



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Lygodium venustum* LW. CONTRA A TOXICIDADE DO CLORETO DE MERCÚRIO EM MODELO MICROBIANO

FERNANDO GOMES FIGUEREDO

CRATO – CE,
2014

FERNANDO GOMES FIGUEREDO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE CITOPROTETORA DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Lygodium venustum* LW. CONTRA A TOXICIDADE DO CLORETO DE MERCÚRIO EM MODELO MICROBIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de MESTRE EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

FENANDO GOMES FIGUEREDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioprospecção Molecular, do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais. A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, de acordo com as normas da ética científica, e encontra-se à disposição na biblioteca setorial do referido programa.

Fernando Gomes Figueredo

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____

Examinadores:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – Orientador
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof^ª. Dra. Micheline Azevedo Lima – Avaliadora externa;
Universidade Federal Paraíba-UFPB

Prof^ª. Dra. Marta Regina Kerntopf – Avaliadora Interna
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares – (SUPLENTE).
Faculdade Leão Sampaio – FALS

CRATO – CE,
2014

Dedico aos meus queridos pais, Joaquim Figueredo dos Santos e Maria Aparecida Gomes Viana, a meus irmãos Ana Beatriz Gomes Figueredo e Jakson Gomes Figueredo, a minha esposa Amanda Letícia Paiva Freire e em especial ao meu amado filho, Joaquim Davi Freire Figueredo (o Nego).

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Ao meu Orientador Professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos e oportunidades. Com certeza é um exemplo de educador, preocupado com o crescimento humano e profissional de cada orientando.

Ao Professor Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, pelas suas contribuições e ensinamentos demonstrando ser sempre solícito.

Ao Professor Dr. José Galberto Martins da Costa por ter concedido a carta de aceite e pelos seus ensinamentos.

A professora Dra. Marta Regina Kerntopf pelo carinho, parceria e seus ensinamentos.

A meu amigo Professor Me. Edinaldo Fagner pelo incentivo, parceria e apoio.

Flaviana Morais-Braga pela receptividade, otimismo e pelas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha querida amiga e parceira Luciene, sempre otimista “vai dar tudo certo”.

Ao meu amigo Saulo exemplo de pesquisador, aprendi muito com você.

Aos amigos pelo apoio: Rafael Bezerra “Primo” por sua amizade e exemplo de vida, Cícero Luiz e Lane pelas noites em claro e sempre determinados.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Dara Izabel, Elba Souza, Francisco Cunha, Jacqueline Andrade, Joara, Ivanildo, Karyzia Lima, Nadghia Leite, Rosimeire Sabino, pela partilha de conhecimentos e experiências e pelo carinho recebido.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular.

Às agências brasileiras fomentadoras de pesquisa FUNCAP, CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento das pesquisas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Temos o destino que merecemos. nosso destino está de acordo com nossos méritos” (Albert Einstein)

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ANEXOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	
3.1 Plantas Medicinais	23
3.2 Espécie botânica em estudo	24
3.2.1 Taxonomia	24
3.2.2 Caracterização botânica	25
3.2.3 <i>Lygodium venustum</i> SW	25
3.2.4 Etnobotânica e farmacologia de <i>Lygodium venustum</i>	27
3.3 Metais pesados	29
3.3.1 Mercúrio	29
3.3 Efeito quelante	30
3.4 Atividade Antioxidante	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Material Vegetal	34
4.1.1 Obtenções de extrato alcoólico e frações	35
4.2 Microrganismos	35

4.3 Meios de cultura	35
4.4 Inoculação de bactérias	35
4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
4.6 Avaliação do potencial citoprotetor em modelo microbiano contra cloreto de mercúrio	36
4.7 Ensaio FRAP	37
4.8 Fenóis totais	37
4.9 Flavonóides	38
4.10 Efeito quelante	38
4.11 Análise estatística	38
5 RESULTADOS E DISCUSÃO	39
5.1 Artigo 1	
5.1.1 Avaliação do Potencial Fitoprotetor de <i>Lygodium venustum</i> SW (LYGODIACEAE) Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio	41
5.2 Artigo 2	
5.2.1 Avaliação do Potencial Citoprotetor Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio e Antioxidante de <i>Lygodium venustum</i> SW (LYGODIACEAE).	61
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	
APÊNDICE	

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$ – microgramas de soluto por mililitro de solvente

μl – microlitro(s)

ATCC – *American Type Culture Collection*

CA– *Candida krusei*

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM– Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DMSO – dimetilsulfóxido

EC – *Escherichia coli*

EROs – Espécies reativas de oxigênio

et al – e outros; e colaboradores (latim)

HCDAL – Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima

Hg – Mercúrio

Hg^{+2} – Forma inorgânica divalente do mercúrio

HgCl_2 – Cloreto de mercúrio

HIA – *Heart Infusion Agar*

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LFQM – Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (URCA)

LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA)

LPPN – Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (URCA)

mg/ml – miligramas de soluto por mililitro de solvente

UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

URCA – Universidade Regional do Cariri

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** - Foto de *Lygodium venustum* 27

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 2** - Foto da exsicata de *Lygodium venustum* 34

ARTIGO 1

- Figura 1** Gráfico demonstrativo da atividade moduladora da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à *E. coli* 25922 na presença e na ausência do extrato etanólico de *Lygodium venustum* e suas frações. 55

ARTIGO 2

- Figura 1** Gráfico demonstrativo da atividade moduladora da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à *C. krusei* 02 na presença e na ausência do extrato etanólico de *Lygodium venustum* e suas frações. 74

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	O teor de fenóis totais e flavonoides do extrato e frações de <i>Lygodium venustum</i> .	51
Tabela 2	Tabela 2: FRAP ensaio do extrato etanólico e frações de <i>Lygodium venustum</i> .	53
Tabela 3	Atividade quelante de ferro do extrato etanólico e frações de <i>Lygodium venustum</i> ..	54
Tabela 4	Correlação entre os dados analisados neste trabalho	56

ARTIGO 2

Tabela 1	O teor de fenóis totais e flavonóides do extrato e frações de <i>Lygodium venustum</i> .	71
Tabela 2	FRAP ensaio do extrato etanólico e frações de <i>Lygodium venustum</i> .	72

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Comprovante de submissão

Avaliação do Potencial Fitoprotetor de *Lygodium venustum* SW (LYGODIACEAE)
Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio

ANEXO 2 - Comprovante de submissão

Avaliação do Potencial Citoprotetor Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio e
Antioxidante de *Lygodium venustum* SW (LYGODIACEAE).

RESUMO

O mercúrio é um metal muito perigoso quando em contato com o organismo do homem, quer seja pela via aérea, cutânea ou por ingestão. Os danos causados pelo metal são graves e em grande parte dos casos permanentes. Neste contexto os vegetais principalmente as pteridófitas podem ser uma alternativa terapêutica e ambiental a toxicidade causada pelo cloreto de mercúrio, visto que alguns estudos demonstram a aplicação de pteridófitas para a fitorremediação de metais pesados. *L. venustum* (Lygodiaceae) é uma samambaia com distribuição mundial e o hábito lianescente. Esta espécie é usada como um bioindicador da degradação ambiental e na medicina popular de populações da América do Sul. Este trabalho teve como objetivo investigar as possíveis interações entre extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum* SW. combinados ao cloreto de mercúrio frente à linhagem *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida krusei* 02. Os polifenóis e flavonóides presentes no extrato e frações foram quantificados em mg equivalentes de ácido gálico/ g de amostra e mg equivalentes de quercetina/ g de amostra, respectivamente. O método de FRAP, *in vitro*, demonstrou a atividade antioxidante das amostras. Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos produtos naturais, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição e ensaios para verificar a possível ação citoprotetora através da combinação entre as amostras e o cloreto de mercúrio, utilizando o extrato e as frações em uma concentração sub-inibitória e logo após foi evidenciada as ações bactericidas e fungicidas mínimas em placas de *petri* contendo HIA. Através do coeficiente de correlação de *Pearson* foi possível inferir que a atividade CBM estar relacionada com a atividade antioxidante e quelante, devido à presença dos fenóis totais e flavonóides. No entanto não foi observado atividade citoprotetora frente as linhagens de *Candida krusei* 02. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato etanólico e as frações de *L. venustum* são uma fonte alternativa de produtos naturais com ação citoprotetora.

Palavras – chave: *Lygodium venustum*, cloreto de mercúrio, citoproteção, *Escherichia coli*, *Candida krusei*.

ABSTRACT

Mercury is a very dangerous metal when humans come in contact with it, whether through the air or skin or by ingestion. The damage caused by the metal is serious and in most cases permanent. In this context, the plants especially pteridophytes can be an alternative therapeutic and ambiental um toxicity caused by mercuric chloride, since some studies show um application of pteridophytes for phytoremediation of heavy metals. *L. venustum* (Lygodiaceae) is a fern with worldwide distribution and lianescent habit, this species is used as a bioindicator of environmental degradation and in folk medicine in South America. The aim of this work was to investigate the possible effects of the ethanolic extract and fractions of *Lygodium venustum* SW. on mercury chloride toxicity towards *Escherichia coli* strain ATCC 25922 and e *Candida krusei* 02 .The polyphenols and flavonoids present in the extract and fractions were quantified in mg equivalents gallic acid/g sample and mg equivalents quercetin/g sample, respectively. The *in vitro* FRAP method demonstrated the antioxidant activity of the samples.The antibacterial activity of the natural products was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method and by assays to elucidate the possible cytoprotective action when combining the plant samples and mercury chloride, utilizing the extract and fractions at a sub-inhibitory concentration and was evident soon after the actions bactericides and fungicides minimum in slabs of petri containing HIA. Using the Pearson correlation coefficient it was possible to infer that the minimum bactericidal concentration is related to antioxidant and chelating activity, due to the presence of total phenolics and flavonoids. However cytoprotective activity was not observed against strains of *Candida krusei* 02. The results obtained in this work indicate that the ethanolic extract and fractions of *L. venustum* are an alternative source of natural products with cytoprotective action.

Palavras – chave: *Lygodium venustum*, mercury chloride, cytoprotection, *Escherichia coli*, *Candida krusei*.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos principais investigar as possíveis atividades citoprotetoras do extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum* LW. frente ao cloreto de mercúrio, utilizando como ferramentas em modelos microbianos, além de quantificar a composição fenólica total e avaliar a atividade antioxidante e quelante com o intuito de correlacionar com a possível atividade citoprotetora.

Os artigos 1 e 2 apresentam a quantificação de fenóis totais e flavonóides expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra e como miligramas de quercetina equivalentes por grama de extrato, respectivamente. Já a atividade antioxidante foi avaliada através do método FRAP, observando-se a capacidade redutora em mg de FeSO_4 por grama de amostra, e para avaliar a atividade antimicrobiana foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição e a atividade citoprotetora por ensaios que utilizaram a combinação entre as amostras e o cloreto de mercúrio, utilizando o extrato e as frações em uma concentração sub-inibitória, assim evidenciado as atividades bactericidas e fungicidas mínimas em placas de *petri* contendo HIA, sendo que a atividade bactericida mínima foi estudada no artigo 1 e a fungicida mínima no artigo 2. Além dos testes mencionados no artigo 1, o mesmo analisa a atividade quelante de ferro que utilizou uma metodologia adaptada para o ensaio, baseada no princípio da formação do complexo O-fenantrolina- Fe^{2+} e a sua ruptura, na presença de agentes quelantes.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A busca pela utilização dos vegetais para beneficiar humanidade data de tempos remotos. O vasto conhecimento da biodiversidade química da natureza pelos povos primitivos pode ser considerado fator primordial para descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo das gerações (VIEGAS; BOLZANI, 2006). Embora este conhecimento apresentado pelas populações seja processado empiricamente, ao longo dos anos vem sendo elaborados diferentes métodos para comprovação científica da eficácia de produtos naturais.

Paralelamente ao conhecimento empírico a um interesse dos pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, Bioquímica, farmacologia, química, microbiologia, toxicologia dentre outras. Áreas estas extremamente importantes para a busca do conhecimento da bioatividade dos produtos naturais (LOPEZ, 2006).

Através de levantamentos etnobiológicos, as plantas têm sido apontadas como os produtos naturais mais utilizados pelas populações em geral. Levantamentos etnobotânicos demonstram que as angiospermas são os principais vegetais utilizados na medicina alternativa. Por outro lado pteridófitas têm tido pouco destaque no uso medicinal em diversas culturas, quando comparadas às angiospermas, entretanto, seu uso medicinal é difundido entre populações mundiais. As pteridófitas, por sua utilidade medicinal e terapêutica, desde tempos passados têm sido prescritas sob a forma de extrato medicinal e hoje, por sua reconhecida importância, são tidas como um recurso biológico com potencial terapêutico(SINGH *et al.*, 2010).

Além do cunho medicinal alguns estudos foram realizados utilizando pteridófitas para a fitorremediação de metais pesados. Pesquisas de Francesconi *et al* (2002) e Oliveira *et al* (2009) com a *Pityrogramma calomelanos* e *Pteris vittat* , entre outras plantas do cerrado são capazes de acumular arsênio quando presentes em solo.

Metais pesados são substâncias altamente tóxicas, porém a toxicidade depende de sua concentração armazenada no organismo vivo ou ambiente, independente do mecanismo de intoxicação. Relata-se que os metais presentes nos efluentes industriais reduzem a capacidade autodepurativa das águas, devido à ação tóxica que eles exercem sobre os microorganismos responsáveis pela recuperação das águas, por meio da decomposição de materiais orgânicos (AGUIAR *et al*, 2002).

O mercúrio é bastante utilizado no monitoramento global de poluição, demonstrando assim seu caráter poluidor devido a sua extensa utilização na década 70 pelas indústrias, e toxidez na sua forma metilada sobre o sistema nervoso central e sua retenção nos sedimentos (MARINS et al, 2004).

Neste contexto *Lygodium venustum* é uma pteridófito da família Lygodiaceae, normalmente presente na aclive da floresta nacional do Araripe . É normalmente observada crescendo em clareiras no interior da mata ou às margens de caminhos, em áreas perturbadas. Por possuir raque volúvel, com forma adaptativa de cipó, especializa-se no hábito lianescente, sendo, após atingir 50 cm de altura, considerada uma exímia alpinista, apoiando-se geralmente em cipós, madeiras mortas ou arbustos, chegando a atingir mais de 5 metros de altura (COSTA, 2007; MEHLTRETER, 2006; PRADO, 2005; TRYON STOLZE, 1989). Alguns trabalhos relatam a atividade biológica destas samambaias, dentre algumas atividades já analisadas estão: antimicrobiana, moduladora (ALANIS *et al.*, 2005, MORAIS-BRAGA *et al.*, 2012a, 2012b), antiangiogênica, antiparasitária, antiandrogênica, antissecretora , citotóxica, tricomonocida, antineoplásica, antiepiléptica, antiansiolítica, contra distúrbios gastrintestinais (VELÁZQUEZ *et al.*, 2006; CALZADA *et al.*, 2010; CALZADA *et al.* 2007, antioxidante, leishmanocida e tripanocida (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2012a, 2012b, 2012c, 2013). Não encontrando relatos da atividade citoprotetora frente a metais pesados.

O estudo e a descoberta de produtos naturais ativos que apresentam potencial antitóxico estão em desenvolvimento, baseando-se na premissa de acumulação de metais pesados pela espécie *Lygodium venustum*, estudos foram realizados frente ao potencial tóxico do mercúrio em testes de citotoxicidade em modelo microbiológico.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação *in vitro* da atividade citoprotetora do extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum* LW. contra a toxicidade do cloreto de mercúrio em modelo microbiano

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citoprotetor do extrato etanólico de *Lygodium venustum* e suas frações em bactérias e fungos contra o cloreto de mercúrio.
- Realizar a quantificação de fenóis totais e flavonóides do extrato etanólico de *Lygodium venustum* e suas frações.
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico de *Lygodium venustum* e suas frações.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO E LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

Segundo a Organização Mundial da Saúde (1998), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos e semi-sintéticos”.

As mais antigas citações sobre drogas vegetais são de origem indiana, *Ayurveda* (Ciência da Vida), com registros do modo de organização da medicina da Índia de até 2500 a.C. e informações sobre a utilização de plantas medicinais cientificamente catalogadas, há aproximadamente 1000 a.C. existia um conjunto de 10000 plantas registradas (CHOPRA, *et al.*, 1958). Estas informações contribuíram para o conhecimento atual sobre as plantas e para a separação de moléculas que são empregadas na prática curativa e em muitos segmentos industriais (HARBORNE; BAXTER, 1993).

Os primeiros povos foram descobrindo as propriedades terapêuticas de determinadas espécies vegetais, através das experimentações e das observações, sendo estas transmitidas de geração em geração, e passando, assim, a participar do saber da sociedade (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O uso de plantas medicinais é comum nos diversos biomas brasileiro (VEIGA; MELLO, 2008) e o surgimento da medicina popular, no Brasil, deve-se aos índios, com contribuição dos afro-descendentes e europeus. Na época em que era colônia de Portugal, os medicamentos restringiam-se as metrópoles e a zona urbana, enquanto a suburbana recorria ao uso das ervas medicinais (REZENDE; COCCO, 2002).

No século XVI, o médico suíço Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, conhecido como Paracelsus (1493-1541), formulou a "Teoria das Assinaturas", baseada no provérbio latim *similia similibus curantur*, "semelhante cura semelhante". Com esta teoria acreditava-se que a forma, a cor, o sabor e o odor das plantas estavam relacionados com as suas propriedades terapêuticas, podendo dar indícios de seu uso clínico. Algumas destas plantas passaram a fazer parte das farmacopéias alopáticas e homeopáticas a partir do século XIX, quando se começou a investigar suas bases terapêuticas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; ELVIN-LEWIS, 2001).

O conhecimento sobre as plantas medicinais representa varias vezes o único recurso disponível para o tratamento de diversas patologias. A experiência popular sobre a utilização de fitoterápicos contribui de forma indispensável para a divulgação das ações curativas dos

vegetais, utilizados rotineiramente pelos efeitos medicinais que apresentam, apesar da não identificação dos metabólitos secundários das plantas indicadas para suas diversas enfermidades (MACIEL, *et al.*, 2002).

