



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO  
AMBIENTE – PPGSHMA

**Andréa de Andrade Timóteo**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ALCOÓLICOS DE  
DUAS ESPÉCIES DE SAMAMBAIAS: *Asplenium  
serratum* L. e *Marsilea minuta* L.**

Vitória de Santo Antão

2015

**Andréa de Andrade Timóteo**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ALCOÓLICOS DE  
DUAS ESPÉCIES DE SAMAMBAIAS: *Asplenium  
serratum* L. e *Marsilea minuta* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Augusto César Pessoa Santiago

Coorientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

**Vitória de Santo Antão**

**2015**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Roseane Souza de Mendonça, CRB4-1148

T585a Timóteo, Andréa de Andrade.  
Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos alcoólicos de duas espécies de samambaias: *Asplenium serratum* L. e *Marsilea minuta* L. / Andréa de Andrade Timóteo. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.  
60f.

Orientador: Augusto César Pessoa Santiago.  
Coorientador: Emerson Peter da Silva Falcão.  
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV. Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Pteridófitas. 2. Samambaias. 3. *Asplenium serratum* L. - Ação antimicrobiana e citotóxica. 4. *Marsilea minuta* L. - Ação antimicrobiana e citotóxica. I. Santiago, Augusto César Pessoa (Orientador). II. Falcão, Emerson Peter da Silva (Coorientador). III. Título.

587.3 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-098/2015



Dissertação de Mestrado apresentada por **Andrea de Andrade Timoteo** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ALCOÓLICOS DE DUAS ESPÉCIES DE SAMAMBAIAS: *Asplenium serratum* L. e *Marsilea minuta* L.**", orientada pelo Prof. Dr. Augusto César Pessoa Santiago e coorientada pelo Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, aprovada no dia 31 de agosto de 2015 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

---

**Dr. Cristiano Aparecido Chagas**  
Núcleo de Ciências Biológicas – CAV/UFPE

---

**Dr<sup>a</sup> Jeanne Claine Albuquerque Modesto**  
Núcleo de Ciências Biológicas – CAV/UFPE

---

**Dr<sup>a</sup> René Duarte Martins**  
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Autora

---

**Andrea de Andrade Timoteo**

Dedico este Mestrado aos meus pais, Roberto e Áurea, grandes incentivadores da educação, que priorizaram minha formação, em detrimento de suas próprias necessidades, proporcionando condições favoráveis, as quais permitiram que eu chegasse até aqui. Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força interior para superar as dificuldades, por nortear os caminhos nos momentos de angústia e suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus orientadores, Prof. Augusto César Pessôa Santiago e Prof. Emerson Peter da Silva Falcão, por terem me lançado e acompanhado nesta aventura que foi a pesquisa experimental, vivência nunca antes praticada por mim, mas que sempre tive o interesse de desenvolver. Obrigada, por me mostrarem o caminho da ciência.

À minha família, pelo carinho, incentivo, e por acreditar sempre nos meus projetos.

Aos(Às) amigos(as), que fizeram parte desse momento, sempre me ajudando, incentivando, e compreendendo minha ausência.

A todos os colegas de turma (amigos) e professores da pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente pelo convívio e aprendizado.

E, não menos, à também mestranda Aparecida, por me ajudar no desenvolvimento dos trabalhos experimentais.

À professora Idjane Santana de Oliveira, que me acompanhou na realização dos experimentos microbiológicos.

À Rejane Santana, fonte de inspiração, que acreditou e incentivou a realização desse Mestrado.

À Andreia Cybelle Marques, futura Doutora e exemplo de pesquisadora, que me auxiliou na construção da redação dessa dissertação. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

À equipe do Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Henrique Douglas Melo Coutinho, do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-CE/ Brasil, por disporem do ambiente e das orientações para realização dos experimentos preliminares, por me receberem tão bem, por me ajudarem e por participarem deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE/ Brasil, pela realização dos testes de atividade citotóxica.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), órgão de fomento à ciência e à tecnologia, pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente (PPGSHMA) e ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV/ UFPE) pela utilização das instalações e apoio na parte das coletas.

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>RESUMO</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>CAPÍTULO 1</b>	1
<b>1.1 Introdução</b>	1
<b>1.2 Objetivos</b>	4
1.2.1 Objetivo Geral	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
<b>1.3 Revisão de Literatura</b>	5
1.3.1 Caracterização botânica	5
1.3.2 Aspecto botânico	6
1.3.3 Importância etnobotânica	8
1.3.4 Metabólitos secundários e importância medicinal	10
1.3.5 Atividades biológicas	13
1.3.5.1 Atividade antimicrobiana	13
1.3.5.2 Atividade citotóxica	17
<b>CAPÍTULO 2</b>	20
<b>Avaliação do potencial antibacteriano e citotóxico dos extratos alcoólicos de <i>Asplenium serratum</i> L. e <i>Marsilea minuta</i> L.</b>	
<b>2.1 Abstract</b>	21
<b>2.2 Introdução</b>	22
<b>2.3 Material e Métodos</b>	23
<b>2.4 Resultados e Discussão</b>	29
<b>2.5 Conclusões</b>	35
<b>2.6 Agradecimentos</b>	35
<b>2.7 Referências Bibliográficas</b>	36
<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b>	45

<b>REFERÊNCIAS</b>	46
<b>APÊNDICES</b>	Xvii
<b>Apêndice I</b> - Esquema de montagem da atividade antibacteriana na placa de microdiluição de 96 poços.	Xvii
<b>Apêndice II</b> - Curva de calibração de Quercetina.	Xvii
	i
<b>Apêndice III</b> - Cromatograma de CLAE do padrão Quercetina (0,0625 mg/mL) a 254 nm.	Xvii
	i
<b>Apêndice IV</b> - Cromatograma de CLAE do extrato alcoólico de <i>Asplenium serratum</i> a 254nm, em Tr. entre 0,0 a 40,0 min.	Xix
<b>Apêndice V</b> - Valores de tempo de retenção (Tr - min), área e área relativa dos picos do cromatograma de CLAE, a 254 nm, do extrato alcoólico de <i>Asplenium serratum</i> .	Xix
<b>Apêndice VI</b> - Cromatograma de CLAE do extrato alcoólico de <i>Marsilea minuta</i> a 254nm, em Tr. entre 0,0 a 40,0 min.	Xx
<b>Apêndice VII</b> - Valores de tempo de retenção (Tr - min), área e área relativa dos picos do cromatograma de CLAE, a 254 nm, do extrato alcoólico de <i>Marsilea minuta</i> .	Xx

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	<i>Asplenium serratum</i> L. ....	5
Figura 1.2	<i>Marsilea minuta</i> L. ....	6

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas....	11
Tabela A.1	Concentração Inibitória Mínima dos extratos alcoólicos de <i>Asplenium serratum</i> e <i>Marsilea minuta</i> frente a cepas bacterianas.....	31
Tabela A.2	Perfil de Citotoxicidade dos extratos alcoólicos de <i>Asplenium serratum</i> e <i>Marsilea minuta</i> frente linhagens de células tumorais humanas.....	34

## LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
°C	Graus Celsius
%	Por cento; porcentagem
≥	Maior ou igual que
g	Gramas(s)
H	Hora(s)
mAU	<i>Milli-absorbance units</i> (inglês)
Mg	Miligrama(s)
Min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
Mm	Milímetro(s)
nm	Nanômetro(s)
Mg	Micrograma (s)
µL	Microlitro(s)
µm	Micrometro(s)
UFC	Unidade(s) formadora de colônia(s)
v/v	Volume por volume

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A-549</b>	Linhagem celular tumoral de mama ou de adenocarcinoma de pulmão
<b>a.C</b>	Antes de Cristo
<b>ATCC</b>	<i>American type culture collection</i>
<b>Av.</b>	Avenida
<b>BHI</b>	<i>Brain heart infusion</i>
<b>CAV</b>	Centro Acadêmico de Vitória
<b>CBM</b>	Concentração bactericida mínima
<b>CCD</b>	Cromatografia de camada delgada
<b>CE</b>	Ceará
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CMH</b>	Caldo Mueller-Hinton
<b>CO<sup>2</sup></b>	Dióxido de carbono
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CL50</b>	Concentração letal média
<b>CL90</b>	Concentração inibitória necessária para inibir o crescimento de 90% dos organismos-teste
<b>DAD</b>	<i>Diode array detector</i>
<b>d.C</b>	Depois de Cristo
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Dr<sup>o(a)</sup></b>	Doutor(a)
<b>e-mail</b>	Correio eletrônico
<b>et al.</b>	E outros; e colaboradores (latim)
<b>etc.</b>	Entre outros

<b>HEp2</b>	Linhagem celular de carcinoma de laringe humana
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (vírus da imunodeficiência humana - inglês)
<b>HL-60</b>	Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda
<b>HPLC</b>	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HT-29</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração que induziram 50% de inibição do crescimento celular
<b>L.</b>	Linn (autor)
<b>LMBM</b>	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
<b>MCF-7</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana
<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>NCI-H29</b>	Linhagem celular de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
<b>Prof<sup>o</sup> (a)</b>	Professor(a)
<b>RPMI</b>	<i>Roswell park memorial institute</i>
<b>SIM</b>	Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular
<b>sp.</b>	Espécie
<b>Tr</b>	Tempo de retenção
<b>TTC</b>	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
<b>URCA</b>	Universidade Regional do Cariri
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VERO</b>	Linhagem celular de rim de macaco verde africano
<b>WHO</b>	<i>World health organization</i>

## RESUMO

Propriedades farmacológicas de plantas são reconhecidas, empiricamente, há séculos. Neste aspecto, o interesse por vegetais deve-se, sobretudo, à aptidão destes em produzir compostos biologicamente ativos. As samambaias, apreciadas pelo uso ornamental, são utilizadas para a cura de doenças. Além da atividade antimicrobiana, várias outras, tais como antioxidante, antinociceptiva, antitumoral, anti-inflamatória, citotóxica são relatadas como propriedades biológicas destes vegetais. Com a ascensão das doenças crônicas não transmissíveis, especialmente das doenças do aparelho circulatório e das neoplasias, e a persistência das doenças infecciosas e parasitárias, marcadas pela resistência microbiana a antibióticos, a busca por novos fármacos com ação antimicrobiana e citotóxica torna-se imprescindível. Diante deste contexto, este estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos de *Asplenium serratum* L. e *Marsilea minuta* L., samambaias ocorrentes no Brasil, e descritas na terapêutica popular. Os extratos metanólico de *A. serratum* e etanólico de *M. minuta* foram obtidos, respectivamente, por esgotamento a frio e maceração. A análise fitoquímica foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para os padrões quercetina e cafeína. Na atividade antimicrobiana foram utilizadas bactérias padrão, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* MSSA, e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição, com concentrações variando de 5mg/mL a 0,005mg/mL. O sinergismo, testado contra *E. coli* e *S. aureus* MSSA, foi realizado pelo método *checkerboard*. A citotoxicidade foi verificada através do método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), frente a células tumorais humanas NCI-H29, HEp-2, MCF-7 e HL-60. A quercetina e cafeína foram sugeridas como constituintes de *M. minuta*. Os extratos apresentaram CIM de 5,0 mg/mL frente à *S. aureus* MSSA e *S. typhimurium*, e de 2,5 mg/mL contra *E. coli* e *S. flexneri*. Em sinergismo, perante *S. aureus* MSSA, apresentaram atividade bactericida em concentrações  $\geq 2,56$  mg/mL (*A. serratum*) e  $\geq 0,33$  mg/mL (*M. minuta*). No caso de *E. coli*, a ação bactericida foi  $\geq 1,31$  mg/mL (*A. serratum*) e  $\geq 2,62$  mg/mL (*M. minuta*). Os extratos foram considerados inativos frente às células tumorais testadas, com percentuais de inibição inferiores a 50 % para concentração de 50  $\mu$ g/ mL. Portanto, foi possível concluir que os extratos das espécies em estudo possuem potencial antimicrobiano e exibem efeito sinérgico, além de apresentarem metabólitos, ainda a serem identificados.

