



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

LUCIENE FERREIRA DE LIMA

Avaliação do potencial citoprotetor de *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link. contra o efeito do mercúrio

CRATO – CE

2014

LUCIENE FERREIRA DE LIMA

Avaliação do potencial citoprotetor de *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link. contra o efeito do mercúrio

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 e Microbiologia).

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas M. Coutinho

CRATO – CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

L732a Lima, Luciene Ferreira de.

Avaliação do potencial citoprotetor de *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link, contra o efeito do mercúrio / Luciene Ferreira de Lima . – 2014.

67f. il. color, enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional do Cariri, Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, Crato, 2014.

Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais e Microbiologia

Orientação: Prof. Dr. Henrique Douglas M. Coutinho

1. Samambaia. 2. Citoproteção. 3. Antioxidantes. I. Título.

CDD 575

---

## **LUCIENE FERREIRA DE LIMA**

Avaliação do potencial citoprotetor de *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link. contra o efeito do mercúrio

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.

**Aprovada em 05 de Setembro de 2014**

### **Examinadores:**

---

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

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa** – Avaliador Externo  
Departamento de Biologia Molecular – UFPB

---

**Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes**– Avaliador Interno  
Departamento de Química Biológica – URCA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marta Regina Kerntopf** – (SUPLENTE).

Dedico a meus amados pais, Francisco José de Lima e Maria das Dores Ferreira de Lima, a minha querida avó Rosa de Lima, meus irmãos Luciano Ferreira de Lima e Verônica Ferreira de Lima, e em especial aos Príncipes da Família: Gabriel Zacarias de Lima e Luiz Salvanyo Teixeira de Lima, amores da titia.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sua imensa misericórdia. A Ti toda honra, toda glória por todo o sempre.

Ao meu Orientador Professor **Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**, por ter aceitado me orientar, pelos incentivos, ensinamentos e oportunidades. Sempre nos direcionando pelo caminho correto e mostrando que somos capazes de tudo e mais um pouco.

Ao Professor **Dr. Irwin Rose Alencar Menezes**, pelas suas contribuições e ensinamentos neste trabalho.

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

Ao Professor **Me. Edinardo Fagner** pelo grande incentivo e apoio.

À querida **Me. Flaviana Moraes-Braga** pelo seu acolhimento amoroso, sempre solícita e preocupada com todos. Obrigada por demonstrar uma humanidade sem igual, aprendi muito com você.

A meu colega e amigo **Fernando G. Figueredo**, aprendi demais com você e sempre levarei comigo essa frase de perseverança: “Vai dar tudo certo!” (“Já deu né?”)

A minha amiga **Jacqueline Cosmo** pelo incentivo para fazer o mestrado e também a **Danny Souza, Norma Fernandes, Tânia Francelino, Mariana Andrade, Gerlânia Leite e Jacielly Matos** por compartilharem comigo momentos de conquista e felicidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, **Saulo Tintino, Dara Izabel, Elba Souza, Francisco Cunha, Joara, Ivanildo, Karyzia Lima, Nadghia Leite, Rosimeire Sabino, Audilene, Gioconda, João Vítor** pelo companheirismo e conhecimentos.

Aos **coordenadores, professores e funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, em especial ao Professor **Dr. Pimentel**, grande educador.

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

À **Universidade Regional do Cariri**.

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

**“A maior glória na vida não é nunca cair, mas  
se levantar depois de cada queda”.**

*Nelson Mandela*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.....	16
Figura 2 Observação da área superficial e abaxial de <i>P. calomelanos</i> (L.) Link .....	26
Figura 3 Exemplares de samambaias com bioatividade descrita no texto .....	29
Figura 4 Município de Crato (em amarelo), Ceará, Brasil .....	32
Figura 5 Localização da área de coleta de <i>P. calomelanos</i> (Parque Granjeiro, Crato - CE, Brasil) .....	32
Figura 6 Hábito de <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link.....	33
Figura 7 Placas de microdiluição (a); Esquema da placa de petri para leitura da CBM e CFM (b).....	35
Figura 8 Gráfico demonstrativo da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à <i>E. coli</i> e <i>C. krusei</i> , respectivamente, na presença e na ausência do extrato etanólico de <i>P. calomelanos</i> (L.) Link e suas frações..	40
Figura 9 Gráfico demonstrativo da Concentração Fungicida Mínima (CFM) da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à <i>E. coli</i> e <i>C. krusei</i> , respectivamente, na presença e na ausência do extrato etanólico de <i>P. calomelanos</i> (L.) Link e suas frações..	41



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração Efetiva (CE <sub>50</sub> ) do Teor de Fenóis Totais e Flavonóides com Extrato Etanólico, Fração Metanólica e Acetato de Etila de <i>P. calomelanos</i> (L.) Link... ..	37
Tabela 2 Concentração Efetiva (CE <sub>50</sub> ) do Teste de Quelação de Ferro e Teste FRAP com Extrato Etanólico, Fração Metanólica e Acetato de Etila de <i>P. calomelanos</i> (L.) Link.....	38

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

As – Arsênio  
ATCC – American Type Culture Collection  
CA – *Candida krusei*  
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
CBM– Concentração Bactericida Mínima  
CFM– Concentração Fungicida Mínima  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
DMSO – dimetilsulfóxido  
EC – *Escherichia coli*  
EEPC – extrato etanólico de *P. calomelanos*  
*et al* – e outros; e colaboradores (latim)  
FAEPC – fração acetato de etila de *P. calomelanos*  
FMPC – fração metanólica de *P. calomelanos*  
FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching  
FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
HCDAL– Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima  
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)  
UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro  
URCA – Universidade Regional do Cariri

## RESUMO

Os metais pesados exercem ação inibitória nos diversos organismos atuando no seu crescimento, morfologia, metabolismo e também na sua reprodução. A espécie de samambaia estudada é capaz de bioacumulação de metais em suas partes vegetais através da fitoextração, método de biorremediação de solos contaminados. Baseado nessa capacidade foram realizados testes de citoproteção com modelos *in vitro*, objetivando a avaliação do potencial citoprotetor de *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link. de seu extrato etanólico e das frações acetato de etila e metanólica, contra o potencial tóxico do cloreto de mercúrio frente à *E. coli* e *C. krusei*. O material vegetal foi preparado para os testes de quelação de ferro, atividade antioxidante (FRAP) e ainda estimação de flavonóides e fenóis totais, assim como, os microrganismos foram reavivados em meios de cultura específicos para serem utilizados nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), no teste de concentração microbicida mínima (CBM e CFM) da atividade tóxica do mercúrio. As análises estatísticas seguiram a ANOVA com teste *post hoc* de Tukey e a regressão linear foi utilizada para mensurar as Concentrações Efetivas (CE<sub>50</sub>) e o coeficiente de correlação de pearson foi realizado para verificar a relação dos resultados químicos com a CBM e a CFM. Diferenças em  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas. Os testes químicos evidenciam a presença de flavonóides (EEPC: 35,65; FMPC: 7,18; FAEPC: 46,67) e fenóis totais (EEPC: 151; FMPC: 61,12; FAEPC: 118,44) em quantidade de mg/g de quercetina e ácido gálico, respectivamente. O teste de FRAP e quelação de ferro também demonstraram resultados satisfatórios evidenciando capacidade redutora no extrato e nas frações, principalmente na fração metanólica e capacidade quelante em ambos, com ação mais acentuada na fração acetato de etila (65,83 mg equivalentes de FeSO<sub>4</sub>/ g de amostra). Para os resultados de CFM e CBM, a CBM demonstrou melhor resultado comparado a CFM, pois o extrato (CBM: 314,98Mm ou 1270%; CFM: 19,69μm ou 146%) e as frações (CBM: FMPC: 194,85μM ou 785%; FAEPC: 157,40μM ou 634% e a CFM: FMPC: 39,37 μM ou 293%; FAEPC: 24,80 Mm ou 185%) da samambaia estudada foi capaz de inibir a ação do mercúrio sobre a espécie *E. coli* tanto do extrato como das frações, o que não ocorreu com o extrato na CFM na presença de *C. krusei*. A presença de teores de fenóis totais e flavonóides, fortalecem a possível ação dos metabólitos secundários atuando como antioxidantes do mercúrio evidenciados no teste de FRAP. No coeficiente de pearson se pode verificar uma correlação direta com a presença de fenóis totais, a atividade redutora e a concentração bactericida mínima já que todos os valores foram quase 1.0. Esse é o primeiro relato da ação citoprotetora por parte da samambaia *P. calomelanos* em teste *in vitro*. A partir desses resultados conclui-se que o extrato e a frações de *P. calomelanos* podem ser uma alternativa para citoproteção contra o metal pesado, o mercúrio, em microrganismos como bactéria e fungo.

**Palavras-chave:** samambaia, cloreto de mercúrio; citoproteção; fenóis totais, atividade antioxidante, *Pityrogramma calomelanos*

## ABSTRACT

Heavy metals exert inhibitory action on various bodies acting in their growth, morphology, metabolism, and also in its reproduction. The species studied fern is capable of bioaccumulation of metals in their plant parts through phytoextraction, method of bioremediation of contaminated soils. Based on this ability to cytoprotection tests with in vitro models were conducted, aimed at evaluating the potential cytoprotective *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link. ethanolic extract and its fractions of ethyl acetate and methanol, against the toxic potential of mercuric chloride for *E. coli* and *C. krusei*. The plant material was prepared for testing for iron chelation, antioxidant activity (FRAP) and still allowed flavonoids (EEPC: 35,65 ; FMPC: 7,18; FAEPC: 46,67) and phenolics (EEPC: 151; FMPC: 61,12; FAEPC: 118,44), as well as the microorganisms were revived in particular for use in the Minimum Inhibitory Concentration test culture media (CIM ), the minimum microbicidal concentration (MBC and CFM) of mercury toxic activity test. Statistical analysis ANOVA followed by post hoc Tukey test and linear regression was used to measure the Effective Concentration (EC<sub>50</sub>) and the Pearson's correlation coefficient was performed to investigate the relationship between chemical results with CBM and CFM. Differences at p <0.05 were considered statistically significant. Chemical tests show the presence of flavonoids and phenolics in amount of mg / g of quercetin and gallic acid, respectively. The FRAP test and iron chelation also showed satisfactory results showing reductive capacity in the extract and the fractions, especially in the methanol fraction and chelating ability on both, with sharper action in the ethyl acetate fraction (65.83 mg equivalent to FeSO<sub>4</sub> / g sample). For results CFM and CBM, CBM showed better results compared to CFM as the extract (CBM: 314,98Mm or 1270%; CFM: 19,69µm or 146%) and fractions (CBM: FMPC: 194,85µM or 785%; FAEPC: 157,40µM or 634% and CFM: FMPC: 39,37 µM or 293%; FAEPC: 24,80 Mm or 185%) fern studied was able to inhibit the action of mercury on the species *E. coli* extract as much of the fractions, which does not occurred with the extract in the CFM presence of *C. krusei*. The presence of total phenol and flavonoids, can strengthen the action of secondary metabolites acting as antioxidants evidenced mercury in the FRAP test. In pearson coefficient can be seen a direct correlation with the presence of phenolic compounds, the reductive activity and the minimum bactericidal concentration since all values were almost 1.0. This is the first report of cytoprotective action by fern *P. calomelanos* in vitro test. From these results it is concluded that the extract and fractions of *P. calomelanos* may be an alternative for cytoprotection against the heavy metal, mercury, in microorganisms as bacteria and fungus.