Estudos sobre o conhecimento popular sobre os fármacos confirmam a ação farmacológica registrando enorme número de utilidades de plantas medicinais, comprovando assim o conhecimento popular que deu origem a vários medicamentos fitoterápicos a partir de uso empírico (ELIZABETSKY, 1993).

A busca de princípios ativos mais eficazes e menos agressivos ao homem, tem colocado a pesquisa sobre plantas medicinais num importante patamar científico e tem aberto perspectivas para estudos de etnofarmacologia, fitoquímica e microbiologia entre outros, principalmente motivada pela existência de doenças endêmicas, de novos agentes infecciosos e a poluição ambiental favorecendo a disseminação de infecções por várias vias como a hídrica (RECIO; RIOS, 1989).

Neste contexto o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, possuindo mais de 20% do número total de espécies da Terra, o que leva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos (ou de maior biodiversidade) (MMA, 2013).

Entretanto, muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem acarretar reações indesejáveis, sejam pela presença contaminante ou adulterante presentes nas preparações fitoterápicas, requerendo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, prospecção fitoquímica, até a produção de um novo medicamento (ELVIN-LEWIS, 2001).

No Brasil as plantas medicinais e seus derivados são regulamentados principalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entidade de direito público do Ministério da Saúde que tem função de promover e proteger a saúde da sociedade garantindo a segurança higiênica de serviços e produtos (BRASIL, 1999).

3.2 Espécie botânica em estudo

3.2.1 Taxonomia

Classe: Polypodiopsida

Ordem: Schizaeales

Família: Lygodiaceae

Gênero: *Lygodium*

Espécie: *Lygodium venustum*

3.2.2 Caracterização botânica

Pteridófitas constituem um grupo de vegetais com uma grande riqueza de espécies e este fato tem contribuído para que o homem se utilize, de variadas maneiras, de seus potenciais quer sejam econômicos, alimentícios ou medicinais (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2012a). As pteridófitas constituem um grupo de plantas vasculares sem flores nem sementes que se reproduzem por esporos. Seu ciclo de vida é heteromórfico com duas fases, diferenciando-se em gametofítica e esporofítica (PRYER *et al.*, 2004). Ocupam uma grande diversidade de ambientes em variados ecossistemas, apresentando diferentes formas biológicas, incluindo quase todas as formas de crescimento e de adaptação das angiospermas (HOLTUM, 1938).

Os ambientes de maior ocorrência das pteridófitas são os tropicais bastante úmidos, que não apresentam longos períodos secos durante o ano. Entretanto, podem ocorrer nos mais variados ecossistemas e microhabitats, em condições bem distintas, de ambientes árticos e alpinos das elevadas altitudes e latitudes até ambientes úmidos no interior das florestas tropicais; de condições subdesérticas até às formações costeiras pantanosas (PAGE, 1979). O fato de compartilharem a alternância de gerações em seu ciclo lhe rendeu o tratamento taxonômico em uma única divisão, a “Pteridophyta”, constituída por classes 25 evolutivamente distintas, formando um táxon parafilético (STEVENSON; LOCONTE, 1996; PRYER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2006).

Fatores físicos podem limitar ou possibilitar o desenvolvimento e o crescimento tanto do gametófito quanto do esporófito, dificultando ou facilitando a amplitude ecológica de adaptação e sobrevivência de suas espécies (PAGE, 1979).

Segundo Smith (2006), a classe Polypodiopsida forma o maior grupo entre as monilófitas atuais e são comumente conhecidas como samambaias ou feto, sendo o grupo das pteridófitas leptosporangiadas, abrangendo cerca de 11.000 espécies distribuídas em 37 famílias.

3.2.3 *Lygodium venustum* SW

A família Roe Lygodiaceae M. Roe é tipicamente representada por plantas terrestres de hábito lianescente, com distribuição pantropical, formada por apenas um gênero *Lygodium* e cerca de 25 espécies (SKOG *et al.*, 2002).

O gênero *Lygodium* sw. distribui-se pantropicalmente, chegando a atingir até mesmo regiões temperadas ao leste dos Estados Unidos, África do Sul, Japão e Nova Zelândia (MORAN, 1995). Apresentam em sua estrutura um rizoma terrestre contendo tricomas aciculares, pluricelulares, alaranjados e caule curto-reptante com tricomas. Possui características incomuns como frondes volúveis e crescimento indeterminado, enrolando-se a partir da gema apical da raque, monomorfas.

No ápice dos segmentos são encontrados os soros e nestes, os esporângios abaxiais solitários, formados na margem da lâmina foliar (contendo apenas 1 soro) protegidos pelo tecido laminar marginal, formando um falso-indúzio e seus esporos apresentam-se como triletes (PRADO, 2005).

A lâmina pode ser 1–3-pinado-pinatífida, papirácea, glabra ou com tricomas pluricelulares alaranjados. Apresenta pinas alternas, pecioluladas; pínulas divididas, palmado-lobadas a pinadas. As nervuras distribuem-se livremente ou de forma anastomosadas (MORAN, 1995).

Lygodium venustum que possui as sinonímias *Lygodium commutatum* C. Presl; *L. mexicanum* C. Presl; *L. polymorphum* (Cav.) Kunth. é uma planta terrestre com rizoma subterrâneo a partir do qual são produzidas suas folhas, que possuem lâmina 2-3 pinado-pinatífida com crescimento indeterminado e pinas alternas com cerca de 14 cm de comprimento, pecioluladas. As pínulas, com 3-7,5 x 1,3 cm, podem ser de palmado-lobadas a pinadas, articuladas, sendo cobertas por tricomas pluricelulares, diminuem de tamanho em direção ao ápice da pina. A base do pedíolulo não apresenta dilatação e tem entre 1-3 mm de comprimento. As frondes são subdimorfas, sendo a estéril mais larga que a fértil. Os segmentos proximais são palmatilobados, com base hastada e margens dentadas. O ápice é obtuso, a venação é aberta e as nervuras são livres, podendo ser simples ou furcadas (Figura 1) (PRADO, 2005).

Figura 1 *Lygodium venustum*



Fonte: Morais-Braga et al. (2012a)

Essa espécie apresenta-se amplamente distribuído na América Latina, do México ao Paraguai e ilhas do Caribe, onde se desenvolve em até 1.100 m de altitude em relação ao nível do mar. No Brasil, distribui-se em diversas zonas fitogeográficas, tendo sido registrada a sua ocorrência em estados de regiões distintas (PRADO, 2005; ARANTES, 2008; COSTA, 2007; SANTIAGO, 2003).

Segundo Mehlreter (2006), esta espécie é capaz de manter uma reserva de vida quando a iluminação não lhe é favorável, podendo revigorar em condições propícias. Buscando condições de iluminação adequada e uma planta que lhe possibilite um suporte perfeito. A *L. venustum* muitas vezes pode se tornar invasora, tida como uma espécie difícil de erradicar, uma vez que mesmo fragmentado o rizoma é capaz de se regenerar e produzir novas folhas. Entretanto, não é considerada uma espécie de rápido desenvolvimento, uma vez que seu ciclo de vida é lento. Mehlreter (2006) ainda observou que a luz do sol é de fundamental importância para a indução da fertilidade. A planta apresenta padrão de crescimento sazonal, correlacionado com a precipitação, indicando que a água age como um fator limitante para seu desenvolvimento.

3.2.4 Etnobotânica e farmacologia de *Lygodium venustum*

A utilização de *L. venustum* como planta medicinal tem sido registrada na Mesoamérica por populações indígenas, entre outras, possuindo atividades antiséptica, fungicida e tricomonicida e sendo indicada para o tratamento de dermatoses, micoses e infecções (DUKE, 2008). É também usada no tratamento de distúrbios gastrointestinais e ginecobstétricas e como antiinflamatório pós-parto (ARGUETA, 1994). Tradicionalmente tem destaque no preparo da bebida de efeito alucinógeno, *ayahuasca*, entre os Sharanahua e os índios do alto do rio Purus na Amazônia Peruana (RIVIER *et al.*, 1972). No Brasil, é utilizada por afro-brasileiros em cultos místicos para banhos de limpeza (ALBUQUERQUE *et al.*, 1997).

Há uma grande diversidade de estudos envolvendo o gênero *Lygodium* desde a avaliação da bioatividade de produtos naturais *in vitro* e *in vivo*, assim como pesquisas que se reportam a tentativas de erradicação de algumas espécies que têm se tornado um grande problema como invasoras. Uma estratégia interessante vem sendo utilizada pelos chineses, que é a de conhecer a miúdo as espécies por intermédio da fitoquímica e realização de testes para bioatividade, tentando dar a elas uma importância farmacológica. Assim como, estudos em ecologia, fenologia geraram registros e descrição de 30 novas espécies do gênero

Lygodium e em alguns casos isolamentos de compostos vem sendo realizados (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2012a).

O primeiro relato sobre a bioatividade dessa samambaia foi em 2005, através de uma triagem feita por Alanis *et al.*, (2005) onde investigando 26 plantas medicinais mexicanas sobre o potencial antibacteriano frente a 8 linhagens, verificou que *L. venustum* apresentou percentual de inibição abaixo de 50%.

Neste estudo foram testados os extratos metanólico e aquoso (8 mg), usando o método da difusão em disco e neste estudo a planta foi considerada pouco eficiente como inibidora do crescimento bacteriano. Como é usada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, tais como diarreia, *L. venustum* teve sua atividade anti-secretora testada em modelo *in vivo*, induzido por toxina do cólera (VELÁZQUEZ *et al.*, 2006), tendo sido utilizada a concentração de 300 mg/kg dos extratos metanólico e aquoso, ficando constatado que apenas o metanólico apresentou inibição (51,6%), mostrando uma interessante atividade antidiarreica.

Nesta mesma concentração, o extrato metanólico foi investigado quanto à inibição do peristaltismo do trato intestinal em ratos, apresentando efeito moderado (42%) superior ao da droga usada como controle positivo, a lorepamida - 34% em 10 mg/Kg (CALZADA *et al.*, 2010). Calzada *et al.* (2007), avaliou a atividade tricomonocida de 22 plantas e constatou uma atividade moderada para *L. venustum*.

Algumas atividades farmacológicas já foram evidenciadas, atividades antidiarreica (VELÁZQUEZ *et al.*, 2006), antiperistáltica (CALZADA *et al.*, 2010), tricomonocida (CALZADA *et al.*, 2007), leishmanocida, tripanocida (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2013), e o seu efeito no tratamento de distúrbios gastrointestinais (CALZADA *et al.*, 2010) já foram investigado. Também a atividade antibacteriana (ALANIS *et al.*, 2005, MORAIS-BRAGA *et al.*, 2012b), antifúngica e moduladora da ação de antimicrobianos utilizados na clínica (Morais-Braga *et al.* 2012b, 2012c, 2013) e efeito antioxidante (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2012a). Suas partes aéreas são utilizadas sob a forma de chá ou tópica, no tratamento de infecções e dermatoses (DUKE, 2008). Não encontrando relatos da atividade citoprotetora frente a metais pesados. No entanto, alguns estudos foram realizados utilizando pteridófitas para a fitorremediação de metais pesados (Gomes *et al.*, 2013). Pesquisas de Francesconi *et al.* (2002) e Oliveira *et al.* (2009) com a *Pityrogramma calomelanos* e *Pteris vittat*, entre outras plantas do cerrado são capazes de acumular arsênio quando presentes em solo.

3.3 Metais pesados

Metais pesados são elementos químicos naturalmente encontrados na natureza em baixas concentrações, no entanto a partir da década de 70 com a intensificação da industrialização e urbanização, as concentrações destes metais vêm se elevando a níveis maiores do que os naturais, ocasionando a contaminação dos mais diversos biomas tornando-se uma preocupação para os ambientalistas (DEMIRAK *et al.*, 2006).

Alguns metais pesados são definidos como elementos metálicos devido a sua densidade que excede $5,0\text{g/cm}^3$ (BRASILEIRO *et al.*, 2006; FÖRSTNER; WITTMAN, 1983) são consideradas substâncias altamente tóxicas, porém a toxicidade depende de sua concentração armazenada no organismo vivo ou ambiente, o que os torna altamente perigosos (FÖRSTNER; WITTMAN, 1983; PEIJNENBURG, 2004) e também depende de sua biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade pode ser definido como a fração de metal que está ou pode estar disponível para ser absorvida e causar prejuízos ao organismo (PEIJNENBURG, 2004). Mesmo em países subdesenvolvidos, alguns metais podem ser uma ameaça potencial às espécies de um ecossistema em baixas concentrações (LACERDA; MIGUENS, 2011).

3.3.1 Mercúrio

Dentre os metais pesados o mercúrio é um metal com características *sui generis*. Ele é o único metal que é líquido a temperatura ambiente tendo ponto de fusão de $-38,87\text{ }^\circ\text{C}$, e ponto de ebulição de $356,58\text{ }^\circ\text{C}$. Este metal líquido prateado é muito denso, e ainda possui uma tensão superficial alta o bastante para fazer com que o seja capaz de formar pequenas esferas perfeitas nas rochas e minerais onde é encontrado (ANDREN; NRIAGU, 1979). O mercúrio ocorre naturalmente na crosta terrestre (LEE *et al.*, 2009), em formas orgânicas e inorgânicas porém não apresenta funções biológicas, e é considerado um agente potencialmente tóxico por oferecer grande risco de contaminação ambiental ao ser humano (AZEVEDO, 2003).

A ação tóxica do mercúrio na exposição ocupacional já é conhecida há muitos anos. Em alguns ambientes, os riscos são maiores, como é o caso de hospitais, que utilizam mercúrio elementar em vários equipamentos (JUNG, 2004). Devido ao uso crescente desse metal o Ministério da Saúde e da Agricultura regulamentou o uso do mercúrio na indústria brasileira (BRASIL, 2010).

Segundo Jesus *et al.* (2010) o mercúrio possui efeito acumulativo, tornando-se, assim, motivo de perturbação crônica e progressiva das funções metabólicas e celulares dos indivíduos que a ele estão expostos. A contaminação com metais pesados afeta o crescimento, como também a distribuição e o ciclo biológico das espécies vegetais (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1992). Um efeito comum aos metais pesados é o oxidativo devido aos efeitos pró-oxidantes do mercúrio e a sua capacidade para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alteração das defesas antioxidantes (BOUJBIHA *et al.*, 2009).

Uma das principais formas que o mercúrio se encontra na natureza é associado ao cloro formando o Cloreto de mercúrio (HgCl_2), sendo alvo de inúmeras investigações, não só por causa de sua toxicidade intrínseca, mas também porque representa a toxicidade do mercúrio elementar desde o último oxidado a Hg^{+2} (PATRICK *et al.*, 2002). As suas principais características são alta solubilidade em solventes orgânicos e possui grande lipossolubilidade quando comparado com a forma inorgânica divalente (Hg^{+2}) o que facilita a sua permeabilidade pelas membranas biológicas (COLOMBI, 2009). A sua inalação é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior. É tóxico se absorvido através da pele, causa queimaduras na pele e nos olhos, pode ser fatal se ingerido, atinge principalmente rim nervos e via gastrointestinal (PATRICK *et al.*, 2002).

3.4.1 Efeito quelante

Um dos mecanismos que podem atuar na neutralização dos metais pesados é a quelação por produtos naturais, o termo quelar deriva do grego *khele*, que significa garra. Essas substâncias captam os íons metálicos do complexo molecular aos quais se encontram unidas, fixando-os por uma união coordenada chamada quelação. Assim as substâncias que têm a propriedade de fixar os íons metálicos em um determinado complexo molecular são denominadas quelantes. (COSTA *et al.*, 2009).

Agentes quelantes naturais são aqueles excretados por vegetais como ácido acético e o ácido cítrico entre os principais artificiais destacam-se DTPA e FRAP (MEERS *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2006).

3.4.3 Atividade Antioxidante

Agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células são classificados como compostos antioxidantes, além de possuir a capacidade em baixas concentrações de regenerar ou prevenir de maneira eficaz a oxidação por espécies reativas de oxigênio (AL-MAMARY *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2002; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2006).

A atuação dos antioxidantes é diversa podendo agir sobre diferentes níveis na proteção dos organismos. Como captadores de radicais e supressores de estados excitados, como sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam as espécies reativas de oxigênio ou realizam ligações com íons metálicos à proteínas, tornando-os indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (HALLIWELI; GUTTERIDGE, 1999).

O principal artifício para inibição do estresse oxidativo é impedir sua formação dos radicais livres, inibindo principalmente reações em cadeia com o ferro e o cobre. Outro mecanismo importante de defesa é o fato dos antioxidantes serem capazes de interceptar os radicais gerados pelo metabolismo das células ou por fontes exógenas, evitando o prejuízo aos lipídeos, aos aminoácidos, às duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados e às bases de DNA, impedindo a lesão e perda de integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O processo metabólico oxidativo leva à produção de energia indispensável para o metabolismo celular. No entanto, a oxidação nas células vivas também leva à produção de radicais livres (ADEGOKE *et al.*, 1998; MCCORD, 1994).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem causar inúmeros distúrbios como a peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, enzimas, carboidratos e ácidos nucleicos. Estas espécies estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, *Diabetes mellitus*, aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese (GYAMFI *et al.*, 1999; AL-MAMARY *et al.*, 2002; GÜLCIN *et al.*, 2003; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005).

A presença de metais em concentrações elevadas podem causar estresse oxidativo (KHAYATZADEH, 2010). Segundo Benassi (2004), os metais pesados possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e, quando essas espécies são formadas intracelularmente, elas podem induzir peroxidação lipídica, depleção de

grupamentos tióis, alterar vias de transdução de sinais, a homeostase do cálcio e dano ao DNA.