**Palavras-Chave:** Pteridófitas. Atividades biológicas. Sinergismo. Citotoxicidade. Fitoconstituintes.

## ABSTRACT

Pharmacological properties of plants are recognized, empirically, for centuries. In this aspect, interest in plants is mainly because their ability to produce biologically active compounds. Ferns, appreciated by their ornamental use, are utilized to cure diseases. Besides antimicrobial activity, several others properties such as antioxidant, anti-nociceptive, antitumor, anti-inflammatory, cytotoxic and biological are reported for these plants. With the rise of non-communicable chronic diseases, especially circulatory diseases and neoplasms, and the persistence of infectious and parasitic diseases, marked by microbial resistance to antibiotics, the search for new drugs with antimicrobial and cytotoxic action becomes imperative. In front of this context, this study aimed to evaluate antimicrobial and cytotoxic activity of extracts from *Asplenium serratum* L. and *Marsilea minuta* L., occurring ferns in Brazil, described in popular therapy. Extracts, methanolic of *A. serratum* and ethanolic of *M. minuta*, were obtained, respectively, by cold exhaustion and maceration. Phytochemical analysis was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for standards of quercetin and caffeine. Default bacteria *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* MSSA, were used in antimicrobial activity. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the microdilution method, with concentrations ranging from 5mg / mL to 0.005 mg / mL. Synergism tested against *E. coli* and *S. aureus* MSSA was executed by *checkerboard* method. Cytotoxicity was assessed by MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) against human tumor cells, NCI-H29, HEP-2, MCF-7 and HL -60. Quercetin and caffeine have been suggested as constituents of *M. minuta*. The extracts showed MIC of 5.0 mg / mL against *S. aureus* MSSA and *S. typhimurium*, and 2.5 mg / mL against *E. coli* and *S. flexneri*. In synergism, against *S. aureus* MSSA, fern extracts showed bactericidal activity at concentrations  $\geq 2.56$  mg / mL (*A. serratum*) and  $\geq 0.33$  mg / mL (*M. minuta*). In the case of *E. Coli*, the bactericidal action was  $\geq 1.31$  mg / mL (*A. serratum*) and  $\geq 2.62$  mg / mL (*M. minuta*). The extracts were considered inactive in front of the tumor cells tested, with percentages lower than 50% inhibition at concentration of 50  $\mu$ g / ml. Therefore, the extracts of studied species have antimicrobial potential and exhibits synergistic effect, besides having metabolites, yet to be identified.

**Keywords:** Pteridophytes. Biological activities. Synergism. Cytotoxicity. Phytochemicals.

# CAPÍTULO 1

## 1.1 Introdução

As plantas são utilizadas na medicina popular desde longa data (BARROS; ANDRADE, 1997; MACIEL *et al.*, 2002), sendo a terapia com extratos vegetais uma das formas mais antigas da prática medicinal na humanidade, talvez um dos primeiros meios de aproveitamento dos produtos naturais (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; FIRMO *et al.*, 2014). O uso desses vegetais, apontados como os produtos naturais mais consumidos pelas populações em geral (MORAIS-BRAGA, 2012), é bastante difundido em todo o mundo (VEIGA-JUNIOR, 2008), sobretudo entre as populações de países em desenvolvimento, que dependem do uso de medicamentos tradicionais, aplicados como principal fonte nos cuidados à saúde (CUNNINGHAM, 1993), por causa de seus baixos custos, da sua eficácia, do fornecimento frequentemente inadequado da medicina moderna e de preferências culturais e religiosas (VAN ANDEL; HAVINGA, 2008).

O emprego das plantas no tratamento de doenças teve seu início empiricamente (CUNHA; ROQUE *et al.*, 2005), e, ainda hoje, a grande maioria delas não tiveram suas potencialidades terapêuticas cientificamente comprovadas (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005). Estudo de Primack (1993) estimava a existência de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas nas medicinas tradicionais do mundo, das quais apenas 1% é conhecida por estudos científicos, com demonstração de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos. Em trabalho mais recente, Caballero-George e Gupta (2011), descrevem um total de 300 mil espécies de plantas sejam identificadas em todo o mundo. Desse total, apenas 6% foram farmacologicamente estudados, e apenas 15% fitoquimicamente.

Levantamentos etnobotânicos apontam as angiospermas, entre os grandes grupos vegetais, como principais fitoterápicos. Embora ancestrais, as samambaias têm tido relativo destaque no uso medicinal, quando comparadas às angiospermas, contudo, seu uso

terapêutico é disseminado entre populações mundiais (MORAIS-BRAGA, 2012). Segundo Singh *et al.* (2010), as samambaias são prescritas desde tempos passados, na forma de extrato medicinal, para tratamento de várias doenças, e hoje, devido à reconhecida importância, são apresentadas como um recurso terapêutico potencial.

Atualmente, são reconhecidas 46.097 espécies para a flora brasileira, sendo 4.747 de Algas, 32.831 de Angiospermas, 1.524 de Briófitas, 5.712 de Fungos, 30 de Gimnospermas e 1.253 de Samambaias e licófitas (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015). Na região Nordeste, Agra *et al.* (2008) listaram 650 espécies de plantas usadas como medicinais, destas, cinco pertencem ao grupo das samambaias. Outros trabalhos, como Barros e Andrade (1997) e Perumal (2010), revelam um número considerável de espécies deste grupo utilizadas na medicina popular, tais como, *Asplenium serratum* L., *Adiantum caudatum* L., *Marsilea minuta* L., *Lycopodium clavatum* L., *Pteridium aquilinum* L., entre outras.

No Brasil, nota-se um aumento dos estudos científicos para comprovar a potencialidade das samambaias como produtoras de compostos bioativos, como corrobora a revisão realizada por Santos *et al.* (2009) e trabalhos recentes de Moraes-Braga *et al.* (2012) e Souza *et al.* (2012). Diversos destes trabalhos vêm confirmar as indicações de potencialidade de produtos bioativos diversos de samambaias, como propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antinociceptivas, entre outras.

Algumas espécies apresentam um bom potencial para serem testadas, devido às indicações populares, como também por serem facilmente encontradas na natureza e formarem populações numerosas. *A. serratum* e *M. minuta*, que ocorrem no nordeste brasileiro (SYLVESTRE, 2012; WINDISCH, 2013; LOURENÇO; XAVIER, 2013), são exemplos dessas samambaias, apreciadas na medicina popular, que podem ser exploradas nesta perspectiva, permitindo o manejo adequado de suas propriedades.

*A. serratum*, encontrada em áreas úmidas e sombreadas (BOLDRIN; PRADO, 2007), apresenta relatos de uso etnobotânico como analgésico (DÍAZ; ORTEGA, 2006), antipirético (NAVARRETE *et al.*, 2006), anti-inflamatório (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2012), no tratamento de queimaduras (GUPTA *et al.*, 2005; CABALLERO-GEORGE; GUPTA, 2011) e propriedades anti-infecciosas para afecções do fígado (BARROS; ANDRADE, 1997).

*M. minuta*, encontrada no substrato aquático (WINDISCH, 2015), é aproveitada na medicina popular no tratamento de hepatite, diabetes, picada de cobra, inflamação, e infertilidade (PAWAR, 2014), insônia (SINGH; KUMAR, 2014), tosse e bronquite (PERUMAL, 2010), condições espásticas dos músculos da perna (SINGH; UPADHYAY,

2014), sangramento do nariz, indigestão, inchaço das gengivas (AJAIB *et al.*, 2014), entre outros.

As plantas possuem alto valor biológico e vêm sendo utilizadas como potencial terapêutico (PLETSCH, 1998; SANDES; DI BLASI, 2000). A investigação destes recursos naturais, no que tange a caracterização fitoquímica e biológica, contribui para descobertas farmacológicas significativas, promovendo o uso direcionado e seguro. A realização deste estudo visou avaliar as potencialidades antimicrobiana e citotóxica, como também obter análises cromatográficas dos extratos alcoólicos de *A. serratum* e *M. minuta*, provendo informações sobre propriedades químicas e biológicas dessas espécies, na busca por drogas alternativas às terapias antimicrobiana e antineoplásica convencionais disponíveis. As informações obtidas poderão subsidiar vários campos de pesquisa, entre estes, os de cunho bioquímico e farmacológico.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos alcoólicos das espécies *Asplenium serratum* L. e *Marsilea minuta* L.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar os constituintes fitoquímicos dos extratos por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos das folhas de *A. serratum* e de *M. minuta* frente a linhagens gram-positivas e gram-negativas;
- Descrever a ação sinérgica dos extratos de *A. serratum* e *M. minuta* frente a isolados de *Staphylococcus aureus* MSSA e *Escherichia coli*;
- Avaliar a eventual atividade citotóxica destes extratos frente às linhagens tumorais NCI-H292, HEP-2, MCF-7 e HL-60.

## 1.3 Revisão de Literatura

### 1.3.1 Caracterização botânica

#### Posição Taxonômica (*A. serratum*)

Samambaias (Smith *et al.*, 2006)

Classe: Polypodiopsida

Ordem: Polypodiales

Família: Aspleniaceae

Gênero: *Asplenium*

Espécie: *Asplenium serratum* L. (Figura 1.1)

Figura 1.1- *Asplenium serratum* L.



Fonte: acervo pessoal

### Posição taxonômica (*M. minuta*)

Samambaias (Smith *et al.*, 2006)

Classe: Polypodiopsida

Ordem: Salviniales

Família: Marsileaceae

Gênero: *Marsilea*

Espécie: *Marsilea minuta* L. (Figura 1.2)

Figura 1.2 - *Marsilea minuta* L.



Fonte: acervo pessoal

#### 1.3.2 Aspecto botânico

As samambaias, também conhecidas como fetos ou avencas, constituem um grupo de plantas vasculares, sem sementes, bastante heterogêneo, que habitam uma vasta gama de regiões e ambientes, apresentando diversidade morfológica acentuada e adaptações a variados habitats (WINDISCH, 1992). São representadas por cerca de 13.000 espécies, as quais muitas são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, e, em sua maioria, dependem de condições de umidade e sombreamento, favorecendo a sujeição

deste grupo vegetal a regiões de mata onde se formam estes tipos de microambientes (WINDISCH, 1992; BARROS; SILVA,1996; MORAN, 2008; COSTA *et.al.*, 2013).

Segundo Prado e Sylvestre (2015), existem 36 famílias, 133 gêneros, 1253 espécies, 13 subespécies e 35 variedades de samambaias no Brasil. Dentre as famílias existentes, Aspleniaceae é uma das maiores e mais ricas famílias de samambaias (KRAMER; VIANE, 1990), com cerca de 700 espécies, com distribuição sub-cosmopolita (em todos os continentes, exceto na Antártida) (OHLSEN, 2014), apresentando-se mais numerosa nos trópicos, principalmente, em florestas tropicais (SMITH *et al.*, 2006). Esta família exhibe uma delimitação genérica constituída por dois gêneros, *Asplenium* e *Hymenasplenium* (BELLEFROID *et al.*,2010), sendo a maioria das espécies pertencente à *Asplenium* (SMITH *et al.*, 2006).

*Asplenium* L., constituído de plantas terrestres, epífitas ou rupícolas (MORAN, 2011), é um dos gêneros de samambaia mais difundidos, incidindo em todos os continentes, também à exceção da Antártida (CHANG *et al.*, 2013), sendo a maioria ocorrente em ilhas do Atlântico e ilhas do Pacífico no Havaí (REGALADO GABANCHO; SÁNCHEZ VILLAVERDE, 2003).

*A. serratum*, à semelhança do gênero, é uma planta encontrada no interior de matas como terrícola, como epífita sobre troncos vivos ou em decomposição, e como rupícola em paredões rochosos (GÓES-NETO; PIETROBOM, 2012). Esta espécie é registrada nos Estados Unidos, México, Guatemala, Belize, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Grandes e Pequenas Antilhas, Trinidad e Tobago, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina (MICKEL; SMITH, 2004). No Brasil, já foi relatada nos estados do Acre, Alagoas, Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Roraima, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo (SYLVESTRE, 2015).

A família Marsileaceae, que compreende samambaias com capacidade de viver em ambientes aquáticos e terrestres, corresponde a uma pequena família, com três gêneros: *Marsilea* L. (50-80 espécies), *Pilularia* L.(seis espécies) e o monotípico *Regnellidium* Lindman (JOHNSON, 1986; PUEBLA; PRÁMPARO; GANDOLFO, 2015).

O gênero *Marsilea* L., constituído por samambaias aquáticas distribuídas ao longo dos cinco continentes, é encontrado, principalmente, em habitats sazonalmente úmidos, onde espécies crescem em águas rasas e nas margens de lagos, lagoas ou rios. O clima desempenha um fator importante na distribuição de espécies de plantas (WU; KAO, 2011; PAWAR, 2014).

*M. minuta*, naturalizada na América tropical, apresenta-se geograficamente distribuída na África do Sul, Austrália, Cambódia, Brasil, Índia, Filipinas, Malásia, Indonésia, Trinidad e Tobago, Nova Caledônia, Paquistão, Tailândia e Vietnã (LOURENÇO, 2012). No Brasil, é encontrada nos estados de Pernambuco (biomas da caatinga), Rio de Janeiro (Mata Atlântica) Pará (Amazônia brasileira), Paraíba e Ceará (WINDISCH, 2013; TAVARES *et al.*, 2014; LOURENÇO; XAVIER, 2013; REINALDO *et al.*, 2015). Essa espécie apresenta dependência peculiar por ambientes urbanos (antropizados), sendo encontrada em valas, bueiros, áreas alagadas e quintais, onde, no período chuvoso, forma extensas populações com poucos indivíduos férteis. No período menos chuvoso, a espécie é encontrada estéril e com população reduzida (TAVARES *et al.*, 2014).