**Keywords:** fern, mercuric chloride; cytoprotection; total phenols; antioxidant activity, *Pityrogramma calomelanos*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Material vegetal.....	16
3.2 Microrganismos.....	16
3.3 Meios de cultura.....	17
3.4 Inoculação de microrganismos.....	17
3.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	18
3.6 Avaliação do potencial citoprotetor em modelo microbiano contra cloreto de mercúrio.....	18
3.7 Ensaio FRAP - Método de Redução do Ferro.....	18
3.8 Fenóis totais.....	19
3.9 Flavonóides.....	19
3.10 Atividade quelante de ferro.....	19
3.11 Análise estatística.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1 Samambaias como agentes de proteção contra a contaminação com cloreto de mercúrio: o exemplo da <i>Pityrogramma calomelanos</i> Linnaeus Link e uma pequena revisão.....	22
5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

### APÊNDICE

APÊNDICE A - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS VINCULADAS AO PROJETO

APÊNDICE B – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS NÃO VINCULADAS AO PROJETO

## 1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados são substâncias altamente tóxicas e dependendo da concentração armazenada no organismo vivo ou no ambiente que pode causar danos (AGUIAR et al., 2002). Em baixas concentrações, alguns metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde bactérias e plantas até o ser humano, porém, sua característica biocumulativa, ao atingir altas concentrações, podem causar toxicidade e afetar o crescimento e a reprodução nos sistemas biológicos (CELERE et al., 2007).

De acordo com Demirak (2006), citado por Andrade (2011) 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 tornando um dos maiores problemas ambientais da atualidade.

Os metais pesados tóxicos em pequenas quantidades são o Berílio, Alumínio, Cádmio, Chumbo, Urânio, Plutônio, e ainda os semimetais Arsênio, Selênio e o Antimônio (LÁZARO, 2008) e dentre estes metais, o Mercúrio (Hg) é considerado um poluente de alto risco (LIN e PEHKONEN, 1999) e não essencial ao metabolismo (WINDMÖLLER et al., 2007). Este tem a capacidade de acumulação no solo por tempo prolongado, e em ambientes aquáticos bioacumula na cadeia biológica (BISINOTI e JARDIM, 2004; MIRANDA et al., 2007), por exemplo, nos peixes, presente na dieta de vários seres, que o metaboliza lentamente por cerca de um a três anos (NASCIMENTO e CHASIN, 2001).

Além da dieta, os organismos adquirem este metal a partir da água, do ar (BISINOTI e JARDIM, 2004), assim como o exemplo da Baía de Minamata (Japão) onde dejetos industriais da companhia Chisso Fertilizer contendo mercúrio causou contaminação no ambiente aquático (NAOTO et al., 2001). Nos ambientes aquáticos, os microrganismos são responsáveis pela ciclagem aquática do Hg, sendo esse ambiente aeróbico ou anaeróbico, o mercúrio é metilado pelo metabolismo microbiano (MIRANDA et al., 2007; GRAZZIOTIN, 2010), bioacumulando, podendo ser utilizado no monitoramento global de poluição (MARINS et al., 2004).

Em ambiente terrestre os microrganismos também são responsáveis pela ciclagem do carbono, produção de nutrientes e na fertilidade, além de influenciar a relação das plantas com o solo (SIQUEIRA et al., 1994). No solo, a contaminação por metais pesados é

determinada por um conjunto de elementos do mesmo e fatores químicos, físicos e biológicos que influem na reatividade do ambiente. O Hg possui alta afinidade com matéria orgânica formando complexos solúveis e insolúveis capazes de serem absorvidos por plantas, por intermédio da rizofiltração. No organismo de plantas capazes de bioacumular metal, este pode sofrer os processos de fitovolatilização, fitoextração, fitodegradação, ou fitoestabilização, processos de fitorremediação do solo (LÁZARO, 2008).

Alguns estudos de fitorremediação de metais pesados foram realizados utilizando samambaias, e a *Pityrogramma calomelanos* e *Pteris vittat*, entre outras plantas do cerrado se mostraram capazes de acumular arsênio quando presentes em solo (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA, 2012). Estudos complementares apresentaram a *Thelypteris salzmannii* e a *Dicranopteris flexuosa* como samambaias que podem ser utilizadas para a reabilitação de áreas contaminadas, sendo a mais expressiva para o As a segunda citada (SCHENEIDER et al., 2012).

Baseando-se na premissa de acumulação de metais pela espécie *Pityrogramma calomelanos*, foram realizados testes de citotoxicidade com modelos *in vitro*, objetivando a avaliação do potencial citoprotetor de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. (extrato etanólico e frações) quanto ao potencial tóxico do cloreto de mercúrio frente à *E. coli* e *C. krusei*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar na espécie *Pityrogramas calomelanos* Linnaeus Link. o potencial citoprotetor ao cloreto de mercúrio frente a cepa bacteriana e fungica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a resistência microbiana ao cloreto de mercúrio combinado ao extrato bruto e as frações acetato de etila e metanólica de *P. calomelanos*;
- Quantificar a presença de compostos antioxidantes e quelantes no extrato bruto e nas frações de *P. calomelanos*;
- Avaliar os possíveis efeitos de citoproteção com a presença de compostos antioxidantes e quelantes no extrato bruto e nas frações de *P. calomelanos* .



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

O extrato etanólico de *P. calomelanos* e as frações acetato de etila e metanólica de *P. calomelanos* foram cedidas por Me. Teógenes M. Souza. Uma exsiccata do material está depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) sob o registro: (5570).

**Figura 1** *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.



Fonte: Cedida pela Me. Maria Flaviana Morais-Braga

#### 3.2 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.

#### 3.3 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda), para reavivamento dos microrganismos e Caldo *Sabouraud* Dextrose para

os testes com cepas fúngicas, ambos foram preparados de acordo com as especificações do fabricante, e o Meio mínimo M9 TRIS composto por solução de sais (KCl – 3,725g; NaCl – 1,24g; NH<sub>4</sub>Cl – 2,5g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O – 0,115g) enriquecido com glicose a 20% (SAMBROOK et al., 1989) utilizado para os testes com cepas bacterianas. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave à 121°C, 1atm por 20 minutos.

### **3.4 Inoculação dos microrganismos**

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

### **3.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A determinação da 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<sup>5</sup> Unidades Formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) Uma solução contendo 900 µL BHI a 10% e 100 µL do inóculo foi colocado em cada um dos *ependorfs*<sup>®</sup>. 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, sendo a última cavidade reservada para controle. As concentrações das amostras nos poços variaram de 512-8 µg/mL. 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). Um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antimicrobiana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade.

### 3.6 Avaliação do Potencial Citoprotetor em Modelo Microbiano contra Cloreto De Mercúrio

Para a avaliação do efeito protetor do extrato e das frações de *P.calomelanos* contra o metal pesado, foram preparados *eppendorfs*<sup>®</sup> contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões de  $10^5$  UFC/mL de *E. coli* em meio M9 Tris com 20% de glicose e *eppendorfs*<sup>®</sup> com  $10^5$  UFC/mL de *C. krusei* em meio *Sabouraud* a 10%. Cada solução foi distribuída nas cavidades da placa de 96 poços. Logo em seguida 100  $\mu$ L de cloreto de mercúrio foi adicionado na maior 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  $\mu$ M. As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 35 °C, em estufa.

Em seguida, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram determinadas como as menores concentrações capazes de matar o crescimento dos microrganismos. Foi utilizado placas de petri com HIA para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição. Uma alíquota de cada poço da placa de microdiluição foi subcultivada em placas de Agar Heart Infusion – HIA. Após 24 horas de incubação a 35 °C, realizou-se leitura, com a finalidade de observação do crescimento das colônias. As leituras das CBM 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 e CARTWRIGHT, 1985).

### 3.7 Ensaio FRAP – Método de Redução do Ferro

Uma modificação no método de Benzie e Strain (1999) para o teste de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) foi realizada para as análises das amostras. As soluções estoque incluem um tampão acetato 300 mM de pH 3,6, TPTZ (2,4,6 –tripirydyls-Triazina) 10 mM em 40 mM HCl e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 Mm na proporção de 10:01:01 no momento da utilização.

As amostras (0,15 mL) foram misturadas para reagir com 2,85 mL de solução de FRAP durante 30 minutos no escuro em temperatura ambiente, após isso, as amostras foram mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda 593nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de  $\text{FeSO}_4$ /g de amostras, interpolando este valor na curva de

calibração construída com os padrões de  $\text{FeSO}_4$ , em diferentes concentrações (125 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.8 Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais foi quantificada adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800  $\mu\text{L}$  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 em diferentes concentrações (300 a 5  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.9 Flavonoides

Foram preparadas soluções do extrato e frações (800 a e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 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 absorvância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonoides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões da quercetina, utilizando diferentes concentrações (200 a 0,78  $\mu\text{g/mL}$ ) diluída em etanol 80%.

### 3.10 Atividade Quelante de Ferro

A metodologia utilizada foi de Benzie e Strain, (1996) e Benzie e Szeto (1999) adaptada para o ensaio. O princípio baseia-se na formação do complexo O-fenantrolina- $\text{Fe}^{2+}$  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  $\mu\text{M}$ ) e 2 mL de várias

concentrações das amostras (125 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) 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  $\text{FeSO}_4$  (doses graduais 500 - 3000 $\mu\text{g/ml}$ ). A atividade quelante foi expressa em equivalentes g de  $\text{FeSO}_4$  por g de extrato e os valores foram apresentados como média das análises da triplicata.

### **3.11 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada através do *software* v4.0 Prisma™ (GraphPad® Software, San-Diego, Califórnia, EUA). Todos os ensaios químicos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) através da Análise de variância (ANOVA) por uma via pelo teste *post hoc* de Tukey. Modelos de regressão linear foram gerados para analisar os resultados das  $\text{CE}_{50}$  e através do coeficiente de Pearson (r), foi avaliada a correlação entre os resultados obtidos neste trabalho. Diferenças em  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **PRODUÇÃO DERIVADA DO PROJETO**

Caro leitor o presente trabalho teve como resultado a produção de um capítulo de livro intitulado: “Samambaias como agentes de proteção contra a contaminação com cloreto de mercúrio: o exemplo da *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link e uma pequena revisão” submetido e aceito pela editora *Nova Sciences Publishers*.

#### 4.1 Samambaias como agentes de protecção contra a contaminação com cloreto de mercúrio: o exemplo da *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link e uma pequena revisão

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

**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, Dara Izabel V. de Brito, Anne Karyzia L. S. Lavor, Ednardo Fagner F. Matias, Antonio J. T. Machado, Irwin R. A. Menezes e Henrique D. M. Coutinho**

**\* Autor para correspondência:**

**Henrique Douglas Melo Coutinho**

**Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, 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: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com)**

## Resumo

As Pteridófitas apresentam-se em diversos ecossistemas mundiais, desde regiões ártico-alpinas a florestas tropicais úmidas. No entanto, samambaias e licófitas também podem ocorrer em regiões semi-áridas do Brasil conhecida como Caatinga e no estado de Minas Gerais, sendo o gênero mais abundante o *Anemia*. Estima-se que existam cerca de 45.000 a 60.000 espécies vasculares no Brasil o que representa 20% da flora mundial. As evidências fossilíferas demonstram o sucesso ecológico ao longo da história da Terra das plantas vasculares, registros informam que possivelmente as pteridófitas habitam a Terra desde o final do período Devoniano e início do período Carbonífero e de acordo com a moderna análise Cladística existem samambaias datadas do Período Triássico Superior. As pteridófitas são muito utilizadas pelo homem, desde o uso como plantas ornamentais, como matéria-prima para a fabricação de artesanatos, como cosméticos, na alimentação e na medicina popular. Estudos na Índia, no distrito de Darjeeling, extratos de *Cyclosorus interruptus* (Willd) H.I. e de *Gleichenia microphylla* R.Br, *Microsorium pteropus* (Bl.) e *Athyrium filix-femina* (L.) apresentaram potencial antibacteriano. As pteridófitas também podem ter ação antiparasitária, no qual o estudo evidenciou a atividade tripanocida, antileishmania por parte da *Pityrogramma calomelanos* L. (Link). Para aprofundar o conhecimento sobre a *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link foram realizados testes de citoproteção em modelo fúngico e bacteriano contra um metal pesado capaz de produzir radicais livres, o cloreto de mercúrio. os resultados demonstraram ser satisfatórios para *P. calomelanos*, possivelmente isso se deve aos seus componentes antioxidantes evidenciados nos testes de FRAP, Fenóis totais e Flavonóides e ainda no teste de quelação. Esse trabalho é o primeiro relato da ação citoprotetora por parte de uma samambaia e esse estudo teve como base bibliografias que indicaram a capacidade de fitorremediação de solos contaminados por metais que utilizaram tanto a *P. calomelanos* como outras samambaias. A análise da *P. calomelanos* (L.) Link em teste de citoproteção demonstrou efeito antagônico tanto na presença de bactérias com de fungos, e a partir disso, pode-se evidenciar mais uma bioatividade por parte de uma pteridófita.