Na busca de prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e restringir a utilização dos antioxidantes sintéticos, a identificação e purificação de novas substâncias com atividade antioxidante tem se intensificado na última década, principalmente os compostos derivados de fontes naturais, que possuam ação isolados ou que venham a potencializar os outros antioxidantes (SHAHIDI *et al.*, 2007).

Produtos naturais são uma fonte promissora de agentes antioxidantes, uma vez que a toxicidade do oxigênio atmosférico tem se mostrado com o principal desafio à sobrevivência de organismos vivos (GOUVÊA, 2004). Os compostos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, taninos, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis. Antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários que agem como terminais para os radicais livres (XING; WHITE, 1996).

Os flavonoides são conhecidos por neutralizarem as espécies reativas de oxigênio (ROS), como os peróxidos lipídicos, os ânions peróxido, os hidroperóxidos e os radicais hidroxila, possuindo assim atividade citoprotetora sobre os sistemas vivos (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2002). Vale ressaltar que, os antioxidantes da dieta, tais como a vitamina E, C, A, os flavonóides e carotenóides exercem papel essencial nessa interceptação de radicais livres. (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Folhas de *L. venustum* foram coletadas por Maria Flaviana Bezerra Morais Braga em maio de 2010 entre 9:30 e 10:30 horas da manhã na encosta da Chapada do Araripe em uma localidade chamada Grangeiro, no município do Crato, sul do Ceará, Brasil, a cerca de 700 m de altitude entre as coordenadas geográficas 24M 0451385 UTM 9195214; 24M 0451927 UTM 9195554; . 24M 0452231 UTM 9194998 e 0452240 UTM 24M 9194784. Uma exsicata do material coletado foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA e identificada sob registro: (5569) Figura 2.

Figura 2: Exsicata de *Lygodium venustum* depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL)



Fonte: Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL)

4.1.1 Obtenções de extrato etanólico e frações de *L. venustum*

Para preparação do extrato etanólico, foram coletadas folhas de *L. venustum* que foram pesadas, aumentada sua superfície de contato e em seguida acondicionada em recipiente com o solvente em volume suficiente para submergir todo material vegetal, permanecendo assim por 72h. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo (BRASILEIRO *et al.*, 2006). E para obtenção das frações, 6 g do extrato foi misturado à sílicagel 60 (VETEC), sendo depois colocados em um funil de *Busting* com papel de filtro acoplado a um kitassato e bomba à vácuo para filtração. Solventes em escala crescente de polaridade foram vertidos sobre a mistura um a um nesta ordem: diclorometano, acetato de etila e metanol para enfim se obter as frações desejadas. Cada fração foi concentrada em evaporador rotativo e levadas a banho-maria para retirada de todo o solvente. Foram obtidos os seguintes rendimentos: fração diclorometano de *L. venustum* (FDLV): 0,39g e fração acetato de etila de *L. venustum* (FAELV): 0,52 g.

4.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram a *Escherichia coli* ATCC 25922 e a *Candida krusei* 02, cedida pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

4.3 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante, Caldo Sabouraud Dextrose e o Meio mínimo M9 TRIS (SAMBROOK *et al.*, 1989, modificado) Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

4.4 Inoculação dos microrganismos

Bactérias e fungos foram inoculados *Agar Heart Infusion* – HIA (Difco Laboratories Ltda) e incubados a 35 °C, aproximadamente, durante 24 horas.

4.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. O inóculo foi depositado em solução salina para formar uma suspensão de 10^5 UFC/mL, as concentrações das amostras variaram de 512-8 $\mu\text{g/mL}$. Uma solução contendo 900 μL BHI a 10% e 100 μL do inóculo foi colocada em cada um dos *eppendorfs*. Em seguida foi distribuído 100 μL desta solução em cada cavidade da placa de microdiluição e logo após adicionou-se 100 μL do produto natural na primeira cavidade, sendo passado para as demais, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade. A última cavidade foi reservada para controle. A placa foi colocada na estufa a 35°C , por um período de 24 horas (NCCLS, 2003).

Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 μL da solução indicadora foram adicionadas em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indicou o crescimento bacteriano (MANN; MARKHAN, 1998; PALOMINO *et al.*, 2001), auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada (NCCLS, 2003).

4.6 Avaliação do potencial citoprotetor em modelo microbiano contra cloreto de mercúrio

Para a avaliação do efeito protetor do extrato e das frações de *L. venustum* ao metal pesado, foram preparados *eppendorfs* contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões de 10^5 UFC / ml de *Escherichia coli* ATTC 25922 em meio M9 Tris com 2% de glicose e *eppendorfs* com 10^5 UFC / ml de *Candida krusei* 02 em meio Sabouraud a 10%. Cada solução foi distribuída nas cavidades da placa de 96 poços. Logo em seguida 100 μL de cloreto de mercúrio foi adicionado uma de concentração do cloreto de mercúrio na primeira cavidade seguindo com sucessivas microdiluições até a penúltima cavidade. A concentração do metal variou de 500 a 0,49 μM . As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 37°C , em estufa.

Em seguida, a concentração bactericida mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram determinadas como as menores concentrações capazes de inibir o

crescimento dos microrganismos. Foi utilizado placas de petri com HIA para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição.

Uma alçada de cada poço da placa de microdiluição foi subcultivada em placas de *Agar Heart Infusion* – HIA. Após 24 horas de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, realizou-se leitura, com a finalidade de observação do crescimento das colônias. As leituras das CBMs e CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CBM e CFM, as menores concentrações das amostras capazes de inibir crescimento visível do subcultivo (SHADOMY; ESPINELINGROFF; CARTWRIGHT, 1985).

4.7 Ensaio FRAP

Uma modificação no método de Benzie e Strain (1999) para o teste de FRAP foi realizada para as análises das amostras. As soluções estoque incluem um tampão acetato 300mM de pH 3,6 (3,1g de acetato de sódio tri-hidratado e adicionar 16ml de ácido acético glacial e fazer um volume de 1L com água destilada), TPTZ (2,4,6 –tripirydyls- Traizina) 10mM em 40mM HCl e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM.

A solução de trabalho foi preparada misturando 25 ml de tampão de acetato, 2,5 ml TPTZ e 2,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na proporção de 10:01:01 no momento da utilização.. A temperatura da solução foi elevada para 37°C antes de usar. As amostras (0,15 ml) foram misturadas para reagir com 2,85 ml de solução de FRAP durante 30 minutos no escuro em condições ambiente. As amostras foram mensuradas em absorbância (593nm). A curva padrão foi linear entre 125 e 1000 mM de FeSO_4 . Os resultados foram expressos em mg equivalentes de FeSO_4 /g de amostras.

4.8 Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais, realizada em triplicata, foi determinada adicionando-se 200 μL de cada amostra (800 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de água) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 μL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas

equivalentes de ácido gálico/ grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300 a 5 µg/mL).

4.9 Flavonóides

Foram preparadas soluções do extrato e frações (800 a e 100 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl₃) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (200 a 0,78 µg/mL) diluída em etanol 80%.

4.10 Atividade quelante de ferro

A metodologia utilizada foi de Benzie e Strain (1999) e Smith (1992) adaptada para o ensaio. O princípio baseia-se na formação do complexo O-fenantrolina-Fe²⁺ e a sua ruptura, na presença de agentes quelantes. A mistura de reação contendo 1 ml de 0,05% de O-fenantrolina em 2 ml de metanol com cloreto férrico (200 µM) e 2 ml de várias concentrações das amostras (125 a 1000 µg/ml) foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e a absorbância do mesmo foi medida a 510 nm. O conteúdo de atividade de quelação foi extrapolada a partir de uma curva padrão, utilizando FeSO₄ (doses graduais 500 - 3000µg/ml) como um padrão. A atividade quelante foi expressa em equivalentes g de FeSO₄ por g de extrato. Os valores são apresentados como as médias de análises das triplicatas.

4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software v4.0 Prisma™ (GraphPad® Software, San-Diego, Califórnia, EUA). Todos os ensaios químicos foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos em média ± desvio padrão (SD). Análise One-way de

variância (ANOVA) para comparação de médias, e inter diferenças significativas de mel foram calculados de acordo com o teste de múltipla gama HSD de Tukey. O valor médio para a terminação da concentração inibitória mínima, no teste de atividade antimicrobiana, foi calculada a partir das triplicatas. Modelos de regressão linear foram gerados para analisar os resultados das atividades antioxidantes e quelante, e para a dosagem de fenóis totais e flavonoides. Através do coeficiente de correlação de Pearson (r), foi avaliada a correlação entre resultados obtidos neste trabalho. Diferenças em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Artigo 1

Avaliação do Potencial Fitoprotetor de *Lygodium venustum* SW (LYGODIACEAE) Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio

Este artigo está submetido para publicação no *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. JCR 1,23, Qualis B1 em biodiversidade. Os testes deste artigo que tratam da atividade antioxidante, quelante de metal e citoprotetora da planta *Lygodium venustum* SW.

Avaliação do Potencial Fitoprotetor de *Lygodium venustum* SW (LYGODIACEAE) Contra o
Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio

Fernando Gomes Figueredo ^{1,2,3*}	fgfigueredo@gmail.com
Luciene Ferreira de Lima ¹	lucieneflima@ymail.com
Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga ¹	flavianamoraisb@yahoo.com.br
Saulo Relison Tintino ¹	saulorelison@gmail.com
Pablo Antonio Maia de Farias ³	pablomaia@gmail.com
Edinaldo Fagner Ferreira Matias ^{1,2}	effm_biologia@hotmail.com
Irwin Rose Alencar Menezes ²	irwinalencar@yahoo.com.br
Henrique Douglas Melo Coutinho ^{1*}	hdmcoutinho@gmail.com

¹Universidade Regional do Cariri-URCA-63.100-000, Crato, CE, Brazil

²Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

³Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte- ESTÁCIO-FMJ- 63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

* *Autor correspondente*

Fernando Gomes Figueredo

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: fgfigueredo@gmail.com

Resumo

O mercúrio é um metal muito perigoso quando em contato com o organismo do homem, quer seja pela via aérea, cutânea ou por ingestão. Os danos causados pelo metal são graves e em grande parte dos casos permanentes. Este trabalho teve como objetivo investigar as possíveis interações entre extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum* SW. combinados ao cloreto de mercúrio frente à linhagem *Escherichia coli* ATCC 25922. Os polifenóis e flavonóides presentes no extrato e frações foram quantificados em mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra e mg equivalentes de quercetina/g de amostra, respectivamente. O método de FRAP, *in vitro*, demonstrou a atividade antioxidante das amostras. Foi avaliada a atividade antibacteriana dos produtos naturais, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição e ensaios para verificar a possível ação citoprotetora através da combinação entre as amostras e o cloreto de mercúrio, utilizando o extrato e as frações em uma concentração sub-inibitória. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato etanólico e as frações de *L. venustum* são uma fonte alternativa de produtos naturais com ação citoprotetora, proteção esta que esta correlacionada com a atividade antioxidante e quelante, devido à presença de fenóis totais e flavonóides.

Palavras – chave: *Lygodium venustum*, cloreto de mercúrio, citoproteção, Antagonismo.

Abstract

Mercury is a very dangerous metal when humans come in contact with it, whether through the air or skin or by ingestion. The damage caused by the metal is serious and in most cases permanent. The aim of this work was to investigate the possible effects of the ethanolic extract and fractions of *Lygodium venustum* SW. on mercury chloride toxicity towards *Escherichia coli* strain ATCC 25922. The polyphenols and flavonoids present in the extract and fractions were quantified in mg equivalents gallic acid/g sample and mg equivalents quercetin/g sample, respectively. The *in vitro* FRAP method demonstrated the antioxidant activity of the samples. The antibacterial activity of the natural products was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method and by assays to elucidate the possible cytoprotective action when combining the plant samples and mercury chloride, utilizing the extract and fractions at a sub-inhibitory concentration. The results obtained in this work indicate that the ethanolic extract and fractions of *L. venustum* are an alternative source of natural products with cytoprotective action, where this protection is correlated with antioxidant and chelating activity, due to the presence of total phenols and flavonoids.

Key words: *Lygodium venustum*, mercury chloride, cytoprotection, antagonism.

Introdução

Os metais pesados são elementos químicos naturalmente encontrados na natureza em pequenas concentrações, mas com a chegada da industrialização e urbanização, as concentrações destes metais vêm se elevando a níveis maiores do que os naturais, ocasionando a contaminação dos ecossistemas aquáticos e terrestres e conseqüentemente se torna um dos maiores problemas ambientais da atualidade [1]. Em baixas concentrações, alguns metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde bactérias e plantas até o ser humano. Entretanto, como apresentam características biocumulativas no organismo, em altas concentrações podem tornar-se tóxicos por danificar os sistemas biológicos [2].

Um exemplo de metal pesado é o cloreto de mercúrio – (HgCl_2), bastante solúvel em solventes orgânicos e possui grande lipossolubilidade quando comparado com a forma inorgânica divalente (Hg^{+2}) o que facilita a sua permeabilidade pelas membranas biológicas. [3]. Pode ser perigoso se for inalado, é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior. É tóxico se absorvido através da pele, causa queimaduras na pele e nos olhos, pode ser fatal se ingerido, atinge principalmente rim, nervos e via gastrointestinal. No meio ambiente aquático, o cloreto de mercúrio é muito tóxico para os organismos, pode causar efeitos negativos a longo prazo, possui bioacumulação muito elevada [4].

Neste contexto existem espécimes de plantas que possuem estratégias para gerir as altas concentrações de metais e metaloides na rizosfera podem ser divididos em dois grupos : as plantas que utilizam mecanismos de exclusão , limitando a absorção e/ou de transporte para as partes aéreas, e para o desenvolvimento de mecanismos de imobilização internos , ou

compartimentalização desintoxicação via produção de compostos que promovem ligações estáveis com metais e metaloides [5].

Alguns estudos foram realizados utilizando plantas para a fitorremediação de metais pesados, conforme pode ser conferido em [6]. Pesquisas de Francesconi et al e Oliveira et al [7,8] com a *Pityrogramma calomelanos* e *Pteris vittat* , entre outras plantas do cerrado são capazes de acumular arsênio quando presentes em solo.

L. venustum (Lygodiaceae) é uma samambaia com distribuição mundial e o hábito lianescente [9]. Esta espécie é usada como um bioindicador da degradação ambiental e na medicina popular de populações da América do Sul [10].

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citoprotetor de *Lygodium venustum* SW (extrato etanólico e frações) quanto a seu potencial antitóxico ao cloreto de mercúrio frente à *E. coli* 25923.

Métodos

Material Vegetal

Folhas de *L. venustum* foram coletadas por Maria Flaviana Bezerra Morais Braga em maio de 2010 entre 9:30 e 10:30 horas da manhã na encosta da Chapada do Araripe em uma localidade chamada Grangeiro, no município do Crato, sul do Ceará, Brasil, a cerca de 700 m de altitude entre as coordenadas geográficas 24M 0451385 UTM 9195214; 24M 0451927 UTM 9195554; . 24M 0452231 UTM 9194998 e 0452240 UTM 24M 9194784. Uma exsicata do material coletado foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA e identificada sob registro: (5569).

Obtenções do extrato etanólico e frações de *L. venustum*

Para preparação do extrato etanólico, foram coletadas folhas de *L. venustum* que foram pesadas, aumentada sua superfície de contato e em seguida acondicionada em recipiente com o solvente em volume suficiente para submergir todo material vegetal, permanecendo assim por 72h. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo [11]. E para obtenção das frações, 6 g do extrato foi misturado à sílicagel 60 (VETEC), sendo depois colocados em um funil de Busting com papel de filtro acoplado a um kitassato e bomba à vácuo para filtração. Solventes em escala crescente de polaridade foram vertidos sobre a mistura um a um nesta ordem: diclorometano, acetato de etila e metanol para enfim se obter as frações desejadas. Cada fração foi concentrada em evaporador rotativo e levadas a banho-maria para retirada de todo o solvente. Foram obtidos os seguintes rendimentos: fração diclorometano de *L. venustum* (FDLV): 0,39 g e fração acetato de etila de *L. venustum* (FAELV): 0,52 g.

Ensaio FRAP

Uma modificação no método de Strain [13] para o teste de FRAP foi realizada para as análises das amostras. As soluções estoque incluem um tampão acetato 300mM de pH 3,6 (3,1g de acetato de sódio tri-hidratado e adicionar 16ml de ácido acético glacial e fazer um volume de 1L com água destilada), TPTZ (2,4,6 –tripirydyls- Traizina) 10mM em 40mM HCl e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM.

A solução de trabalho foi preparada misturando 25 ml de tampão de acetato, 2,5 ml TPTZ e 2,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na proporção de 10:01:01 no momento da utilização.. A temperatura da solução foi elevada para 37° C antes de usar. As amostras (0,15 ml) foram

misturadas para reagir com 2,85 ml de solução de FRAP durante 30 minutos no escuro em condições ambiente. As amostras foram mensuradas em absorvância (593nm). A curva padrão foi linear entre 125 e 1000 mM de FeSO₄. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de FeSO₄/g de amostras[14].

Atividade quelante de ferro

A metodologia utilizada foi de Benzie et al., e Strain et al [12,13] adaptada para o ensaio. O princípio baseia-se na formação do complexo e a sua O-fenantrolina-Fe²⁺ e a sua ruptura, na presença de agentes quelantes. A mistura de reação contendo 1 ml de 0,05% de O-fenantrolina em 2 ml de metanol com cloreto férrico (200 µM) e 2 ml de várias concentrações das amostras (125 a 1000 µg/ml) foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e a absorvância do mesmo foi medida a 510 nm. O conteúdo de atividade de quelação foi extrapolada a partir de uma curva padrão, utilizando FeSO₄ (doses graduais 500 - 3000µg/ml) como um padrão. A atividade quelante foi expressa em equivalentes g de FeSO₄ por g de extrato. Os valores são apresentados como as médias de análises das triplicatas.

Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais, realizada em triplicata, foi determinada adicionando-se 200 µL de cada amostra (800 a 100 µg/mL de água) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 µL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. A

média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico/ grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300 a 5 µg/mL).