### 1.3.3 Importância etnobotânica

As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas (metabólitos secundários), e sua utilização para curar diversos males é, tradicionalmente, conhecida há milhares de anos pela humanidade (SANDES; DI BLASI, 2000). Populações de países em desenvolvimento dependem do uso de medicamentos tradicionais, à base de vegetais, aplicados como principal fonte nos cuidados à saúde (CUNNINGHAM, 1993).

Empregado pela primeira vez em 1895, o termo etnobotânica engloba a maneira como um grupo social classifica e dá utilidade às plantas (SCHULTES, 1962; POSEY, 1986). No estudo das plantas medicinais, a etnobotânica se relaciona com outras disciplinas correspondentes como a etnofarmacologia, abordagem que consiste em associar conhecimentos adquiridos junto à comunidade usuária da flora medicinal, com estudos químicos e farmacológicos (ELIZABETSKY, 2003). Nesta abordagem, as plantas medicinais não são apreciadas apenas como simples matéria prima, e considera-se a descrição do histórico da planta como um recurso terapêutico para o tratamento e cura de doenças por determinado grupo étnico (MACIEL *et al.*, 2002).

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, mas a etnobotânica e etnofarmacologia têm sido as principais abordagens utilizadas por cientistas de todo o mundo para selecionar plantas medicinais que podem resultar em novos medicamentos para interesses médicos e farmacêuticos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Segundo Maciel *et al.* (2002), a etnobotânica é citada na literatura como sendo um dos caminhos alternativos que mais evoluiu, nos últimos anos, para a descoberta de produtos naturais bioativos.

Muitos costumam pensar que as samambaias têm sua utilização limitada a ornamentação, porém elas têm sido usadas pela população como gêneros alimentícios, chás e diversas formas de medicamentos, desde os tempos mais antigos (LEE; SHIN, 2010). As samambaias são uma fonte abundante de compostos, e apresentam um potencial significativo em relação às propriedades químicas e atividades biológicas, mas que tem sido pouco explorado (WANG; HE, 2006; ANDRADE *et.al.*, 2014).

Um número significativo de espécies de samambaia é comumente usado na medicina popular. *A. serratum*, popularmente conhecida como rabo de azanata, feto macho do Pará, pena-de-xangô (ARJONA; MONTEZUMA; SILVA, 2007; BARROS; ANDRADE, 1997), tem sido relatada com propriedades medicinais anti-infecciosas para afecções do fígado (BARROS; ANDRADE, 1997). Há relatos de seu uso, por populações no Panamá, no tratamento de queimaduras, na forma de cataplasma (GUPTA *et al.*, 2005; CABALLERO-GEORGE; GUPTA, 2011). O emprego como analgésico é realizado por populações na Venezuela, que consomem a infusão associada a leite (DÍAZ; ORTEGA, 2006). Navarrete *et al.* (2006) relatam o uso como antipirético por grupos étnicos no Equador. O aproveitamento das folhas como anti-inflamatório, também, foi citado por Benko-Iseppon *et al.*(2012), quando descreveram os usos etnobotânicos da flora nativa do Nordeste brasileiro.

*M. minuta*, também conhecida como 'trevo d'água' ou 'trevo da sorte' (TAVARES *et. al.*, 2014), possui importante valor medicinal, apresentando propriedades medicinais úteis para tratar hepatite, diabetes, picada de cobra, inflamação, infertilidade (PAWAR, 2014). As folhas de *M.minuta* têm sido utilizadas, por populações na Índia, no tratamento do diabetes (NATARAJAN *et al.*, 2013) e no combate à insônia (SINGH; KUMAR, 2014). O uso para o diabetes também é mencionado por Ganesan, Ramar Pandi e Banumathi (2007), que relatam que as folhas, secas e em pó, são consumidas misturadas à água quente. As folhas ainda são empregadas como anti-inflamatórios e diuréticos (DHANAM; ELAYARAJ, 2014), sedativo (SINGH; UPADHYAY, 2014), para tratar tosse e bronquite (PERUMAL, 2010), condições espásticas dos músculos da perna (SINGH; UPADHYAY, 2014), parar sangramento do nariz, tratar indigestão, reduzir inchaço das gengivas (AJAIB *et al.*, 2014) e na terapêutica de problemas mentais ( SEM;GHOSH, 2011). Planta é encontrada no Sul da Ásia. Qadir *et al.* (2013) ressaltam, também, o uso tradicional como antibacteriano, anticonvulsivante, analgésico e antitóxico.

### 1.3.4 Metabólitos secundários e importância medicinal

O metabolismo, processo através do qual os sistemas vivos obtêm e utilizam energia livre para efetuarem suas funções, é dividido em anabolismo (processo de síntese de biomoléculas) e catabolismo (processo de degradação de nutrientes e constituintes celulares) (VOET, VOET, PRATT, 2014). E são denominados metabólitos os compostos químicos resultantes desses processos (MACHADO, 2007).

Em vegetais, o metabolismo divide-se em: primário e secundário. Os metabólitos primários são os açúcares, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, que são responsáveis pelas funções vitais das plantas (DI STASI, 1995). Estes produtos essenciais, através de rotas biossintéticas diversas, originam os metabólitos secundários, que, de modo geral, apresentam estrutura química bastante complexa e acentuada atividade biológica (SANDES; DI BLASI, 2000). Os metabólitos secundários são, normalmente, produzidos pelas plantas para fornecer proteção contra efeitos adversos em seu ambiente, tendo importância na defesa contra herbívoros, pragas e patógenos. Como não podem se deslocar, os vegetais lançam mão desses artifícios moleculares para garantir sua sobrevivência (SANDES; DI BLASI, 2000; BENNET; WALLSGOVER, 2006; LEE; SHIN, 2010).

Uma ampla gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, é biologicamente ativa, isto é, tem ação tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida (PLETSCH, 1998). Dentre esses compostos têm-se os metabólitos secundários: taninos, alcalóides, flavonóides, saponinas, entre outros (KLEIN *et al.*, 2010).

Existem vários grupos de princípios ativos, alguns de destaque são abordados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas

<b>Princípio ativo</b>	<b>Propriedades medicinais ou tóxicas</b>
Esteróides	Propriedades hipocolesterolêmicas, anticarcinogênica.
Alcalóides	Propriedades calmante, sedativa, estimulante, anestésica, analgésica, antiarrítmica, antibacteriana, antitussígeno; Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais.
Antocianinas	Propriedades antioxidantes.
Mucilagens	Propriedades cicatrizante, anti-inflamatória, laxativa, expectorante e antiespasmódica.
Terpenóides	Propriedades sedativa, ansiolítica, antinociceptiva, anticonvulsivante, pró-convulsivante, alucinógena.
Flavonóides	Propriedades anti-inflamatórias, antiesclerótica, antiedematosa, fortalecedora dos vasos capilares, dilatadora de coronárias, espasmolítica, anti-hepatotóxica, colerética, antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, antineoplásica, antioxidante, anti-hipertensiva, hipolipidêmica, antiplaquetária; Poder de redução da fragilidade e permeabilidade capilares; Inibição da destruição do colágeno.
Taninos	Propriedades adstringentes, antimicrobiana (antidiarréica), antioxidante, antisséptica, cicatrizante, vasoconstritora, anticarcinogênica, anti-inflamatória, inibidora da transcriptase reversa em HIV; Precipitam proteínas.
Saponinas	Propriedades antioxidantes, ação citotóxica atuando contra células tumorais.
Óleos essenciais	Propriedades bactericida, antivirótica, cicatrizante, analgésica, relaxante, expectorante, antiespasmódica.

Fonte: Adaptada de Lorenzi; Matos (2002); Monteiro (2005); Machado *et al.* (2008); Passos *et al.* (2009); García; Pérez-Urria Carril (2009); Pereira; Cardoso (2012).

Os componentes responsáveis pelas atividades biológicas das samambaias são, em sua maioria, compostos fenólicos, flavonóides, alcalóides, terpenóides (HO *et al.*, 2010). A partir dos efeitos desses metabólitos secundários, as samambaias apresentam atividades funcionais para saúde humana (por exemplo, antioxidante, antibiótica, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras) (LEE; SHIN, 2010).

Os glicosídeos mais comumente relatados são flavonóides, principalmente, kaempferol, quercetina, luteolina e derivados de apigenina (ANDRADE *et al.*, 2014). Os flavonóides são metabólitos pertencentes à classe dos polifenóis, principais responsáveis pelo poder antioxidante dos vegetais. A quercetina é o flavonoide mais amplamente distribuído no reino vegetal. Além de sua alta capacidade antioxidante, a quercetina também apresenta propriedade antiviral, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicrobiana (CAPRA *et al.*, 2014).

Os alcalóides são uma classe de metabólitos secundários, geralmente, bastante bioativa (SANDES; DI BLASI, 2000). A cafeína é um dos alcalóides, com atividade biológica, mais ingeridos no planeta, e está presente em mais de 60 espécies de plantas. Apresenta ação farmacológica variada provocando, dentre outros efeitos, alterações no sistema nervoso central, sistema cardiovascular e homeostase de cálcio (DE MARIA; MOREIRA, 2007; TAVARES; SAKATA, 2012).

Estudos químicos em samambaias do gênero *Asplenium* têm revelado a presença de compostos de diferentes classes, como: flavonóides (IMPERATO, 1989; JOHNSON; IRUDAYARAJ, 2011; IWASHIMA; MATSUMOTO, 2011; ANDRADE *et al.*, 2014), xantonas (SMITH; HARBORNE, 1971; IMPERATO, 1991; IWASHIMA; MATSUMOTO, 2011; ANDRADE *et al.*, 2014), fenóis e lignanas (DALL'ACQUA *et al.*, 2009), triterpenos, alcalóides (KULIP *et al.*, 2010; JOHNSON; IRUDAYARAJ, 2011; ONDO *et al.*, 2013), taninos, polifenóis, cumarina, glicosídeos cardíacos (ONDO *et al.*, 2013).

No que se refere ao gênero *Marsilea*, têm identificado a presença de: açúcares redutores, triterpenóides, açúcares, antraquinonas, alcalóides (DE BRITTO; GRACELIN; KUMAR, 2013; PANDA *et al.*, 2014), compostos fenólicos, flavonóides, esteróides, saponinas (MITHRAJA *et al.*, 2011; PEPSI; BEN; JEEVA, 2012; DE BRITTO; GRACELIN; KUMAR, 2013), taninos (MITHRAJA *et al.*, 2011; DE BRITTO; GRACELIN; KUMAR, 2013; PANDA *et al.*, 2014), cumarinas (MITHRAJA *et al.*, 2011; PEPSI; BEN; JEEVA, 2012).

A variedade, em termos de composição e de propriedades químicas, na qual esses compostos incidem na natureza é relevante, e, frequentemente, essas substâncias podem servir, direta ou indiretamente, para a elaboração e síntese de um grande número de fármacos (SANDES; DI BLASI, 2000). A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial em plantas medicinais pode constituir em mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000), e a biodiversidade dos biomas brasileiros pode ser uma opção como fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de medicamentos (NOGUEIRA, 2010; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

### 1.3.5 Atividades biológicas

#### 1.3.5.1 Atividade antimicrobiana

Os micro-organismos são seres microscópicos unicelulares, pertencentes a diversos grupos taxonômicos, englobando os reinos Monera (bactérias e cianobactérias) e Fungi (ODEBRECHT; ABREU, 1997). Inúmeras doenças de importância para a saúde pública são de origem microbiana, principalmente, bacteriana (ALVARENGA *et al.*, 2007).

As bactérias revestem pele e mucosas, e ainda cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais, compondo a microbiota. Muitas delas são inofensivas, e até benéficas ao seu hospedeiro, conferindo proteção contra patógenos e doenças, limitando a colonização por bactérias nocivas (SANTOS, 2004). Outras são patogênicas, e, dentre elas, destacam-se as pertencentes aos gêneros: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, entre outros (LEVINSON, 2014).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da pele e da mucosa de diversos animais. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções oportunistas (NOSTRO *et al.*, 2004). *Staphylococcus aureus* representa o agente etiológico mais comum em infecções como furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana, além de causar diferentes tipos de intoxicações (VERHOEFF *et al.*, 1999).

*Escherichia coli*, da família das Enterobacteriaceae, é classificada como um bacilo gram-negativo fermentador de glicose e lactose com produção de gás e ácido, sendo uma espécie predominante entre as bactérias intestinais anaeróbias facultativas e não formadoras de esporos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007). Essa espécie é responsável por uma ampla gama de enfermidades em humanos, principalmente infecções do trato urinário (HUGHES *et al.*, 1982). É conhecida por produzir enterotoxinas cujas propriedades e participação em diarreias tem sido amplamente investigada (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977, 1978; SCOTLAND *et al.*, 1980).