## Introdução

O termo “Pteridófitas” se refere a plantas vasculares sem sementes (PRADO, 2005), esse termo é usado tradicionalmente, o que não remete a real classificação dessas plantas. Uma nova classificação foi estabelecida por estudos de SMITH et al. (2006; 2008) a partir de dados morfológicos em cloroplastos, mitocôndrias e no núcleo das células do grupo parafilético Pteridófitas. A partir de marcadores moleculares do cloroplasto (*rbcL*, *atpA*, *atpB*, *accD*, *rps4*, 16SrDNA, ITS), um marcador molecular nuclear (18S DNAr) e marcadores mitocondriais (*atp1*, *nad2*, *nad5*) a classificação das samambaias tornou-se monofilética, no qual as plantas vasculares distinguem-se entre licófitas e as eufilófitas, sendo esta última dividida em espermatófitas e monilófitas (samambaias).

As monilófitas são plantas com sementes livres (esporos), vasculatura distinta com protoxilema confinado a lobos do cordão do xilema (PRYER, 2004) e esses organismos reproduzem-se por alternância de gerações em duas fases, a gametofítica e a esporofítica (PRYER, 2004; TRYON e TRYON, 1982).

As monilófitas apresentam-se em diversos ecossistemas mundiais, desde regiões ártico-alpinas a florestas tropicais úmidas (PAGE, 1979). Ocorre em toda a extensão do Brasil e é dependente da umidade relativa do ar elevada, sombra e temperaturas amenas (PRADO, 2003), essa característica torna seu ciclo de vida dependente de água disponível no ambiente para a germinação dos esporos e durante a fecundação (BARROS et al., 2002). No entanto, registros de Xavier, Barros e Santiago (2012) demonstraram que samambaias e licófitas também podem ocorrer em regiões semi-áridas do Brasil conhecida como Caatinga e no estado de Minas Gerais, sendo o gênero mais abundante o *Anemia*.

Ainda nesses termos, as plantas vasculares possuem grande tolerância a altas temperaturas, com grande luminosidade e escassez de água como ocorre em ambientes desérticos. Um exemplo é a *Sphaeropteris cooperi* que sobrevive a uma temperatura de 41 °C, e ao excedê-la passa a não produzir clorofila suficiente (HIETS, 2010); as samambaias *Polypodium vulgare* e *Selaginella lepidophylla* também sobrevivem em temperaturas altas (KAPPEN, 1966; EICKMEIER, 1986 apud HIETS, 2010).

## Família Pteridaceae e a espécie *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link

A morfologia dessa família é muito diversificada, sendo difícil distinguí-la através de uma única característica. Possui distribuição ampla, ocorrendo em regiões tropicais e

subtropicais (PERES, et al., 2004) e em ecossistemas de grande variedade de microhabitats ao nível do mar e também em elevadas altitudes. Ocorrem em regiões ártico-alpinas ao interior de florestas tropicais úmidas, em áreas subdesérticas no interior dos continentes até regiões rochosas costeiras e mangues (MELO e SALINO, 2002 apud PAGE, 1979). Apresenta grande heterogeneidade morfológica, a qual constitui diversidade de grupos de gêneros, reunidos em tribos ou subfamílias (PRADO e WINDISCH, 2000).

Segundo SMITH et al. (2006) a família Pteridaceae possui 50 gêneros, 1000 espécies, sendo que 10% é representada por samambaias leptosporangiate. A mais recente classificação dessa família, pode distingui-la em família Pteridaceae e família Vittariaceae. A família Pteridaceae posteriormente foi agregada em seis subfamílias: Adiantoidae, Ceratopteridoideae, Cheilanthoideae, Platyzomatoideae, Pteridoideae e Taenitidoideae (TRYON et al., 1990; KRAMER, 1990). Essa família possui alguns clados que estão caracterizados por suas preferências ecológicas. Pensa-se que a diversificação nesta família se deu pela influencia ecológica fazendo com a mesma obtivesse um sucesso estável em diversos ambientes: terrestres, epífitico e aquáticos (manguezais, pântanos de água doce) (SCHUETTPELZ et al., 2007).

O gênero *Pityrogramma* contém 17 espécies, sendo que 12 espécies apresentam-se na América Tropical e é comum em bordas de trilhas e estradas e em áreas sob ação antrópica, de alta ou baixa elevação (PRADO, 2005).

A espécie *P. calomelanos* (L.) Link é da família Pteridaceae e subfamília Pteridoideae (LINDSAY e MIDDLETON, 2014) caracteriza-se pela presença na lâmina foliar de uma cera branca ou amarelada recobrimdo parte da superfície abaxial e pelos esporângios dispostos ao longo das nervuras (PRADO, 2005). É uma planta terrestre, encontrada em vários estados, se estendendo por todo o território nacional (MORAN, 1995).

Tem como sinonímia o nome *Acrostichum calomelanos* e é conhecida pelos nomes populares de fetó-branco, avenca-branca ou avenca-preta (CORRÊA, 1984) e é indicada contra distúrbios renais, como adstringente, analgésico, antihemorrágico, depurativa peitoral, emenagogo, antigripal, anti-hipertensivo, antitérmico, antitussígeno e estimulante da circulação sanguínea (MAY, 1978; BARROS e ANDRADE, 1997).

**Figura 2** Observação da área superficial e abaxial de *P. calomelanos* (L.) Link



Legenda: a) Observação parcial da área superficial e abaxial; b) Cera branca na superfície abaxial da lâmina  
 Fonte: Imagens disponibilizadas por Robbin Mooran, New York Botanical Garden, disponível no website [www.plantsystematics.org](http://www.plantsystematics.org).

### Bioatividade das Pteridófitas

As samambaias são muito utilizadas pelo homem, com finalidade ornamental (ABRAHAM, RAMACHANDRAN e SOFIA, 2012), como matéria-prima para a fabricação de artesanatos, cosméticos, na alimentação e na medicina popular (MORAIS-BRAGA, et al., 2012).

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 metabolitos secundários das plantas indicadas para suas diversas enfermidades (MACIEL, et al., 2002).

Estudos de Zhang et al. (2012) mostram análises das partes da samambaia *Dryopteris erythrosora* com bioatividade forte para eliminação de radicais livres devido a presença de flavonóides totais, assim como as pteridofitas *Abacopteris penangiana*, *Huperzia selago*, *Equisetum arvense*, *Dryopteris crassirhizoma*, entre outras, que após análises foram constatadas a presença de componentes antioxidantes como flavan-4-ol glicosídeos, abacopterinas, huperzina A, isoquercetina, ácido di-E-cafeoyl-mesotartárico, entre outros componentes (TALUKDAR et al., 2011).

Um grupo de sete componentes, derivados de chalconas, foram encontrados na samambaia *Cyclosorus parasiticus* com capacidade de causar apoptose em células tumorais.

Foram utilizadas células tumorais de câncer de pulmão, carcinoma hepatocelular, câncer de mama, leucemia e câncer de pâncreas. Dos sete compostos, dois mostraram alta citotoxicidade contra as células do carcinoma hepatocelular (WEI, et al., 2013) assim como nos estudos de Tomšík (2013), que demonstram a presença de compostos fenólicos (flavonóides), esteróides, alcalóides e terpenóides (pterossins) considerados anticancerígenos extraídos das pteridófitas. Contudo, Tomšík sugere que mais samambaias sejam avaliadas, pois os habitats dessas plantas estão sendo devastados, o que pode levar consigo espécies endêmicas e raras com potencial medicinal.

A presença de compostos antioxidantes como flavonóides nas samambaias, mostra a possível capacidade de redução ou eliminação de radicais livres (MIR, SHAKOOR A. et al., 2013; SOARE et al., 2012; SUKUMARAN et al., 2012). A samambaia aquática *Azolla microphylla* foi estudada por Selvaraj et al. (2013) e dois compostos bioativos foram isolados e identificados como rutina e quercetina, compostos polifenólicos com potencial antioxidante. Extratos metanólico e etanólico foram preparados com *Marsilea quadrifolia* por Mathangi e Prabhakaran (2013) para verificar a presença de compostos antioxidantes e seus resultados demonstraram ser positivos para o extrato metanólico de *M. quadrifolia*, assim como o estudo de PONNUSAMY, et al. (2013) ao estudar três samambaias utilizadas na medicina tradicional da Malásia, (*Stenochlaena palustris*, *Drynaria quercifolia* e *Dicranopteris linearis*) contra infecções, evidenciou a atividade antioxidante e antibacteriana.

Ainda na Malásia, investigações *in vitro* de extratos aquosos de *Phymatopteris triloba* foram realizados e estes apresentaram atividade antibacteriana, antiglicosidase e também antioxidante, com a presença de conteúdos de flavonóides, ácidos hidroxicinâmicos, e proantocianidinas. A análise de *Stenochlaena palustris*, muito usada como planta ornamental (LIU et al., 2012) e na medicina tradicional (SINGH e SINGH, 2012; NEYRA, 2013), é uma samambaia com alto potencial antioxidante devido a presença de compostos fenólicos (antocianinas) e com alta especificidade para a atividade quelante de metais (CHAI, 2013; 2012).

Confirmando essa funcionalidade, as espécies de samambaias *P. biaurita*, *L. flexuosam*, *H. arifolia*, *A. radiata* e *A. latifolium* foram estudadas em extratos de benzeno, clorofórmio, metanol, éter de petróleo e em água destilada através de análise fitoquímica. Diversificadamente, apresentaram esteróides, triterpenóides, açúcares redutores, açúcares, alcalóides, compostos fenólicos, flavonóides, catequinas, taninos, antroquinonas e aminoácidos (DE BRITO et al., 2012).

Samambaias estudadas na Inglaterra por Harper, Cooper-driver e Swain (1976) da família Pteridaceae, Sinopteridaceae, Vittariaceae, Dennstardiaceae, entre outras, apresentaram resultados positivos a ação cianogênica, uma defesa desses organismos contra animais, insetos e predadores. Isso ocorre pela hidrólise de glicosídeos cianogênicos que são capazes de liberar ácido cianídrico (HARBORNE, 1984).

Essa capacidade antiinseticida foi reportada pelo estudo de Gracelin et al. (2012) no qual ressaltou a atividade antibacteriana de *A. caudatum* L., *P. argyraea*, *P. confusa*, e *L. microphyllu* em plantas com a mancha-bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv . *centellae*. Conforme a autora, o uso das samambaias seria um método vantajoso, já que os pesticidas causam danos ambientais; e uma característica das pteridófitas é a resistência a patógenos microbianos, fator importante no sucesso evolutivo e na sua permanência por mais de 350 milhões de anos nos mais diversos ambientes (SHARMA e VYAS, 1985).

