da quercetina pelo método de inibição do radical DPPH.



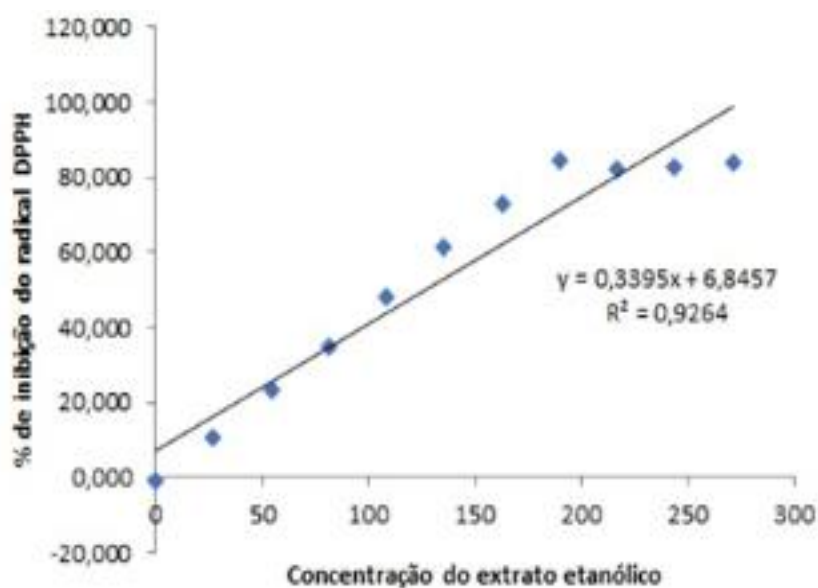
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 14 - Curva analítica da atividade antioxidante do extrato clorofórmico das partes aéreas de *P. angulata* pelo método de inibição do radical DPPH



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 15 - Curva analítica da atividade antioxidante do extrato etanólico das partes aéreas de *P. angulata* pelo método de inibição do radical DPPH.



Fonte: Elaborada pelo autor

De posse de cada curva, descobriu-se a equação da reta de cada gráfico e calculou-se a quantidade de substância necessária para que fosse alcançada a inibição e 50% dos radicais livres (EC_{50}) presentes no meio de análise, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Atividade antioxidante dos padrões e extratos das partes aéreas de *P. angulata*.

Amostra	DPPH EC ₅₀ - µg/mL
Ácido ascórbico	2,52
Ácido gálico	0,97
Rutina	26,76
Quercetina	3,98
Extrato clorofórmico	415,00
Extrato etanólico	127,11

Fonte: Elaborado pelo autor

O ácido ascórbico é uma substância bastante utilizada nas análises de atividade antioxidante pela capacidade de reduzir rapidamente o DPPH. Existem outros compostos com a mesma capacidade de captação de espécies reativas de oxigênio, porém motivados pela presença de princípios ativos diferentes do ácido ascórbico. Este é o caso do ácido gálico que tem seu alto potencial antioxidante associado à presença de compostos fenólicos, especificamente os taninos (SOARES, 2002).

Por outro lado, a quercetina tem sua atividade antioxidante relacionada aos altos níveis de flavonoides presentes em suas estruturas, assim como a rutina que é um flavonol heterosídico derivado da quercetina (BRANDÃO, H.; DAVID, J.; DAVID, J. 2007). A triagem fitoquímica das partes aéreas de *P. angulata* indicou a presença tanto de flavonóides como taninos, situação que justifica a utilização do ácido gálico, quercetina e rutina como padrões para a avaliação da atividade antioxidante.

Os extratos das partes aéreas de *P. angulata* apresentaram cinética de reação intermediária, segundo classificação de BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995), pois foram necessários 30 minutos para a descoloração máxima do DPPH. Na medida de EC₅₀, os valores obtidos foram de 415 µg/mL para o extrato clorofórmico e 127,11 µg/mL para o extrato etanólico, demonstrando que serão necessários 415 µg/mL do extrato clorofórmico para a redução de 50% do DPPH, enquanto somente 127,11 µg/mL do extrato etanólico levando-o a ter uma atividade antioxidante mais eficaz que a do extrato clorofórmico. O solvente etanólico utilizado na maceração selecionou metabólitos especializados com maior atividade antioxidante do que o solvente clorofórmico, por esse motivo é observada a diferença entre os resultados dos extratos. O valor encontrado para o extrato etanólico é compatível com o EC₅₀

de 180,40 µg/mL para o extrato etanólico de folhas de *P. angulata* relatado por Susanti *et al.* (2015) e com a concentração de 250 µg/mL de Fawole *et al.* (2013). Porém, não se aproxima da concentração de 4311 mg/mL relatada por Kusumaningtyas *et al.* (2015). Fato que pode ser explicado pela forma de preparação dos extratos, pois o último autor acrescentou DMSO em sua extração.

5.7 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos na avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de bactérias e na Concentração Bactericida Mínima (CBM) estão descritos na tabela 11.

Os resultados obtidos na avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de leveduras e fungos filamentosos e na Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão descritos nas tabelas 12 e 13.

[illegible]

Controle da esterilidade do meio	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle da esterilidade das nanoemulsões	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) (mg/mL) dos extratos, frações e nanoemulsões de *P. angulata* frente às leveduras.

Amostra	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
Extrato clorofórmico	1,25	> 5	2,5	2,5	2,5	> 5
Extrato etanólico	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
Hexano-acetato 9:1	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
Hexano-acetato 7:3	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5	> 5
Hexano-acetato 6:4	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Hexano-acetato 3:7	2,5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
Acetato	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
Metanol	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	> 5
Nanoemulsão do extrato etanólico	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25
Nanoemulsão do extrato clorofórmico	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25
Nanoemulsão da fração Hexano-Acetato 6:4	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25

Anfotericina B (µg/mL)	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Controle da viabilidade do sistema solvente	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Controle da viabilidade da nanoemulsão	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Controle da esterilidade do sistema solvente	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle da esterilidade do meio	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle da esterilidade das nanoemulsões	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 13 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) (mg/mL) dos extratos, frações e nanoemulsões de *P. angulata* frente à fungos dermatófitos.