As gram-negativas *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* destacam-se como principais causadoras de doenças diarreicas (O'RYAN; PRADO; PICKERING, 2005). As infecções por *Shigella* são uma das principais causas de morte no mundo (ONODERA *et al.*, 2012), e compreendem uma das principais causas de morbimortalidade associada à diarreia em crianças menores de cinco anos (KOTLOFF, *et al.*, 1999). Micro-organismos

pertencentes a esse gênero causam disenteria bacilar, uma doença invasiva do cólon humano, prevalente em regiões tropicais, especialmente, em algumas áreas superpovoadas do mundo em desenvolvimento (SANSONETTI, 1992). *Shigella* compreende quatro espécies, incluindo *Shigella flexneri* (LEVINE *et al.*, 2007), agente gram-negativo associado a surtos endêmicos de shigelose (MALDONADO-CONTRERAS *et al.*, 2013), que invade o epitélio do cólon e causa destruição inflamatória maciça e dano tecidual grave (FRITAH, S. *et al.*, 2014, GEORGE *et al.*, 2014).

*Salmonella* é o principal agente patogênico de origem alimentar, responsável por causar um amplo espectro de doenças humanas, que vão desde a gastroenterite leve a doença sistêmica ameaçadora à vida (DOBLE, 2012). As infecções por *Salmonella* são um importante problema de saúde pública mundial (GUENTHER *et al.*, 2012), e ocasionam muitas mortes todos os anos (CHAUHAN; KANG, 2014). *Salmonella Typhimurium*, um patógeno zoonótico (TORPDAHL *et al.*, 2013), é considerado um dos principais causadores de gastroenterite em humanos (MCCLELLAND, *et al.*, 2001), e apresentam alta prevalência da resistência antimicrobiana (TORPDAHL *et al.*, 2013).

Os antibióticos, utilizados no tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos, são compostos, naturais ou sintéticos, capazes de destruir agentes infecciosos ou inibir o seu crescimento. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (RANG; DALE; RITTER, 2001; WALSH, 2003).

O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928 (NICOLAOU; MONTAGNON, 2008). A ampla utilização dos antibióticos favoreceu o desenvolvimento de resistência bacteriana (FUCHS; WANNAMACHER; FERREIRA, 2006). As constantes alterações das características microbiológicas, já com perfil de resistência farmacológica, tende a esgotar as estratégias terapêuticas de que se dispõe na atualidade (OLIVEIRA; DE LIMA, 2010; PALAVRA *et al.*, 2010).

A resistência aos antibióticos assume, para determinadas estirpes, um caráter verdadeiramente alarmante, e o desenvolvimento de novos fármacos não acompanha a velocidade de evolução das multirresistências (PALAVRA *et al.*, 2010). Um grande número de pesquisas vem sendo realizadas enfatizando as propriedades antibacterianas de produtos vegetais, em decorrência à crescente importância dada às infecções bacterianas em comunidades hospitalares e o desenvolvimento progressivo da resistência antimicrobiana (OLIVEIRA; DE LIMA, 2010; PALAVRA *et al.*, 2010).

Os vegetais, devido ao seu metabolismo secundário, apresentam a capacidade de produzir substâncias antibióticas, podendo ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas (GOTLIEB, 1981; NASCIMENTO *et al.*, 2000). Os principais compostos químicos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas, incluem: terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas, polipeptídios, substâncias fenólicas e polifenóis, fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis, flavonóides, tanino e cumarinas (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005).

A presença de atividade antimicrobiana é citada para algumas espécies de *Asplenium*. Em estudo de Berk *et al.* (2013), o extrato aquoso de *Asplenium ceterach* L., por meio do método de difusão em ágar e da determinação da Concentração Inibitória Mínima, demonstrou potencial antimicrobiano, e *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus* foram considerados os micro-organismos mais sensíveis, apresentando CIM de 18 µg/mL e 09 µg/mL, respectivamente. Esses autores relatam que o extrato não demonstrou efeito antimicrobiano contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Candida albicans*.

Desta (1993) também constatou a atividade antimicrobiana, através do método de difusão, de extratos brutos da raiz de *Asplenium trichomanes* L., cujas frações metanólica e aquosa apresentaram melhores percentuais de inibição do crescimento microbiano, contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Conforme Lai, Lim e Tan (2009), o extrato bruto metanólico de *Asplenium nidus* L., por meio do teste de disco difusão, demonstrou efetiva ação antimicrobiana frente a patógenos gram-negativos, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e gram-positivos, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, com percentuais de inibição entre 49 a 74%, quando comparados à estreptomicina.

O gênero *Marsilea* também apresenta relatos de efetiva atividade antimicrobiana, como é evidenciado em estudo desenvolvido por Bindu, Jose e Akhila (2014) com a espécie *M. minuta*, no qual todas as frações dos extratos (clorofórmio, acetato de etila, alcoólica e aquosa) apresentaram atividade para os micro-organismos testados (*Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), exceto o extrato de éter de petróleo. Esses autores mencionaram que o extrato acetato de etila foi mais ativo em frente à *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM, respectivamente, de 97.94 µg/mL e 92.3 µg/mL. O extrato alcoólico foi eficaz contra *Escherichia coli* (CIM de 141.6 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM de 136.87 µg/mL), assim como o de clorofórmio, com CIM equivalentes a 275.8 µg/mL para *E. coli* e 295.3

$\mu\text{g/mL}$  para *P. aeruginosa*. O extrato aquoso foi ativo contra *Escherichia coli* (CIM de 94.19  $\mu\text{g/mL}$ ) e *Staphylococcus aureus* (CIM de 223.7  $\mu\text{g/mL}$ ).

Panda *et al.* (2014), pesquisaram a atividade antimicrobiana dos extratos brutos metanólico e de clorofórmio de *M. minuta*, por disco difusão, utilizando toda planta, e identificaram que o extrato metanólico de *M. minuta* foi eficaz contra *Staphylococcus citreus*, *Chromobacter sp.*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, enquanto que o extrato clorofórmio demonstrou atividade contra *Salmonella typhii*, *Salmonella paratyphii*, *Enterobacter sp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Candida albicans*. Ambos os extratos, conforme ainda descreveram os autores, não foram efetivos frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella*, *Vibrio cholera*, *Shigella sonnie*, *S. boydii*, *Providencia*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* and *Rhizopus sp.* Os valores de CIM do extrato metanólico de *M. minuta* L. foram de 8 mg / mL e 5mg / mL contra *Staphylococcus citreus* e *C. albicans*, respectivamente.

Nagarajan e De Britto (2014) testaram a ação do extrato etanólico das folhas, rizoma e esporocarpo de *M. minuta*, por meio de disco difusão, contra a gram-negativa, *Escherichia coli*, e a gram-positiva, *Bacillus subtilis*, e os resultados mostraram boa atividade antimicrobiana tanto para gram-positiva, quanto para gram-negativa. Os extratos de rizoma e folhas desta espécie apresentaram boa atividade antibacteriana, sendo os extratos do rizoma mais eficazes.

A ocorrência de atividade antimicrobiana também é descrita em outras espécies do gênero *Marsilea*, como a *Marsilea quadrifolia* L. Segundo Gini e Jothi (2015), a atividade antibacteriana dos extratos de hexano, acetato de etila, etanol e metanol de *M. quadrifolia*, avaliada por disco difusão, em concentrações de 1,25, 2,5 e 5 mg/disco, revelou que o extrato de acetato de etila (5 mg/disco) foi eficaz contra a maior parte das estirpes de bactérias, enquanto que os extratos de hexano, etanol e metanol foram fracamente eficaz. Foram sensíveis ao extrato de acetato de etila: *Escherichia coli* - Cipro Resistant (13 mm), *Erwinia amylovora* (12 mm), *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Eubacterium lentum* (11mm cada), *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi* e *Pseudomonas fluorescense* (10 mm cada), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sensível à Meticilina, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica typhimurium* e *Vibrio fischeri* (9 mm cada).

Gopalakrishnan e Udayakumar (2014) avaliaram extratos das folhas e caule de diferentes solventes (aquoso, metanólico, etanólico e éter dietílico), em diferentes concentrações (2,5, 3,75 e 5 mg/mL), de *Marsilea quadrifolia* contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* e *Streptococcus*

*pyogenes* pelo método de difusão em poços. Os autores referiram que os extratos das folhas e tronco apresentaram atividade antimicrobiana, com halos de inibição que variaram de 8 a 23 milímetros. Os extratos, aquoso, etanólico e metanólico, das folhas foram mais eficazes que o extrato de éter dietílico. O extrato aquoso da folha mostrou máxima zona inibição contra *Streptococcus pyogenes* (23 mm), seguido pelo extrato etanólico que mostrou halo de 21 mm contra *Bacillus subtilis*. A mínima atividade antibacteriana foi observada pelo extrato de caule de éter dietílico contra a *Klebsiella pneumonia* (8 mm). *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Streptococcus pyogenes* mostraram resultados positivos contra todos os extratos de caule dos diferentes solventes testados.

### 1.3.5.2 Atividade citotóxica

O câncer, assinalado como uma das principais causas de morbimortalidade nas próximas décadas, em todas as regiões do mundo, é uma patologia caracterizada pelo acelerado desenvolvimento e proliferação de células anômalas que invadem e destroem tecidos adjacentes. Essas células podem se espalhar para qualquer zona do corpo, através do processo de metástase, principal motivo das mortes por câncer (BRAY *et al.*, 2012; WHO, 2015).

Apesar dos consideráveis esforços no domínio da investigação e do tratamento, o câncer continua a ser um grave problema de saúde pública, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas em 2012 (WHO, 2015). Atualmente, constitui a segunda principal causa de morte nos países desenvolvidos, e é uma das principais causas de morbidade (WHO, 2002; WHO, 2008). O número de novos casos deverá aumentar em cerca de 70% ao longo das próximas duas décadas (WHO, 2015).

Ultimamente, usam-se antineoplásicos com origem sintética e/ou natural, no tratamento de leucemias, linfomas e tumores sólidos (CHABNER; BRUNTON; KNOLLMANN, 2011; DE VITA *et al.*, 2008). A maioria dos agentes antineoplásicos é derivada de fontes naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e micro-organismos (CRAGG; NEWMAN, 2005; NEWMAN *et al.*, 2002). Compostos derivados de plantas tem sido fonte importante de diversos agentes antineoplásicos clinicamente úteis. Entre esses agentes estão: vinblastina, vincristina, derivados da camptotecina, topotecano e irinotecano, etoposido, derivados de epipodofilotoxina e paclitaxel (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Por definição, a citotoxicidade de um agente significa o efeito destrutivo que este provoca às células (LI,1996). Segundo Freshney (1994), a citotoxicidade, determinada por antineoplásicos, é um evento complexo *in vivo*, e pode manifestar variados efeitos, desde a morte celular a diversos eventos tóxicos, tanto em células tumorais quanto em células normais de medula óssea, pele ou intestino.

Os estudos de citotoxicidade centram-se nos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular. No entanto, vale considerar que muitas substâncias não tóxicas se tornam tóxicas após o metabolismo hepático. Da mesma forma, muitas substâncias que são tóxicas *in vitro* podem ser detoxificadas pelas enzimas hepáticas (FRESHNEY, 1994).

Muitas samambaias podem ser tóxicas ou apresentar um risco cancerígeno, no entanto, parecem mostrar um enorme potencial, no que diz respeito ao número e à variedade de compostos anticancerígenos, ainda a ser explorado. Os compostos fenólicos incluindo flavonóides, bem como os esteróides, alcalóides (especialmente em licopódios) e terpenóides são considerados os principais componentes anticancerígenos de muitas samambaias (TOMŠÍK, 2014).

Testes citotóxicos frente a linhagens de células tumorais são relatados para os gêneros *Asplenium* e *Marsilea*. Naghibi e colaboradores (2014) descreveram que, através do método de MTT, o extrato metanólico de *Asplenium trichomanes* L., em concentrações que variaram entre 100 e 3.125 ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ), foi considerado inativo frente às linhagens de células tumorais MCF-7, HepG-2, A-549 e HT-29. Segundo Uma e Pravin (2013), também por meio do teste do MTT, os extratos metanólico, de acetato de etila e aquoso de *Marsilea quadrifolia* L., espécie muito próxima à *M.minuta* (Johnson, 1986), mostraram diminuição da viabilidade celular e inibição do crescimento celular, em modo dependente da dose, frente a células tumorais MCF-7. Ainda conforme esses autores, os valores de  $\text{IC}_{50}$  do padrão de 5-fluorouracil, dos extratos de metanol, acetato de etila e aquoso foram, respectivamente, de 9,3, 39,06, 47,82 e 187.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Outros estudos, que avaliam a atividade citotóxica de samambaias do gênero *Asplenium*, também são descritos, como trabalho realizado por Marimuthu alias Antonysamy *et al.* (2014), que decreveram o potencial citotóxico de *Asplenium aethiopicum* (Burm.f.) Bech. Esses autores, através do teste de letalidade com *Artemia Salina*, revelaram que os extratos brutos de éter de petróleo, acetona, clorofórmio e metanol de *A. aethiopicum* mostraram diferentes taxas de mortalidade de náuplios de artemia salina, as quais aumentaram proporcionalmente à concentração do extrato. O extrato de acetona foi o mais

eficaz, com  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , respectivamente, de 192,8 e 434,3 ppm, enquanto que extrato de clorofórmio mostrou menos citotoxicidade ( $CL_{50} = 353,2$  ppm) que as demais fracções.