Flavonóides

Foram preparadas soluções do extrato e frações (800 a e 100 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl₃) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (200 a 0.78 µg/mL) diluída em etanol 80%.

Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante, e Meio mínimo M9 TRIS (SAMBROOK *et al.*, 1989, modificado) Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

Material bacteriano

A bactéria utilizada foi *Escherichia coli* ATCC 25922, cedida pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, que foi inoculada Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) e incubada a 35 °C por 24 horas.

Atividade antibacteriana (CIM) e avaliação do potencial citoprotetor em modelo bacteriano contra cloreto de mercúrio

A concentração inibitória mínima (CIM) das amostras foi determinada pelo ensaio de microdiluição de acordo com [15], com modificações, usando suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25923 a 10^5 UFC / ml em solução salina a 0,85% e os produtos naturais a uma concentração 512 a 8µg / ml. As CIMs foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir o crescimento bacteriano. O efeito protetor do extrato e frações contra o cloreto foi avaliada utilizando concentrações subinibitórias dos mesmos, suspensões bacterianas de 10^5 UFC / mL em meio M9 Tris com 2% de glucose e diluições de cloreto de mercúrio (500 a 0,49µM). As placas de microdiluição foram incubadas durante 24 h a 37°C [16]. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada como a mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, utilizando placas de petri com *Ágar Heart Infusion* (HIA) para a transferência de soluções incubadas em placas de microdiluição. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software v4.0 Prisma TM (GraphPad [®] Software, San-Diego, Califórnia, EUA). Todos os ensaios químicos foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos em média ± desvio padrão (SD). Análise *One-way* de variância (ANOVA) para comparação de médias, e inter diferenças significativas de mel foram calculados de acordo com o teste de múltipla gama HSD de Tukey. O valor médio para a terminação da concentração inibitória mínima, no teste de atividade antimicrobiana, foi calculada a partir das triplicatas. Modelos de regressão linear foram gerados para analisar

os resultados das atividades antioxidantes e quelante, e para a dosagem de fenóis totais e flavonoides. Através do coeficiente de correlação de Pearson (r), foi avaliada a correlação entre resultados obtidos neste trabalho. Diferenças em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e discussão

O conteúdo fenólico total e de flavonóides do extrato etanólico de *L. venustum* e de suas frações estão representadas na Tabela 1. Sendo a concentração mais representativa a da fração FAELV para ambos os compostos que são metabolitos secundários de origem vegetais reconhecidos pelo seu potencial antioxidante [14].

Tabela 1: O teor de fenóis totais e flavonoides do extrato e frações de *Lygodium venustum*.

Nº	Amostra	Conteúdo de fenóis totais (mg equivalentes de ácido gálico/ g de amostra) (\pm SEM)	Conteúdo de flavonóides (mg equivalentes de quercetina/ g de amostra) (\pm SEM)
1.	EELV	37,10 \pm 0,08	16,29 \pm 0,02
2.	FDLV	17,77 \pm 0,07	10,80 \pm 0,09
3.	FAELV	68,43 \pm 0,04	40,20 \pm 0,04

EELV-Extrato Etanólico de *Lygodium venustu*, FDLV- Fração Diclorometano de *Lygodium venustum*, Fração de Acetato de Etila de *Lygodium venustum* * Todos os valores são expressos como média \pm SEM de três determinações.

Através de prospecção fitoquímica realizada em estudo anterior por Morais-Braga et al [17], o extrato etanólico de *L. venustum* apresentou na sua composição a presença de diversos metabolitos secundários, tais como fenóis, Taninos Flobabênicos, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, flavonoides, alcaloides, que possuem as mais diversas atividades biológicas. A identificação e quantificação de compostos fenólicos do EELV e de suas respectivas frações foram realizadas por Morais-Braga [18] em ensaio utilizando o método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o qual registrou a presença de diversos compostos, dentre eles o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, rutina, quercetina e kaempferol, demonstrando portanto, que os produtos naturais em análise contêm flavonóides do grupo dos flavonóis e compostos fenólicos ácidos, derivados dos ácidos: benzoico, fenilacrílico e cinâmico. Os ácidos clorogênico e caféico, bem como o flavonóide quercetina tiveram sua presença registrada tanto no extrato quanto nas frações. A rutina, entretanto, não foi encontrada na fração diclorometano. O kaempferol também não constava no extrato etanólico desta espécie. Na análise destes dados, os autores concluíram que a quercetina, flavonóide encontrado em maior quantidade em *L. venustum*, apresentou maior afinidade com o solvente acetato de etila [19] e que a fração oriunda deste foi, entre todos os produtos naturais testados, a que mais se destacou em conteúdo fenólico. A ocorrência está de acordo com que foi preconizado por [20], ao afirmar que flavonóides são preferencialmente extraídos pelo solvente acetato de etila.

A capacidade de redução de um composto pode servir como um indicador significativo da sua potencial atividade antioxidante [14]. A Tabela 2 descreve os valores do FRAP para o extrato etanólico *Lygodium venustum* e suas respectivas frações demonstrando a capacidade redutora em mg de FeSO₄ por g de amostra.

Tabela 2: FRAP ensaio do extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum*.

Nº	Amostra	Atividade redutora (mg equivalentes de FeSO ₄ /g de amostras) (± SEM)
1.	EELV	37,1 ± 0,04
2.	FDLV	17,77 ± 0,02
3.	FAELV	68,43 ± 0,03

EELV-Extrato Etanólico de *Lygodium venustum*, FDLV- Fração Diclorometano de *Lygodium venustum*, Fração de Acetato de Etila de *Lygodium venustum* * Todos os valores são expressos como média ± SEM de três determinações

Resultados obtidos neste estudo para a atividade antioxidante, demonstram que a FAELV apresentou o melhor resultado, apresentando uma equivalência de 68.43mg equivalentes de FeSO₄ por grama de extrato, destacando-se na capacidade de reduzir Fe⁺³ a Fe⁺², fato este que pode ser justificado pela retenção de compostos fenólicos e flavonoides pela fração de acetato de etila que podem contribuir diretamente para a atividade antioxidante [21]. Resultados estes que vão de acordo com os obtidos por Morais-Braga *et al.*, (21), que indicou atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum* pelo método fotolorimétrico do 2,2-difenil,1- picrihidrazila (DPPH).

O ferro é essencial para a vida, uma vez que é necessário para o transporte de oxigênio, a respiração e a atividade de muitas enzimas. No entanto, é um metal extremamente reativo e catalisa alterações oxidativas em lipídios, proteínas e outros componentes celulares [13].

A tabela 3 demonstra a capacidade quelante do EELV e suas respectivas frações. Com base nos dados obtidos a partir do presente estudo é possível evidenciar que os produtos naturais demonstram uma significativa atividade quelante por reduzir o Fe⁺³ em Fe⁺². Segundo Duh, Tu e Yen [22] esta atividade pode ser devido à presença de polifenóis que evita

danos celulares causados por radicais livres através da redução dos íons de metais de transição [22].

Tabela 3: Atividade quelante de ferro do extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum*.

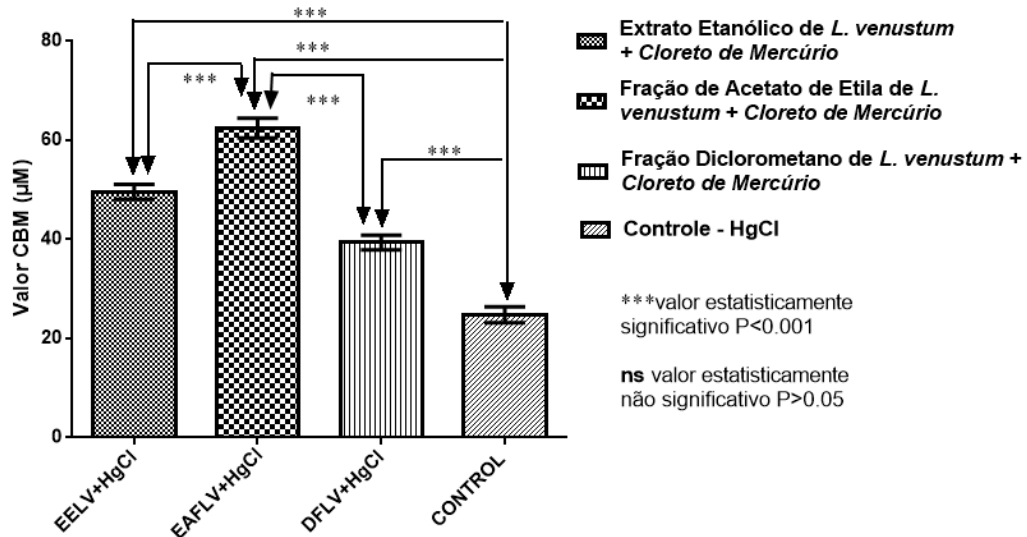
Nº	Amostras	Atividade quelante (mg equivalentes de FeSO ₄ /g de amostras) (± SEM)
1.	EELV	42,64 ± 4,08
2.	FDLV	23,65 ± 1,40
3.	FAELV	59,24 ± 1,45

EELV-Extrato Etanólico de *Lygodium venustu*, FDLV- Fração Diclorometano de *Lygodium venustum*, Fração de Acetato de Etila de *Lygodium venustum* * Todos os valores são expressos como média ± SEM de três determinações

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) das amostras, testadas frente à linhagem ATCC *E. coli* 25922 comparativamente apresentaram o mesmo resultado revelando CIM $\geq 1024\mu\text{g/mL}$, não demonstrando atividade clínica relevante de acordo com os limites estabelecidos pelo protocolo [23]. Um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antibacteriana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade para as cepas ensaiadas.

A figura 1 representa os resultados da avaliação da atividade moduladora da toxidade do cloreto de mercúrio quanto à combinação com o EELV e suas respectivas frações. Os resultados demonstraram que as combinações das amostras com o cloreto de mercúrio, apresentaram um efeito antagônico frente à linhagem de *E. coli* 25922 com significância $p < 0.001$.

Figura 1: Gráfico demonstrativo da atividade moduladora da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à *E. coli* 25922 na presença e na ausência do extrato etanólico de *Lygodium venustum* e suas frações.



CBM- Concentração Bactericida Mínima

A forma química e a via de exposição do mercúrio afeta a distribuição em tecidos e a sua toxicidade, os principais alvos a exposição ao cloreto de mercúrio são: os rins, o fígado, o sangue, o epitélio intestinal e os pulmões [24], enquanto que o fígado, o sistema nervoso, e o epitélio intestinal, os rins e músculos são alvos comuns do mercúrio orgânico [25]. Ao entrar nas células, o mercúrio pode interagir com várias biomoléculas, como a glutatona e proteínas grupos sulfidrílicos presentes em antioxidantes, no reparo do DNA e com as proteínas da homeostase, alterando a sua atividade fisiológica normal [24].

A combinação das amostras com o cloreto de mercúrio pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos indesejáveis deste metal, uma vez que a associação acarreta em um efeito antagônico aumentando significativamente a CBM do cloreto de mercúrio, assim aumentando a dose necessária para que haja toxicidade a célula.

A tabela 4 demonstra os dados da correlação entre os resultados obtidos neste trabalho, através do coeficiente de correlação de Pearson (r). Analisando os resultados foi possível inferir que a atividade CBM estar relacionada com a atividade antioxidante e quelante, devido à presença dos fenóis totais e flavonoides.

Tabela 4. Correlação entre os dados analisados neste trabalho

	CBM	A.A	AQ	Flavonóides	Fenóis
CBM		0,997	0,993	0,965	0,997
AA	0,997		0,999	0,944	0,990
AQ	0,993	0,999		0,928	0,982
Flavonóides	0,965	0,944	0,928		0,982
Fenóis	0,997	0,990	0,982	0,982	

CBM- Concentração Bactericida Mínima, AA- Atividade Antibacteriana, AQ- Atividade Quelante.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato etanólico e as frações de *Lygodium venustum* são uma fonte de produtos naturais com ação citoprotetora. Os resultados demonstraram que as combinações das amostras com o cloreto de mercúrio, apresentaram um efeito antagônico frente à linhagem de *E. coli* 25922, antagonismo este que esta correlacionado atividade antioxidante e quelante, devido a presença de fenóis totais e flavonoides.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse

Referências Bibliográficas

1. Andrade SF, Matos TB, Carvalho CEV: **Varição Sazonal de Metais Pesados em *Siris Callinectes ornatus* (Ordway, 1863) da Lagoa de Iquiparí.** Brasil. Rev. Virtual Quim 2011, 3(2):129-137.
2. Celere MS, Oliveira AS, Trevilato TMB, Segura-Munhõz SI: **Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil e sua relevância para saúde pública.** Caderno de Saúde Pública 2007, v. 23(4):939-947.
3. Ishikawa NM, Ranzani-Paiva MJT, Lombardi JV: **Acute Toxicity of Mercury (HgCl₂) to Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*.** B. Inst. Pesca 2007, 33(1): 99 – 104.
4. Merck KGAA: **Cloreto de Mercúrio.** Disponível em: http://www.merckmillipore.com/brazil/cloreto-de-mercurioi/MDA_CHEM-104425/p_9Yyb.s1LJtQAAAEWC.EfVhTl. Acessado em 09 abril 2013.
5. Dias LE, Melo RF, Mello JWVM, Oliveira JAO, Daniels WL: **Growth of seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan*(L.) millsp), wand riverhemp (*Sesbania virgata*(cav.) pers.), and lead tree (*Leucaena leucocephala* (lam.) de wit) in an arsenic-contaminated soil.** Rev. Bras. Ciênc. Solo 2010, 34(3): 975-983.
6. Gomes MP, Carvalho M, Carvalho GS, Marques TCLLSM, Garcia QS, Guilherme LRG, Soares A M: **Phosphorus Improves Arsenic Phytoremediation by *Anadenanthera Peregrina* by Alleviating Induced Oxidative Stress.** International Journal of Phytoremediation 2013, 15 (Issue 7): 633-646.
7. Francesconi K, Visoottiviset P, Sridokchan W, Goessler W: **Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential**

- phytoremediator of arsenic-contaminated soils.** Elsevier Science 2002, 284: 27-35.
8. Oliveira DLO, Rocha C, Moreira PC, Moreira SOL: **Plantas nativas do cerrado: uma alternativa para fitorremediação.** Estudos, Goiânia 2009, 36:1141-1159.
 9. Klaus M: **Leaf Phenology of the climbing fern *Lygodium venustum* in a semideciduous lowland forest on the Gulf of Mexico.** American Fern Journal 2006, 96:21–30.
 10. Duke JA: **Duke’s Handbook of Medicinal Plants of Latin America.** CRC Press Taylor & Francis group, New York. 2008.
 11. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, JAMAL C M, SILVEIRA D: **Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in overnador Valadares district.** Braz. J. Pharm. Sci 2006, 42:195–202.
 12. Benzie IEF, Strain JJ: **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.** Anal Biochem 1996, 239: 70-76.
 13. Smith C, Halliwell B, Aruoma OI: **Protection by albumin against the pro-oxidation actions of phenolic dietary components.** Food Chem Toxicol 1992, 30: 483-489.
 14. Kumar S, Pooja M, Harika K, Haswitha E, Nagabhushanamma G, Vidyavathi N. **In-vitro antioxidant activities, total phenolics and flavonoid contents of whole plant of *hemidesmus indicus* (linn.).** asian j pharm clin res 2013, 6 (suppl 2): 249-251.
 15. Nattinal Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically.** 6 ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standart M7-A6, 2003.
 16. Coutinho, H. D. M. et al., 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis*. And chlorpromazine. Chemotherapy. 54, 328–330.

17. Morais-Braga MFB, Souza TGM, Santos KKA, Andrade JC, Guedes MM, Tintino RT, SOBRAL-SOUZA CE, Costa JG, M; Menezes IA, Saraiva AAF, Coutinho HDM: **Antimicrobial and Modulatory Activity of Ethanol Extract of the Leaves from *Lygodium venustum* SW**. American Fern Journal 2012a,102(2):154–160.
18. Morais-Braga MFB, Souza TM, Menezes IA, Costas JGM, Rocha JBT, Saraiva RA, Nogara P, Bueno D, Athayde ML, Boligon AA, Saraiva AAF, Coutinho HDM.: **Pteridophytes: Ethnobotany and Pharmacologic Bioactivities. In: Gonçalves, R.E.; Pinto, M.C.. (Org.). Natural Products: Structure, Bioactivity and Applications**. Volume 1.1edição. Nova Science Pub Inc, 2012b: 1-34.
19. Morais-Braga MFB, Souza TM, Santos KKA, Guedes GMM, Andrade JC, Rolón CVM ,Costa J GM, Saraiva AAF, Coutinho HDM: **Phenol composition, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activities of *Lygodium venustum* SW. (Lygodiaceae)**. Experimental Parasitology 2013,134: 178–182.
20. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010: 1102.
21. Morais-Braga MFB: **Prospecção Prospecção Química do Extrato Etanólico das Folhas de *Lygodium venustum* sw (lygodiaceae) e Avaliação das Bioatividades Antioxidante, Antiepinastigota, Antipromastigota, Citotóxica e Antimicrobiana de Extrato e Frações (*in vitro*)**. dissertação (mestrado)- programa de pós – graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - 2012.
22. Duh PD, Tu YY, Yen GC: **Antioxidant activity of water extract of *Harnng Jyur* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)**. LMT- Food Sci. Tech, 1999; 32: 269-277.

23. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G: **Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant.** J. Ethnopharmacol 2007, 110:391-400.
24. Mela M, Neto FF, Grötzner SR, Rabitto IS, Ventura DF, Oliveira -Ribeiro CA: **Localization of inorganic and organic mercury in the liver and kidney of *Cyprinus carpio* by autometallography.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol 2012, 7(2): 73-78.
25. Mela M, Randi MA, Ventura DF, Carvalho CE, Pelletier E, Oliveira -Ribeiro CA: **Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*.** Ecotoxicol. Environ. Saf 2007, 68: 426-435.

5.2 Artigo 2

Avaliação do Potencial Citoprotetor Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio e Antioxidante de *Lygodium venustum* SW (LYGODIACEAE).