Um estudo na China evidenciou uma possível atividade inseticida por parte de samambaias e gimnospermas. A utilização dessas plantas não são usuais para a produção de inseticidas, porém de acordo com HUANG et al. (2010) é possível encontrar compostos que se originaram no final do Mesozóico com atividade inseticidas presentes em samambaias e gimnospermas. Seus resultados mostraram uma alta taxa de toxicidade nos modelos testes de *Musca domestica* e *Aedes albopictus*. A *Pteridium aquilinum* foi analisada a partir de seu extrato bruto da planta seca. Os resultados apontaram para a ação repelente e inseticida de todas as formulações da planta, ocasionando efeitos de não-preferência alimentar, redução da sobrevivência e prole animal (LOVATO et al., 2013).

Outros exemplos de atividade antimicrobiana são muito bem relatados por vários autores (PAL et al., 2013; AHMED, et al.; 2012). Espécies conhecidas como *D. quercifolia*, *D. heterophyllum*, *D. lineares*, *B. Orientale* e etc do Western Ghats (India) apresentaram agentes bioativos com largo espectro antimicrobiano (MITHRAJA et al., 2012) assim como *Thelypteris interrupta* (Wild.) e *Marsilea minuta* L. (PANDA et al., 2014). Outros estudos, também na Índia, no distrito de Darjeeling, extratos de *Cyclosorus interruptus* (Willd) H.I. e de *Gleichenia microphylla* R.Br, *Microsorium pteropus* (Bl.) e *Athyrium filix-femina* (L.) apresentaram potencial antibacteriano (PAL, 2012). *Adiantum capillus veneris* apresentou componentes fitoquímicos capazes de ter tanto atividade antibacteriana como antifúngica (ISHAQ et al., 2014).

Confirmando a capacidade antimicrobiana das samambaias, foi estudada a atividade antibacteriana e atividade antifúngica dos extratos etanólico, metanólico e acetato de etila de *Ligodium venustum* na presença de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e antifúngicos

clássicos contra microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. albicans*. Os testes antifúngicos não apresentaram resultados clínicos fortes, contudo, significativamente, os testes antibacterianos apresentaram uma nova alternativa para combater a resistência bacteriana. Os extratos combinados apresentaram uma colaboração sinérgico-agonista com os componentes terapêuticos (MORAIS-BRAGA et al., 2013).

**Figura 3 Exemplos de samambaias com bioatividade descrita no texto**



Fonte: Lindsay, S. & Middleton, DJ (2012 em diante). Samambaias da Tailândia, Laos e Camboja. <http://rbg-web2.rbge.org.uk/thaiferns/>

Uddin et al. (2013) isolaram da pteridófito *Acrostichum aureum* L. (Pteridaceae) por HPLC o composto derivado do ácido éster ftálico o, 2'' - (metoxicarbonil) -5'' - metilpentil 2'-metil-ftalato das partes aéreas da samambaia em um mangue em Bangladesh. Os resultados desse trabalho são promissores para o tratamento contra o vírus da dengue, o vírus da influenza humana e chikungunya.



Além das bioatividades citadas, as pteridófitas também podem ter ação antiparasitária, como no relato de SOUZA (2012a,2012b,2012c) no qual o seu estudo evidenciou a atividade tripanocida, leishmanicida e foi realizada uma análise citotóxica da *Pityrogramma calomelanos* L. (Link), além da atividade antibacteriana associada a aminoglicosídeos, podendo ser mais uma alternativa contra a resistência bacteriana.

Para aprofundar o conhecimento sobre a *Pityrogramma calomelanos* L. (Link). foram realizados testes de citoproteção com a utilização de um metal pesado capaz de produzir radicais livres, o cloreto de mercúrio. Esse teste de citoproteção foi realizado utilizando microorganismos, os resultados demonstraram ser satisfatórios para *P. calomelanos*.

Pensa-se que esse resultado se deve aos seus componentes antioxidantes encontrados em testes de FRAP, fenóis totais e flavonóides e ainda no teste de quelação. Esse é o primeiro relato da ação citoprotetora por parte de uma samambaia. Esse estudo teve como base bibliografias que indicaram a capacidade de fitorremediar solos contaminados por metais que utilizaram tanto a *P. calomelanos* como outras samambaias (FUKUSHI et al., 2003; OLIVEIRA, 2012; OLIVEIRA et al., 2009; FRANCESCONI et al., 2002).

### **ESTUDO DE CASO: Avaliação do potencial antitóxico de *Pityrogramma calomelanos* Linnaeus Link. contra o efeito do mercúrio**

Alguns metais pesados são definidos como elementos metálicos devido a sua densidade que excede  $5,0 \text{ g/cm}^3$  (FÖSTNER e WITTMAN, 1983) e são consideradas substâncias altamente tóxicas, porém a toxicidade depende de sua concentração armazenada no organismo vivo ou ambiente, o que os torna altamente perigosos (FÖSTNER e 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 efeitos nefastos nos organismos (PEIJNENBURG, 2004).

Os metais pesados exercem ação inibitória nos microrganismos atuando no seu crescimento, morfologia, metabolismo e também exercendo pressão seletiva na comunidade microbiana. Agem no bloqueio de grupos funcionais de enzimas e polinucleotídeos e no sistema de transporte de nutrientes, deslocamento e substituições de íons essenciais (PEREIRA et al., 2010).

Relata-se que os metais presentes nos efluentes industriais reduzem a capacidade autodepurativa das águas, devido à ação tóxica que eles exercem sobre os microrganismos

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 nos anos 70 pelas indústrias, e toxidez na sua forma metilada sobre o sistema nervoso central e sua retenção nos sedimentos (MARINS et al., 2004).

Alguns estudos foram realizados utilizando plantas para a fitorremediação de metais pesados com samambaias, e a *Pityrogramma calomelanos* e *Pteris vittat*, entre outras plantas do cerrado se mostraram capazes de acumular Arsênio (As) quando presentes no solo (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA, 2012). Estudos complementares apresentaram a *Thelypteris salzmannii* e a *Dicranopteris flexuosa* como samambaias que podem ser utilizadas para a reabilitação de áreas contaminadas, sendo a mais expressiva para o As a segunda citada (SCHENEIDER et al., 2012).

Baseando-se na premissa de acumulação de metais pela espécie *Pityrogramma calomelanos*, foram realizados testes de citotoxicidade com modelos *in vivo*, objetivando a avaliação do potencial antitóxico de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. (extrato etanólico e frações) quanto ao potencial tóxico do cloreto de mercúrio frente à *E. coli* e *C. krusei*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material Vegetal

Folhas de *P. calomelanos* foram coletadas na encosta da Chapada do Araripe, no município do Crato, sul do Ceará, Brasil (Figura 4 e 5), e os extratos foram preparados por Me. Teógenes M. Souza, o qual cedeu o material para este estudo.

Uma exsicata do material coletado foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA e identificada por Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva e depositada sob o registro: 5570.



**Figura 4 Município de Crato (em amarelo), Ceará, Brasil**



Fonte: <http://www.crato.ce.gov.br/documentos/regiao-metropolitana-do-cariri.pdf>. 20 de junho de 2014

**Figura 5 Localização da área de coleta de *P. calomelanos* (Parque Granjeiro, Crato - CE, Brasil)**



Fonte: [www.earth.google.com](http://www.earth.google.com), 20 de junho de 2014.

**Figura 6 Hábito de *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link.**



Fonte: Cedida pela Me. Maria Flaviana Morais-Braga

### **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.

### **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 a 121°C, a 1atm por 20 minutos.

### **Inoculação dos microrganismos**

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

### **Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

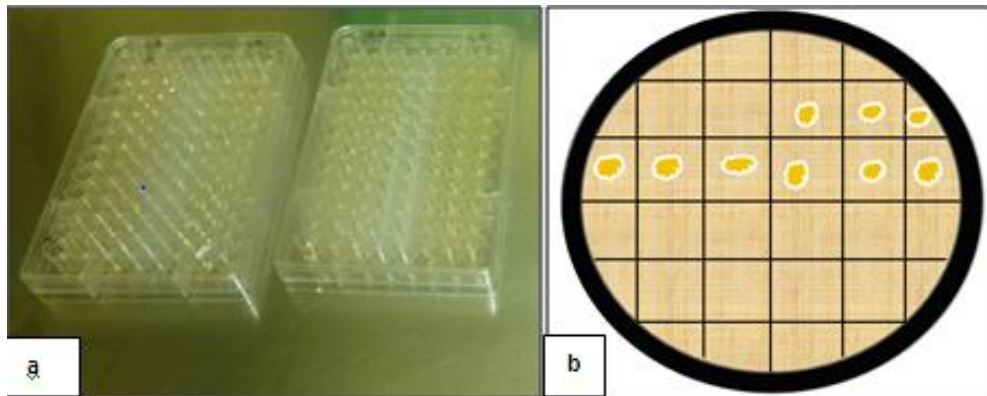
A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. O inóculo foi depositado em solução salina para formar uma suspensão de  $10^5$  UFC/mL. Uma solução contendo 900  $\mu$ L BHI a 10% e 100  $\mu$ L do inóculo foi colocado em cada um dos *eppendorfs*<sup>®</sup>. Em seguida foi distribuído 100  $\mu$ L desta solução em cada cavidade da placa de microdiluição e logo após adicionou-se 100  $\mu$ L do produto natural na primeira cavidade, sendo passado para as demais, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade, sendo a última cavidade reservada para controle. As concentrações das amostras nos poços variaram de 512-8  $\mu$ g/mL. 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  $\mu$ L 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). Um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antimicrobiana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade.

### **Avaliação do potencial citoprotetor em modelo microbiano contra cloreto de mercúrio**

Para a avaliação do efeito protetor do extrato e das frações de *P.calomelanos* contra o metal pesado, foram preparados *eppendorfs*<sup>®</sup> contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões de  $10^5$  UFC/mL de *E. coli* em meio M9 Tris com 20% de glicose e *eppendorfs*<sup>®</sup> com  $10^5$  UFC/mL de *C. krusei* em meio *Sabouraud* a 10%. Cada solução foi distribuída nas cavidades da placa de 96 poços. Logo em seguida 100  $\mu$ L de cloreto de mercúrio foi adicionado na maior 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  $\mu$ M. As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 35 °C, em estufa.

**Figura 7** Placas de microdiluição (a); Esquema da placa de petri para leitura da CBM e CFM (b)



Fonte: autora

Em seguida, a concentração bactericida mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram determinadas como as menores concentrações capazes de matar 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 e CARTWRIGHT, 1985).

### **Ensaio FRAP – Método de Redução do Ferro**

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

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  $37^\circ\text{C}$  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 temperatura ambiente (t), após isso, as amostras foram mensuradas em espcetrofotômetro com

comprimento de onda 593nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de  $\text{FeSO}_4/\text{g}$  de amostras, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de  $\text{FeSO}_4$ , em diferentes concentrações (125 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **Fenóis totais**

A quantidade de fenóis totais, realizada em triplicata, foi determinada adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 em diferentes concentrações (300 a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **Flavonoides**

Foram preparadas soluções do extrato e frações (800 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 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 flavonoides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões da quercetina, utilizando diferentes concentrações (200 a 0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluída em etanol 80%.