Amostra	<i>M. canis</i>		<i>T. rubrum</i>		<i>T. mentagrophytes</i>	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
Extrato clorofórmico	0,62	5	2,5	2,5	> 5	> 5
Extrato etanólico	> 5	>5	1,25	2,5	2,5	> 5
Hexano-acetato 9:1	0,62	5	2,5	2,5	> 5	> 5
Hexano-acetato 7:3	0,31	1,25	1,25	1,25	2,5	> 5
Hexano-acetato 6:4	0,07	0,31	0,31	0,31	0,62	0,62
Hexano-acetato 3:7	0,31	0,31	0,31	0,31	1,25	1,25
Acetato	0,31	0,31	1,25	1,25	2,5	2,5
Metanol	0,31	1,25	2,5	2,5	> 5	1,25

Nanoemulsão do extrato clorofórmico	1,25	1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25
Nanoemulsão do extrato etanólico	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25	>1,25
Nanoemulsão da fração Hexano-Acetato 6:4	0,31	0,31	0,62	0,62	1,25	1,25
Anfotericina B($\mu\text{g/mL}$)	0,31	0,31	0,15	0,15	< 0,03	< 0,03
Controle da viabilidade do sistema solvente	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Controle da viabilidade da nanoemulsão	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Controle da esterilidade do sistema solvente	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle da esterilidade do meio	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle da esterilidade das nanoemulsões	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Controle positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Controle da viabilidade do sistema solvente	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Controle da viabilidade da nanoemulsão	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

Fonte: Elaborado pelo autor

Analizando os controles, houve crescimento de microrganismos nos poços selecionados para controle positivo e nos poços destinados ao controle da viabilidade do sistema solvente e da nanoemulsão branca. Não houve crescimento nos poços selecionados para controle da esterilidade do meio, do sistema solvente e das nanoemulsões, validando assim os resultados obtidos nas placas.

A cepa de *S. epidermidis* utilizada foi a única a apresentar resistência a todas as concentrações do antibiótico e do extrato clorofórmico, as demais foram inibidas por concentrações diferentes tanto do antibiótico como dos extratos.

A partir das Tabelas 11, 12 e 13, é possível comparar os resultados de CIM obtidos a partir do uso dos extratos e verificar que o extrato clorofórmico teve melhor desempenho que o etanólico frente às cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, ou seja, o primeiro apresentou menores resultados nos testes. O mesmo cenário foi verificado com as três espécies de leveduras e com o fungo filamentoso *M. canis*.

Considerando as diferenças entre os resultados das atividades antimicrobianas dos extratos, da performance que o extrato clorofórmico apresentou e os dados apresentados por Pietro *et al.* (2000) e Januário *et al.* (2002), o extrato clorofórmico foi selecionado para a realização do fracionamento e novos testes de CIM. A realização do fracionamento visa a obtenção de amostras mais concentradas dos compostos bioativos, especificamente de fisalinas, das partes aéreas de *P. angulata*.

Em relação a atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir do extrato clorofórmico, os dados apresentados na tabela 11, mostraram que a menor concentração inibitória encontrada para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foi de 0,62 mg/mL obtida pela fração metanol. Valores de CIM de 1,25 mg/mL foram obtidos para *S. epidermidis* nas frações de Hexano-Acetato (6:4) e metanol. Ainda para *B. subtilis* a fração metanol obteve o mesmo valor. Para as outras frações ou extratos, os valores foram maiores.

A tabela 12 demonstrou que a menor concentração inibitória encontrada para *C. albicans* foi de 1,25 mg/mL com as frações de Hexano-Acetato (6:4), acetato e metanol. Para *C. krusei* o mesmo valor de CIM foi obtido com as frações Hexano-Acetato (6:4) e metanol. Entretanto para *C. parapsilosis*

apenas a fração Hexano-Acetato (6:4) demonstrou a mesma CIM obtido pelas outras frações.

A tabela 13 revelou que a menor concentração inibitória encontrada para *M. canis* foi de 0,07 mg/mL com a fração Hexano-Acetato (6:4). Frente ao *T. rubrum* foram obtidos valores de CIM d de 0,31 mg/mL com as frações Hexano-Acetato (6:4) e Hexano-Acetato (3:7) enquanto para *T. mentagrophytes* foi de 0,62 mg/mL, obtida com a fração Hexano-Acetato (6:4). O antifúngico foi efetivo contra todas as leveduras e fungos filamentosos, ao contrário do extrato etanólico que não foi eficaz contra nenhuma cepa.

Os valores de CIM apresentados pela fração de metanol frente às bactérias e os da fração Hexano-Acetato (6:4) frente às leveduras e fungos filamentosos são inferiores aos obtidos com o extrato clorofórmico. Isso indica que existe maior concentração do composto bioativo responsável pela atividade antimicrobiana das frações citadas do que no extrato.

A transposição, via hastes de madeira, do inóculo para placa, com meio adequado para o crescimento do microrganismo, apresentou comportamento compatível aos obtidos nas CIMs.

Na literatura há dados escassos sobre a atividade microbiológica dos organismos testados neste trabalho. Algumas espécies têm trabalhos relacionados e outras não. Quando há, foram utilizados extratos diferentes dos utilizados ou partes diferentes do vegetal. Como, Osho *et al.* (2010), que determinou a concentração inibitória mínima do óleo essencial para *Candida albicans* de 4,0 mg/mL. Ainda, Dias *et al.* (2020) definiu que a concentração inibitória mínima do extrato aquoso de folhas de *P. angulata*, foi de 50 mg/mL contra *S. aureus*. Ushie *et al.* (2019) utilizou o extrato clorofórmico das folhas de *P. angulata* contra *E. coli* e *C. albicans*, obtendo a concentração inibitória mínima de 25 mg/mL.

Esses estudos possuem variáveis que devem ser consideradas, como a parte da *P. angulata* utilizada nos experimentos. É sabido que há diferença de concentração de metabólitos secundários entre as diferentes partes de um mesmo exemplar vegetal, pois cada substância tem uma especificidade de síntese e armazenamento dependente das estruturas dos diferentes tecidos vegetais. Se há diferença em um mesmo exemplar, a diferença entre exemplares é ainda maior. Isso porque, variações de condições ambientais são

determinantes na quantidade e qualidade na produção de metabólitos secundários. Considerando essas variáveis, apesar desses estudos utilizarem solventes polares e apolares, como o presente trabalho utilizou, a amostra vegetal pode ser a justificativa para a variação dos resultados (PEREIRA; CARDOSO, 2012; SILVA, 2013; REZENDE *et al.* 2017).

Outras espécies da família *Physalis* também tiveram sua atividade antibacteriana testada, como é o caso de *Physalis minima* pesquisado por Sharrif *et al.* (2006). O extrato etanólico das folhas de *P. minima* apresentou CIM de 2,00 mg/mL para *B. subtilis* e 4,00 mg/mL para *E. coli*. Enquanto o extrato clorofórmico apresentou o valor de 4,00 mg/mL para as duas bactérias. Banothu *et al.* (2017) utilizou extrato clorofórmico de folhas e caules de *P. minima* contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e encontrou CIM de 4,00 mg/mL para todos os microorganismos testados. Os resultados encontrados por Sharrif *et al.* (2006) e Banothu *et al.* (2017) são parecidos com os encontrados neste trabalho, conforme demonstrado na Tabela 11. Os achados literários reforçam a hipótese de que a atividade antimicrobiana das espécies de *Physalis* sp esteja relacionada com a presença de um metabólito secundário específico dessa família vegetal. Esse trabalho, ao testar frações do extrato clorofórmico, investiga que as fisalinas são os compostos responsáveis por essa atividade biológica.