O gênero *Marsilea* também possui outros relatos de atividade citotóxica confirmada. *Marsilea quadrifolia* L., apresentou atividade citotóxica, a partir do teste de letalidade com *Artemia Salina*, com valores de  $CL_{50}$  de 9.543  $\mu\text{g/mL}$ , 7,820  $\mu\text{g/mL}$ , e 8.589  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, para os extratos brutos de éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila, valores próximos ao do padrão vincristina ( $CL_{50} = 6.628$   $\mu\text{g/mL}$ ), indicando a presença de princípios bioativos que podem ser muito úteis como antitumorais (Ripa *et al.*, 2009).

## CAPÍTULO 2

\*Artigo a ser submetido à revista *Journal of Ethnopharmacology*

### **Avaliação do potencial antibacteriano e citotóxico dos extratos alcoólicos de *Asplenium serratum* L. e *Marsilea minuta* L.**

**Andrea de A. Timóteo<sup>a</sup>, Emerson P. S. Falcão<sup>b</sup>, Idjane S. de Oliveira<sup>c</sup>, Terezinha Gonçalves<sup>d</sup>, Augusto C. P. Santiago<sup>e,\*</sup>**

<sup>a</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Síntese e Isolamento molecular, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

<sup>d</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

<sup>e</sup> Laboratório de biodiversidade, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil

\*Endereço para correspondência: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE; e-mail: [augustosantiago@yahoo.com.br](mailto:augustosantiago@yahoo.com.br)

## 2.1 Abstract

**Ethnopharmacological relevance:** Ferns, known mainly for ornamental use, are used in folk medicine since ancient times to cure diseases. Species of the genus *Asplenium* L. and *Marsilea* L. presents a wide range of biological activities. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and cytotoxic activity of the extracts of the species *Asplenium serratum* L. and *Marsilea minuta* L., species occurring in Brazil, in addition using reports in the popular therapy. **Materials and Methods:** Alcoholic extracts of *A. serratum* and *M. minuta*, were produced, respectively, by cold exhaustion and maceration. Chromatographic analyzes were carried out through HPLC for quercetin and caffeine standards. Default bacterial strains of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* MSSA were used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by microdilution method. Synergism tested against *E. coli* and *S. aureus* MSSA was performed by checkerboard method. Verification of cytotoxicity was developed by the MTT method, against human tumor cell lines NCI-H29, HEp-2, MCF-7 and HL-60. **Results:** Quercetin and caffeine have been suggested as constituents of *M. minuta* L. The extracts showed MIC of 5.0 mg/mL against *S. aureus* MSSA and *S. typhimurium*, and 2.5 mg/mL against *E. coli* and *S. flexneri*. In synergy, extracts had better bactericidal activity against *S. aureus* MSSA at concentrations  $\geq 2.56$  mg / ml (*A. serratum*) and  $\geq 0.33$  mg / mL (*M. minuta*). The extracts were considered inactive front human tumor cell lines. **Conclusion:** These results demonstrate antimicrobial activity and synergistic effects of these ferns extracts, in addition revealing the presence of a large variety of metabolites, yet unidentified.

**Keywords:** Ferns. Biological activities. Synergism. Cytotoxicity. Phytochemicals

## 2.2 Introdução

As plantas medicinais possuem considerável valor biológico e são aproveitadas como recurso terapêutico (Pletsch, 1998; Sandes; Di Blasi, 2000). As samambaias compreendem um grupo de plantas vasculares sem sementes (Zuquim *et al.*, 2008), com apontamentos antigos sobre algumas formas de uso no tratamento de doenças (Singh *et al.*, 2010). No entanto, ainda são pouco exploradas em suas potencialidades, e relegadas, muitas vezes, ao caráter ornamental que possuem (Teixeira *et al.*, 2015).

Os principais compostos relacionados às atividades biológicas, deste grupo vegetal, são: compostos fenólicos, flavonóides, alcalóides, terpenóides (Ho *et al.*, 2010). A partir dos efeitos dos metabólitos secundários, as samambaias exibem atividades funcionais à saúde humana (Lee; Shin, 2010; Singh *et al.*, 2010). Ainda segundo Singh e colaboradores (2010), Teofrasto (327-287 a.C) e Dioscórides (50 d.C) listaram várias espécies desse grupo com potencial para cura de graves distúrbios e ressaltaram a importância dos estudos fitoquímicos, dando ênfase aos compostos encontrados e suas aplicações terapêuticas.

Vários trabalhos têm demonstrado que as samambaias apresentam um forte potencial de utilização na medicina popular (Barros; Andrade, 1997; Caballero-George, C., Gupta, M. P., 2011; Benko-Iseppon *et al.*, 2012; Singh; Singh, 2012; Sujarwo *et al.*, 2014), além de atividades biológicas comprovadas, como antimicrobiana (Banerjee; Sen, 1980; Singh *et al.*, 2008; Lai; Lim; Tan, 2009; Lai; Lim; Kim, 2010; Morais – Braga *et al.*, 2012; Chai *et al.*, 2013), antitumoral (Quadri-Spinelli *et al.*, 2000; Lai; Lim; Kim, 2010), antioxidante (Lai; Lim; Tan, 2009; Lai; Lim; Kim, 2010; Chai *et al.*, 2013), antinociceptiva (Nogueira, 2010), anti-inflamatória (Nogueira, 2010; Haider *et al.*, 2011), entre outras.

Espécies do gênero *Asplenium*, caracterizadas por plantas terrestres, epífitas ou rupícolas (Boldrin; Prado, 2007), apresentaram atividade antimicrobiana contra alguns micro-organismos patogênicos à saúde humana (Desta, 1993; Lai; Lim; Tan, 2009, Berk *et al.*, 2013), assim como espécies do gênero *Marsilea* L. (Ripa *et al.*, 2009; Gopalakrishnan; Udayakumar, 2014; Sethi, 2014; Gini; Jothi, 2015), constituído por samambaias aquáticas (Wu; Kao, 2011). Além disso, a atividade citotóxica também foi identificada no gênero *Asplenium* (Marimuthu alias Antonysamy *et al.*, 2014) e *Marsilea* (Ripa *et al.*, 2009).

*Asplenium serratum* L. e *Marsilea minuta* L., espécies ocorrentes no Brasil (Sylvestre, 2015; Windisch, 2013; Tavares *et al.*, 2014; Lourenço; Xavier, 2013; Reinaldo *et al.*, 2015), apresentam diversas indicações de uso na medicina popular, em variadas partes no mundo, dentre elas, respectivamente, propriedades anti-infecciosas para afecções do fígado (Barros; Andrade, 1997) e antibacteriana (Qadir *et al.*, 2013).

Neste contexto, é importante a análise de espécies indicadas na medicina popular e com potencialidades biológicas. A realização deste estudo visou avaliar a atividade antibacteriana e citotóxica do extrato alcoólico das espécies *A. serratum* e *M. minuta*, na busca por novas substâncias, com potencial antimicrobiano e antineoplásico.

## **2.3 Material e Métodos**

### **2.3.1 Material botânico**

A coleta de *A. serratum* foi realizada no dia 03 de junho de 2014, correspondente ao inverno, na Mata da Colônia, município de Bonito, Pernambuco, Brasil (8°30'14"S e 35°42'56"W). *M. minuta* foi coletada em 29 de agosto de 2013, também durante o inverno, na Fazenda Chico da Velha, bairro São José, Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil (7°13'16"S e 39°21'14"W). O material testemunho foi depositado no Herbário UFP (Prof. Geraldo Mariz), Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco.

### **2.3.2 Preparação dos extratos vegetais**

#### **Extrato das folhas de *A. serratum* (metanólico)**

O extrato metanólico de *A. serratum* foi obtido utilizando-se o método de esgotamento a frio. As folhas foram secas à temperatura ambiente (30 °C), e trituradas com auxílio de tesoura e pilão, sendo obtidas 30 g de matéria-prima. Sequencialmente, o material foi submetido a três extrações sucessivas com metanol P.A. (200 mL), com intervalo de setenta e duas horas (72 h) entre as extrações, à temperatura ambiente. Os extratos obtidos dessas extrações foi concentrado, a vácuo, em evaporador rotativo, e em banho-maria à temperatura de 65 °C para remoção do solvente. O extrato foi mantido em dessecador até peso constante, sendo retirado apenas quando utilizado para os testes biológicos.

### **Extrato das folhas de *M.minuta* (etanólico)**

O extrato etanólico da espécie *M. minuta* (folhas frescas) foi elaborado através de maceração com etanol 95 % à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-CE/ Brasil. Para a extração, as folhas frescas de *M.minuta* foram cortadas com o uso de tesouras, para o aumento da superfície de contato, e colocadas em recipiente de vidro, com a adição do etanol 95 % até encobrir todo material vegetal, permanecendo por setenta e duas horas (72 h), à temperatura ambiente. O extrato obtido foi, então, concentrado, a vácuo, em evaporador rotativo, e em banho-maria à temperatura de 80 °C para remoção do solvente. O extrato foi mantido em dessecador até peso constante, sendo retirado apenas quando utilizado para os testes biológicos.

### **2.3.3 Análise Cromatográfica dos extratos de *A. serratum* e *M. minuta***

#### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Os extratos de *A. serratum* e *M. minuta* foram submetidos a análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme metodologia proposta por Vicente e Legaz (1988). Os ensaios foram realizados em cromatógrafo líquido *Dionex Thermo Scientific* modelo *Ultimate 3000*, acoplado a detector de ultravioleta (UV), com arranjo de Diador (*Diode Array Detector- DAD*) a 254 nm, coluna C18 de fase reversa, à temperatura de 24,0 °C. O volume de injeção (automático) foi de 20 µL, com fluxo constante a uma taxa de 1,0 mL/min. As amostras foram analisadas por CLAE no modo isocrático, utilizando como fase móvel o sistema metanol/água/ácido acético (80:19,5:05, v/v/v). Os extratos orgânicos brutos foram diluídos na fase móvel à concentração de 100 mg/mL. Quercetina e cafeína foram utilizadas como padrão, sendo submetidas às mesmas condições experimentais dos extratos. Os resultados foram avaliados mediante tempo de retenção das substâncias na coluna, e cálculo da área dos picos cromatográficos.

### 2.3.4 Atividade Antibacteriana

#### Micro-organismos

Quatro cepas de espécies bacterianas foram utilizadas no estudo, sendo todas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC). Para os testes de microdiluição em caldo, foram utilizadas bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC® 25922; *Shigella flexneri* ATCC® 12022; *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028. E a bactéria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina) ATCC® 29213.

Para os testes de sinergismo, foram utilizadas uma cepa bacteriana Gram-negativa, *Escherichia coli* ATCC® 25922, e outra cepa Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC® 29213. Essas bactérias, padrões para testes antimicrobianos, compõem grupo dos principais agentes causadores de infecção intestinal e hospitalar, respectivamente.

#### Preparo das soluções teste dos extratos vegetais

Para os testes de microdiluição em caldo, os extratos de *A. serratum* e *M. minuta* foram dissolvidos em DMSO 10 %, perfazendo concentração de 10 mg/mL. Para ambos os extratos, a concentração inicial, na placa 96 poços, foi de 5 mg /mL. A concentração final atingiu a faixa de 0,005 mg/mL, após diluição seriada 1:2.

Para o teste de sinergismo, os extratos foram dissolvidos em DMSO 10 % numa concentração de 20,5 mg /mL (*A. serratum*) e 21 mg/mL (*M. minuta*). As concentrações dos extratos, nos poços da microplaca, após diluição seriada 1:2, variaram entre 10,25 mg /mL a 0,08 mg /mL (*A. serratum*) e 10,5 mg /mL a 0,005 mg /mL (*M. minuta*).

#### Preparo das suspensões bacterianas

As suspensões foram preparadas conforme CLSI (2012). Os inóculos foram preparados a partir de culturas em crescimento exponencial (16h). Os isolados bacterianos foram semeados, em placas de Petri, com meio ágar Mueller-Hinton e incubados a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, os micro-organismos foram suspensos diretamente em solução salina (0,9 %) estéril, cuja suspensão foi ajustada à solução padrão da escala de *McFarland* tubo 0,5, contendo  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

A partir da suspensão bacteriana de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, foi realizada diluição para obtenção de suspensão contendo  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, da seguinte forma: 0,1 mL da suspensão  $10^8$  foi diluída em 9,0 mL de solução salina 0,9 % (1:100). Quando alíquota dessa suspensão foi aplicada aos poços da placa, contendo meio de cultura (caldo Mueller-Hinton ou caldo BHI) e extrato de samambaia, a concentração final de bactérias do teste atingiu, aproximadamente,  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL.