### **Atividade quelante de ferro**

A metodologia utilizada foi de Benzie e Strain, (1996) e Benzie e Szeto (1999) adaptada para o ensaio. O princípio baseia-se na formação do complexo O-fenantrolina- $\text{Fe}^{2+}$  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  $\mu\text{M}$ ) 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 FeSO<sub>4</sub> (doses graduais 500 - 3000µg/ml). A atividade quelante foi expressa em equivalentes g de FeSO<sub>4</sub> por g de extrato e os valores foram apresentados como média das análises da triplicata.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada através pelo *software* v4.0 Prisma™ (GraphPad® Software, San-Diego, Califórnia, EUA). Todos os ensaios químicos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM) através da Análise de variância (ANOVA) por uma via pelo teste *post hoc* de Tukey. Modelos de regressão linear foram gerados para analisar os resultados das Concentrações Efetivas (CE<sub>50</sub>) e através do coeficiente de Pearson (r), foi avaliada a correlação entre os resultados obtidos neste trabalho. Diferenças em p<0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

### Resultados e Discussão

Na tabela 1 pode-se verificar o teor fenólico total e o de flavonoides de *P.calomelanos* (L.) Link. O teor mais elevado de flavonoides foi encontrado na fração acetato de etila de *P. calomelanos* (FAEPC) seguida do extrato etanólico de *P. calomelanos* (EEPC). Para o teor de fenóis totais, o extrato demonstrou melhor resultado seguido da fração acetato de etila.

**Tabela 1 Concentração Efetiva (CE<sub>50</sub>) do teor de Fenóis Totais (mg/g de ácido gálico) e Flavonóides (mg/g de Quercetina) com extrato etanólico, fração metanólica e acetato de etila de *P. calomelanos* (L.) Link.**

Nº	Amostras	Teor de fenóis totais (± EPM)	Teor de flavonóides (± EPM)
1.	EEPC	151,00 ± 0,04	35,65± 0,01
2.	FMPC	61,12 ± 0,04	7,18± 0,03
3.	FAEPC	118,44 ± 0,08	46,67± 0,08

EEPC - extrato etanólico de *P. calomelanos*; FMPC - fração metanólica de *P. calomelanos*; FAEPC - fração de acetato de etila de *P. calomelanos*. \* Todos os valores são expressos como média ± EPM de três determinações.

A Tabela 2 também representa os valores de FRAP de extratos de *P. calomelanos*. Os valores de CE<sub>50</sub> do extrato e frações de *P. calomelanos* são 1,24 mg / mL ( FAEPC ), 1,47 mg / mL ( EEPC ) e 1,38 mg / mL ( FMPC ). Considerando que, o valor de CE<sub>50</sub> para FeSO<sub>4</sub> padrão observado foi 1,09 mg / mL. O extrato e frações de *P. calomelanos* mostraram atividade antioxidante mais significativa do que o padrão.

A capacidade de quelante de metal do extrato e frações de *P. calomelanos* foram analisados e os valores estão resumidos na Tabela 2. Os valores de CE<sub>50</sub> do extrato etanólico de *P. calomelanos* (EEPC) sendo 59,25 mg / mL, a FAEPC 65,83 mg / mL, e para a FMPC 60,16 mg / ml, respectivamente. Visto que o valor de CE<sub>50</sub> de FeSO<sub>4</sub> padrão foi observado em 130mg/mL.

**Tabela 2 Concentração Efetiva (CE<sub>50</sub>) do Teste FRAP (mg equivalentes de FeSO<sub>4</sub>/g de amostras) e Teste de Quelação de Ferro (mg equivalentes de FeSO<sub>4</sub>/g de amostras) com extrato etanólico, fração metanólica e acetato de etila de *P. calomelanos* (L.) Link.**

Nº	Amostras	Atividade antioxidante (± EPM)	Atividade quelante (± EPM)
1.	EEPC	1,24 ± 0,03	59,25 ± 0,03
2.	FMPC	1,47 ± 0,04	60,16 ± 0,06
3.	FAEPC	1,38 ± 0,04	65,83 ± 0,04
4.	Controle FeSO <sub>4</sub>	1,09 mg/mL	130 mg/mL

EEPC - extrato etanólico de *P. calomelanos*; FMPC - fração metanólica de *P. calomelanos*; FAEPC - fração de acetato de etila de *P. calomelanos*. \* Todos os valores são expressos como média ± EMP de três determinações

No *screening* fitoquímico realizado por SOUZA et al. (2012b) da mesma samambaia apresentou classes de metabólitos secundários com características antioxidantes como a presença de fenóis, flavonas, flavonóis, flavononóis e flavononas, além de, alcalóides, auronas, catequinas, chalconas, xantonas, saponinas no extrato e nas frações.

Segundo Morais-Braga (2012) através do método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os extratos e frações dessa espécie revelaram a presença de conteúdos fenólicos como o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, rutina, quercetina e kampferol. O EEPC e a FMPC apresentam como seu componente majoritário o ácido

clorogênico e na FAEPC o composto em maior quantidade é o kampferol, seguido do ácido clorogênico e da quercetina.

Nesse estudo a FAEPC apresentou os melhores resultados para o teor de flavonoides. Os flavonoides são potenciais antioxidantes e diversos trabalhos têm evidenciado a presença de quercetina e kaempferol em samambaias e têm demonstrado que estes compostos, contribuem efetivamente na captação de radicais livres e auxiliam na proteção de moléculas essenciais à vida (KUMAR et al., 2013; CHOWDHARY et al., 2010).

Os resultados da atividade antioxidante corrobora com resultados prévios, demonstrando que a fração metanólica de *P. calomelanos* (FMPC) possui a melhor atividade antioxidante, seguido da FAEPC e EEPC. Segundo Morais-Braga (2012) a samambaia analisada possui compostos fenólicos utilizados na defesa e na conservação dessa espécie no ambiente. No EEPC o *screening* fitoquímico realizado através do teste de DPPH mostrou a presença de catequinas, flavononas, fenóis; na FMPC a presença de catequinas, flavononas e flavonas e na FAEPC a presença de flavonoides, flavonas, flavononas e fenóis.

Lai e Lim (2011) realizaram um *screening* para a atividade antioxidante e para a determinação de fenol total com a *P. calomelanos* e outras samambaias. Seus dados mostraram a presença de compostos fenólicos no extrato metanólico de *P. calomelanos*. Sendo o nível de atividade antioxidante dependente do nível de fenóis totais apresentado que é dependente das condições ambientais (incidência de luz UV, baixa temperatura, regime hídrico desfavorável, pressão parcial de O<sub>2</sub>) e do habitat de cada samambaia.

A atividade quelante teve como melhor resultado a FAEPC, seguida da FMPC e do EEPC. A FAEPC apresentou a maior quantidade de quercetina, um polifenol com propriedade quelante de metais (DE LUCIA et al., 2007).

Os compostos fenólicos possuem propriedades redutoras e sua estrutura química desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (DEGÁSPARIE e WASZCZYNSKYJ, 2004; SOUZA et al., 2007). Estes compostos também são importantes contra a morte celular protegendo o DNA de dimerização e ruptura (STRACK, 1997).

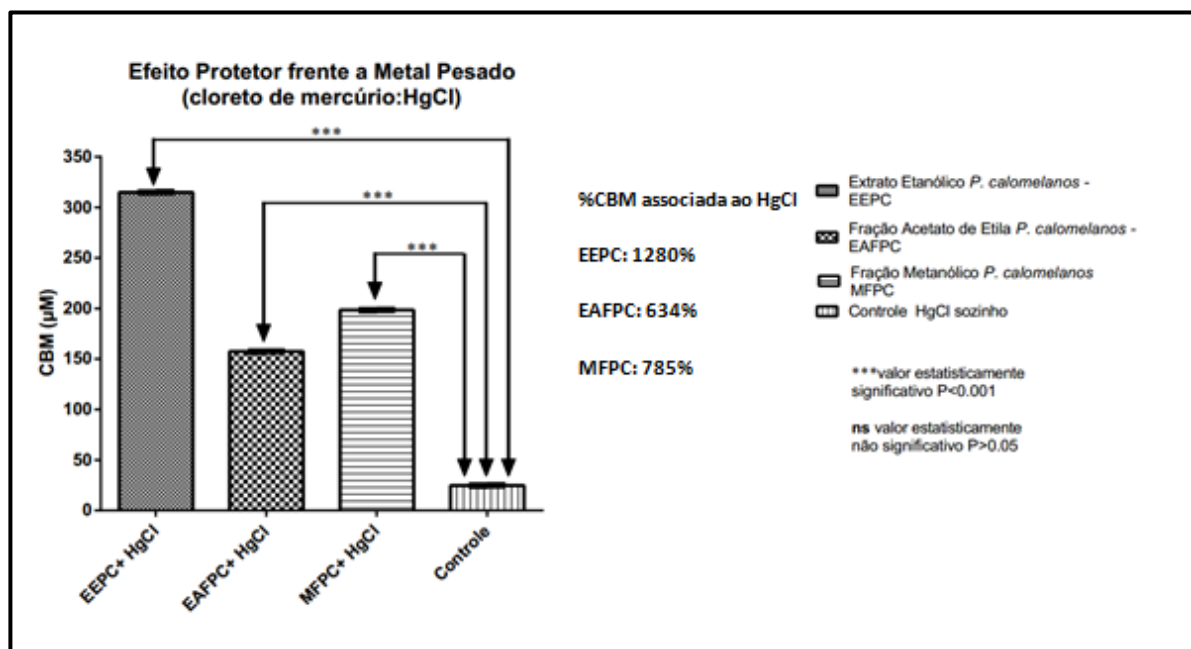
A Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras, testadas frente à linhagem de *C. krusei* e à linhagem *E. coli* apresentaram o mesmo resultado com a CIM  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ .



A Figura 8 e 9 apresentam os resultados da avaliação da atividade citoprotetora frente à toxicidade do cloreto de mercúrio quanto à combinação com o EEPC e suas respectivas frações em modelo fúngico e bacteriano. Os resultados demonstraram que as combinações das amostras e o cloreto de mercúrio, apresentaram um efeito antagônico nas frações de FAEPC e FMPC, no modelo fúngico e na CBM os resultados demonstraram que as combinações das amostras, tanto do extrato etanólico quanto das frações apresentaram um efeito citoprotetor frente à linhagem de *E. coli* com significância  $p < 0.001$ .

Comparando os testes, a CBM demonstrou melhor resultado do que a CFM, em relação aos controles 24,80  $\mu\text{M}$  e 13,40  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O EEPC na CBM foi eficaz cerca de 1270% (314,98  $\mu\text{M}$ ), enquanto na CFM foi de 146% (19,69  $\mu\text{M}$ ). A FMPC na CBM demonstrou redução de morte celular em 785% (194,85  $\mu\text{M}$ ) e na CFM cerca de 293% (39,37  $\mu\text{M}$ ). A FAEPC na CBM demonstrou citoproteção em 634% (157,40  $\mu\text{M}$ ) e na CFM 185% (24,80  $\mu\text{M}$ ). Ainda, em ambos os testes, a fração metanólica foi a mais expressiva, por ter causado mais citoproteção do que a FAEPC.