Há muito tempo extratos vegetais têm sido utilizados como fonte de pesquisa para novos antimicrobianos, como Ballen *et al.* (2019) testou o extrato de folhas de *Laurus nobilis* contra *S. aureus* e *E. coli* e obteve o valor de 4,7 mg/mL para ambas as cepas. Também, SOBREIRA *et al.* (2020) pesquisou sobre a atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* e obteve MIC de 0,47 mg/mL e 0,93 mg/mL respectivamente. Extratos de *Scutellaria baicalensis* foram testados por DA *et al.* (2019) contra *T. rubrum* no qual foi encontrado o CIM de 20 mg/mL para todos os testes. Os resultados encontrados na literatura, reforçam o potencial dos extratos vegetais contra microorganismos e justificam as pesquisas que seguem esse caminho. A biodiversidade vegetal é grandiosa e é considerada fonte inesgotável de compostos bioativos.

Embora não exista um consenso na literatura sobre os valores de referência de concentração mínima inibitória para extratos vegetais, alguns

autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial aqueles com níveis de inibições superiores. Os resultados obtidos neste trabalho, colaboram com as pesquisas de compostos de origem vegetal com potencial antimicrobiano. Essa vertente se justifica, uma vez que, bactérias têm se revelado resistentes aos fármacos atuais. E antifúngicos precisam ter sua ação seletiva, ou seja, que iniba um processo do patógeno que não exista no hospedeiro para que seu metabolismo seja pouco afetado. A utilização de extratos vegetais se mostra satisfatória nessa busca por serem compostos abundantes e de fácil acesso na natureza, além de ter menor custo envolvido em sua busca (DIAS *et al.*, 2020).

Com o intuito de otimizar as atividades biológicas apresentadas por extratos vegetais e seus derivados, a nanotecnologia tem se mostrado uma importante ferramenta. Nesse trabalho, o extrato clorofórmico, etanólico e a fração metanol foram incorporados em nanoemulsão e sua atividade biológica testada contra bactérias. É possível notar na Tabela 11 que as nanoemulsões apresentaram valores superiores a 1,25 mg/mL frente todas as cepas.

Em comparação com os valores obtidos pelos extratos e pelas frações anteriormente, é possível perceber que não houve a atividade dos compostos ao serem incorporados na nanoemulsão. Como a concentração inicial das nanoemulsões foi de 1,25 mg/mL, devido à perda de estabilidade em concentrações maiores, não foi possível avaliar a atividade nas concentrações entre 5 e 1,25 mg/mL.

Uma vez que a metodologia do experimento com a nanoemulsão e do extrato e frações foi o mesmo, há de ser considerado se o tempo de experimento foi o suficiente para que a nanoemulsão liberasse o ativo responsável pela atividade biológica.

Frente às leveduras e fungos filamentosos, foram testadas nanoemulsões com incorporação do extrato clorofórmico, etanólico e a fração Hexano-Acetato (6:4). Analisando os valores apresentados na tabela 12, nota-se que os valores obtidos pelas nanoemulsões são superiores a 1,25 mg/mL e, portanto, não houve melhora no desempenho apresentado pelos extratos e frações anteriormente.

Na Tabela 13, é possível notar que a nanoemulsão extrato clorofórmico e da fração Hexano-Acetato (6:4) apresentaram atividades, porém com

resultados maiores que os obtidos somente com o extrato e a fração. Na literatura, a atividade biológica da *P. angulata* está relacionada à presença de fisalinas, um vitaesteróides com características lipofílicas. Com a sua natureza, as fisalinas tendem a ter maior interação com a nanoemulsão, devido a sua fase oleosa, portanto deverá apresentar maior tempo para a sua liberação. Esse fato aliado ao fato de que a NE extrato clorofórmico e a NE fração Hexano-Acetato (6:4) apresentaram atividade biológica contra os fungos filamentosos, é possível deduzir que a alteração no tempo do experimento talvez proporcionasse maior atividade biológica.

5.8 Análise das Nanoemulsões

Os extratos clorofórmico e etanólico, a fração Hexano-Acetato (6:4) e a fração Metanol foram escolhidos para serem incorporados em nanoemulsão por causa dos resultados apresentados nos testes biológicos frente bactérias, leveduras e fungos. Na figura 16 é possível observar as nanoemulsões.

Após a formulação das NE, foi medido o tamanho, a homogeneidade do sistema foi avaliada através do índice de polidispersão (IPd) e a composição da interface das NE foi ponderada através do potencial zeta. Os valores foram obtidos com três medições ao longo de 30 dias e estão relacionados na tabela 14.

Figura 16 - Aspecto visual das formulações. Na sequência: nanoemulsão branca, nanoemulsão extrato etanólico, nanoemulsão da fração metanol, nanoemulsão do extrato clorofórmico e nanoemulsão fração Hexano-Acetato (6:4).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 14 - Valores de tamanho, IPd e potencial Zeta das nanoemulsões nos dias 1, 7 e 30.

	DIA 1			DIA 7			DIA 30		
	Tamanho (nm)	IPd	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	IPd	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	IPd	Potencial Zeta (mV)
NE branca	68,13 ± 0,57	0,28 ± 0,01	-13,4 ± 0,66	59,04 ± 0,06	0,31 ± 0,01	-24,7 ± 0,76	72,05 ± 0,35	0,18 ± 0,007	-26,8 ± 0,75
NE Extrato etanólico	81,87 ± 1,68	0,28 ± 0,005	-47,0 ± 1,10	87,2 ± 0,56	0,25 ± 0,001	-56,9 ± 1,05	85,64 ± 0,57	0,34 ± 0,23	-43,0 ± 1,65
NE fração metanol	53,97 ± 0,21	0,41 ± 0,008	-25,2 ± 0,79	81,3 ± 1,7	0,35 ± 0,007	-27,2 ± 0,8	78,45 ± 0,03	0,23 ± 0,02	-26,2 ± 0,82
Extrato clorofórmico	40,09 ± 0,26	0,36 ± 0,012	-23,6 ± 1,42	82,7 ± 0,54	0,2 ± 0,01	-28,5 ± 1,98	78,5 ± 0,12	0,27 ± 0,023	-26,4 ± 1,65
NE fração Hexano-Acetato (6:4)	39,85 ± 0,1929	0,190 ± 0,005	-17,3 ± 6,88	55,2 ± 1,00	0,251 ± 0,01	-33,9 ± 0,64	68,9 ± 0,14	0,187 ± 0,02	-26,3 ± 1,87

Fonte: Elaborado pelo autor

O tamanho da NE Extrato etanólico variou aproximadamente 4% entre as três medições. A NE Extrato clorofórmico dobrou o tamanho do dia 1 para o dia 7, mas manteve-se próximo ao valor do dia 30. A fração Hexano-Acetato (6:4) aumentou 38% seu diâmetro entre a primeira e segunda medição e 24% da segunda para a terceira medição. A fração metanol exibiu aumento de 50% em seu diâmetro do dia 1 para o 7, mas não houve grande variação no dia 30.