### **Método de Microdiluição em caldo**

A atividade antibacteriana foi determinada, através do teste de microdiluição em caldo, com definição da Concentração Inibitória Mínima (CIM), de acordo com CLSI (2012), adaptada para produtos naturais, com a finalidade de avaliar a susceptibilidade dos isolados bacterianos aos extratos vegetais.

O desenvolvimento do experimento foi realizado em placas de microdiluição 96 poços, com fundo redondo "U", ordenadas em fileiras de A a H e colunas de 1 a 12, sendo utilizada uma placa para cada cepa bacteriana testada (Apêndice I). Foram distribuídos 80  $\mu$ L do meio caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) em todos os poços da placa. Sequencialmente, 80  $\mu$ L da solução do extrato de *A. serratum* (solução teste) foram acrescentadas nos poços C2, D2 e E2, e 80  $\mu$ L da solução do extrato de *M. minuta* (solução teste) nos poços F2, G2 e H2. Após homogeneização dos produtos nos poços da coluna 2, realizaram-se diluições seriadas (1:2) e sucessivas, transferindo-se sempre uma alíquota de 80  $\mu$ L dos poços da coluna mais concentrada para os poços da coluna sucessora até a coluna 12, sendo os 80  $\mu$ L finais desprezados. As concentrações dos extratos de *A. serratum* e *M. minuta* testadas, após diluições seriadas (1:2), foram: 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,62 mg/mL, 0,31 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,009 mg/mL e 0,005 mg/mL.

Adicionalmente, foram distribuídos 20  $\mu$ L do inóculo bacteriano em todos os orifícios da microplaca, exceto nos poços A1 a A6, correspondente apenas ao meio de cultura (BHI), e nos poços C1 a H1, que continham o meio BHI e extratos. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 35 °C por 24h.

Após esse intervalo, foram adicionados 30  $\mu$ L de TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) a 0,5% em cada orifício das microplacas, que foram incubadas por 1h. Nos poços em que se identificou ausência de coloração existiu inibição do crescimento microbiano, já os que apresentaram coloração avermelhada houve crescimento. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o aparecimento de coloração avermelhada (Duarte *et al.*, 2004).

Para cada microplaca, correspondente a uma cepa, foi usado um controle negativo (BHI, DMSO e inóculo bacteriano), um controle de crescimento (BHI e inóculo bacteriano) e um controle positivo de atividade antibacteriana (BHI, antibiótico padrão e inóculo bacteriano). Ainda, foram procedidos os controles de esterilidade do meio BHI (80 µL do meio de cultura em um poço vazio), dos extratos (80 µL da solução teste dos extratos com 80 µL de BHI). Os antibióticos-padrão utilizados foram cloranfenicol na concentração 0,5 mg/mL e oxacilina, também, na concentração 0,5 mg/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Teste de Sinergismo dos extratos Vegetais**

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *A. serratum* e *M. minuta*, em sinergismo, seguiram-se os procedimentos do método de *checkerboard* em placas de microdiluição (Lorian, 2005).

Foram distribuídos 45 µL do meio caldo Mueller-Hinton em todos os poços da placa, em seguida, 50 µL da solução teste do extrato de *A. serratum* foram adicionados em todos os poços da fileira H (colunas H2 a H12), e 50 µL da solução do extrato de *M. minuta* (solução teste) foram colocados em todos os poços da 1ª coluna (fileiras A1 a G1). Após homogeneização dos produtos nos poços da coluna 1, correspondente ao extrato de *M. minuta* foi feita diluição 1:2, transferindo 50 µL da mistura para os poços da coluna 2. Em seguida, diluições seriadas e sucessivas foram feitas transferindo sempre 50 µL da mistura dos poços de uma coluna para a seguinte até os poços da coluna 12, desprezando os 50 µL finais. Os produtos da fileira H, referentes ao extrato de *A. serratum*, depois de homogeneizados, também seguiram diluição 1:2, transferindo 50 µL da mistura para os poços da fileira G. Sequencialmente, diluições seriadas e sucessivas foram feitas transferindo sempre 50 µL da mistura dos poços de uma fileira para a seguinte até os poços da fileira A, desprezando os 50 µL restantes desses últimos poços. Ou seja, foram feitas diluições seriadas e consecutivas (1:2) de cada extrato no sentido linha e coluna. As concentrações testadas para o extrato de *A. serratum*, após diluições seriadas (1:2), foram: 10,25 mg/mL, 5,12 mg/mL, 2,56 mg/mL, 1,28 mg/mL, 0,64 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL. E para o extrato de *M. minuta* foram: 10,5 mg/mL, 5,25 mg/mL, 2,62 mg/mL, 1,31 mg/mL, 0,66 mg/mL, 0,33 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,005 mg/mL.

Em todos os poços da microplaca foram adicionados 5 µL de inóculo bacteriano, sendo aplicado uma cepa por placa, e, então, estas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após

esse intervalo, para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), semeou-se, em placas de Petri contendo o meio de cultura (CMH), 1 µL da solução contida no poço em que houve inibição visual do crescimento bacteriano, correspondente à Concentração Inibitória Mínima (CIM), menor concentração do extrato capaz de causar inibição total do crescimento, e dos 4 poços anteriores a ele. A placa foi vedada e colocada na estufa a 37 °C por 24 h. A observação de ausência de crescimento microbiano na placa, após o período de incubação, demonstrou o efeito bactericida do extrato, enquanto que a presença de crescimento bacteriano revelou o efeito bacteriostático. A menor concentração em que houve ausência de crescimento microbiano correspondeu à CBM.

Para cada microplaca foi usado um controle negativo (CMH, DMSO e inóculo bacteriano), um controle de crescimento (CMH e inóculo bacteriano) e um controle positivo (CMH, antibiótico padrão e inóculo bacteriano). Ainda, foram procedidos os controles de esterilidade do caldo Mueller-Hinton (95 µL do meio de cultura em um poço vazio), dos extratos (100 µL da solução teste dos extratos com 95 µL do CMH) e dos antibióticos (95 µL do CMH e 5 µL de antibiótico). Os antibióticos padrão para as bactérias gram-positivas e gram-negativas foram, respectivamente, cloranfenicol na concentração 0,5 mg/mL em solução salina 0,9 % e ciprofloxacino na concentração 0,5 mg/mL. Os experimentos foram realizados em 03 ensaios isolados em duplicata.

### 2.3.5 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica dos extratos de *A. serratum* e *M. minuta* foi realizada através do ensaio de viabilidade celular MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Alley *et al.*, 1988; Mosmann, 1983).

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HEp-2 (carcinoma de laringe humana) mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO<sub>2</sub>.

As células NCI-H292, MCF-7, HEp-2 (10<sup>5</sup> células/mL), HL-60 (0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços (fundo chato) e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (0,5 %) foram adicionadas aos poços em concentração final de 50 µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo.

Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 5.0*.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. De acordo com a inibição da proliferação celular as amostras foram classificadas como ativas (95 a 100 % de inibição), moderadamente ativas (inibição variando de 70 a 90 %) e ou inativas (inibição menor que 50 %) (RODRIGUES *et al.*, 2014). As amostras consideradas ativas foram selecionadas para determinação, através do MTT, da IC<sub>50</sub> (concentração que induz 50% de inibição da proliferação celular).

## 2.4 Resultados e discussão

### Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, o cromatógrafo foi calibrado com concentrações crescentes de quercetina originando a curva de calibração da quercetina (Apêndice II). O padrão quercetina, com concentração de 0,0625 mg/mL, apresentou tempo de retenção (Tr) de 3,52 min, e o padrão cafeína Tr correspondente a 4,14 min (Apêndice III).

A análise em CLAE, com tempo de corrida de 40 (quarenta) minutos (min), demonstrou um padrão de picos característicos para *A. serratum* (Apêndice IV). Foram observados nove picos principais, com Tr de 2,57 min, 2,67 min, 2,737 min, 2,8 min, 2,9 min, 8,513 min, 8,74 min, 34,283 min e 35,151 min (Apêndice V). Destes compostos, o que apresentou maior concentração foi o pico 8, com Tr de 34,283 min e 52,86 % de concentração relativa. A quercetina e cafeína não foram identificadas ou sugeridas em *A. serratum*.

O gênero *Asplenium* tem sido estudado do ponto de vista fitoquímico, o que permite verificar as potencialidades de estudos de espécies desse gênero como fontes de novas substâncias químicas (Murakami; Tanaka, 1988). Pesquisas revelam a presença de compostos de diferentes classes em espécies do gênero como: flavonóides (Imperato, 1989; Iwashima; Matsumoto, 2011; Andrade *et. al.*, 2014), xantonas (Smith; Harborne, 1971;

Imperato, 1991; Iwashima; Matsumoto, 2011; Andrade *et al.*, 2014), fenóis e lignanas (Dall'acqua *et al.*, 2009), triterpenos e alcalóides (Kulip *et al.*, 2010).

Flavonóides foram isolados em: *Asplenium carruthersii* Baker, *A. contiguum* Kaulf., *A. caudatum* G. Forst., *A. insiticium* Brack., *A. laserpitifolium* Lam. e *A. subfulexuosum* Ros. (Iwashina; Matsumoto, 2011); *A. trichomanes-ramosum* L. (Iwashina *et al.*, 1995); *A. affine* Swartz, *A. decrescens* Kunze e *A. zenkeranum* Kunze (Johnson; Irudayaraj, 2011). Os flavonóides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse terapêutico (Behling *et al.*, 2008). A quercetina, um desses flavonóides, possui potencial anticarcinogênico (Behling *et al.*, 2008), e tem presença descrita em espécies desse gênero, como *A. trichomanes-ramosum* L. (Iwashina *et al.*, 1995) e *A. incisum* Thunb. (Iwashina *et al.*, 2000). Alcalóides, também, foram identificados em *Asplenium*, como: *Asplenium affine* Swartz, *Asplenium decrescens* Kunze, *Asplenium zenkeranum* Kunze (Johnson; Irudayaraj, 2011), *Asplenium africanum* (Ondo, 2013) e *Asplenium aethiopicum* Burm. f. (Marimuthu alias Antonyamy *et al.*, 2014).

Embora presente em espécies do gênero *Asplenium*, neste estudo, a quercetina, assim como a cafeína, não foram identificadas, por meio da CLAE, em *A. serratum*. Análises do perfil fitoquímico de *A. serratum* não foram relatadas, até então, na literatura.

Na análise da cromatografia líquida do extrato *M. minuta* (Apêndice VI), com tempo de corrida equivalente ao do extrato de *A. serratum*, foram revelados sete picos, cinco de substâncias ainda não identificadas. Os tempos de retenção das substâncias foram: 2,36 min, 2,77 min, 3,07 min, 3,28 min, 3,89 min, 4,24 min e 30,49 min (Apêndice VII). O pico 06, com Tr de 4,24 min, representa o composto majoritário da amostra, com área de 39,47 %. É possível que o pico com retenção de 3,28 min, ou ainda, com Tr de 3,89 min seja a quercetina ou substância com molécula semelhante a ela. É sugerida, ainda, a presença de cafeína (Tr = 4,14 min.) no extrato etanólico, correspondente ao pico com Tr de 4,24 min.

Assim como sugerido em *M. minuta*, por este estudo, De Britto, Gracelin e Kumar (2013), em análise qualitativa e quantitativa de *M. minuta*, descreveram a presença de flavonóides e alcalóides nesta espécie, além da identificação de outros compostos como esteróides, açúcares redutores, triterpenóides, açúcares, compostos fenólicos, saponinas, taninos, antraquinonas e aminoácidos. Segundo os autores, o extrato metanólico dessa espécie revelou a presença de dez constituintes, enquanto que no presente estudo o extrato etanólico revelou a presença de sete compostos, demonstrando que o extrato metanólico extraiu um maior número de compostos químicos.

Outros estudos, também, destacam a presença de flavonóides e alcalóides em *M. minuta* (Sharma *et al.*, 2013; Mithraja *et al.*, 2011). Mithraja e colaboradores (2011)

identificaram, a partir do extrato bruto etanólico, a presença de fenol e esteróide, dentre alcalóides, flavanóides, saponinas, quinonas, taninos, xantoproteínas, ácidos carboxílicos, cumarinas presentes em extratos com outros solventes. Em contrapartida ao estudo em questão, que sugeriu a presença do flavonóide quercetina e do alcalólido cafeína a partir da extração com o etanol, através da CLAE.

### Atividade Antibacteriana e ensaio de Sinergismo

*A. serratum* e *M.minuta* apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas, com padrões de inibição semelhantes, e valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) coincidentes (Tabela A.1). A ação antibacteriana desses extratos ocorreu na concentração inicial do teste frente às bactérias *Staphylococcus aureus* MSSA e *Salmonella typhimurium*, com CIM correspondente a 5,0 mg/ mL. Já contra *Escherichia coli* e *Shigella flexneri*, a CIM correspondeu a 2,5 mg/ mL, indicando que os extratos mostraram-se mais eficazes contra cepas de bactérias Gram-negativas.