Este artigo está submetido para publicação no *Jundishapur Journal of Microbiology*. JCR : 0,383, Qualis B2 em biodiversidade. Os testes deste artigo que tratam da atividade antioxidante e citoprotetora da planta *Lygodium venustum* SW, são parte inerentes da dissertação sendo assim eles são os que compõem o projeto original.

Avaliação do Potencial Citoprotetor Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio e Antioxidante de *Lygodium venustum* SW (LYGODIACEAE).

Fernando G. Figueredo^{1,2,3*}, Luciene F. Lima¹, Maria F. B. Morais-Braga¹, Saulo R. Tintino¹, Edinaldo F. F. Matias^{1,2}, Pablo A. M. Farias³, Francisco A. B. Cunha¹, Irwin R. A. Menezes¹, Henrique D. M. Coutinho¹

¹Universidade Regional do Cariri-URCA-63.100-000, Crato, CE, Brazil

²Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

³Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte- ESTÁCIO-FMJ-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

* A correspondência deve ser dirigida ao:

Fernando Gomes Figueredo

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: fgfigueredo@gmail.com

RESUMO

Introdução: O mercúrio é um metal com elevado potencial tóxico por sua capacidade de bioacumulação nos organismos e biomagnificação na cadeia trófica. No organismo, o mercúrio é altamente reativo, podendo induzir modificações estruturais e funcionais no organismo.

Objetivos: Este trabalho teve como objetivo investigar as possíveis interações entre extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum* SW. combinados ao cloreto de mercúrio frente à linhagem *Candida krusei* 02.

Materiais e Métodos: Os polifenóis e flavonóides presentes no extrato e frações foram quantificados em mg equivalentes de ácido gálico/ g de amostra e mg equivalentes de quercetina/ g de amostra, respectivamente. O método de FRAP, *in vitro*, demonstrou a atividade antioxidante das amostras. Foi avaliada a atividade antifúngica dos produtos naturais, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição e ensaios para verificar a possível ação citoprotetora através da combinação entre as amostras e o cloreto de mercúrio, utilizando o extrato e as frações em uma concentração sub-inibitória.

Resultados e Conclusão: Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato etanólico e as frações de *L. venustum* são uma fonte alternativa de produtos naturais com ação antioxidante, no entanto, não foi capaz de reverter a citotoxicidade desencadeada pelo cloreto de mercúrio.

Palavras – chave: *Lygodium venustum*, cloreto de mercúrio, Atividade antioxidante.

Abstract

Background: Mercury it is a metal with high potential toxic per its bioaccumulation potential in the organism and biomagnifications in the trophic chain. In the organism, the mercury it is highly reactive, can induce structural modifications and functional in the organism.

Objectives: This work has aimed investigate possible between ethanolic extract and fractions of *Lygodium venustum* SW. combined with mercuric chloride in the lineage *Candida krusei* 02.

Materials and Methods: The polyphenols and flavonoids present in the extract and fractions were quantified in mg Gallic acid equivalent/ Sample g and quercetin equivalents / Sample g respectively. Method of FRAP *in vitro*, demonstrated the antioxidant activity in the samples. Also was evaluated antifungal activity of natural products, minimal inhibitory concentration (MIC) was determined using microdilution and check to essay a possible cytoprotective action through the combination between samples and mercuric chloride, using extract and fractions in a subinhibitory concentration.

Results and Conclusions:The results obtained in this work indicated that ethanolic extract and fractions of *L. venustum* are an alternative source of natural products with antioxidant action, however, was not able reverse cytotoxicity triggered per mercury chloride.

Keywords: *Lygodium venustum*; Mercury chloride; Antioxidant activity; Cytoprotection.

1. Introdução

O cloreto de mercúrio – (HgCl_2), bastante solúvel em solventes orgânicos e possui grande lipossolubilidade quando comparado com a forma inorgânica divalente (Hg^{+2}) o que facilita a sua permeabilidade pelas membranas biológicas (1). Depois de sua oxidação no

organismo e por causa de sua grande afinidade pelos grupos sulfidrilas das proteínas e em menor grau, por grupos fosforilas, carboxílicos, amins e amidas. Nas células, o mercúrio é um potente desnaturador de proteínas e inibidor de aminoácidos, interferindo nas funções metabólicas celulares. Ele causa também sérios danos à membrana celular ao interferir em suas funções e no transporte através da membrana, especialmente nos neurotransmissores cerebrais (2).

Por outro lado, estudos citogenéticos já realizados em pessoas contaminadas por Hg, em níveis considerados toleráveis pela Organização Mundial de Saúde (OMS), revelaram aumento significativo de quebras cromatídicas, com a possível interferência nos mecanismos de reparo do DNA. Este efeito pode resultar em quebras cromossômicas e em morte celular, o que justificaria o quadro progressivo de deterioração mental nos indivíduos mais altamente contaminados. Os efeitos sobre a saúde humana, relacionados com a bioacumulação, a transformação e o transporte mundial do mercúrio inorgânico, se devem quase exclusivamente à conversão dos compostos de mercúrio em metilmercúrio (2).

Neste contexto existem espécimes de plantas que possuem estratégias para gerir as altas concentrações de metais e metaloides na rizosfera podem ser divididos em dois grupos : as plantas que utilizam mecanismos de exclusão , limitando a absorção e / ou de transporte para as partes aéreas, e além de desenvolver mecanismos de imobilização internos , ou compartimentalização desintoxicação via produção de compostos que promovem ligações estáveis com metais e metaloides (3)

Pteridófitas constituem um grupo de vegetais com uma grande riqueza de espécies e este fato tem contribuído para que o homem se utilize, de variadas maneiras, de seus potenciais quer sejam econômicos, alimentícios ou medicinais. (4). No grupo das plantas vasculares, a samambaia lianescente *Lygodium venustum*, têm sido tradicionalmente utilizada como um fitoterápico. Algumas atividades farmacológicas foram realizadas, atividade

antibacteriana (5,6) e ainda antifúngica, moduladora da ação de drogas (6-8). Seu efeito no tratamento de distúrbios gastrointestinais (9), já foram investigado,. atividades antidiarréica (10), antiperistáltica, (9), tricomonocida (11), antioxidante, leishmanicida, tripanocida (8). Suas partes aéreas são utilizadas sob a forma de chá ou tópica, no tratamento de infecções e dermatoses (11).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citoprotetor, as dosagem de fenóis totais e flavonoides além de avaliar a atividade antioxidante de *Lygodium venustum* SW (extrato etanólico e frações) quanto a seu potencial antitóxico ao cloreto de mercúrio frente à *Candida krusei* 02.

3. Matérias e Métodos

3.1 Material Vegetal

Folhas de *L. venustum* foram coletadas por Maria Flaviana Bezerra Morais Braga em maio de 2010 entre 9:30 e 10:30 horas da manhã na encosta da Chapada do Araripe em uma localidade chamada Grangeiro, no município do Crato, sul do Ceará, Brasil, a cerca de 700 m de altitude entre as coordenadas geográficas 24M 0451385 UTM 9195214; 24M 0451927 UTM 9195554; . 24M 0452231 UTM 9194998 e 0452240 UTM 24M 9194784. . Uma exsicata do material coletado foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA e identificada sob registro: (5569).

3.1 Obtenção do extrato etanólico (EELV) e frações de diclorometano, acetato de etila (DFLV e EAFLV) de *L. venustum*.

Para preparação do extrato etanólico, foram coletadas folhas de *L. venustum* que foram pesadas, aumentada sua superfície de contato e em seguida acondicionada em recipiente com o solvente em volume suficiente para submergir todo material vegetal, permanecendo assim por 72h. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo (12). E para obtenção das frações, 6 g do extrato foi misturado à sílicagel 60 (VETEC), sendo depois colocados em um funil de Busting com papel de filtro acoplado a um kitassato e bomba à vácuo para filtração. Solventes em escala crescente de polaridade foram vertidos sobre a mistura um a um nesta ordem: diclorometano, acetato de etila e metanol para enfim se obter as frações desejadas. Cada fração foi concentrada em evaporador rotativo e levadas a banho-maria para retirada de todo o solvente. Foram obtidos os seguintes rendimentos: fração diclorometano de *L. venustum* (FDLV): 0,39 g; fração acetato de etila de *L. venustum* (FAELV).

3.3 Ensaio FRAP

Uma modificação no método de Strain (13) para o teste de FRAP foi realizada para as análises das amostras. As soluções estoque incluem um tampão acetato 300mM de pH 3,6 (3,1g de acetato de sódio tri-hidratado e adicionar 16ml de ácido acético glacial e fazer um volume de 1L com água destilada), TPTZ (2,4,6 –tripirydyls- Traizina) 10mM em 40mM HCl e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM.

A solução de trabalho foi preparada misturando 25 ml de tampão de acetato, 2,5 ml TPTZ e 2,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na proporção de 10:01:01 no momento da utilização.. A temperatura da solução foi elevada para 37° C antes de usar. As amostras (0,15 ml) foram misturadas para reagir com 2,85 ml de solução de FRAP durante 30 minutos no escuro em condições ambiente. As amostras foram mensuradas em absorbância (593nm). A curva

padrão foi linear entre 125 e 1000 mM de FeSO_4 . Os resultados foram expressos em mg equivalentes de FeSO_4 /g de amostras (14).

3.4 Estimação de Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais, realizada em triplicata, foi determinada adicionando-se 200 μL de cada amostra (800 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de água) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 μL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico/ grama de amostra, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.5 Estimação de Flavonoides

Foram preparadas soluções do extrato e frações (800 a e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl_3) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (200 a 0.78 µg/mL) diluída em etanol 80%.

3.6 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: *Agar Heart Infusion* – HIA (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante, e meio *Agar Sabouraud*. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

3.7 Material fúngico

O fungo utilizado foi *Candida krusei* 02 (CK LMBM 02), cedido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. O fungo foi inoculado em *Agar Heart Infusion* – HIA (Difco Laboratories Ltda) e incubado a 35 °C por 24 horas.

3.9 Atividade antibacteriana (CIM) e avaliação do potencial citoprotetor em modelo fúngico contra cloreto de mercúrio

A concentração inibitória mínima (CIM) das amostras foi determinada pelo ensaio de microdiluição de acordo com (15.16), com modificações, usando suspensões de *Candida krusei* 02 a 10^5 UFC / ml em solução salina a 0,85% e os produtos naturais a uma concentração 512 a 8µg / ml. As CIMs foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir o crescimento bacteriano. O efeito protetor do extrato e frações contra o cloreto foi avaliada utilizando concentrações subinibitórias dos mesmos, suspensões bacterianas de 10^5 UFC / mL em meio Caldo Sabouraud Dextrose a 10% e diluições de cloreto de mercúrio (500 a 0,49µM). As placas de microdiluição foram incubadas durante 24 h a 37°C (16). A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada como a mais baixa

concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, utilizando placas de petri com Ágar Heart Infusion (HIA) para a transferência de soluções incubadas em placas de microdiluição (17).. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* v4.0 Prisma TM (GraphPad [®] Software, San-Diego, Califórnia, EUA). Todos os ensaios químicos foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (SD). Análise *One-way* de variância (ANOVA) para comparação de médias, e inter diferenças significativas de mel foram calculados de acordo com o teste de múltipla gama HSD de *Tukey*. O valor médio para a terminação da concentração inibitória mínima, no teste de atividade antimicrobiana, foi calculada a partir das triplicatas. Modelos de regressão linear foram gerados para analisar os resultados das atividades antioxidantes e quelante, e para a dosagem de fenóis totais e flavonoides. Através do coeficiente de correlação de Pearson (r), foi avaliada a correlação entre resultados obtidos neste trabalho. Diferenças em $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados e discussão

O conteúdo fenólico total e de flavonoides do extrato etanólico de *L. venustum* e de suas frações estão representadas na Tabela 1. Sendo a concentração mais representativa a da fração FAELV para ambos os compostos que são metabolitos secundários de origem vegetais reconhecidos pelo seu potencial antioxidante (14).

Tabela 1: O teor de fenóis totais e flavonoides do extrato e frações de *Lygodium venustum*.

N°	Amostras	Conteúdo de fenóis totais	Conteúdo de flavonoides
		(mg equivalentes de ácido gálico/ g de amostra) (\pm SEM)	(mg equivalentes de quercetina/ g de amostra) (\pm SEM)
1.	EELV	37,10 \pm 0.08	16,29 \pm 0.02
2.	FDLV	17,77 \pm 0.07	10,80 \pm 0.09
3.	FAELV	68,43 \pm 0.04	40,20 \pm 0.04

EELV-Extrato Etanólico de *Lygodium venustum*, FDLV- Fração Diclorometano de *Lygodium venustum*, FAELV- Fração de Acetato de Etila de *Lygodium venustum*. * Todos os valores são expressos como média \pm SEM de três determinações.

Em análise fitoquímica realizada em estudos anteriores foi constatado que *L. venustum* apresenta em sua composição constituintes químicos da classe dos flavonoides, taninos e alcaloides, entre outros (6). A realização de um *screening* por compostos fenólicos e flavonoides (4) revelou a presença de ácidos fenólicos como os ácidos gálico (0,17%), clorogênico (0,51%) e cafeico (0,29%) e dos flavonóides rutina (0,32%) e quercetina (0,60%) e dessa forma, evidenciou-se que os constituintes majoritários da samambaia são, portanto, a quercetina e o ácido clorogênico.

A capacidade de redução de um composto pode servir como um indicador significativo da sua potencial atividade antioxidante (14). A Tabela 2 descreve os valores do FRAP para o extrato etanólico *Lygodium venustum* e suas respectivas frações demonstrando a capacidade redutora em mg por g de FeSO₄. Resultados obtidos neste estudo para a atividade antioxidante, demonstram que a FAELV apresentou o melhor resultado, apresentando uma equivalência de 68,43mg de FeSO₄ por grama de amostra, destacando-se na capacidade de reduzir Fe⁺³ a Fe⁺², fato este que pode ser justificado pela retenção de compostos fenólicos e

flavonoides pela fração de acetato de etila que podem contribuir diretamente para a atividade antioxidante (4). Resultados estes que vão de acordo com os obtidos por Morais-Braga *et al.*, (4), que indicou atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum* pelo método fotolorimétrico do 2,2-difenil,1- picrihidrazila (DPPH).

Tabela 2: FRAP ensaio do extrato etanólico e frações de *Lygodium venustum*.

Nº	Amostras	Atividade redutora (mg equivalentes de FeSO ₄ /g de amostras) (± SEM)
1.	EELV	1.13 ± 0.04
2.	FDLV	0.66 ± 0.02
3.	FAELV	1.59 ± 0.03

EELV-Extrato Etanólico de *Lygodium venustum*, FDLV- Fração Diclorometano de *Lygodium venustum*, FAELV- Fração de Acetato de Etila de *Lygodium venustum*. * Todos os valores são expressos como média ± SEM de três determinações.

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) das amostras, testadas frente à linhagem *Candida krusei* 02 comparativamente apresentaram o mesmo resultado revelando CIM $\geq 1024\mu\text{g/mL}$, não demonstrando atividade clínica relevante de acordo com os limites estabelecidos pelo protocolo (19). Um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antibacteriana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade para as cepas ensaiadas. Resultados estes que corroboram com os de Morais-Braga *et al.*, (7) que avaliou ainda a atividade moduladora frente a fungos do gênero *Candida*

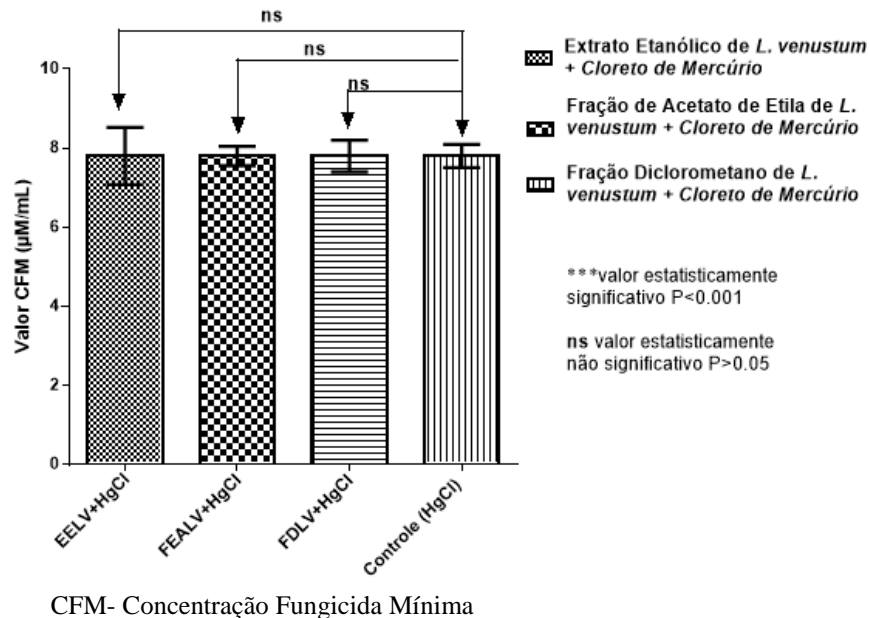
demonstrando que nenhuma alteração do CIM foi verificada quando as frações foram associadas aos antifúngicos.

Em outros estudos a atividade antibacteriana dos extratos metanólico e aquoso de *L. venustum* foram ensaiados frente a linhagens de *E. coli* (7), porém os extratos não foram considerados eficientes inibidores do crescimento bacteriano, uma vez que apresentaram percentuais de inibição abaixo de 50%, além disso, a atividade do extrato foi apresentada diante de uma concentração considerada muito elevada para aplicação clínica (19).

Segundo Moraes-Braga et al., (7) seus resultados indicaram diferença de susceptibilidade entre as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *E. coli*, em relação às frações testadas. Podendo ser em decorrência a membrana externa das bactérias Gram-negativas que apresentam uma barreira resistente à penetração de vários agentes microbianos e estas possuem também um espaço periplasmático com enzimas capazes de inativar alguns antibióticos (20), podendo esta ser a explicação pela diferença na vulnerabilidade dos microrganismos.