Segundo Solans *et al.* (2005), as nanoemulsões com o diâmetro de gotículas variando entre 20 e 300 nm são mais vantajosas em relação às demais nanoemulsões por apresentarem maior estabilidade frente à sedimentação, por utilizarem baixa concentração de tensoativos, por serem transparentes, fluidas, aumentarem a molhabilidade, a capacidade de espalhar e a penetração devido à baixa tensão interfacial. Mesmo com as variações observadas, as NE's apresentam tamanho vantajoso.

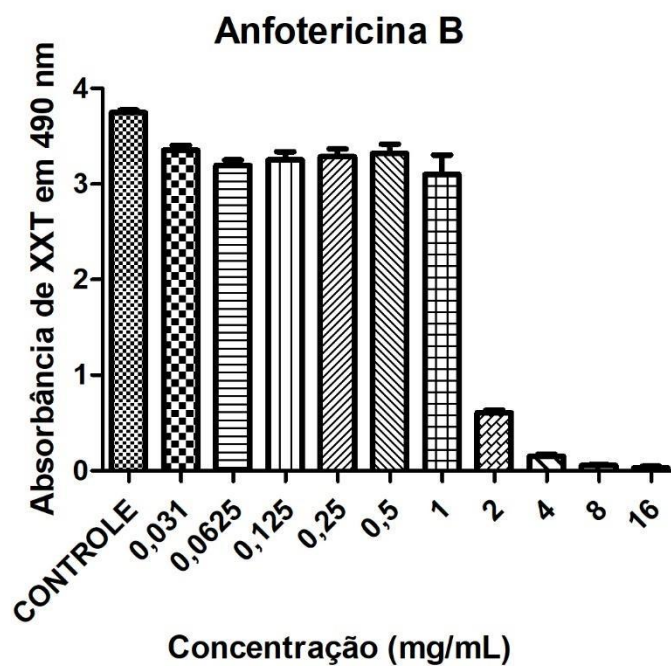
O IPd sugere a homogeneidade do sistema e quanto menor o valor obtido, preferencialmente $\leq 0,2$, maior o grau de homogeneidade da amostra. No dia 1 e no dia 30, a NE Hexano-Acetato (6:4) teve respectivamente 0,190 e 0,187 de IPd e foi a que mais se aproximou de 0,2, portanto a mais homogênea de todas as amostras. Entretanto, as demais ultrapassaram o valor de 0,2 nos três dias.

O potencial zeta reflete o potencial elétrico no plano de cisalhamento da formulação e é um indicador de carga superficial útil para prever instabilidades na nanoemulsão através das forças de repulsão que evitam processos de floculação e coalescência após longo tempo de armazenamento. Valores altos de potencial zeta (>30 mV) sugerem partículas altamente carregadas, que geram repulsão e consequentemente uma boa estabilização. O valor de potencial zeta pela NE etanólica apresentou a melhor estabilidade no dia 1, no dia 07 a NE etanólica continuou com a melhor estabilidade assim como a NE fração Hexano-Acetato (6:4). Entretanto, no dia 30, a NE continuou apresentando a melhor estabilidade.

5.9 Biofilme

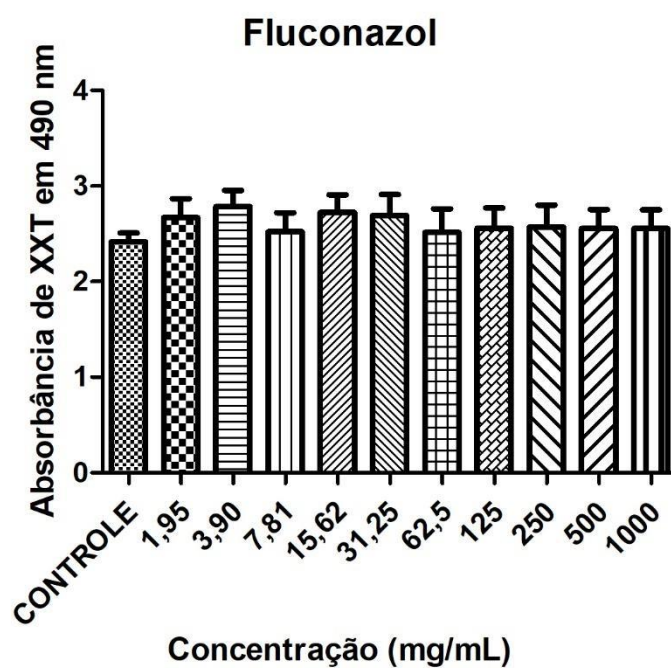
A quantificação de biofilmes de *Candida albicans* pode ser realizada através do ensaio de redução do XTT, porque consegue mediar a atividade celular do complexo. O XTT, que é um sal amarelo, ao entrar em contato com células metabolicamente ativas do biofilme é reduzido em formazano, uma substância marrom solúvel em água que pode ser medido espectrofotometricamente. As figuras 17, 18, 19, 20 e 21 mostram os resultados obtidos nos testes de viabilidade de biofilme com o tratamento de Anfotericina B, Fluconazol, Extrato clorofórmico, Fração Hexano-Acetato (6:4) e Fração Metanol, respectivamente, com a revelação do XTT.

Figura 17 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de *Candida albicans* em contato com Anfotericina B em diferentes concentrações.



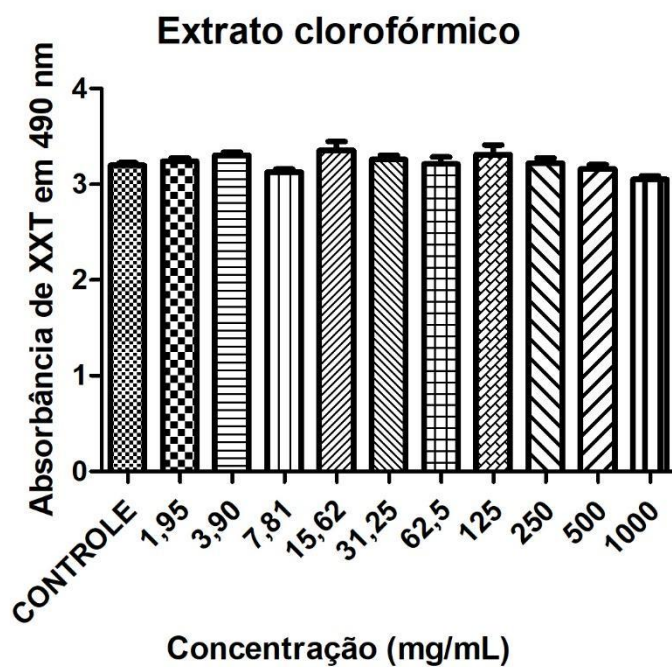
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 18 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de *Candida albicans* em contato com Fluconazol em diferentes concentrações.