Tabela A.1 - Concentração Inibitória Mínima dos extratos de *Asplenium serratum* e *Marsilea minuta* frente a cepas bacterianas.

<b>Micro-organismo</b>	<b><i>A. serratum</i> CIM (mg/mL)</b>	<b><i>M. minuta</i> CIM (mg/mL)</b>
<i>Escherichia coli</i>	2,5mg/mL	2,5mg/mL
<i>Shigela flexneri</i>	2,5 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>Salmonella typhimurium</i>	5,0 mg/mL	5,0 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	5,0 mg/mL	5,0 mg/mL

Algumas espécies do gênero *Asplenium* apresentam atividade antimicrobiana contra micro-organismos patógenos humanos, assim como verificado, no presente estudo, para a *A. serratum*, que, segundo Barros e Andrade (1997), já é utilizada, popularmente, por apresentar propriedades medicinais anti-infecciosas.

Os isolados bacterianos sensíveis ao extrato de *A. serratum* assemelham-se aos de outros estudos com espécies congêneres, como identificado em estudo de Berk *et al.*

(2013), no qual, utilizando-se o método de difusão em ágar e a determinação da concentração inibitória mínima, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus* foram os micro-organismos mais sensíveis ao extrato aquoso de *Asplenium ceterach* L., apresentando CIM igual a 18 µg/mL e 9 µg/mL, respectivamente.

O extrato bruto metanólico de *Asplenium nidus* L. apresentou, conforme Lai, Lim e Tan (2009), por meio de disco difusão, inibição sobre os agentes patogênicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*. Desta (1993), da mesma forma, identificou a inibição do crescimento microbiano, conferida pelo extrato metanólico de *Asplenium trichomanes* L., sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de *Salmonella gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

A atividade antimicrobiana de *M. minuta* foi evidenciada por este estudo. Nagarajan e De Britto (2014) descreveram que o extrato etanólico das folhas de *M. minuta* mostrou boa atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, assim como o estudo ora apresentado. Sethi (2014) referiu que a espécie congênera, *Marsilea quadrifolia* L., demonstrou inibição eficaz contra bactérias gram-negativas, dentre elas a *Escherichia coli*.

Corroborando ainda com os achados, extratos alcoólicos de *M. minuta* foram descritos por Bindu, Jose e Akhila (2014) como potentes antimicrobianos frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com MIC correspondentes a, respectivamente, 141,6 µg / mL e 142,3 µg / mL. Parihar *et al.* (2010) também identificaram a ação de extratos alcoólicos de *M. minuta* contra microo-organismos semelhantes: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*.

Panda *et al.* (2014) descreveram que o extrato bruto alcoólico (metanólico) de *M. minuta* não apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, o que sugere, então, que o extrato etanólico de *M. minuta*, aplicado no nosso e em outros estudos, é mais eficiente frente a essas espécies bacterianas. Esses autores apresentaram valores de CIM entre 8 mg/mL e 5 mg/mL, e, em nosso estudo, esses valores variaram entre 2,5 mg/mL e 5 mg/mL.

No teste de sinergismo, frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* MSSA, os extratos apresentaram ação bactericida na concentração inicial, correspondente a, respectivamente, 10,25 mg/mL e 10,5 mg/mL. O extrato de *A. serratum* seguiu com efeito bactericida frente à *Staphylococcus aureus* MSSA até a concentração 2,56 mg/mL, já o extrato de *M. minuta* até concentração de 0,33 mg/mL. Diante *Escherichia coli*, a ação bactericida se estendeu até a concentração de 2,62 mg/mL para *M. minuta*, e 1,31 mg/mL para *A. serratum*. Em concentrações inferiores, o efeito desses extratos sobre as cepas bacterianas testadas foi bacteriostático.

Os resultados revelam que, em sinergismo, os extratos apresentaram melhor atividade bactericida frente à cepa Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* MSSA, já que o efeito foi evidenciado em concentrações inferiores às apresentadas pelos extratos isoladamente, a qual correspondeu a um valor de CIM de 5,0 mg/mL, em contrapartida à ação bactericida, em sinergismo, correspondente a 2,56 mg/mL (*A. serratum*) e 0,33 mg/mL (*M. minuta*). A ação dos extratos, tanto isoladamente quanto sinergicamente, perante *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* representa um dado relevante, já que essas bactérias compõem grupo dos principais agentes causadores de infecção hospitalar (Levinson, 2014).

Segundo Lorian (2005), o sinergismo é caracterizado por essa interação positiva, em que a ação combinada dos agentes antimicrobianos é, significativamente, maior que seu efeito isolado. Tais agentes são usados em combinação, numa tentativa de prevenir ou retardar o aparecimento de subpopulações de micro-organismos droga-resistentes. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (Maciel *et al.*, 2002).

### **Atividade citotóxica**

Neste estudo, os extratos alcoólicos de *A. serratum* e *M. minuta*, testados *in vitro*, através do teste do MTT, em concentração única correspondente a 50 µg/mL, foram considerados inativos frente às linhagens de células tumorais NCI-H29, HEp-2, MCF-7 e HL-60, com percentuais de inibição do crescimento celular inferiores a 50% (Tabela A.2).

Tabela A.2 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos alcoólicos de *Asplenium serratum* e *Marsilea minuta* em linhagens celulares de tumores humanos.

Produtos teste	% de inibição			
	NCI-H292	HEP-2	MCF-7	HL-60
<i>A. serratum</i>	16,89±0,73	13,11±0,66	16,22±1,77	11,42±0,38
<i>M. minuta</i>	14,79±0,53	14,34±1,23	17,81±0,75	13,41±0,00
DOXORRUBICINA	94,15±1,99	79,39±2,65	74,77±2,09	92,91±0,63

A maioria dos agentes antineoplásicos é derivada de fontes naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e micro-organismos (Cragg; Newman, 2005; Newman *et al.*, 2002). Em consonância aos achados encontrados neste estudo para *A. serratum*, Naghibi *et al.*, (2014) descreveram que o extrato metanólico de outra espécie de *Asplenium*, *Asplenium trichomanes* L., avaliado através do método MTT, em concentrações que variaram entre 100 e 3.125 ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ), foi inativo frente às linhagens de células tumorais MCF-7 e HepG-2, assim como também diante das linhagens A-549 e HT-29.

Diferentemente do resultado apresentado, por este estudo, para *M. minuta*, o ensaio com os extratos metanólico, aquoso e de acetato de etila, através do método de MTT, da congênera, *M. quadrifolia*, segundo Uma e Pravin (2013), mostrou atividade antiproliferativa frente à linhagem de células MCF-7, com valores de  $\text{IC}_{50}$ , respectivamente, de 39.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 187,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 47,825  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A inatividade, *in vitro*, diante às linhagens testadas, não exclui a possibilidade de serem potentes antitumorais, pois se pode tratar de substâncias com atividade de pró-fármacos, compostos em sua forma inativa ou, substancialmente, menos ativas que, quando administrados, sofrem uma biotransformação *in vivo*, passando a produzir metabólitos ativos (Chung; Ferreira, 1999), caráter que não é possível ser detectado pelo teste aplicado neste estudo. Muitas substâncias não tóxicas se tornam tóxicas após o metabolismo hepático. Da mesma forma, muitas substâncias que são tóxicas *in vitro* podem ser detoxificadas pelas enzimas hepáticas (Freshney, 1994). Além disso, esses extratos, pouco conhecidos quanto ao potencial citotóxico, podem, ainda, apresentarem-se tóxicos a outras linhagens tumorais.

## 2.5 Conclusões

Dados da literatura, assim como os apresentados por este estudo, relevam o potencial das plantas como agentes terapêuticos. Assim como espécies congêneres, e, corroborando com as indicações populares, *A. serratum* e *M. minuta* possuem potencial antimicrobiano, além de efeito sinérgico quanto a propriedade antibacteriana, podendo ser promissoras como alternativa aos antibióticos convencionais. Apesar de se mostrarem inativas frente às linhagens de células tumorais humanas utilizadas, o possível efeito citotóxico dessas plantas perante células tumorais não pode ser excluído. Maiores análises da citotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, bem como a ampliação dos testes antimicrobianos e avaliação de outras potencialidades biológicas, são necessárias. Novos estudos são imprescindíveis para identificação dos metabólitos secundários, e consequente alargamento do conhecimento químico das espécies *A. serratum* e *M. minuta*.

## 2.6 Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), órgão de fomento à ciência e à tecnologia, pelo apoio financeiro. À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE/ Brasil, instituição que apoiou a realização do estudo. À equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA), Cráto-CE/ Brasil, por disporem do ambiente e orientações para realização dos experimentos preliminares. À equipe do Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE/ Brasil, pela realização dos testes de atividade citotóxica. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Idjane Oliveira nortear os ensaios microbiológicos.

## 2.7 Referências Bibliográficas

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J.G., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 48, 589-601.

Andrade, J. M., dos S Passos, C., Dresch, R. R., Kieling-Rubio, M. A., Moreno, P. R. H., Henriques, A. T., 2014. Chemical analysis, antioxidant, antichemotactic and monoamine oxidase inhibition effects of some pteridophytes from Brazil. *Pharmacognosy magazine* 10(Suppl 1), S100-9.

Araujo, J. D. D., 2012. Polarização epidemiológica no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 21, 533-538.

Banerjee, R. D., Sen, S. P., 1980. Antibiotic activity of pteridophytes. *Economic Botany* 34, 284-298.

Barreiro, E. J., Bolzani, V. D. S., 2009. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova* 32, 679-688.

Barros, I. C. L., Andrade, L. H. C., 1997. Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins), *Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, Recife*.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. T., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology* 45, 493.

Behling, E., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., Bianchi, M. D. L. P., 2008. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara* 15, 285-292.

Benko-Iseppon, A. M., de Barros Pinangé, D. S., Chang, S. C., Morawetz, W., 2012. Ethnobotanical uses of the native flora from Brazilian North-Eastern region, in: Rai, M., Cordell, G. A., Martinez, J. L., Marinoff, M., Rastrelli, L. (Eds.), *Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs*, CRC press, New York, pp.84-105.

Bennett, R. N., Wallsgrove, R. M., 2006. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 127, 617-633.

Berk, S., Tepe, B., Arslan, S., Sarikurkcu, C., 2013. Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC. African Journal of Biotechnology 10, 8902-8908.

Bindu, A. R., Jose, R., Akhila, S., 2014. Antimicrobial activity screening of *M. minuta* L. extracts. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6, 581-583.

Boldrin, A. H. L., Prado, J., 2007. Pteridófitas terrestres e rupícolas do Forte dos Andradas, Guarujá, São Paulo, Brasil. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 25, 1- 69.

Bonassa, E.M.A.; Santana, T.R., 2005. Enfermagem em terapêutica oncológica, 3ª ed. Atheneu, Rio de Janeiro.

Brasil. Ministério da Saúde, 2006. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde Brasileiro. Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil 15, 47- 65.

Caballero-George, C., Gupta, M. P., 2011. A quarter century of pharmacognostic research on Panamanian flora: a review. Planta Medica 77, 1189-1202.

Cavaletti, G.; Marmioli, P., 2004. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. Expert Opinion on Drug Safety 3, 535-46.

Chai, T. T., Elamparuthi, S., Yong, A. L., Quah, Y., Ong, H. C., Wong, F. C., 2013. Antibacterial, anti-glucosidase, and antioxidant activities of selected highland ferns of Malaysia. Botanical Studies 54, 55.

Chung, M.C.; Ferreira, E.I., 1999. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. Química Nova 22, 75-84.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically (M07-A9), Ninth Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.

Cragg, G. M., Newman, D. J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of ethnopharmacology 100, 72-79.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N., Polissiou, M. G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop protection 22, 39-44.

Dall'Acqua, S., Tomè, F., Vitalini, S., Agradi, E., Innocenti, G., 2009. In vitro estrogenic activity of *Asplenium trichomanes* L. extracts and isolated compounds. *Journal of ethnopharmacology* 122, 424-429.

De Britto, A. J., Gracelin, D. H. S., Kumar, P. B. J. R., 2013. Qualitative and Quantitative analysis of phytochemicals in *Marsilea minuta* Linn. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4, 800-805.

Desta, B., 1993. Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 129-139.

Di Stasi, L. C., 1995. *Plantas Medicinais: Arte e Ciência*, UNESP, Brasil.

Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Pereira, B., Magalhães, P. M., Delarmelina, C., 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 6-8.

Georgopapadakou, N. H., 2002. Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. *Drug resistance updates* 5, 181-191.

Gini, T. G., Jothi, G. J., 2015. In vitro screening of antibacterial and antifungal activity of *Marsilea quadrifolia* (Marsileaceae) Linn. Extract. *Advanced Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 3, 313-329.

Gonçalves, A. L., Alves Filho, A., Menezes, H., 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico* 72, 353-358.

Gopalakrishnan, K., Udayakumar, R., 2014. Antimicrobial Activity of *Marsilea quadrifolia* (L.) against some selected pathogenic microorganisms. *British Microbiology Research Journal* 4, 1046-1056.