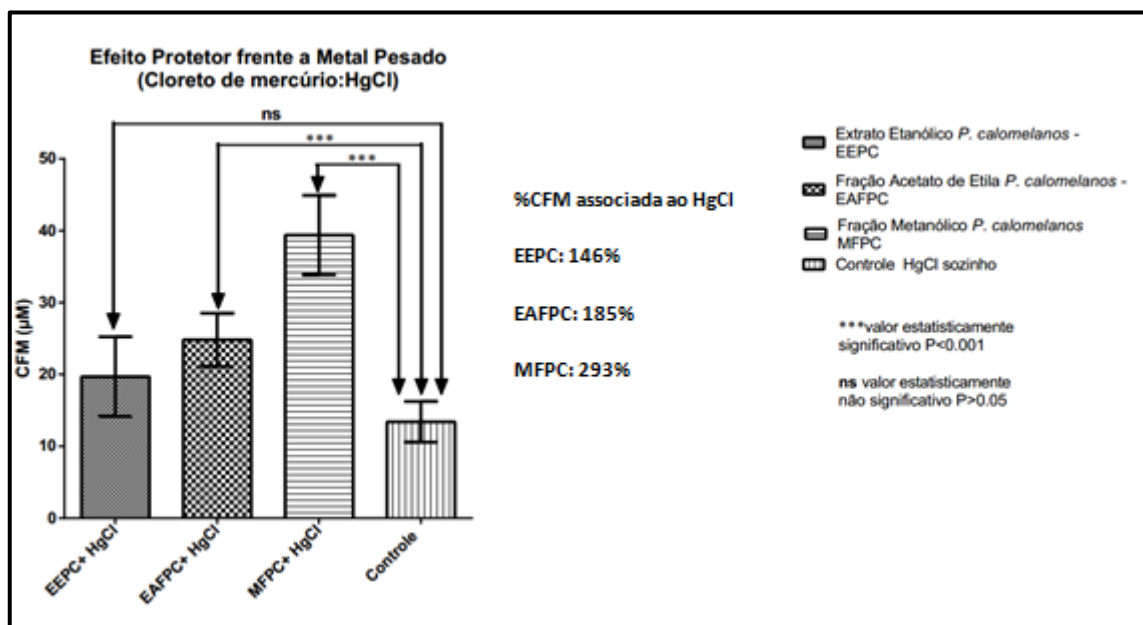
**Figura 8** Gráficos demonstrativo da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à *E. coli* e *C. krusei*, respectivamente, na presença e na ausência do extrato etanólico de *P. calomelanos* (L.) Link. e suas frações.



Possivelmente, essa diferença seja devido à estrutura entre os microrganismos. A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, o seu envoltório é formado por duas membranas, uma interna e outra externa, e entre elas um espaço periplasmático e sua estrutura interna é

simples, apresentando ribossomos e ácido desoxirribonucléico. A *C. krusei* apresenta uma estrutura complexa tanto em seu envoltório como no citoplasma. A membrana plasmática é rica em fosfolípidios e esterol e em sua parede celular apresenta microfibrilas como a quitina e glucanos (ALMEIDA, 2008; PELCZAR *et al.*, 1997). O mercúrio possui uma capacidade de combinação com as membranas celulares, que perturba ou impede o transporte de substâncias essenciais, tais como os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e de substâncias orgânicas (JORDÃO *et al.*, 1999). Ao penetrar na célula este inibi a formação do fuso mitótico, o que resulta na forte afinidade do mercúrio pelos grupos sulfidrilas encontrados nas proteínas do fuso (BUCIO *et al.*, 1999; DE FLORA *et al.*, 1994), sendo também capaz de produzir radicais livres, via peroxidação lipídica (BUCIO *et al.*, 1999).

**Figura 9** Gráficos demonstrativo da Concentração Fungicida Mínima (CFM) da toxicidade do cloreto de mercúrio frente à *E. coli* e *C. krusei*, respectivamente, na presença e na ausência do extrato etanólico de *P. calomelanos* (L.) Link. e suas frações.



A partir dos resultados se verificou que as células, em relação ao controle, cresceram consideravelmente, indicando que o metal teve sua toxicidade celular reduzida na presença do extrato e das frações da samambaia em estudo.

Neste contexto, o extrato e as frações podem ser uma alternativa para minimizar o dano causado pelo cloreto de mercúrio, visto que a associação das amostras com esse metal acarreta em um aumento da dose necessária para que ocorra toxicidade celular. Os resultados da atividade quelante e atividade redutora do extrato e das frações foram relevantes (Tabela

2), assim como, a presença de flavonoides e fenóis totais (Tabela 1) que podem auxiliar nessa citoproteção ao inibir a formação de radicais livres e a formação de quelato.

Para se verificar essas possibilidades foi realizada o Coeficiente de Correlação de Pearson (r). Na CFM não foi obtido esse coeficiente, porém, ao fazer a análise para a CBM foi demonstrado uma correlação direta entre a atividade antioxidante e a presença de fenóis totais com a CBM observando uma relação de 0,723, (atividade antioxidante e fenóis totais), 0,896 (atividade antioxidante e CBM) e 0,955 (fenóis totais e CBM). Para atividade quelante não houve correlação com a citoproteção das células procariotas.

Os metais podem ser acumulados na parede, como no citoplasma ou em vácuolos das células de plantas (SOUSA et al., 2008). Estas possuem mecanismo de regulação, tendo em vista sua capacidade de tolerância intracelular, capaz de retirar, acumular e tolerar metais pesados (VÁLEGA et al., 2008; SANTOS et al., 2011) como no processo de quelação, um mecanismo de detoxicação e tolerância aos metais (HALL, 2002).

Relatos dessa ação protetora da *P. calomelanos* demonstram esses mecanismos de regulação a partir da capacidade de fitorremediação frente ao semimetal Arsênio (XU et al. 2010; ANH et al., 2011 e NIAZIN et al., 2012). De modo que esta, se adequa ao ambiente contaminado promovendo a acumulação em suas partes vegetais, nas raízes e folhas (FRANCESCONI et al., 2002). As suas partes vegetais alcançam a hiperacumulação em seis semanas (WONGKONGKATEP et al., 2003), caracterizando esta samambaia como fitoextratora (SANTOS et al., 2010), capaz de retirar metais do solo contaminado.

## 5 CONCLUSÃO

- As concentrações inibitórias mínimas do extrato etanólico e das frações de *P. calomelanos*, testados frente às linhagens de *E. coli* ATCC 25922 e de *C. krusei* 02 comparativamente apresentaram a mesma CIM de  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ , não demonstrando atividade clínica relevante.
- As frações e o extrato etanólico contém fenóis totais e flavonoides, sendo os fenóis totais mais expressivos que os flavonoides, principalmente em relação à fração metanólica.
- Os testes de quelação de ferro e FRAP apresentaram resultados satisfatórios tanto nas frações quanto no extrato etanólico.
- Assim como, os testes de CBM e CFM, ambos apresentaram antagonismo quando associado ao extrato e as frações de *P. calomelanos* com cloreto de mercúrio, exceto para o EEPC na CFM que se mostrou não significativo.
- Através da correlação de Pearson ( $r$ ) foi demonstrado uma associação direta entre a atividade antioxidante e a presença de fenóis totais com a CBM, indicando que a atividade antioxidante é devido a presença de fenóis totais.
- Através dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o extrato etanólico e as frações de *P. calomelanos* são uma fonte alternativa de produtos naturais com ação citoprotetora.

## Referências

- ALMEIDA, S.R. **Ciências Farmacêuticas Micologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 161, 2008.
- ABRAHAM, Sonia; RAMACHANDRAN, V. S.; SOFIA, C. Potential ornamental Ferns from Nilgiris, Tamil Nadu. v. 3, Coimbatore Tamil Nadu, India: **Advances in Applied Science Research**, 2012.
- 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, 2002.
- ANH, B.T.; KIM, D.D.; TUA, T.V.; KIEN, N.T.; ANH, T. Phytoremediation potential of indigenous plants from Thai Nguyen province, Vietnam. **Journal Environmental Biology**, v. 32, n. 2, 2011.
- ANDRADE, S.F.; MATOS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Variação Sazonal de Metais Pesados em Siris *Callinectes ornatus* (Ordway, 1863) da Lagoa de Iquiparí, Brasil. **Revista Virtual Química**, v. 3 (2), p. 129-137, 2011.
- AXSMITH, B. J.; KRINGS, M.; TAYLOR, T.N. A filmy fern from the Upper Triassic of North Carolina (USA). **American Journal of Botany**, v. 88, p. 1558-1567, 2001.
- BARROS, I.C., SANTIAGO, A.C., XAVIER, S.R., SILVA, M.R., & LUNA, C.P. Diversidade e aspectos ecológicos de pteridófitas (avencas, samambaias e plantas afins) ocorrentes em Pernambuco. (M. TABARELLI, & J. M. SILVA, Eds.) **Editora Massangana e Secretaria de Tecnologia e Meio Ambiente (SECTMA)**, p. 153-172, 2002.
- BENZIE, I.E.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1999.
- BENZIE, I.F.F., SZETO, Y.T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 633, 1999.
- BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BUCIO L.; GÁRCIA, C.; SOUZA, V.; HERNÁNDEZ E.; GONZÁLES, C.; BETANCOURT, M.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M.C. Uptake, Cellular Distribution and DNA damage Produced by Mercuric Chloride in a Fetal Hepatic Cell Line. **Mutation Research**, v. 423, p. 65, 1999.

BRASILEIRO B.G.; PIZZOLO 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, 2006.

CARRIÓN, J.S.; FUENTES, N.; FERNÁNDEZ, S. Una perspectiva paleobotánica—y por tanto, heterodoxa, para las grandes extinciones. Carrión, JS, Fernández, S., Fuentes, N.(Ed), *Paleoambientes y cambio climático*. **Quaderna**. Fundación Séneca, Agencia Regional de Ciencia y Tecnología, Murcia, p. 31-53, 2006.

CHAI, T.; PANIRCHELVUM, E.; ONG, H.; WONG, F. Phenolic contents and antioxidant properties of *Stenochlaena palustris*, an edible medicinal fern. **Botanical Studies**, v. 53, n. 4, 2012.

CHAI, T.; ELAMPARUTHI, S.; YONG, A.; QUAH, Y.; ONG, H.; WONG, F. Antibacterial, anti-glucosidase, and antioxidant activities of selected highland ferns of Malaysia. **Botanical Studies**, v. 54, n. 1, p. 55, 2013.

CELERE, M.S.; OLIVEIRA, A. S.; TREVILATO, T.M.B.; SEGURA-MUNHÕZ, S.I. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil e sua relevância para saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 939-947, 2007.

CHOWDHARY S.; VERMA, D.L.; PANDE, R.; KUMAR, H. Antioxidative properties of flavonoids from *Cheilanthesanceps* Swartz. **Journal of American Science**, v. 6, p. 203, 2010.

COLLINSON, M.E. "What use are fossil ferns?" 20 years on: with a review of the fossil history of extant pteridophyte families and genera. (J. M. CAMUS, M. GIBBY, & R. J. JOHNS, Eds.) **Pteridology in Perspective**, p. 349-394, 1996.

DE BRITTO, A. J.; GRACELIN, D.; KUMAR, P. Phytochemical studies on five medicinal ferns collected from Southern Western Ghats, Tamilnadu. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 536-S538, 2012.

DE FLORA S.; Bennicelli C.; Bagnasco M. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutation Research**, v. 57, p. 3171, 1994.

DE LUCIA, Roberto; FILHO, Ricardo M. de Oliveira; PLANETA, Cleopatra S.; GALLACCI, Marcia; AVELLAR, Maria Christina W. de; **Farmacologia Integrada**; 3ª Edição; Rio de Janeiro; RJ; 2007.

DEGÁSPARIE C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33, 2004.

LÁZARO, F. J. D. **Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas**. Univ Santiago de Compostela, 2008.

FRANCESCONI, K., VISOOTTIVISET, P., SRIDOKCHAN, W., & GOESSLER, W. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pytyrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. **Elsevier Science**, v. 27, p. 284, 2002.

FÖRSTNER, U.E.; WITTMAN, G. T. W. Metal pollution in the aquatic environment. 2nd. **Berlin: Spriger-Verlag**, p. 475, 1983.