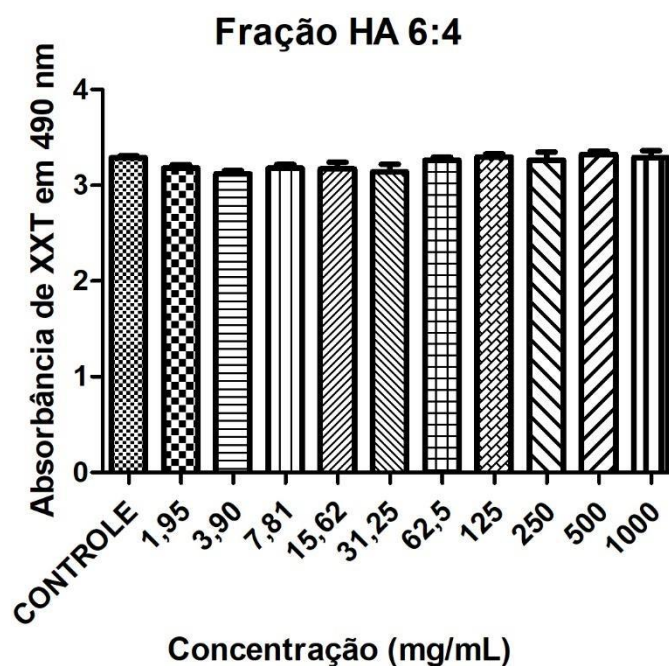
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 19 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de *Candida albicans* em contato com extrato clorofórmico de *P. angulata* em diferentes concentrações.



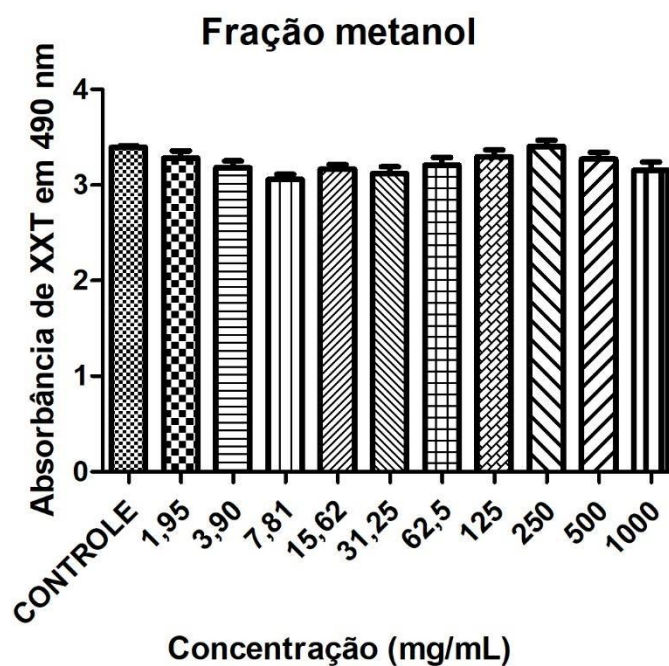
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 20 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de *Candida albicans* em contato com fração Hexano-Acetato (6:4) do extrato clorofórmico de *P. angulata* em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 - Resultados do ensaio de XTT em células de biofilme de *Candida albicans* em contato com fração Metanol do extrato clorofórmico de *P. angulata* em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pelo autor

A Anfotericina B foi o único composto que nas concentrações 16 mg/mL, 8 mg/mL, 4 mg/mL e 2 mg/mL apresentou atividade de inibição da formação do biofilme de *Candida albicans*. Essa conclusão é possível a partir da comparação do controle com os resultados das amostras nas diferentes concentrações. Os demais compostos testados apresentaram resultados parecidos com os do controle.

De acordo com Bueno (2014) e Akbari et al. (2015) Essa não efetividade possivelmente se deu devido à estrutura do biofilme, pois esta contribui para a tolerância dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, e a matriz extracelular age como uma espécie de barreira, impedindo a penetração de substâncias. Quando há o estabelecimento do biofilme, este pode tolerar agentes antimicrobianos em concentrações de 10-1000 vezes maiores que as utilizadas na eliminação de células planctônicas.

Considerando essa informação e o CIM que varia de 1,25 mg/mL a 2,5 mg/mL do extrato clorofórmico, fração Hexano-Acetato (6:40 e da fração Metanol frente à *Candida albicans*, é possível realizar testes com concentrações superiores a que foram testadas neste trabalho. Em paralelo, seria interessante a realização de testes de toxicidade para colaborar com a determinação das concentrações a serem utilizadas.

6. CONCLUSÕES

A triagem fitoquímica dos principais metabólitos secundários permitiu a identificação de flavonóides, alcalóides, terpenos e glicosídeos cardiotônicos nas partes aéreas da amostra de *P. angulata* estudada. A partir disso, foram escolhidos os solventes e realizadas extrações, de acordo com a polaridade desses compostos.

Os extratos clorofórmico e etanólico apresentaram atividade antioxidante e atividade antimicrobiana frente diversas cepas de microrganismos. Pelo encontro de dados que evidenciam que o extrato etanólico apresentou melhor atividade antioxidante e o extrato clorofórmico melhor atividade antimicrobiana, a futura realização de cromatografia de alta eficiência permitirá encontrar as diferenças químicas entre os extratos e ajudará a entender quais são os compostos responsáveis pelos resultados encontrados nas duas atividades.

Com a obtenção de melhores resultados na avaliação antimicrobiana do extrato clorofórmico, optou-se pelo seu fracionamento e realização dos CIMs com as frações obtidas. A fração de metanol mostrou ser mais efetiva contra todas as espécies de bactérias, enquanto a fração Hexano-Acetato (6:4) demonstrou bons resultados contra todos os fungos filamentosos e leveduras.

Os extratos etanólico e clorofórmico foram incorporados em nanoemulsão, assim como as frações Hexano-Acetato (6:4) e metanol. Após a caracterização das nanoemulsões, foram testadas contra os microorganismos patógenos já testados. Os resultados obtidos demonstram que as emulsões não apresentaram atividade contra bactérias e leveduras. Em contrapartida apresentaram atividade contra fungos filamentosos, porém não houve melhora no desempenho. Maiores comparações não foram possíveis, pois não conseguiu suportar maiores concentrações de composto ativo. É possível que o tempo de execução do experimento não tenha sido o suficiente para total liberação do composto ativo da nanoemulsão, dada a sua característica lipofílica. Dessa forma, o teste de tempo de morte poderia acrescentar informações relevantes ao uso de nanoemulsões com extratos e frações de *P. angulata*. Além disso, seria interessante testar novas formulações que liberassem o princípio ativo mais rápido.

Em relação ao experimento de inibição da formação do biofilme, as amostras testadas não apresentaram atividade na concentração testada.

O perfil cromatográfico do extrato clorofórmico e das frações Hexano-Acetato (6:4) e metanol, mostram que as três frações são distintas, mas compartilham compostos que podem ser os responsáveis pelas atividades biológicas. A identificação desses compostos depende do comparativo com um padrão ou testes específicos, como RMN.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARI, F.; KJELLERUP, B.V. Elimination of Bloodstream infections associated with *Candida albicans* Biofilm in Intravascular Catheters. **Pathogens**, São Francisco, v. 4, p. 457–469, 2015.
- ALAMINO, D. A. **Características agrônômicas de físalis (*Physalis pubescens* L) produzida por diferentes métodos e substratos e aspectos**

anatômicos e fitoquímicos. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em agronomia, Universidade tecnológica federal do Paraná, Pato Branco, p.87, 2011.