A figura 1 representa os resultados da avaliação da atividade moduladora da toxicidade do cloreto de mercúrio quanto à combinação com o EELV e suas respectivas frações. Os resultados demonstraram que as combinações das amostras com o cloreto de mercúrio, não demonstraram atividade citoprotetora com significância $p > 0.05$.

Figura 1: Gráfico demonstrativo da atividade moduladora da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à *C. krusei* 02 na presença e na ausência do extrato etanólico de *Lygodium venustum* e suas frações.



5. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato etanólico e as frações de *Lygodium venustum* são uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade antioxidante, uma vez que possuem metabolitos secundários como os fenóis totais e flavonoides que possui reconhecida atividade antioxidante. No entanto os produtos naturais não foram capazes de reverter a toxicidade causada pelo cloreto de mercúrio frente a linhagens de *C. krusei* 02.

References

1. Ishikawa NM, Ranzani-Paiva MJT, Lombardi JV: Acute Toxicity of Mercury (HgCl₂) to Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *B. Inst. Pesca*. 2007; 33(1): 99 – 104.
2. Vassalo DV, Massaroni L, Oliveira EM, Rossoni LV, Amaral SMC, Vassalo PF. Ações tóxicas e agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. Centro Biomédico da UFGS, Vitória e Hospital Universitário da UFSM, Santa Maria RS, Vitória ES. *Arq. Bras. Cardiologia*. 1996; 67:54-61.
3. Dias LE, Melo RF, Mello JWVM, Oliveira JAO, Daniels WL: *Growth of seedlings of pigeon pea (Cajanus cajan(l.) millsp), wand riverhemp (Sesbania virgata(cav.) pers.), and lead tree (Leucaena leucocephala (lam.) de wit) in an arsenic-contaminated soil. Rev. Bras. Ciênc. Solo; 2010, 34(3): 975-983.*
4. Morais-Braga MFB, Souza TM, Menezes IA, Costas JGM, Rocha JBT, Saraiva RA, Nogara P, Bueno D, Athayde ML, Boligon AA, Saraiva AAF, Coutinho HDM.: *Pteridophytes: Ethnobotany and Pharmacologic Bioactivities. In: Gonçalves, R.E.; Pinto, M.C.. (Org.). Natural Products: Structure, Bioactivity and Applications. Volume 1.1edição. Nova Science Pub Inc; 2012: 1-34.*
5. Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Ceballos GM. Antibacterial properties of some plants used in Mexican tradicional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol*. 2005;100:153-157.
6. Morais-Braga MF, Souza TM, Santos K K, Andrade JC, Guedes GM, Tintino SR, Sobral-Souza CE, Costa JGM, Menezes IRA, Saraiva AAF, Coutinho HDM. . Antimicrobial and Modulatory Activity of Ethanol Extract of the Leaves from *Lygodium venustum* SW. *Am Fern J* . 2012;102(2):154-160.
7. Morais-Braga MFB, Souza TM, Santos KKA, Guedes GMM, Andrade JC, Tintino SR, Sobral-Souza CE, Costa JGM, Saraiva AAF, Coutinho HDM.. Phenolic Compounds and Interaction between Aminoglycosides and Natural Products of

- Lygodium venustum* SW against Multiresistant Bacteria. *Chemotherapy*. 2012; 58(5): 337-340.
8. Morais-Braga MFB, Souza TM, Santos KKA, Guedes GMM, Andrade JC, Tintino SR, Costa JGM, Menezes IRA, Saraiva AAF, Coutinho HDM. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. *Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát.* .2013; 12(1):38-43.
 9. Calzada F, Arista R, Pérez H. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal - gum acacia - induced hyperperistalsis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2010; 128: 49-56 .
 10. Velázquez C, Calzada F, Torres J, González F, Ceballos G. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. *J Ethnopharmacol*. 2006; 103(1): 66–70.
 11. Calzada F, Lilian YM, Contreras AT. 2007. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113:248-251.
 12. Brasileiro, B. G.; Pizziolo, V.R.; Raslan, D.S.; Jamal, C.M.; Silveira, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district, *Rev. Bras. Ciênc. Farmacêut.* 2006; 19: 195-202.
 13. Smith C, Halliwell B, Aruoma OI: Protection by albumin against the pro-oxidation actions of phenolic dietary components. *Food. Chem. Toxicol.* 1992; 30:483-489.
 14. Kumar S, Pooja M, Harika K, Haswitha E, Nagabhushanamma G, Vidyavathi N. In-vitro antioxidant activities, total phenolics and flavonoid contents of whole plant of *hemidesmus indicus* (linn.). *asian. J. Pharm. Clin. Res.* 2013,6(2): 249-251.

15. National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 6 ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.
16. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M27-
17. A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2002.
18. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Rev. Bras. Farmacog.* 2008; 18;670-675.
19. Morais-Braga MFB: Prospecção Química do Extrato Etanólico das Folhas de *Lygodium venustum* Sw (Lygodiaceae) e Avaliação das Bioatividades Antioxidante, Antiepinastigota, Antipromastigota, Citotóxica e Antimicrobiana de Extrato e Frações (in vitro). dissertação (mestrado)- programa de pós – graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – 2012.
20. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G: Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. *J. Ethnopharmacol* 2007, 110:391-400.
21. Vermelho AB, Bastos MCF, Branquinha M. Bacteriologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007, 582.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Foi detectado o conteúdo fenólico total e de flavonoides do extrato etanólico de *L. venustum* e de suas respectivas frações, sendo as concentrações mais representativas para ambos os compostos encontradas na fração de acetato de etila (FAELV).
- Analisando os produtos testados, a fração acetato de etila exibiu um potencial antioxidante e quelante de metal com maior representatividade, fato este que pode ser explicado pela maior concentração do seu conteúdo fenólico.
- As concentrações inibitórias mínimas do extrato etanólico e das frações de *L. venustum*, testados frente às linhagens de *E. coli* ATCC 25922 e de *Candida krusei* 02 comparativamente apresentaram a mesma CIM de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, não demonstrando atividade clínica relevante.
- As combinações do extrato etanólico e das frações de *Lygodium venustum* com o cloreto de mercúrio, apresentaram um efeito citoprotetor frente à linhagem de *E. coli* ATCC 25922,
- Através do coeficiente de correlação de *Pearson*, foi possível inferir que a CBM estar relacionada com a atividade antioxidante e quelante, devido à presença dos fenóis totais e flavonoides. Assim justificando por que a melhor atividade citoprotetora foi evidenciada com a fração de acetato de etila, que possui um maior conteúdo fenólico em relação aos produtos testados.
- Não foi observado efeito citoprotetor do extrato etanólico e das frações de *Lygodium venustum* frente à *Candida krusei* 02.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. N.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARDARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **J. Food Sci. Technol.**, v. 35, p. 283-298, 1998.
- AGUIAR, M.R.M.P; NOVAES, A.C.; GUARICO, A.W.S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, p. 1145-1154, 2002.
- ALANIS AD, CALZADA F, CERVANTES JA, CEBALLOS GM. Antibacterial properties of some plants used in Mexican tradicional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **J Ethnopharmacol.** v.100, p. 153 -157, 2005.
- ALBUQUERQUE, U.; BARROS, I.C.L.; CHIAPETTA, A.A. Pteridófitas utilizadas nos cultos afro-brasileiros em Recife – PE: um estudo etnobotânico. **Biológica Brasileira**, v. 7, p. 23-30, 1997.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutr Res** .v.22, pag. 1041-1047, 2002.
- ANDREN, A.W.; NRIAGU, J.O. **The Global Cycle of Mercury**. Em: J.O.NRIAGU (eds.), *The Biochemistry of Mercury in the Environment*. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press. Holanda. pag.1-21. 1979.
- ARANTES, A.A.; PRADO, J.; RANAL, M. A. Polypodiaceae e Pteridaceae da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** . v. 33, p 167-183, 2010.
- ARGUETA, A.; CANO, L.; RODARTE, M., **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**, vol. I-III. Instituto Nacional Indigenista, Mexico City. 1994.
- AZEVEDO, B. F. A.; FURIERI, L. B.; PEÇANHA, F. M.; WIGGERS, G. A.; VASSALLO, P. F.; SIMÕES, M. R. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 349, p.1731-1737, 2012.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**. v. 2, pag. 345-361. 1992.
- BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.
- BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Nutrire**, v.12, n 2, p.123-30, 1999.
- BOUJBIHAA, M.A.; HAMDENA, K.; GUERMAZIB, F.; BOUSLAMAC, A.; OMEZZINEC, A.; KAMMOUND, A. and EL FEK, A. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: Association with oxidative stress. **Reproductive Toxicology**. v.28, pag 81-89. 2009.

BRASIL, Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. **Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências.** Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 27 de janeiro 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Produção Vegetal, Divisão de Sementes e Mudas. Regras para análise de sementes. LANARV/SNAD/MA, Brasília. 188p. 2009.

BRASILEIRO B. G.; PIZZIOLLO V. R.; RASLAN D. S.; JAMAL C. M.; SILVEIRA D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 42 p.195, 1996.

CALZADA, F.; ARISTA, R.; PÉREZ, H. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal - gum acacia - induced hyperperistalsis in rats, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 49–51, 2010.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chem**, v. 92, p 491-497. 2005.

CHOPRA, R. N.; CHOPRA, J. C.; HONDA, K. L.; APUR, L. D. **Indigenous Drugs of India.** Calcutta: U.N. Dhur & Sons, 1958.

COLOMBI, J. S. **Avaliação da Acetilcolinesterase como Biomarcador em Experimentos De Contaminação *in vitro* com MeHg E HgCl₂ em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794).** [Monografia de Bacharel em Biociências e Biotecnologia] Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2009.

COSTA, D.; DALMINA, F.; IRALA, LED. O uso do vinagre como auxiliar químico em Endodontia: uma revisão de literatura. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**. v. 6, n. 2, p 185-193, 1999.

COSTA, J.M.; PIETROBOM, M.R.. **Pteridófitas (Lycophyta e Monilophyta) da Ilha de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará, Brasil, Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, Belém, v. 2, n. 3, p. 45-55, 2007.

DEMIRAK A, YILMAZ F, TUNA AL AND OZDEMIR N. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. **Chemos**, v. 63, n. 9, p. 1451-1458, 2006.

Duke JA. **Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America.** CRC Press Taylor & Francis group, New York, USA, 2008.

DUKE, J.A. **Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America**, New York: CRC Press Taylor & Francis group, pag. 832, 2008.

ELISABETSKY, E. The status of ethnopharmacology in Brazil. **J. Ethnopharmacology**, v. 38, p. 137, 1993.

ELVIN-LEWIS, Memory. Should we be concerned about herbal medicines? **J. Ethnopharmacol., Amsterdam**, v.75, p.141-164, 2001.

- FÖRSTNER, U. E.; WITTMAN, G. T. W. Metal pollution in the aquatic environment. 2nd. Berlin: Spriger-Verlag, pag. 475, 1983.
- FRANCESCONI, K.; VISOOTTIVISET, P.; SRIDOKCHAN, W.; GOESSLER, W. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **Elsevier Science**, v. 284, p. 27-35, 2002.
- GOMES. M.P; CARVALHO, M.; CARVALHO. G.S.; MARQUES, T.C.L.L.S.M.; GARCIA Q.S.; GUILHERME, L.R.G.; SOARES, A. M.; Phosphorus Improves Arsenic Phytoremediation by *Anadenanthera Peregrina* by Alleviating Induced Oxidative Stress. **International Journal of Phytoremediation**, v. 15,p. 633-646, 2013.
- GOUVÊA, C.M.C.P. Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Carvalho, J.C.T. coord. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 101-124, 2004.
- GÜLCIN, I.; OKTAY, M.; KIRECCI, E.; KÜFREVIÖGLU, O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. **Food Chem**, 83, p 371-382, 2003.
- GYAMFI, M.A.; YONAMINE, M.; ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **Gen Pharmacol**. v. 32, p. 661-667, 1999.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radicals in Biology and Medicine, 3th ed., New York: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press (Oxford Science Publications), p. 285, 293, 625, 1999.
- HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. London: Taylor & Francis, 1993.
- HOLTTUM, R.E. The ecology of tropical pteridophytes. In: VEERDORN, F. (Ed.) **Manual of Pteridology**. Amsterdam: The Hague Martinus Nijhoff, p. 420-450, 1938.
- JESUS, L.F.; MARINHA, M.S.; MOREIRA, F.R. Amálgama dentário: fonte de contaminação por mercúrio para a Odontologia e para o meio ambiente. **Cad. Saúde Colet. Rio de Janeiro**, v.18, n. 4, p. 509-15. p. 2010.
- KHAYATZADEH, J. A., E. **The effects of heavy metal on aquatic animals**. The 1º International Applied Geological Congress. Iran 2010.
- LACERDA, L.D.de; MIGUENS, F.C. A Ressureição do Metal: Contaminação de estuários deltas. **Ciências Hoje**, v. 48, p. 38-41, 2011.
- LEE, R.; MIDDLETON, D.; CALDWELL, K.; DEARWENT, S.; JONES, S.; LEWIS, B.; MONTEILH, C.; MORTENSEN, M.E.; NICKLE, R.; ORLOFF, K.; REGER, M.; RISHER, J.; ROGERS, H.S.; WATTERS, M. A review of events that expose children to elemental mercury in the United States. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, p. 585-598. 2009.
- LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVÊA, C.M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Rev Bras Farmacogn**. v.16, p. 531-536, 2006.

- LÓPEZ, C.A.A. Considerações gerais sobre plantas medicinais, **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n.1, p. 19-27, 2006.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. R, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.
- MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **J Appl Microbiol**, v. 84, p. 538-44, 1998.
- MARINS, R.V.; FILHO, F.J.P.; MAIA, S.R.R. Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. São Paulo - SP. **Química Nova**, Vol. 27, p. 763-770, 2004.
- MARTÍNEZ-FLORES, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.** V.17, n. 6, p. 271-278, 2002.
- MCCORD, J. M. **Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition.** Food. Technol. v. 48, n. 3, p. 106-110, 1994.
- MEERS, W.E.; HOPGOOD, M.; LESAGE, E.; VERVAEKE, P.; TACK, F.M.G.; VERLOO, M.G. Enhanced phytoextraction: In search of EDTA alternatives. **Intern. J. Phytor**, 6:95-109. 2004.
- MEHLTRETER K. Leaf Phenology of the Climbing Fern *Lygodium venustum* in a Semideciduous Lowland Forest on the Gulf of Mexico, **American Fern Journal**, v. 96, n. 1, p. 21-30, 2006.
- MEHLTRETER K. Leaf Phenology of the Climbing Fern *Lygodium venustum* in a Semideciduous Lowland Forest on the Gulf of Mexico, **American Fern Journal**, v. 96, n. 1, p. 21-30, 2006.
- MELO, E.E.C.; NASCIMENTO, C.W.A.; SANTOS, A.C.Q. Solubilidade, fracionamento e fitoextração de metais pesados após aplicação de agentes quelantes. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 30, p. 1051-1060, 2006.
- MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira.** <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>; Acesso em 05/02/2014.
- MORAIS-BRAGA MFB, SOUZA TM, MENEZES IA, COSTAS JGM, ROCHA JBT, SARAIVA RA, NOGARA P, BUENO D, ATHAYDE ML, BOLIGON AA, SARAIVA AAF. 2012a . **Pteridophytes: Ethnobotany and Pharmacologic Bioactivities.** In: **Gonçalves, R.E.; Pinto, M.C. (Org.). Natural Products: Structure, Bioactivity and Applications.** Volume 1.edição. Nova Science Pub Inc, 1-34.
- MORAIS-BRAGA, M.F.; SOUZA, T.M.; SANTOS, K. K.; ANDRADE, J. C.; GUEDES, G. M.; TINTINO, S. R.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; SARAIVA, A.A.F.; COUTINHO, H.D.M. Antimicrobial and Modulatory Activity of Ethanol Extract of the Leaves from *Lygodium venustum* SW. **American Fern Journal**, v.102, n. 2, p. 154-160, 2012b.
- MORAIS-BRAGA, M.F.B.; SOUZA, T.M.; SANTOS, K.K.A.; GUEDES, G.M.M.; ANDRADE, J.C.; TINTINO, S.R.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; COSTA, J.G.M.; SARAIVA,

A.A.F.; COUTINHO, H. D. M. Phenolic Compounds and Interaction between Aminoglycosides and Natural Products of *Lygodium venustum* SW against Multiresistant Bacteria. **Chemotherapy**, v. 58, n. 5. Pag. 337-340, 2012.

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

MORAN, R. C. **Polypodiaceae**. In Psilotaceae a Salviniaceae (R. C. Moran & R. Ribas, eds.). In Flora Mesoamericana. (G. Davidse, M. Souza & S. Knapp, orgs). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, v. 1, p. 333-365, 1995.

MUELLER, R. J. Indeterminate growth and ramification of the climbing leaves of *Lygodium japonicum* (Schizaeaceae), **American journal of botany**, v. 70, n. 5, p. 682–690, 1983.

OLIVEIRA, D.L.O.; ROCHA, C.; MOREIRA, P.C.; MOREIRA, S.O.L. **Plantas nativas do cerrado: uma alternativa para fitorremediação**. Estudos, Goiânia, vol. 36, p. 1141-1159, 2009.

PAGE, C. N. **The diversity of ferns: An ecological perspective**. In: Dyer, A.F. (ed.). **The experimental biology of ferns**. Academic Press, London, p. 10-5, 1979.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemoter**, v. 46, n.8, p. 2720-22, 2002.

PATRICK, L. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione ad alpha-lipoc acid in the treatment of mercury toxicity. **Altern Med Rev**. v.7,p. 456-471. 2002.

PEIJNENBURG W. **Fate of contaminants in soil**. In: DOELMAN, P.; EIJSACKERS, H. J. P., (Eds.), Vital soil: Function, values and properties. (Developments in Soil Science. Elsevier, Amsterdam), p. 245, 2004.