FUKUSHI, J.W.K., PARKPIAN, P., DeLAUNE, R., & JUGSUJINDA, A. Arsenic uptake by native fern species in Thailand: Effect of chelating agents on hyperaccumulation of arsenic by *Pityrogramma calomelanos*. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 38, p. 2773, 2003.

GRACELIN, D.H.S.; BRITTO, A.J.; KUMAR, P.B.J.R. Antibacterial screening of a few medicinal ferns against antibiotic resistant phyto pathogen. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 3, p. 868-873, 2012.

GRAZZIOTIN, P.G. **Isolamento de microrganismos resistentes a mercúrio e caracterização da mercúrio redutase de *Pseudomonas* sp. B50A**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente. Porto Alegre, RS 2010.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxication and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 366, p. 1-11, 2002.

HALLECK, L.F. Understorey fern responses to post-hurricane fertilization and debris removal in a Puerto Rican rain forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 20(2), p. 173-181, 2004.

HARPER, N., COOPER-DRIVER, G.; SWAIN, T. A survey for cyanogenesis in ferns and gymnosperms. Surrey, England: **Phytochemistry**, v. 15, 1976.

HARBORNE, J.B. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of Plant analysis. London, **Chapman and Hall**. 1984.

HUANG, S.; ZHANG, Z.; LI, Y.; LI, Y.; XU, H. Anti-insect activity of the methanol extracts of fern and gymnosperm. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 2, p. 249-256, 2010.

ISHAQ, M. S., HUSSAIN, M.M.; AFRIDI, M.S.; ALI, G.; KHATTAK, M.; AHMAD, S.; SHAKIRULLAH. In Vitro Phytochemical, Antibacterial, and Antifungal Activities of Leaf, Stem, and Root Extracts of *Adiantum capillus veneris*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

JORDÃO, C.P.; SILVA, A.C.; PEREIRA, J.L.; BRUNE, W. Contaminação por cromo de águas de rios proveniente de curtumes em Minas Gerais. **Quimica Nova**, v. 22, p. 47, 1999.

KITAYAMA, K.M. Primary succession of Hawaiian montane rain forest on a chronosequence of eight lava flows. **Journal of Vegetation Science**, v. 6(2), p. 211-222, 1995.

KUMAR S.; P.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 Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6 p. 249, 2013.

LAI, H.Y.; LIM, Y.Y. Antioxidant Properties of Some Malaysian Ferns. 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering IPCBEE. Singapore: **IACSIT Press**, v. 20, 2011.

LIN, C.J.; PEHKONEN, S.O. The Chemistry of Atmospheric Mercury: a review. **Atmospheric Environment**, v. 33, p. 2067-2079, 1999.

LINDSAY, S.; MIDDLETON, D.J. Ferns of Thailand, Laos and Cambodia. Royal Botanic Edinburgh. Disponível em: <<http://rbg-web2.rbge.org.uk/thaiferns/>> Acesso em: 24 de junho de 2014.



- LIU, Y.; WUJISGULENG, W.; LONG, C. Food uses of ferns in China: a review. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 81, n. 4, 2012.
- LOVATTO, P.B.; SCHIEDECK, G.; MAUCH, C.R. "13917 - Efeito do extrato de *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae) sobre a preferência alimentar e biologia de *Brevicoryne brassicae* e *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)". **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p.429-438, 2002.
- MARCUCCI, M.C.W.; R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v.46. 1998.
- MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, 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. **Química Nova**, v. 27, p. 763, 2004.
- MATHANGI, T.; PRABHAKARAN, P. DPPH Free Radical Scavenging Activity of the Extracts of the Aquatic Fern *Marsilea quadrifolia* Linn. **International Journal Current Microbiology Applied Sciences**, v. 2, n. 10, p. 534-536, 2013.
- McELWAIN, J.C. Ferns: a xylem success story. **New Phytologist**, v. 192(2), p. 307-310, 2011.
- MEHLTRETER, K.; WALKER, L. **Fern Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- MIR, S. A.; MISHRA, A.K.; RESHI, Z.A.; SHARMA, M.P. Preliminary Phytochemical Screening Of Some Pteridophytes From District Shopian (J&K). **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 5, 2013
- MIRANDA, M. R.; COELHO-SOUZA, S.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; CORREIA, R.R.S.; OLIVEIRA, D. Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 240-251, 2007.

MITHRAJA, M.J. Chemical diversity analysis on some selected medicinally important pteridophytes of Western Ghats, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, 2012.

MORAIS-BRAGA, M.F.; 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.Á.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, 2013.

MORAIS-BRAGA, M. F., SOUZA, T. M., MENEZES, I., COSTA, J., ROCHA, J., SARAIVA, R.A.; NOGARA, P.; BUENO, D.; ATHAYDE, M.L.; BOLIGON, A.A.; SARAIVA, A.Á.F.; COUTINHO, H.D.M. Pteridophytes: Ethnobotany and Pharmacologic Bioactivities. (1 ed., Vol. 1). (R. & GONÇALVES, Ed.) **Nova Science Publishers**, 2012.

NAOTO, A., MOTOO, F., MASAZUMI, H., MICHIO, H., ISAOSHI, M., JUNKO, N., JUN, U. In the hope of avoiding repetition of a tragedy of Minamata disease – what we have learned from the experience; The Social Scientific Study Group on Minamata Disease: **Minamata**, 2001.

NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M.; **Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos**, Salvador: CRA., 2001.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically**. 6 ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.

NEYRA, J. P. Formas de vida en la etnobotánica aymara. **Indiana**, n. 30, p. 301-324, 2013.

NIAZI, N. K.; SINGH, B.; VAN ZWIETEN, L.; KACHENCKO, A.G. Phytoremediation of an arsenic-contaminated site using *Pteris vittata* L. and *Pityrogramma calomelanos* var. austroamericana: a long-term study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3506-3515, 2012.

OLIVEIRA, D., ROCHA, C., MOREIRA, P., MOREIRA, S. Plantas nativas do cerrado: uma alternativa para fitorremediação. **Estudos**, v. 36, p. 1141, 2009.

OLIVEIRA, L. **Potencial de samambaias para fitorremediação de arsênio**. Lavras, Minas Gerais, Brasil: Universidade Federal de Lavras - UFLA, 2012.

- 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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46(8), p. 2720-22, 2002.
- PAGE, C. The diversity of ferns. An ecological perspective. **The experimental biology of the ferns**, p. 10-56, 1979.
- PAL, S.K. Study of solvent extracts of some selected ferns for antimicrobial activity. West Bengal, India: **Indian Journal of Biological Sciences**, v. 18, 2012.
- PANDA, S., SAHOO, K., RANA, M., ROUT, N., DHAL, N. Antimicrobial activities and phytochemical investigation of some native pteridophytes. Odisha, India: **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, 2014.
- PRADO, J. Revisões e monografias como base para análise da diversidade, o quanto conhecemos sobre a nossa flora. (M. Jardim, M. Bastos, & J. Santos, Eds.) **MEPG/UFRA/EMBRAPA**, p. 78-79, 2003.
- PRADO, J. Flora Da Reserva Ducke, Amazônia, Brasil: Pteridophyta – Pteridaceae. **Instituto De Botânica, Seção de Briologia e Pteridologia**. São Paulo, SP, 2005.
- PRADO, J. & WINDISCH, P.G. The genus *Pteris* L. (Pteridaceae) in Brazil. **Boletim do Instituto de Botânica**, v. 13, p. 103-199, 2000.
- 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.
- PELCZAR JUNIOR., MICHAEL J; CHAN, EC S; KRIEG, NOEL R; EDWARDS, DIANE D; PELCZAR, MERNA F. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Pearson Education do Brasil, 1997.
- PEREIRA S.I.A.; FIGUEIRA, E.M.A.P.; VIANA, I.M.S.V.C. Efeitos da toxicidade por metais pesados em *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: diversidade e resposta de população isoladas de uma mina de chumbo. **Universidade de Aveiro**, 2010.
- PRYER, K.M. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. **American Journal of Botany**, v. 91, 1582-1598, 2004.

PONNUSAMY, Y.; CHEAR, N.J.Y.; RAMANATHAN, S.; MURUGAIYAN, V.; LAI, C. Antioxidant and antibacterial properties of Malaysian ferns used traditionally against infection. **J. Nat. Prod. Plant Resource**, v. 3, n. 6, p. 14-18, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 1989.

SANTOS, J.A.; GONZAGA, M.I.; MA, L.Q. Optimum P levels for arsenic removal from contaminated groundwater by *Pteris vittata* L. of different ages. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1, p. 26-66, 2010.

SCHNEIDER J; OLIVEIRA, L.M.; GUILHERME, L.R.G; STÜRMER, S.L.; SOARES, C.R.F.S. Espécies tropicais de pteridófitas em associação com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio. **Química Nova**, v. 35, p. 709, 2012.

SELVARAJ, K.; CHOWDHURY, RANJANA; BHATTACHARJEE, CHIRANJIB. Isolation And Structural Elucidation Of Flavonoids From Aquatic Fern *Azolla Microphylla* And Evaluation Of Free Radical Scavenging Activity. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 5, 2013.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. In: LENNETE, E.H.; 1985

SHARMA, B.D.; VYAS, M.S. Ethanobotanical studies on the fern and fern allies of Rajasthan. *Bull. of Bot. Survey of India*, v. 27, p. 90-91, 1985.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos no solo: perspectiva ambiental. Brasília, **EMBRAPA-SPI**, 1994.

SINGH, B.; SINGH, B.K. Ethnomedicinal use of Pteridophytes in reproductive health of tribal women of Pachmarhi Biosphere Reserve, Madhya Pradesh, India. **International Journal of Medicine and Medical researcher**, v. 3, n. 12, p. 4780-4790, 2012.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152-178, 1999.

SMITH, A., PRYER, K., SCHUETTPELZ, E., KORALL, P., SCHNEIDER, H. A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55(3), p. 705-731, 2006.

SMITH, A., PRYER, K., SCHUETTPELZ, E., KORALL, P., SCHNEIDER, H. Fern classification. **Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes**, p. 417-467, 2008.

SOARE, L.C.; FERDES, M.; STEFANOV, S.; DENKOVA, Z.; NICOLOVA, R.; DENEV, P.; BEJAN, C.; PAUNESCU, A. Antioxidant Activity, Polyphenols Content and Antimicrobial Activity of Several Native Pteridophytes of Romania. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 40, n. 1, 2012.

SOUSA, A.; CAÇADOR, I.; LILLEBO, A.; PARDAL, M. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: Intra- and extra-cellular metal binding sites. **Chemosphere**, v.70, n.5, p.850-857, 2008.

SOUZA F.T.M., MORAIS-BRAGA, M.F.; SARAIVA, R.A.; NOGARA, P.A.; BUENO, D.C.; BOLIGON, A.A.; FONE, M.L.A.; ROCHA, J.B.T. Cytotoxic and Tripanocide Activities of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. Crato: **American Fern Journal**, v. 102, 2012a.

SOUZA F.T.M., MORAIS-BRAGA, M.F.; SARAIVA, A.A.F.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Evaluation of the anti-Leishmania activity of ethanol extract and fractions of the leaves from *Pityrogramma calomelanos* (L.) link. Crato: **Natural Product Research**, 2012b.

SOUZA F.T.M., MORAIS-BRAGA, M.F.; COSTA, J.G.M.; SARAIVA, A.A.F.; COUTINHO, H.D.M. Enhancement Of Antimicrobial Activity Of Antibiotics And Antifungals By The Use Of Natural Products From *Pityrogramma calomelanos* (L.) LINK. Crato: **Archives. Biological Sciences**, Belgrade, v. 64, 2012c.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, p. 351, 2007.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: P.M. Dev. & J.B. Harborne (Eds.), *Plant Biochemistry*, London, UK, **Academic Press**, p 387-416, 1997.