ALMEIDA, D. F. L. dos S. **Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, p.61, 2017.

ALMEIDA JÚNIOR, L. D. Atividade anti-inflamatória intestinal do extrato padronizado de *Physalis angulata* L. (camapú). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração Farmacologia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, p.82, 2013.

ALVES, R. S. *et al.* Genotóxico efeito de *Physalis angulata* L. (*Solanaceae*) extrato de linfócitos humanos tratados *in vitro*. **Biocell**, Mendoza, v. 32, n. 2, p. 195–200, 2008.

ALVES, D. T. A. V. *et al.* Estudo Químico de *Physalis angulata* (camapú) por HPLC. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 33. **Anais [...]**. Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2010.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 5, n. 3, p. 450–513, 2013.

BALLEN, S. C. *et al.* Determinação do potencial antioxidante (DPPH) e antimicrobiano de extratos vegetais e óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*). **Perspectiva**, Santa Catarina, v. 43, n. 163, p. 61-70, 2019.

BANOTHU, V. *et al.* In Vitro Total Phenolics, Flavonoids Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts From the Medicinal Plant *Physalis Minima* Linn. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Maharashtra, v. 9, n. 3, p. 192, 2017.

BASEY, K.; MCGAW, B. A.; WOOLLEY, J. G. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 12, p. 4173–4176, 1992.

BASTOS, G. N. T. *et al.* Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 103, n. 2, p. 241–245, 2006.

BAZANA, M. T. *et al.* Development of nanoemulsions containing *Physalis*

peruviana calyx extract: A study on stability and antioxidant capacity. **Food Research International**, Essex, v. 125, n. April, p. 108645, 2019.

BAZANA, M. T. *et al.* Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Physalis Peruviana* Calyx Extract. **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais, v. 6, n. 10, p. 77422–77432, 2020.

BEILINTANI, M. C. **Avaliação da atividade imunomoduladora de fisalinas isoladas de *Physalis angulata* L. em macrófagos ativados e no choque endotóxico**. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Salvador, p.64, 2002.

BERNARDELLI, W.; FILHO, S. Práticas Medicinais dos Colonizadores na América Portuguesa Quinhentista. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTORY, 5. **Anais [...]**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2011, p.1898-1906.

BESSA, N. G. F. de *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 4, p. 692–707, 2014.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnológica**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54–67, 2020.

BOTELHO, A. F. M. **Efeitos dos glicosídeos cardioativos (digoxina, ouabaína e oleandrina) na fisiologia cardiorrenal em ratos wistar hígidos**. Tese (Doutorado em Medicina e Cirurgias Veterinárias) - Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 99, 2018.

BOUCHEMAL, K. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1–2, p. 241–251, 2004.

BRAGA, C. de M. **Histórico da utilização de plantas medicinais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Consórcio setentrional de educação à distância, Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás, Brasília, p.84, 2011.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos e Ciência**, Salvador, v. 5, n. 12, p. 1–8, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

BUENO, J. Anti-biofilm drug susceptibility testing methods: looking for new strategies against resistance mechanism. **Journal of Microbial Biochemical Technology**, Bogotá, v. 3, n. 4, p. 1-9, 2014.

CAMLOFSKI, A. M. de O. **Avaliação dos compostos bioativos e caracterização das pectinas do fruto de *Physalis angulata* L.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014, p. 124.

CARNEIRO, H. **Filtros, Mezinhas e Triacas: as drogas no mundo moderno.** 1994. Xamã Editora, São Paulo, p.250, 1994.

CARVALHO, C. A. *et al.* Immune depression in *Rhodnius prolixus* by seco-steroids, physalins. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 555–562, 2008.

CASTRO, M. R. DE; FIGUEIREDO, F. F. Estudos e pesquisas sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: Caminhos e desafios. **Revista Eletrônica de Recursos en Internet Sobre Geografía y Ciencias Sociales**, Barcelona, v. 240, n. 1, p. 1–19, 2020.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC.** 1. ed. São Paulo, p.192, 1998.

CHECON, J. **Atividade anti-inflamatória do extrato liofilizado de *Physalis angulata* L. em cultura de queratinócitos humanos e seu potencial como ativo dermocosmético.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de pós graduação em Ciências Biológicas e Farmacologia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, p.65, 2011.

CHIANG, H. C. *et al.* Agente antitumoral, F fisalina de *Physalis angulata* L. **Anticancer Research**, Athens, v. 12, n. 3, p. 837–843, 1992.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeta*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrid*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 89, n. 1, p. 171–175, 2003.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard M7-A11**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard M38**, 3rd edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27**, 4th edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

COBALEDA-VELASCO, M. *et al.* Phenolic profiles and antioxidant properties of *Physalis angulata* L. as quality indicators. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research**, Antofagasta, v. 5, n. 2, p. 114–128, 2017.

COBRADO, L. *et al.* Anti-Candida activity of antimicrobial impregnated central venous catheters. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v.6, n.1, p.1-7, 2017.

COLLINS, C. H. O Desenvolvimento da Cromatografia em Camada Delgada. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 2, n. 1, p. 5–12, 2010.

COLLINS, C. H. *et al.* O que é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Química Nova**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 46–49, 1983.

CONTRERAS, T. A. *et al.* Efecto antidiabético de los extractos liofilizados de *Guazuma ulmifolia* Lam., *Dracontium lorentense krause*, *Physalis angulata* L, y *Handroanthus obscurus* (Bureau & K. Schum) Mattos, mediante la inhibición in vitro de la alfa α -glucosidasa. **Revista Peruana de Medicina Integrativa**, Lima, v. 5, n. 1, p. 5–11, 2020.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

DA, X. *et al.* Antifungal activity and mechanism of action of Ou-gon (*Scutellaria root* extract) components against pathogenic fungi. **Nature Scientific Reports**, Londres, v.9, n.1693, p. 1-12, 2019.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* Incorporation of Nonyl 3,4-Dihydroxybenzoate Into Nanostructured Lipid Systems: Effective Alternative for Maintaining Anti-Dermatophytic and Antibiofilm Activities and Reducing Toxicity at High Concentrations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.11, n.1, p.1154, 2020.

DIAS, F. G. B. *et al.* Bioaccessibility of the bioactive compounds and

antimicrobial activity of aqueous extracts of *Physalis angulata* L. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 51, n. 3, p. 2–9, 2020.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Minnesota, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

FAWOLE, F. J. *et al.* Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of selected Indian medicinal plants. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, India, v. 3, n. 1, p. 69–77, 2013.

FERREIRA, L. M. dos S. L. **Caracterização anatômica e fitoquímica da *Physalis angulata* L. e seu efeito sobre células de indivíduos com mielopatia associada os HTLV-1.** Tese (Doutorado em Medicina e Saúde Humana) - Programa de Pós-graduação em medicina e saúde humana, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, p.100, 2018.