PRADO, J. Flora da Reserva Ducke, Amazonia, Brasil: Pteridophyta - Blechnaceae, **Rodriguesia**, v. 56, n. 86, p. 33-34. 2005.

Pryer, K. M. ; Schuettpelz , E.; Paul G. Wolf.; Schneider, H.; Smith, A. R.; Cranfill, R. Phylogeny and evolution of ferns (Monilophytes) with focus on the early leptosporangiate divergences, **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1582-1598, 2004.

RECIO, M. C.; RIOS, J. L. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the lieteratura 1978-1988. **Phytotherapy Research**. v.3, p. 117-125, 1989.

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 36, n. 3,p. 282-8, 2002.

- RIVIER, L.; LIDGREN, J.E. "Ayahuasca: the South American hallucinogenic drink. An ethnobotanical and chemical investigation", **Economic Botany**, v. 26, n.2, p. 101-129, 1972.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SANTIAGO, C.A.P.; BARROS, I.C.L. Pteridoflora do Refúgio Ecológico Charles Darwin (Igarassu, Pernambuco, Brasil), **Acta Botânica Brasílica**, v.17, n.4, p. 597-604, 2003.
- SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. In: LENNETE, E.H.; BALLOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J. & SHADOMY, H.J., ed. **Manual of Clinical Microbiology**. 4 ed. Washington, American Society of Microbiology, p. 991-999, 1985.
- SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts, **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1212-1220, 2007.
- SINGH, A.P. Perspectives of Pteridophytes Biodiversity: a source of economy elevation. NATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY, DEVELOPMENT AND POVERTY ALLEVATION. Disponível em: uspbdb.org/pdf/Souvenir2010/7.pdf. 2010. Acesso em 12 de março de 2013.
- SKOG, J.E.; ZIMMER, E.A.; MICKEL, J.T. Additional support for two subgenera of *Anemia* (Schizaeaceae) from data for the chloroplast intergenic spacer region *trnL-F* and morphology, **American Fern Journal**, v. 92, n. 2, p. 119-130, 2002.
- SMITH, A.R. *et al.* A classification for extant ferns, **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 705-731, 2006.
- STEVENSON D.W.; LOCONTE H. **Ordinal and familial relationships of pteridophyte genera**. In: Camus, J.M., Gibby M., Johns R.J. (eds.) **Pteridology in perspective**. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 435-467, 1996.
- TRYON, R. M; STOLZE, R. G. **Pteridophyta of Peru. Part I. 1. Ophioglossaceae–12. Cyatheaceae**. **Fieldiana Botany**, New series, n. 27: 111-139, 1989.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Toxicological information of some herbal medicines used in Brazil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n.2, p. 289-306, 2006.
- Uberlândia, Minas Gerais, Brasil: Anemiaceae, Aspleniaceae, Cyatheaceae e Lygodiaceae, **Rodriguésia**, v. 59, n.4, p. 845-858, 2008.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais, **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.
- VELÁZQUEZ, C.; CALZADA, F; TORRES, J; GONZÁLEZ F; CEBALLOS, G. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66–70, 2006.
- VIEGAS, J.R.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines. A Worldwide Review**, 1998.

WU, J.H.; TUNG, Y.T.; WANG, S.Y.; SHYUR, L.F.; KUO, Y.H.; CHANG, S.T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **J Agric Food Chem.** v. 53, p. 5917-5921. 2005.

XING, Y.; WHITE, P. J. **Antioxidants from Cereals and Legumes in Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications “in”** SHAHIDI, F. AOCS. Press: Champaign, Illinois, p. 25-55, 1996

ANEXOS

Durante o mestrado foram produzidos artigos que estão listados na tabela abaixo.

	Nome	Situação	Periódico	JCR	Qualis	Ano
1.	Potential Phytoprotective Effect of <i>Lygodium venustum</i> SW (LYGODIACEAE) Against Mercury Chloride Toxicity	Submetido	<i>Journal of Environmental Health Science and Engineering</i>	1,23	B1	2014
2.	Evaluation of Potential cytoprotective Against Toxic Effect of mercury chloride and antioxidant of <i>Lygodium venustum</i> SW (LYGODIACEAE).	Submetido	<i>Jundishapur Journal of Microbiology</i>	0,383	B2	2014

Article processing charge for manuscript submitted to Journal of Environmental Health Science and Engineering



Entrada x



BioMed Central Accounts <payment@biomedcent

20:44 (Há 0 minutos)



para mim ▾



inglês ▾



português ▾

[Visualizar mensagem traduzida](#)

[Sempre traduzir: inglês](#)

MS: 1702681683127602

Potential Phytoprotective Effect of Lygodium venustum SW (LYGODIACEAE) Against Mercury Chloride Toxicity

Fernando G Figueredo, Luciene F Lima, Maria F.B Morais-Braga, Saulo R Tintino, Pablo A.M Farias, Edinardo F.F Matias, Irwin R.A Menezes and Henrique D.M Coutinho
Journal of Environmental Health Science and Engineering

Dear Mr Figueredo

Thank you for your recent submission to Journal of Environmental Health Science and Engineering. I would like to update you regarding your status with respect to the article processing charge that is normally due if a manuscript is accepted.

No payment is due on publication of this article.

The publication costs for Journal of Environmental Health Science and Engineering are covered

----- Forwarded message -----

From: <info@jjmicrobiol.com>
Date: 2014-04-28 12:30 GMT-03:00
Subject: Jundishapur Journal of Microbiology: ID 19798 has been approved by the author
To: hdmcoutinho@gmail.com

Journal: [Jundishapur Journal of Microbiology](#)
ID: 19798
Revision: 0
Title: Evaluation of Potential cytoprotective Against Toxic Effect of mercury chloride and antioxidant of Lygodium venustum SW (LYGODIACEAE)

Dear Dr. Henrique Coutinho,

Thank you for submitting your manuscript via the journal online system.
Your manuscript has been successfully submitted and will be checked by one of the editorial board members.
To check the status of your manuscript, please [sign in](#) with your account to the website and track your manuscript under the Authorial Area.

For further questions, please do not hesitate to contact us.

Kind Regards,

Parisa Bahmani, Production Manager, [Kowsar](#) | Journal: [Jundishapur Journal of Microbiology](#), info@jjmicrobiol.com

Data Protection Notice: You are receiving this e-mail because you are an Author, Reviewer, Associate Editor, Editor or Contributor of a Kowsar products in the belief that it will be of interest to you. If you do not wish to receive general marketing messages from Kowsar Journals, you can visit this page to [Unsubscribe](#). © Kowsar Corp., www.kowsarpub.com

APÊNDICE

Durante o mestrado foram produzidos artigos de trabalhos paralelos que estão listados na tabela abaixo.

Artigo	Título e Autores	Situação	Ano	Periódico	JCR	Qualis
1.	Evaluation of the Modulatory and Antibacterial Activity of the Ethanolic Extract and Fractions of <i>Duguetia furfuracea</i> (A. St.-Hil). FERNANDES, C. N. ; SOUSA, H. H. F. ; BORGES, M. C. M. ; SOUSA, C. E. S. ; GUEDES, G. M. M. ; FIGUEREDO, F. G. ; TINTINO, S. R. ; COSTA, J. G. M. ; COUTINHO, H. D. M. ; MENEZES, I. R. A. ; KERNTOPF, M. R.	Publicado	2014	<i>African Journal of Pharmacy and Pharmacology</i>	0,839	B1
2.	Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de <i>Piper arboreum</i> (piperaceae) e de suas frações FIGUEREDO, F. G. ; TINTINO, S. R. ; BRITO, D. I. V. ; BRAGA, M. F. B. M. ; LEITE, N. F. ; LUCENA, B. F. F. ; SOBRAL-SOUZA, C. E. ; GOMEZ, M. C. V. ; COUTINHO, H. D. M	Publicado	2014	<i>Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada</i>	-	B2
3.	Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from <i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith and <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan. FIGUEREDO, FERNANDO G. ; FERREIRA, E. O. ; LUCENA, B. F. F. ; TORRES, C. M. G. ; Lucetti, D. L. ; LUCETTI, E.C.P. ; SILVA, J. M. F. L. ; SANTOS, F. A. V. ; MEDEIROS, C. R. ; OLIVEIRA, G. M. M. ; COLARES, A V. ; Costa, José G.M. ; COUTINHO, H. D. M. ; MENEZES, I; R. A. ; KERNTOPF, M;R. ; SILVA, J. C. F. ; MATIAS, E; F. F.	Publicado	2013	<i>BioMed Research International,.</i>	2,88	A1
4.	Biological Activities and Chemical Characterization of <i>Cordia verbenacea</i> DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. MATIAS, E. F. FERREIRA ; ALVES, E. FERREIRA ; SANTOS, B. S ; SOBRAL-SOUZA, E.C ; ALENCAR J. V.F; LAVOR, S. A. K. L ; FIGUEREDO, F. G ; LIMA, L. F; SANTOS, F. A. V ; PEIXOTO, F. N. S; COLARES, A. C ; ALINE, A.B ; SARAIVA, R. A; ATHAYDE, M. L ;ROCHA, J. B.T ; MENEZES, I.R.A; COUTINHO, H D.M;COSTA, J. G. M.	Publicado	2013	<i>Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)</i>	1,772	B1

5.	Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra <i>Trypanossoma cruzi</i> e <i>Leishmania brasiliensis</i> .	Publicado	2013	Revista Cubana de Plantas Medicinale	-	B5
	LEITE, N. F. ; SOUZA, C. E. S. ; ALBUQUERQUE, R. S. ; BRITO, D. I. V. ; LAVOR, A. K. L. S. ; ALENCAR, L. B. B. ; TINTINO, S. R. ; FERREIRA, J. V. A. ; FIGUEREDO, F. G. ; LIMA, L. F. ; CUNHA, F. A. B. ; PINHO, A. I. ; COUTINHO, H. D. M.					
6.	Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes.	Publicado	2013	<i>Indian Journal of Traditional Knowledge</i>	0,492	B2
	MORAIS, E. C. ; NOGUEIRA, L. F. B. ; LEITE, J. L. A. ; ALENCAR, L. S. M. ; LUCENA, B. F. F. ; FIGUEREDO, F. G. ; GUEDES, G. M. M. ; TINTINO, S. R. ; SOUZA, C. E. S. ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; LIMA, L. F. ; DIAS, C. S. ; SOUZA, F. H. T. ; COUTINHO, H. D. M					
7.	Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of <i>Myracrodruon urundeuva</i> .	Publicado	2013	<i>Pharmaceutical Biology</i>	1,206	B1
	FIGUEREDO, F. G. ; Lucena, B.F.F ; TINTINO, S. R. ; Matias, E. F. F. ; LEITE, N. F. ; ANDRADE, J. C. ; MORAIS, E. C. ; NOGUEIRA, L. F. B. ; COSTA, J. G. M. ; Coutinho, H. D.M ; Rodrigues, F. F. G.					
8.	Efeito antifúngico e atividade moduladora de <i>lygodium venustum</i> sw.	Publicado	2013	Revista Ouricuri	-	B5
	MORAIS-BRAGA1, M. F. B. ; SALES, D. L. ; CARNEIRO, J. N. P. ; OLIVEIRA, O. P. ; ALBUQUERQUE, R. S. ; BRITO, D. I. V. ; FIGUEREDO, F. G. ; LEITE, N. F. ; TINTINO, S. R. ; Coutinho, H. D.M					
9.	Association Between Drugs and Herbal Products: <i>In vitro</i> Enhancement of the antibiotic	Aceito	2014			

	activity by fractions from leaves of <i>Croton campestris</i> A. (Euphorbiaceae)			European Journal of <i>Integrative</i> Medicine	0,559	B2
	LAVOR, A. K. L. S. ; MATIAS, E. F. ; ALVES, E. F. ; SANTOS, B. S. ; FIGUEREDO, F. G. ; LIMA, L. F. ; LEITE, N. F. ; COUTINHO, H. D					
10.	Composição química e estudo da atividade antibacteriana de <i>Bowdichia Virgilioides</i> Kunth (Sucupira) - Fabaceae Papilionoidae	Aceito	2014	Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas	0,624	B2
	LEITE, L. H. I. ; TINTINO, S. R. ; FIGUEREDO, F. G. ; OLIVEIRA, C. D. M. ; OLIVEIRA, L. ; COUTINHO, H. D. M. ; COSTA, J. G. M. ; Menezes, Irwin A ; KERNTOPF, M. R.					
11.	Modulação da atividade antibacteriana do tecido adiposo da <i>Gallus gallus domesticus</i> (Linnaeus 1758)	Aceito	2014	Comunicata Scientiae	-	B5
	AQUINO, P. E. A. ; LEITE, J. L. A. ; GUEDES, T. T. A. M. ; LEANDRO, L. M. G. ; FIGUEREDO, F. G. ; COUTINHO, H. D. M. ; Matias, E. F. F.					
12.	Avaliação da atividade antibacteriana por modulação <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>cymbopogon citratus</i> (dc) stapf	Aceito	2014	Acta Biologica Colombiana	-	B2
	LUCENA, B. F. F. ; FIGUEREDO, F. G. ; TINTINO, S. R. ; OLIVEIRA, C. D. M. ; AGUIAR, J. J. S. ; CARDOSO, E. N. ; AQUINO, P. E. A. ; ANDRADE, J. C. ; M.COUTINHO, H. D. ; MATIAS, E. F. F.					
13.	Evaluation of Antibacterial, Antifungal and Modulatory Activity of Methanol and Ethanol Extracts of <i>Padina sanctae-crucis</i>	Aceito	2013	<i>African Health Sciences</i>	0,5	B2
	NOGUEIRA, L. F. B. ; MORAIS, E. C. ; BRITO, M. A. ; VALE, D. L. ; LUCENA, B. F. F. ; FIGUEREDO, F. G. ; GUEDES, G. M. M. ; TINTINO, S. R. ; SOUZA, C. E. S. ; NOGUEIRA, R. B. ; MATIAS, EDINARDO F. F. ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; CUNHA, E. V. ; LIMA, M. A. ; COUTINHO, H. D. M.					
14.	Actividad antibacteriana y moduladora de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul en la acción de	Aceito	2013		-	

los aminoglucósidos			Revista Cubana de Plantas Medicinales	B5
<p>SOUZA, D. O. ; TINTINO, S. R. ; FIGUEREDO, F. G. ; BORGES, M. C. M. ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; FELIPE, C. F. B. ; COSTA, J. G. M. ; COUTINHO, H. D. M. ; MENEZES, I. R. A. ; KERNTOPF, M. R.</p>				

Capitulo de livro	Situação	Ano	Editora		
<p>Use of natural products to enhance the antibiotic activity of gentamicin and other aminoglycosides: the future of antibiotic therapy.</p> <p>GONDIM, C. N. F. L. ; LEITE, N. F. ; ANDRADE, J. C. ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; GUEDES, G. M. M. ; TINTINO, S. R. ; TAVARES, C. C. A. ; ALBUQUERQUE, R. S. ; Matias, E. F. F. ; CUNHA, F. A. B. ; BRITO, D. I. V. ; LAVOR, A. K. L. S. ; FERREIRA, J. V. A. ; FIGUEREDO, F. G. ; LIMA, L. F. ; COUTINHO, H. D. M.</p>	Publicado	2013	Emilie Kruger		
<p>Ferns as protective agents against the contamination with mercurium chloride: the example of Pityrogramma calomelanos and a short review</p> <p>LUCIENE F. LIMA, FERNANDO G. FIGUEREDO, MARIA AUDILENE FREITAS, GIOCONDA M. ANDRADE, ROSIMEIRE S. ALBUQUERQUE, MARIA FLAVIANA B. MORAIS-BRAGA, JOÃO VICTOR A. FERREIRA, JOARA N. P. CARNEIRO, ANTONIO J. T. MACHADO, IRWIN R. A. MENEZES AND HENRIQUE D. M. COUTINHO</p>	Aceito	2014	NOVA		



Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações

Fernando Gomes Figueredo^{1*}; Saulo Relison Tintino¹; Dara Isabel Vieira de Brito¹; Maria Flaviana Bezerra Morais Braga¹; Nadghia Figueiredo Leite¹; Bruno Feitosa Furtado Lucena¹; Celestina Elba Sobral-Souza¹; Maria Celeste Vega Gomez²; Henrique Douglas Melo Coutinho¹

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

²Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill. Asunción-Paraguay.

Full Length Research Paper

Evaluation of the modulatory and antibacterial activity of the ethanolic extract and fractions of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hil.

Cicera Norma Fernandes¹, Heloisa Helena Ferreira Sousa¹, Maria Cristina Melo Borges¹,
Celestina Elba Sobral Souza², Glaucia Morgana Melo Guedes², Fernando Gomes
Figueredo^{2*}, Saulo Relison Tintino², José Galberto Martins Costa³, Henrique Douglas Melo
Coutinho², Irwin Rose Alencar Menezes¹, Cícero Francisco Bezerra Felipe¹ and Marta Regina
Kerntopf¹

¹Laboratory of Molecular Pharmacology and Chemistry, Regional University of Cariri, Crato (CE), Brazil.

²Laboratory of Molecular Biology and Microbiology, Regional University of Cariri, Crato (CE), Brazil.

³Research Laboratory of Natural Products, Regional University of Cariri, Crato (CE), Brazil.

Accepted 30 December, 2013

Medicinal plants have been the subject of research in several countries such as Brazil. The *Duguetia furfuracea* A. St.-Hil., popularly known as araticum-bravo, ata-brava and ata de lobo, has been used in folk medicine as anti-rheumatic drugs, for the treatment of renal dysfunction, spinal pain and stomach, and against pediculosis. This work aimed to analyze the antibacterial effect of the crude extract and fractions obtained from the leaves of *D. furfuracea*. The characterization of secondary metabolites was carried out through phytochemical prospection, being checked for the presence of tannins, flavonoids and alkaloids. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by using broth microdilution method and its modulating activity of antibiotic activity in sub-inhibitory (MIC/8) concentration. When standard bacterial strain is used for the MIC and multidrug-resistant strains of modulation, all samples had a MIC \geq 1024 μ g/ml. The samples when combined with aminoglycosides demonstrated synergistic activity against the *Escherichia coli* 27 and *Staphylococcus aureus* 358. The results of this study indicate the species *D. furfuracea* as a promising source in combating bacterial multidrug resistance, increasing the potential of antibiotics.