SUKUMARAN, S.; MAHESH, M.; JEEVA, S. Bioactive constituents of oak leaf fern-*Tectaria zeylanica* (Houtt.) Sledge from southern Western Ghats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S64-S66, 2012.

TALUKDAR, A.D., TARAFDAR, R.G., CHOUDHURY, M.D., NATH, D.; CHOUDHURY, S. A review on Pteridophyte antioxidants and their role in discovery of new drugs. Silchar, India: Assam University Journal of Science & Technology: **Biological and Environmental Sciences**, v. 72011.

TOMŠÍK, P. Ferns and Lycopods—A Potential Treasury of Anticancer Agents but Also a Carcinogenic Hazard. Hradec Králové, Czech Republic: **Phytotherapy Research**, Wiley Online Library, 2013.

TRYON, R.M.; TRYON, A.F. Ferns and allied plants with special reference to Tropical America. **Springer-Verlag**, p. 857, 1982.

TSCHUDY, R.H.; PILLMORE, C.L.; ORTH, C.J.; GILMORE, J.S.; KNIGHT, J.D. Disruption of the terrestrial plant ecosystem at the Cretaceous-Tertiary boundary, Western Interior. **Science**, v. 225, p. 1030-1032, 1984.

WEI, H., ZHANG, X., WU, G., YANG, X., PAN, S., WANG, Y.; RUAN, J. Chalcone derivatives from the fern *Cyclosorus parasiticus* and their anti-proliferative activity. Wuhan 430030: **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, 2013.

WILLIS, K.; MCELWAIN, J. **The evolution of plants**. Oxford University Press, Ed. 2<sup>o</sup>, 2013.

WILF, P.; JOHNSON, K.R. Land plant extinction at the end of the Cretaceous: a quantitative analysis of the North Dakota megafossil record. **Paleobiology**, v. 30, p. 347–368, 2004.

WINDMÖLLER, C.C.; SANTOS, R.C.; ATHAYDE, M.; PALMIERI, H.E.L. Distribuição e especiação de mercúrio em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1088-1094, 2007.

WOLFE, J.; JR UPCHURCH, G.R. Vegetation, climatic and floral changes at the Cretaceous-Tertiary boundary. **Nature**, v. 324, p. 148-152, 1986.

WONGKONGKATEP, J.; FUKUSHI, K.; PARKPIAN, P.; DELAUNE, R.D.; JUGSUJINDA, A. Arsenic uptake by native fern species in Thailand: Effect of chelating agents on hyperaccumulation of arsenic by *Pityrogramma calomelanos*. **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, v. 38, p. 2773, 2003.

VÁLEGA, M.; LILLEBO, A. I.; CAÇADOR, I.; PEREIRA, M. E.; DUARTE, A. C.; PARDAL, M. A. Mercury in salt marshes ecosystems: *Halimione portulacoides* as biomonitor. **Chemosphere**, v. 72, n. 8, p. 1224-1229, 2008.

XAVIER, S.R., BARROS, I.C., & SANTIAGO, A.C. Ferns and lycophytes in Brazil's semi-arid region. **Rodriguésia**, v. 63(2), p. 483-488, 2012.

XU, W. H., KACHENKO, A. G.; SINGH, B. Effect of soil properties on arsenic hyperaccumulation in *Pteris Vittata* and *Pityrogramma calomelanos* var. *austroamericana*. **International Journal Phytoremediation**, v. 12, p. 174–187, 2010.

ZHANG, M., CAO, J., DAI, X., CHEN, X., & WANG, Q. Flavonid contents and free radical scavenging activity of extracts from leaves, stems, rachis and roots of *Dryopteris erythrosora*. Shanghai, China: **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, 2012.

# APÊNDICES



## APÊNDICE A - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS VINCULADAS AO PROJETO

CAPITULO DE LIVRO				
	Autores	Situação	Ano	Editora
Ferns as protective agents against the contamination with mercurium chloride: the example of <i>Pityrogramma calomelanos</i> and a short review.	<b>Luciene F. Lima,</b> Fernando G. Figueredo, et al e Henrique D. M. Coutinho.	ACEITO	2014	Nova Science Publishers
RESUMOS EM CONGRESSOS				
	Situação	Ano	Evento	
Avaliação do potencial antitóxico de <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link. contra o efeito do mercúrio	Apresentado	2014	II Simpósio Latino-Americano de Biotecnologia do Nordeste	
Atividade citoprotetora das frações metanólica e acetato de etila de <i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link. contra o efeito do mercúrio	Aceito	2014	XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental	

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:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Henrique Douglas Melo Coutinho', written over a horizontal line.

Date: 28/APRIL/2014

## APÊNDICE B – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS NÃO VINCULADAS AO PROJETO

ARTIGOS					
Título e Autores	Situação	Ano	Periódico	JCR	Qualis
<p>1. Biological Activities and Chemical Characterization of <i>Cordia verbenacea</i> DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage.</p> <p>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; <b>LIMA, L. F</b>; 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.</p>	Publicado	2013	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)	1,772	B1
<p>2. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra <i>Trypanossoma cruzi</i> e <i>Leishmania brasiliensis</i>.</p> <p>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. ; <b>LIMA, L. F.</b> ; CUNHA, F. A. B. ;</p>	Publicado	2013	Revista Cubana de Plantas Medicinale	-	B5

PINHO, A. I. ;  
COUTINHO, H. D. M.

3. Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes.  
Indian Journal of Traditional Knowledge 0,492 B2
- MORAIS, E. C. ;  
NOGUEIRA, L. F. B. ;  
LEITE, J. L. A. ;  
ALENCAR, L. S. M. ;  
LUCENA, B. F. F. Publicado 2013  
; 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
4. Association Between Drugs and Herbal Products: *In vitro* Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae) Aceito 2014  
*European Journal of Integrative Medicine* 0,559
- 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 B2
5. Avaliação do Potencial Fitoprotetor de *Lygodium venustum* SW (Lygodiaceae) Contra o Efeito Tóxico do Cloreto de Mercúrio Submetido 2014  
*Journal of Environmental Health Science and Engineering* 1,23 B1
- Avaliação do Potencial Citoprotetor Contra o Efeito Tóxico do Submetido B2

6.	Cloreto de Mercúrio e Antioxidante de <i>Lygodium venustum</i> SW (Lygodiaceae).	2014	Jundishapur Journal of Microbiology	0,383
7.	Phytochemical characterization and evaluation of antibacterial activity and resistance modulation to aminoglycosides of chloroform fractions obtained of leaves extracts of <i>Cordia verbenacea</i> DC MS	2014	BMC Biotechnology	2,17
	Edinaldo Matias, Erivania Alves, Maria Karolyna Silva, Victoria Carvalho, Cassio Medeiros, Francisco Santos, Vanessa Bitu, Celestina Elba Souza, Fernando Figueredo, Irwin Menezes, Henrique Coutinho, José Galberto Costa, <b>Luciene Lima</b> João Victor Ferreira	Submetido		-

#### CAPITULO DE LIVRO

	Situação	Ano	Editora		
Use of natural products to enhance the antibiotic activity of gentamicin and other aminoglycosides: the future of antibiotic therapy.	Publicado	2013	Nova Science Publishers		

#### RESUMOS EM CONGRESSOS e SEMANA CIENTÍFICA

	Situação	Ano	Evento		
Modulação de aminoglicosídeos associados à $\beta$ -lactâmicos frente a linhagens bacterianas multirresistentes.	Publicado	2013	Apresentação de Trabalho/ <b>Semana de Iniciação Científica</b>		
<b>LIMA, L. F. ; FIGUEREDO, F. G. ; LUCENA, B. F. F. ;</b>					

COUTINHO, H. D. M.

**URCA**

Modulação da resistência a antibióticos frente a linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina-MRSA

Publicado

2013

Apresentação de Trabalho/**Semana de Iniciação Científica URCA**

FERREIRA, J. V. A. ; FIGUEREDO, F. G. ; **LIMA, L. F.** ; Coutinho, H. D.M

Evaluation of the potential phytoprotection *Lygodium venustum* SW (Lygodiaceae) against toxic activity of mercury chloride

Publicado

2014

Apresentação de Trabalho/**Congresso Internacional**

FIGUEREDO, F. G. ; **LIMA, L. F.** ; MORAIS-BRAGA, M. F. B. ; MATIAS, E. F. ; FARIAS, P. A. M. ; MENEZES, I. R. A. ; COUTINHO, H. D. M.

*Research Article*

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

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

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Ceará-UECE-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>2</sup> Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>3</sup> Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>4</sup> Universidade Regional do Cariri-URCA-63.100-000, Crato, CE, Brazil

<sup>5</sup> Universidade Federal do Maranhão-UFMA-65085-580, São Luís, MA, Brazil

<sup>6</sup> Universidade Federal de Santa Maria-UFSM-97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>7</sup> 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 Edinaldo 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.



---

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

From: **Editorial Office EUJIM** <[avalorenc@hotmail.com](mailto:avalorenc@hotmail.com)>

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

Subject: Your Submission

To: [hdmcoutinho@gmail.com](mailto:hdmcoutinho@gmail.com), [hdouglas@zipmail.com.br](mailto: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:

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 Gondim<sup>1</sup>,  
Nadghia Figueiredo Leite<sup>1</sup>, Jacqueline Cosmo Andrade<sup>1</sup>,  
Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga<sup>1</sup>,  
Gláucia Morgana de Melo Guedes<sup>1</sup>,  
Saulo Relison Tintino<sup>1</sup>, Cícera Cislânia Araújo Tavares<sup>1</sup>,  
Maria Audilene de Freitas<sup>1</sup>,  
Liscássia Beatriz Batista Alencar<sup>1</sup>,  
Celestina Elba Sobral de Souza<sup>1</sup>,  
Rosimeire Sabino Albuquerque<sup>1</sup>,  
Edinardo Fagner Ferreira Matias<sup>1</sup>,  
Francisco Assis Bezerra da Cunha<sup>1</sup>,  
Dara Isabel Vieira de Brito<sup>1</sup>,  
Anne Karyzia Lima Santos de Lavor<sup>1</sup>,  
João Victor de Alencar Ferreira<sup>1</sup>,  
Fernando Gomes Figueredo<sup>1</sup>, Luciene Ferreira de Lima<sup>1</sup>  
and Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>2</sup>*

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

Complimentary Contributor Copy

---

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@jmicrobiol.com](mailto:info@jmicrobiol.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](mailto: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@jmicrobiol.com](mailto:info@jmicrobiol.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](#) &#169, Kowsar Corp., [www.kowsarpub.com](http://www.kowsarpub.com)

### Cover Letter

Dear editor, I would like to submit to be evaluated by the referees of BMC BIOTECHNOLOGY the article entitled **Phytochemical characterization and evaluation of antibacterial activity and resistance modulation to aminoglycosides of chloroform fractions obtained of leaves extracts of *Cordia verbenacea* DC.** I affirm that all authors are according with the submission to this journal and this article is not being considered for publication elsewhere and was not submitted to this journal previously. This article is an original work I affirm too the copyright will be under authorization of the publisher. This article is according with to the international, national and institutional rules considering biodiversity rights.

Sincerely yours.

HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO  
Corresponding author

### SUGGESTED REVIEWERS

Dr. Jose Luiz Martinez - [editor.blacpma@usach.cl](mailto:editor.blacpma@usach.cl)

Dr. Edinaldo Fagner - [effm\\_biologia@hotmail.com](mailto:effm_biologia@hotmail.com)

Dr. Celeste Vega – [mcvegagomez@gmail.com](mailto:mcvegagomez@gmail.com)

Dr. José Galberto - [galberto.martins@gmail.com](mailto:galberto.martins@gmail.com)