GARCIA, M. L. *et al.* A two-way road: antagonistic interaction between dual-species biofilms formed by *Candida albicans*/*Candida parapsilosis* and *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n.1, p.1980, 2020.

GIORGETTI, M. **Estudo das plantas medicinais brasileiras com possível ação no sistema nervoso central citadas em literatura antiga (Séculos XVU - XIX).**Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, p.147, 2009.

GODINHO, C. S. *et al.* Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. **Revista Multitexto**, Montes claros, v. 3, n. 1, 2015.

GOUVEIA, F. *et al.* Bioaccessibility of the bioactive compounds and antimicrobial activity of aqueous extracts of *Physalis angulata* L. 1. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 51, n. 3, p. 1–9, 2020.

GUIMARÃES, E. T. *et al.* Efeitos de seco-esteróides purificados de *Physalis angulata* L., *Solanaceae* na viabilidade de *Leishmania* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 945–949, 2010.

HONG KONG HERBARIUM. HK Database. 2021. Disponível em: <https://www.herbarium.gov.hk/>. Acesso em: 15 jul. 2021.

HUBINGER, S. Z. **Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas,

Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, p.150, 2009.

ISMAIL, N.; ALAM, M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. **Fitoterapia**, Milano, v. 72, n. 6, p. 676–679, 2001.

JANUÁRIO, A. H. *et al.* Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (*Solanaceae*). **Phytotherapy Research**, London, v. 16, n. 5, p. 445–448, 2002.

JIN, Z. *et al.* Physangulidines A, B, and C: Three new antiproliferative withanolides from *Physalis angulata* L. **Organic Letters**, Washington, v. 14, n. 5, p. 1230–1233, 2012.

JUHAS, M. *et al.* Genes essenciais de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* e fábricas celulares mínimas após uma década de engenharia genômica. **Microbiology society**, London, vol. 160, n. 11, 2014.

HALL-STOODLEY, Luanne; STOODLEY, Paul. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, 2009.

KUSUMANINGTYAS, R.; LAILY, N.; LIMANDHA, P. Potential of Ciplukan (*Physalis angulata* L.) as Source of Functional Ingredient. **Procedia Chemistry**, Amsterdam, v. 14, p. 367–372, 2015.

LEE, H. Z. *et al.* Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 561–570, 2009.

LEUCK, A. *et al.* A widely used in vitro biofilm assay has questionable clinical significance for enterococcal endocarditis. **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014

LIMA, C. S. M. *et al.* Características físico-químicas de *Physalis* em diferentes colorações do cálice e sistemas de condução. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, n. 4, p. 1061–1068, 2009.

LIMA, L. G. B. **Influência de extratos de abricó (*Mammea americana*), camapu (*Physalis angulata*) e uxi (*Endopleura uchi*) em linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Programa de Pós-graduação em alimentos e nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.86, 2019.

LIN, Y. S. *et al.* Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L extract. **American Journal of Chinese Medicine**, New York, v. 20, n. 3, p. 233–243, 1992.

LOPES, D. C. *et al.* Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São

Paulo, v. 16, n. 2, p. 206–210, 2006.

MACHADO, H. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 01, 2008.

MADALENO, I. M. Visualização de A flora na obra de José de Anchieta. *In*: CONGRESSO IBERO-AMERICANO EM INVESTIGAÇÃO QUALITATIVA, 5. **Anais [...]** Porto: CIAIQ, 206, p.68-75.

MAGALHÃES, H. I. F. **Atividade antitumoral (in vitro e in vivo) das fisalinas isoladas de *Physalis angulata* Lin.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p.101, 2005.

MARQUES, J. A.; BORGES, C. P. F. **Práticas de Química Orgânica**. 2. ed. Campinas: Editora Átomo & Alínea, 2012.

MAZIERO, M.; TEIXEIRA, M. P. A expansão da utilização de fitoterápicos no Brasil. *In*: ANAIS DO SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9. **Anais [...]**. Santana do Livramento: Universidade Federal do Pampa, 2017, p.1–5.

MCKENNEY, P.T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P. O endósporo de *Bacillus subtilis*: montagem e funções do revestimento multicamadas. **Nat Rev Microbiol**, vol. 11, p. 33– 44, 2013.

MEDINA-MEDRANO, J. R. *et al.* Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of *Physalis* (*Solanaceae*). **Botanical Studies**, Taipei, v. 56, n. 24, p. 1–13, 2015.

MELO, A. C.; AFIATPOUR, P. Presence of acetylcholine in the fruit *Physalis angulata* (*Solanaceae*). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 799–804, 1985.

MESQUITA, H. *et al.* Phychochemical approach of secondary metabolites in *Solanum acanthodes* (*Solanaceae*) hook. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, Rio Branco, v. 4, n. 1, p. 30–41, 2017.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, 2005.

NAGAFUJI, S. *et al.* Trypanocidal Constituents in Plants 4. Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. **Biological and pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 193–197, 2004.

O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T., POGNAN, F. Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.** 267, 5421–5426. 2000.

OLIVEIRA, F. S. de *et al.* Extrato etanólico da *Physalis angulata* inibe o crescimento do T. cruzi e a proliferação espontânea de linhagem leucêmica infectada pelo HTLV-1. *In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL*, 52. 2016, Alagoas. Anais eletrônicos... Alagoas: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2016. 1 p.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de Dicksonia sellowiana (Presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 230–239, 2016.

OSHO, A. *et al.* Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata*. L. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 7, n. 4, p. 303–306, 2010.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PACHECO *et al.* História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1225-1271, 2015.

PANDEY, A.; TRIPHATI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP**, New Delhi, v. 115, n. 25, p. 115–119, 2014.

PAPON, N. *et al.* Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **PLOS Pathogens**, São Francisco, v. 9, n. 9, p. 1-4, 2013.

PEDROSO, R.; SILVA, C. de P.; FURLAN, C. M. Comparação dos principais constituintes químicos de duas espécies de arnica: cravorana (*Porophyllum ruderale* [jacq.] Cass) e varão-de-ouro (*Solidago sp.*) **Revista de Enfermagem e Atenção à Saúde**, v. 7, n. 22, 2009.

PEREIRA, E. M. *et al.* *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*: isolados resistentes à metilicina são detectados

diretamente em hemoculturas por PCR multiplex. *Pesquisa Microbiológica*, v. 165, n.3, 2010.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 1, p. 146–152, 2012.

PEREIRA, R. J.; NASCIMENTO, G. N. L. **Compostos bioativos vegetais**. Tocantins: EdUFT, 2017.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227–229, 2002.

PIETRO, R. C. L. R. *et al.* *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 7, n. 4, p. 335–338, 2000.

PINTO, N. B. *et al.* Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 10, p. 740–743, 2010.

PIO CORRÊIA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984.

PONTES, F. N. **Avaliação das atividades antimicrobiana e moduladora da resistência a antibióticos de extratos de *Physalis angulata* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de pós-graduação em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, p.151, 2015.