Key words: *Duguetia furfuracea* A. St.-Hil., modulation, antibacterial activity, aminoglycosides.

Research Article

Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan

Fernando G. Figueredo,¹ Emerson O. Ferreira,¹ Bruno F. F. Lucena,¹ Cícero M. G. Torres,¹ Daniel L. Lucetti,^{1,2} Elaine C. P. Lucetti,^{1,2} João Marcos F. L. Silva,^{1,2} Francisco A. V. Santos,^{1,2} Cássio R. Medeiros,¹ Gardênia M. M. Oliveira,¹ Aracélio V. Colares,^{1,3} José G. M. Costa,^{1,3} Henrique D. M. Coutinho,^{4,5} Irwin R. A. Menezes,⁶ Júlio C. F. Silva,^{1,2} Marta R. Kerntopf,⁶ Patrícia R. L. Figueiredo,⁶ and Edinardo F. F. Matias^{1,4}

¹ Faculdade Leão Sampaio, 63100-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

² Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, 63100-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

³ Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, 63105-000, Crato, CE, Brazil

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, 63105-000, Crato, CE, Brazil

⁵ Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, 63105-000, Crato, CE, Brazil

⁶ Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, 63105-000, Crato, CE, Brazil

Correspondence should be addressed to
 Henrique D. M. Coutinho; hdmcoutinho@gmail.com

Received 15 August 2012; Revised 15 October 2012; Accepted 15 October 2012

Academic Editor: Fabio Ferreira Perazzo

Copyright © 2013 Fernando G. Figueredo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Research Article

Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage

**Edinardo Fagner Ferreira Matias,^{1,2,3} Erivânia Ferreira Alves,³
Beatriz Sousa Santos,³ Celestina Elba Sobral de Souza,⁴
João Victor de Alencar Ferreira,⁴ Anne Karyzia Lima Santos de Lavor,⁴
Fernando Gomes Figueredo,⁴ Luciene Ferreira de Lima,⁴
Francisco Antônio Vieira dos Santos,³ Flárido Sampaio Neves Peixoto,³
Aracélio Viana Colares,^{2,3,5} Aline Augusti Boligon,⁶ Rogério de Aquino Saraiva,⁶
Margareth Linde Athayde,⁶ João Batista Teixeira da Rocha,⁶ Irwin Rose Alencar Menezes,⁴
Henrique Douglas Melo Coutinho,⁷ and José Galberto Martins da Costa^{2,3,4}**

¹ Universidade Estadual do Ceará-UECE-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

² Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

³ Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

⁴ Universidade Regional do Cariri-URCA-63.100-000, Crato, CE, Brazil

⁵ Universidade Federal do Maranhão-UFMA-65085-580, São Luís, MA, Brazil

⁶ Universidade Federal de Santa Maria-UFSM-97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

⁷ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta 63105-000, Brazil

Correspondence should be addressed to Henrique Douglas Melo Coutinho; hdmcoutinho@gmail.com

Received 5 April 2013; Revised 1 May 2013; Accepted 4 May 2013

Academic Editor: Ulysses Paulino de Albuquerque

Copyright © 2013 Edinardo Fagner Ferreira Matias et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ARTÍCULO ORIGINAL

Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*

Actividad antiparasitaria *in vitro* citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*

In vitro* cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis

MSc. Nadghia F. Leite, MSc. Celestina E. Sobral-Souza, BSc. Rosimeire S. Albuquerque, MSc. Dara I. V. Brito, MSc. Anne K. L. S. Lavor, BSc. Liscássia B. B. Alencar, BSc. Saulo R. Tintino, BSc. João V. A. Ferreira, MSc. Fernando G. Figueredo, MSc. Luciene F. Lima, PhD. Francisco A. B. Cunha, PhD. Antônio I. Pinho, PhD. Henrique D. M. Coutinho

Universidade Regional do Cariri. Crato-CE, Brasil.

Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes

Edson C Morais¹, Lavouisier F B Nogueira¹, Jéssica L A Leite, Larissa S M Alencar Bruno F F Lucena¹, Fernando G Figueredo¹, Glaucia M M Guedes², Saulo R Tintino², Celestina E S de Souza², Maria F B M Braga², Micheline A Lima³, Fábio H T Souza³, Celidarque da Silva Dias³ & *Henrique D M Coutinho²

¹Faculdade de Ciências Aplicadas Doutor Leão Sampaio, Juazeiro do Norte-CE, Brasil; ²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, Brasil; ³Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil

E-mail: *hdmcoutinho@gmail.com

Received 24.06.13, revised 06.08.2013

The emergence of resistant microorganisms and also the toxicity associated with antimicrobial drugs increase the need of research for new active principles. *Richardia brasiliensis*, a weed used popularly as an expectorant, antiemetic, and diaphoretic. The extracts have coumarins, flavonoids, steroids, triterpenoids, alkaloids and resin, as secondary metabolites. The present study aimed to test the potential antimicrobial and modulator of the ethanolic and hexanic extracts of *R. brasiliensis*. The ethanolic and hexanic extracts were tested for their antimicrobial effect and in combination with aminoglycosides and antifungal against standard and multi-resistant microorganisms by the broth microdilution method with culture medium Brain Heart Infusion (BHI). It was observed that the association between antibiotics and ethanolic and hexanic extracts showed clinically relevant results on the tests with multi-resistant bacteria. The natural products from *R. brasiliensis* demonstrated a modulating action against the microorganisms used. These results can represent a new effort to combat antibiotic resistant bacteria.

Keywords: *Richardia brasiliensis*, Antimicrobial activity, Modulatory effect, Multi-resistant microorganisms.

IPC Int. Cl.⁸: A61K 36/00, C12N, C12M, H03K 7/00

EFEITO ANTIFÚNGICO E ATIVIDADE MODULADORA DE *LYGODIUM VENUSTUM*

SW.

ANTIFUNGAL EFFECT AND MODULATORY ACTIVITY OF *LYGODIUM VENUSTUM*

Submetido em: 20/08/2013.

Aprovado em: 15/11/2013.

MORAIS-BRAGA¹, Maria Flaviana Bezerra; SALES², Débora Lima; CARNEIRO³, Joara Nályda Pereira; OLIVEIRA⁴, Olga Paiva; ALBUQUERQUE⁵, Rosimeire Sabino; BRITO⁶, Dara Isabel Vieira de; FIGUEREDO⁷, Fernando Gomes; LEITE⁸, Nadghia Figueiredo; TINTINO⁹, Saulo Relison; COUTINHO¹⁰, Henrique Douglas Melo.

¹ Professora Mestra da Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, URCA. Crato – CE, Brasil. Doutoranda em Etnobiologia e Conservação da Natureza, UFRPE/URCA/UEPB. E-mail: flavianamoraisb@yahoo.com.br

² Mestra em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. Doutoranda em Etnobiologia e Conservação da Natureza, UFRPE/URCA/UEPB. E-mail: debora.lima.sales@gmail.com

³ Graduanda em Ciências Biológicas Licenciatura, Departamento de Ciências Biológicas, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: nalyda_05@hotmail.com

⁴ Mestra em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: olgapaiva8@gmail.com

⁵ Graduanda em Ciências Biológicas Licenciatura, Departamento de Ciências Biológicas, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: rosi_sabino87@hotmail.com

⁶ Mestranda em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: daraisabelvb@hotmail.com

⁷ Mestrando em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE, Brasil. E-mail: fgfigueredo@gmail.com

⁸ Mestranda em Bioprospeção Molecular, Departamento de Química Biológica, URCA. Crato – CE,

ORIGINAL ARTICLE

Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*

Fernando G. Figueredo¹, Bruno F. F. Lucena¹, Saulo R. Tintino¹, Edinaldo F. F. Matias¹, Nadghia F. Leite¹, Jacqueline C. Andrade¹, Lavouisier F. B. Nogueira¹, Edson C. Morais¹, José G. M. Costa², Henrique D. M. Coutinho¹, and Fabiola F. G. Rodrigues²

¹Laboratory of Microbiology and Molecular Biology and ²Laboratory of Research in Natural Products, University of the Region of Cariri, Crato (CE), Brazil

Abstract

Context: The combination of antibiotics with natural products has demonstrated promising synergistic effects in several therapeutic studies.

Objective: The aim of this study was to determine the effect of a combination of an ethanol extract of *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae) (aroeira plant) and its essential oil with six antimicrobial drugs against multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from clinical isolates.

Materials and methods: After identification of the chemical components by GC-MS, the antibacterial activity of the natural products and antibiotics was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) using the microdilution method and concentrations ranging 8–512 µg/mL and 0.0012–2.5 mg/mL, respectively. Assays were performed to test for a possible synergistic action between the plant products and the antimicrobials, using the extract

Keywords

Aminoglycosides, aroeira, clindamycin, *Escherichia coli*, essential oil, *Staphylococcus aureus*, synergism

History

Received 17 April 2013
 Revised 20 September 2013
 Accepted 6 October 2013
 Published online 19 November 2013

----- Forwarded message -----

From: **Editorial Office EUJIM** <avalorenc@hotmail.com>

Date: 2014-03-05 5:12 GMT-03:00

Subject: Your Submission

To: hdmcoutinho@gmail.com, hdouglas@zipmail.com.br

Ms. Ref. No.: EUJIM-D-13-00200R2

Title: Association Between Drugs and Herbal Products: In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)

European Journal of Integrative Medicine

Dear Prof. Henrique Coutinho,

I am pleased to inform you that your paper "Association Between Drugs and Herbal Products: In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)" has been accepted for publication in European Journal of Integrative Medicine.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to European Journal of Integrative Medicine.

Yours sincerely,

Prof. Nicola Robinson, PhD
Editor-in-Chief
European Journal of Integrative Medicine

Comments from the editors and reviewers:

Se em anexo o nomes dos autores,

Ps:Marta ou Laura envai para os demais autores não anexados no email.

Abraço!!E bom fim de semana!

Laura H. I. Leite¹, Saulo R. Tintino^{*2}, Fernando G. Figueredo², Cícera Datiane de M. Oliveira¹, Larissa de Oliveira¹, Ana L. de Albuquerque Siebra¹, Renata de S. Sampaio¹, Augusti Boligon⁴, Daniele O. Souza¹, Margareth Linde Athayde⁴, Henrique D. M. Coutinho², José G. M. Costa³ Irwin R. A. Menezes¹, Marta R. Kerntopf¹.

----- Forwarded message -----

From: **José Luis Martínez Salinas** <editor.blacpma@usach.cl>

Date: 2014-03-08 11:35 GMT-03:00

Subject: Desde BLACPMA

To: Saulo Tintino <saulorelison@gmail.com>

Estimado Dr. Tintino:

Con fecha 8 de Marzo de 2014 su artículo BLACPMA N° 769 ha sido aceptado. Debe tener mucha paciencia para recibir en las próximas semanas las Pruebas de Galera.

Le saluda agradeciendo la confianza puesta en nuestro Boletín

José L Martínez
Editor Jefe

Aceite do Trabalho de Pedro

Entrada x

**Henrique Douglas Coutinho**

11:12 (Há 1 dia) ☆



para Pedro, Jéssica, Tássia, Lívia, mim, Edinardo ▾

Saudações a todos. Tenho prazer de informar que o artigo de Pedro foi aceito para publicação na Revista Comunicata Scientiae (B2 Biodiversidade).

Um abraço a todos e vamos em frente.

Abaixo encaminho o título do artigo e os autores para atualização do lattes:

P.S. - Por favor, edinaldo e fernando, confirmem se os e-mails que eu mandei para os demais autores se estão corretos. Se estiverem errados, por favor, encminhem este e-mail para eles.

Um abraço.

Modulação da atividade antibacteriana do tecido adiposo da *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus 1758)

PEDRO E. A. DE AQUINO, JÉSSICA L. A. LEITE, TÁSSIA T. A. M. GUEDES, LIVIA M. G. LEANDRO, FERNANDO G. FIGUEREDO, HENRIQUE D. M. COUTINHO, EDINARDO F. F. MATIAS.

...

 **Henrique Douglas Coutinho** 14 de nov ☆
para Lavouisier, Edson, Doanny, Bruno, mim, Fernando, Glaucia, Sai ▾

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês ×

Saudações a todos. Tenho o prazer de informar que nosso artigo foi aceito no African Health Sciences (IF=0,5; B2 em biodiversidade). Parabéns a todos e vamos em frente.

P.S. - Lavouisier, encaminhe este e-mail para albertina e beatriz, pois não tenho o e-mail delas;
Micheline, encaminhe este e-mail para emídio e para o pessoal do LTF.

Um abraço e segue o título e autores para atualização do lattes.

**EVALUATION OF ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL AND
MODULATORY ACTIVITY OF METHANOL AND ETHANOL
EXTRACTS OF *Padina sanctae-crucis***

Lavouisier F.B. Nogueira¹, Edson C. Morais¹, Maria A.D. Brito¹, Beatriz S. Santos¹, Doanny L. Vale¹, Bruno F.F. Lucena¹, Fernando G. Figueredo¹, Glaucia M.M. Guedes², Saulo R. Tintino², Celestina E. S. Souza², Raquel B.S.S. Nogueira³, Edinardo F.F. Matias², Maria F.B. Morais-Braga², Emídio V.L. Cunha³, Micheline A. Lima³, Henrique D.M. Coutinho

----- Forwarded message -----

From: <kabaleimc@gmail.com>

Date: 2013/11/14

Subject: African Health Sciences - Decision on Manuscript ID WKRO-2013-02-0083.R1

To: hdmcoutinho@gmail.com

13-Nov-2013

Dear Dr. Coutinho:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EVALUATION OF ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL AND MODULATORY ACTIVITY OF METHANOL AND ETHANOL EXTRACTS OF *Padina sanctae-crucis*" in its current form for

----- Forwarded message -----

From: **MSc. Dra Ana Ibis García Hernández** <revistaplant@infomed.sld.cu>

Date: 2014-03-19 15:30 GMT-03:00

Subject: [RCPM] Atividade antibacteriana e moduladora de Cecropia pachystachya-Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos

To: **Saulo** Relison Tintino <saulorelison@gmail.com>

Estimado Investigador **Saulo**, su artículo fue aprobado para ser publicado en el Vol 19 No 3, ahora continúa en el proceso de edición maquetación, más adelante si necesita una carta de aceptación cuando terminemos de conformar el número, se la enviamos o usted nos la pide, pues este número no sale hasta julio 2014.

Saludos Cordiales. Dra. Ana Ibis.
Revista Cubana de Plantas Medicinales
<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla>

--

Este mensaje le ha llegado mediante el servicio de correo electrónico que ofrece Infomed para respaldar el cumplimiento de las misiones del Sistema Nacional de Salud. La persona que envía este correo asume el compromiso de usar el servicio a tales fines y cumplir con las regulaciones establecidas

Infomed: <http://www.sld.cu/>

Respetados autores

Hemos tomado una decisión sobre su envío a Acta Biológica Colombiana, "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DE AMINOGLICOSÍDEOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPP".

Nuestra decisión es: Que el manuscrito es aceptado con correcciones menores. En la pagina web y anexo encontraran los comentarios de dos evaluadores, que han emitido concepto favorable sobre su manuscrito. Uno de los revisores sugiere para mayor visibilidad que su manuscrito sea cambiado al ingles. Esa misma recomendación hacemos a todos nuestros autores.

Esperamos version con pequeño cambios y si consideran nueva version en ingles sera bienvenida. Para el Mayo 30. Estamos haciendo publicaciones de la version aprobada online para mas rapida visualización de sus resultados.

Saludos cordiales,

Nubia Estela Matta Camacho
Editora Acta Biológica Colombiana. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia
Teléfono 3165000 ext 11337
nemattac@unal.edu.co
Nubia Estela Matta Camacho MSc. Ph.D
Editora Acta Biológica Colombiana
Profesora Titular. Departamento de Biología

In: Gentamicin
 Editor: Emilie Kruger

ISBN: 978-1-62808-841-0
 © 2013 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 3

**USE OF NATURAL PRODUCTS TO ENHANCE
 THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF GENTAMICIN
 AND OTHER AMINOGLYCOSIDES:
 THE FUTURE OF ANTIBIOTIC THERAPY**

*Cícera Natalia Figueirêdo Leite Gondim¹,
 Nadghia Figueiredo Leite¹, Jacqueline Cosmo Andrade¹,
 Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga¹,
 Glaucia Morgana de Melo Guedes¹,
 Saulo Relison Tintino¹, Cícera Cislânia Araújo Tavares¹,
 Maria Audilene de Freitas¹,
 Liscássia Beatriz Batista Alencar¹,
 Celestina Elba Sobral de Souza¹,
 Rosimeire Sabino Albuquerque¹,
 Edinardo Fagner Ferreira Matias¹,
 Francisco Assis Bezerra da Cunha¹,
 Dara Isabel Vieira de Brito¹,
 Anne Karyzia Lima Santos de Lavor¹,
 João Victor de Alencar Ferreira¹,
 Fernando Gomes Figueredo¹, Luciene Ferreira de Lima¹
 and Henrique Douglas Melo Coutinho²*

¹Departamento de Ciências Biológicas, ²Departamento de Química
 Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

Complimentary Contributor Copy

article/chapter.

Edited Book Title: *Ferns: Biology, Cultivation and Implications for the Environment*

Proposed Chapter Title: *Ferns as protective agents against the contamination with mercurium chloride: the example of *Pityrogramma calomelanos* and a short review*

I sign for HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO (28/APRIL/2014) and accept responsibility for transferring copyright of this article to NOVA.

I am a Government Employee and there is no copyright to transfer. I affirm the authors' warranties in points 1 and 2 above.

Author's Name: HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO Affiliation: URCA

Signature: 