PORTO, A. S. *et al.* Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. **Fitos**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 513–527, 2020.

RAMADAN, M.; EL-GHORAB, A.; GHANEM, K. Volatile compounds, antioxidants, and anticancer activities of Cape gooseberry fruit (*Physalis peruviana* L.): An in-vitro study. **Journal of The Arab Society for Medical Research**, Mumbai, v. 10, n. 2, p. 56, 2015.

RENGIFO-SALGADO, E.; VARGAS-ARANA, G. *Physalis angulata* L. (Bolsa Mullaca): A Review of its Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 12, n. 5, p. 431–445, 2013.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A. *et al.* Análise da sequência de nucleotídeos do gene da beta tubulina em uma ampla variedade de dermatófitos. **Med. Mycol.**, v. 52, p. 674–688, 2014.

REZENDE, F. M. de *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em

plantas. **IV Botânica no inverno**, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, v. 1, n. 1, p. 93–104, 2017.

RODRIGUES, F. A. *et al.* Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia: Centro Científico Conhecer, v. 13, n. 23, p. 870–877, 2016.

RODRIGUES, R. M. S. *et al.* Análise do desenvolvimento de camapú da Amazônia (*Physalis angulata* L.) em diferentes substratos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS, 3. João Pessoa. **Anais [...]**. João Pessoa: PDVAGRO, 2018. p. 1689–1699.

ROQUETE A., T. *et al.* Métodos Para Avaliação in Vitro Da Atividade Antimicrobiana De Plantas Medicinais: a Necessidade Da Padronização. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 50–59, 2018.

ROSA, R. C. A. Triagem fitoquímica dos extratos aquosos de *Bauhinia candicans*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium* e *Morus nigra*. **Conexão Ciência**, Formiga, v. 11, n. 1, p. 44–51, 2016.

RUAN, S. Y., HSUEH, P. R. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. **J Formos Med Assoc**, vol. 108, n. 6, p.443-51, 2009.

RUFATO, A.; RUFATO, R.; RUFATO, L.; SIMONE, C.; LIMA, M.; MUNIZ, J. A cultura da *Physalis*. In: KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L.; PELIZZA, T. R. (org.). **Série Fruticultura - Pequenas Frutas**. Florianópolis: UDESC, 2013. p. 143–193.

SANTOS, J. A. A. dos *et al.* Molluscicidal Activity of *Physalis angulata* L. Extracts and Fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under Laboratory Conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 425–428, 2003.

SHARIFF, N. *et al.* Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 10, p. 946–950, 2006.

SHU, J. *et al.* Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. **Life Sciences**, Columbus, v. 74, n. 16, p. 2061–2073, 2004.

SILVA, M. T. G. *et al.* Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (*Solanaceae*) fraction and physalin B bringing out the importance of

assay determination. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 779–782, 2005.

SILVA, P. B. da. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de *Physalis* sp.** Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) - Programa de Pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p.108, 2013.

SILVA, L. R.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, R. A. Identificação dos metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius raddi*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, Rio Branco, v. 2, n. 2, p. 84–93, 2015.

SILVA, R. R. P. da et al. In vitro biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 15, n. 1, p. 249, 2015.

SILVA, B. J. M. et al. *Physalis angulata* induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* via the generation of reactive oxygen species. **Micron**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 25–32, 2016.

SILVA, B. da et al. In vitro antileishmanial effects of *Physalis angulata* root extract on *Leishmania infantum*. **Journal of Integrative Medicine**, Shanghai, v. 16, n. 6, p. 404–410, 2018.

SILVA, L. S. et al. Composição química e atividade fotoprotetora de extratos de espécies de *Physalis* (*Solanaceae*). In: Seminário de Iniciação Científica da UEFS, 20. **Anais [...]**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2018.

SILVA, S. S. da. **Desenvolvimento de formulação nanoestruturada contendo extrato de *Physalis peruviana*.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p.82, 2018.

SILVA, D. H. da. **Métodos cromatográficos para avaliação de antraquinonas, HPAS, atividade antioxidante e composição fenólica como instrumento de controle de qualidade do processamento alternativo de erva mate.** Dissertação (Mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Programa de pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, p.116, 2019.

SILVA, T. G. D. A. Antioxidant Activity, Phenolic Content and Fatty Acid Profile for Seeds *Physalis angulata* L. **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais, v. 6, n. 12, p. 101241–101251, 2020.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 65-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SKOOG, D.A., WEST, D.A., HOLLER, F.J., CROUCH, R. S. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo. v. 8

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOARES, M. B. P. *et al.* Inhibition of macrophage activation and lipolyssacaride-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 459, n. 1, p. 107–112, 2003.

SOARES, N. P. *et al.* Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia: Centro Científico Saber, v. 13, n. 24, p. 991–1010, 2016.

SOUZA, O. V. S. *et al.* Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. - Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, p. 50–53, 2003.

SOUZA, M. O. de **Expressão diferencial de genes em sementes osmocondicionadas e plântulas de *Physalis angulata* L. e prospecção de constituintes seco-esteroidais em plantas submetidas a estresse abiótico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012, p.107.

SOBREIRA, A. L. de C. *et al.* Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Ceará, v.15, n.4, p.429-433, 2020.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface**

Science, Amsterdam, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005.

SOUZA, T. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2007.

SPAGNOL, C. M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, p.146, 2014.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – um fenômeno de resistência bacteriana. **Microbiology Society**, Londres, v. 58, n. 9, 2009.

SUSANTI, R. F. *et al.* Total Phenol, Flavanoid and Antioxidant Activity of *Physalis angulata* Leaves Extract by Subcritical Water Extraction. **Modern Applied Science**, Ontario, v. 9, n. 7, 2015.

TOMASSINI, T. C. B. *et al.* Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 47–57, 2000.

USHIE, O. A. *et al.* Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of Chloroform and Ethyl Acetate Extracts of *Physalis angulata*. **Journal of Chemical Society of Nigeria**, Karu, v. 44, n. 6, p. 1062–1069, 2019.

VIECELI, P. S. *et al.* *Physalis angulata* reduces the progression of chronic experimental periodontitis by immunomodulatory mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 273, n. 1, p. 113986, 2021.

VIDAL, J. O. **Micropropagação e aclimatização de camapú (*Physalis angulata* L.)** Dissertação (Mestrado em Agricultura e sustentabilidade na Amazônia) Programa de Pós-graduação em agronomia tropical, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, p.61, 2008.

VIEIRA, N. C. *et al.* Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 1676–1682, 2008.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, v. 316, n. 1, p. 1–17, 2010.

WAGNER, H.; Blatt, S. **Plant drug analysis – a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Heidelberg: Spring-Verlag, 386 p., 1986.

YU, Y. *et al.* Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 290–297, 2010.

ZANON, R. B. **Metabólitos secundários em *Vernonia tweedieana baker***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p.180, 2006.

ZIMMER, T. ***Physalis pubescens L*: Avaliação físico química, bioativa, antioxidante, antimicrobiana e antitumoral de frutos oriundos da região Sul do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.