Gottlieb, M. G. V., Morassutti, A. L., 2011. Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva. *Scientia Medica* 21, 69-80.

Haider, S., Nazreen, S., Alam, M. M., Gupta, A., Hamid, H., Alam, M. S., 2011. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of ethanolic extract and its various fractions from *Adiantum capillus veneris* Linn. *Journal of ethnopharmacology* 138, 741-747.

Ho, R., Teai, T., Bianchini, J. P., Lafont, R., Raharivelomanana, P., 2010. Ferns: From traditional uses to pharmaceutical development, chemical identification of active principles. In: Fernandez, H., Revilla, M. A., Kumar, A. (editors). Working with ferns: Issues and applications. Springer, New York, pp. 321-346.

Hughes, C., Müller, D., Hacker, J., Goebel, W., 1982. Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* haemolysin. *Toxicon* 20, 247-252.

Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2011. ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro.

Imperato, F., 1989. Flavonol glycosides from ferns of the genera *Asplenium* and *Cheilanthes*. *Biochemical Systematics and Ecology* 17, 161-166.

Imperato, F., 1991. Xanthone 2, 4-di-C-glycosides from *Asplenium adiantum-nigrum*. *Phytochemistry* 30, 3839-3840.

Iwashina, T., Matsumoto, S., Nishida, M., Nakaike, T., 1995. New and rare flavonol glycosides from *Asplenium trichomanes-ramosum* as stable chemotaxonomic markers. *Biochemical systematics and ecology* 23, 283-290.

Iwashina, T., López-Sáez, J. A., Herrero, A., Kitajima, J., Matsumoto, S., 2000. Flavonol glycosides from *Asplenium foreziense* and its five related taxa and *A. incisum*. *Biochemical systematics and ecology* 28, 665-671.

Iwashina, T., Matsumoto, S., 2011. Flavonoid properties of six *Asplenium* species in Vanuatu and New Caledonia, and distribution of flavonoid and related compounds in *Asplenium*. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science*, 37, 133-145.

Johnson, M., Irudayaraj, V., 2011. Pharmacognostical Studies on Three *Asplenium* Species. *Journal of Phytology* 3, 01- 09.

Kulip, J., Fan, L. N., Manshoor, N., Julius, A., Said, I. M., Gisil, J., Joseph, J.A., Tulin, W. F., 2010. Medicinal plants in Maliau Basin, Sabah, Malaysia. *Journal of Tropical Biology and Conservation* 6, 21- 33.

Lai, H. Y., Lim, Y. Y., Kim, K. H., 2010. *Blechnum orientale* Linn- a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. *BMC complementary and alternative medicine* 10,15.

Lai, H. Y., Lim, Y. Y., Tan, S. P., 2009. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 73, 1362-1366.

Lee, C. H., Shin, S. L., 2010. Functional activities of ferns for human health. In: Fernández, H., Revilla, M.A., Kumar, A. (Eds.), *Working with ferns*. Springer, New York, pp. 347-359.

Leiser, J. J., Tognim, M. C. B., Bedendo, J., 2007. Infecções hospitalares em um centro de terapia intensiva de um hospital de ensino no norte do Paraná. *Ciência, cuidado e saúde* 6, 181-186.

Levinson, W., 2014. *Microbiologia médica e imunologia*, 12 ed. AMGH editora Ltda., Porto Alegre, Brasil.

Lorian, V., 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

Marimuthu alias Antonysamy, J., Janarthanan, G., Arumugam, S., Narayanan, J., Mani, N., 2014. Antioxidant, Larvicidal, and Cytotoxic Studies on *Asplenium aethiopicum* (Burm. f.) Becherer. *International Scholarly Research Notices* 2014, 01- 06.

Marini, M. B., Ventura, T. L. B., De Freitas, W. R., Muzitano, M. F., Kanashiro, M. M., 2012. Avaliação da atividade antineoplásica de espécies vegetais ocorrentes no Brasil. In: IV Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica (Confict). **Resumo**. Rio de Janeiro: Essentia Editora. Disponível em: <<http://essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/confict/article/view/2284>> Acesso em: 15 fev. 2015.

Mithraja, M. J., Marimuthu, J., Mahesh, M., Paul, Z. M., Jeeva, S., 2011. Phytochemical studies on *Azolla pinnata* R. Br., *M. minuta* L. and *Salvinia molesta* Mitch. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1, S26-S29.

Morais-Braga, M. F., Souza, T. M., Santos, K. K., Andrade, J. C., Guedes, G. M., Tintino, S. R., Sobral-Souza, C.E., Costa, J.G. M., Menezes, I. R. A., Saraiva, A. A. F., Coutinho, H. D., 2012. Antimicrobial and modulatory activity of ethanol extract of the leaves from *Lygodium venustum* Sw. *American Fern Journal* 102, 154-160.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.

Murakami, T., Tanaka, N., 1988. Occurrence, Structure and Taxonomic Implications of Fern Constituents, In: Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., Tamm, C. (Eds.), Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer Vienna, New York, 54, pp. 1-329.

Mundim, G. J., Dezena, R. A., Oliveira, A.C.S., Silva, P. R., Cardoso, M., Pereira, G. A., Morais, C.S., Terra, A. P. S., 2003. Avaliação da presença de *Staphylococcus aureus* nos leitos do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à posição no colchão antes e após a limpeza. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36, 685-688.

Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian journal of microbiology 31, 247-256.

Naghibi, F., Khalaj, A., Mosaddegh, M., Malekmohamadi, M., Hamzeloo-Moghadam, M., 2014. Cytotoxic activity evaluation of some medicinal plants, selected from Iranian traditional medicine Pharmacopoeia to treat cancer and related disorders. Journal of ethnopharmacology 155, 230-239.

Newman, D. J., Cragg, G. M., Holbeck, S., Sausville, E. A., 2002. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. Current cancer drug targets 2, 279-308.

Nogueira, T.M.O., 2010. Caracterização da atividade antinociceptiva do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* Lam. em modelos experimentais de dor inflamatória. Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S., Alonzo, V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbiology Letters 230, 191-195.

Ondo, J. P., Obame, L. C., Barhé, T. A., Akoue, G. N., Nsi, E., 2013. Phytochemical screening, total phenolic content and antiradical activity of *Asplenium africanum* (Aspleniaceae) and fruit of *Megaphrinium macrostachyum* (Marantaceae). Journal of Applied Pharmaceutical Science 3, 092-096.

Panda, S. S., Sahoo, K., Rana, M., Rout, N. C., Dhal, N. K., 2014. Antimicrobial activities and phytochemical investigation of some native pteridophytes. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 7, 43-45.

Parihar, P., Parihar, L., Bohra, A., 2010. In vitro antibacterial activity of fronds (leaves) of some important pteridophytes. Journal of Microbiology and Antimicrobials 2, 19-22.

Pazhani, G. P., Sarkar, B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Takeda, Y., Niyogi, S. K., 2004. Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in eastern India. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 681-684.

Qadir, M. I. *et al.*, 2013. Natural Hepatoprotectives: Alternative Medicines for Hepatitis. *Rajiv Gandhi University of Health Sciences Journal of Pharmaceutical Sciences* 3, 12-20.

Quadri-Spinelli, T., Heilmann, J., Rali, T., Sticher, O., 2000. Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*. *Planta medica* 66, 728-733.

Ripa, F. A., Nahar, L., Haque, M., Islam, M. M., 2009. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of crude extract of *Marsilea quadrifolia*. *European Journal of Scientific Research* 33, 123-129.

Rodrigues, F. A. R., Bomfim, I. S., Cavalcanti, B. C., Pessoa, C., Goncalves, R. S. B., Wardell, J. L., Wardell, S.M.S.V., Souza, M. V., 2014. Mefloquine–oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. *Chemical biology & drug design* 83, 126-131.

Santos, A. V., da Silva, A. A. O., de Sousa, A. F. L., de Moura Carvalho, M., Carvalho, L. R. B.; Moura, M. E. B. (2015). Perfil epidemiológico da sepse em um hospital de urgência. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde* 1, 19-30.

Sarker, M. A. Q., Mondol, P. C., Alam, M. J., Parvez, M. S., Alam, M. F., 2011. Comparative study on antitumor activity of three pteridophytes ethanol extracts. *Journal of Agricultural Technology* 7, 1661-1671.

Schramm, J. M. D. A., Oliveira, A. F. D., Leite, I. D. C., Valente, J. G., Gadelha, A. M. J., Portela, M. C.; Campos, M. R., 2004. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. *Ciênc. saúde coletiva* 9, 897-908.

Scotland, S. M., Day, N. P., Willshaw, G. A., Rowe, B., 1980. Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Lancet* 315, 90.

Sethi, P., 2014. Antibacterial activity of *Marsilea quadrifolia* Linn. *International Journal of Research in Plant Science* 4, 60-62.

Sharma, D., Bhatia, V. K., Patil, S., Sharma, P. C., 2013. Antimicrobial activity of selected Cryptogams from Solan region. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research* 4, 448-454.

Smith, D. M., Harborne, J. B., 1971. Xanthenes in the Appalachian *Asplenium* complex. *Phytochemistry* 10, 2117-2119.

Singh, A.P., Rawat, V. K., Behera, S. K., Khare, P. B., 2010. Perspectives of Pteridophytes Biodiversity: a source of economy elevation. National Conference on Biodiversity, Development and poverty alleviation. Disponível em: <<http://uspbdb.org/pdf/Souvenir2010/7.pdf>> Acesso em 13 de dezembro 2013.

Singh, M., Singh, N., Khare, P. B., Rawat, A. K. S., 2008. Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. *Journal of ethnopharmacology* 115, 327-329.

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

Springfield, E. P., Amabeoku, G., Weitz, F., Mabusela, W., Johnson, Q., 2003. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. *Phytomedicine* 10, 434-439.

Sujarwo, W., Lugrayasa, N., Caneva, G., 2014. Ethnobotanical Study of Edible Ferns Used in Bali Indonesia. *Asia Pacific Journal of Sustainable Agriculture, Food and Energy* 2, 1-4.

Tahir, M. M., Ibrahim, N., Yaacob, W. A., 2014. Cytotoxicity and antiviral activities of *Asplenium nidus*, *Phaleria macrocarpa* and *Eleusine indica*. *AIP Conference Proceedings* 1614, 549- 552.

Teixeira, G., Maciel, S.; Pietrobon, M. R., 2015. Potencial utilitário de licófitas e samambaias: aplicabilidade ao contexto amazônico. *Biota Amazônia* 5, 68-73.

Tomšík, P. (2014). Ferns and Lycopods—a potential treasury of anticancer agents but also a carcinogenic Hazard. *Phytotherapy Research* 28, 798-810.

Tortora, G.; Funke, B.; Case, C., 2007. *Microbiologia*, 8 ed. Artmed, São Paulo.

Uma, R.; Pravin, B., 2013. In vitro Cytotoxic Activity of *Marsilea quadrifolia* Linn of MCF-7 Cells of Human Breast Cancer. *International Research Journal of Medical Sciences* 1, 10-13.

Verhoef, J., Beaujean, D., Blok, H., Baars, A., Meyler, A., Van Der Werken, C., Weersink, A., 1999. A Dutch approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18, 461-466.

Vicente, C., Legaz, M. E., 1988. Lichen enzymology. In: Galun, M. (ed.) Handbook of lichenology, CRC Press, New York, 239-284.

Wu, T. C., Kao, W. Y., 2011. Ecophysiological traits of leaves of three *Marsilea* species distributed in different geographical regions. *Taiwania* 56, 279-286.

Zuquim, G., Costa, F.R.C., Prado, J.; Tuomisto, H., 2008. Guia de samambaias e licófitas da Reserva Biológica Uatumã, Amazônia Central, Attema, Manaus.

## DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Vários estudos têm revelado a ação bactericida de plantas. Assim como espécies congêneres, *A. serratum* e *M. minuta* também possuem potencial antibacteriano, fundamentando o uso etnobotânico de *A. serratum* L. como agente anti-infeccioso, conforme citação de Barros e Andrade (1997), e antibacteriano de *M. minuta*, como descrito por Qadir e colaboradores (2013). Os extratos mostraram-se eficazes contra importantes microorganismos patogênicos à saúde humana (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* MSSA, *Shigella flexneri*), sobretudo, frente às bactérias gram-negativas, *E. coli* e *S. flexneri*, despontando como possíveis agentes antibacterianos.

Embora, os extratos de *A. serratum* e *M. minuta*, isoladamente, tenham apresentado atividade antimicrobiana, quando testados em conjunto obtiveram melhor resultado. Em sinergismo, esses extratos apresentaram melhor atividade bactericida frente à cepa gram-positiva, *Staphylococcus aureus* MSSA. Diante à resistência microbiana a antibióticos, a avaliação da presença de atividade sinérgica dos extratos de *A. serratum* e *M. minuta* torna-se, também, uma possibilidade para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, em concentrações mais baixas, e conseqüentemente, menos tóxicos. A ação sinérgica vem sendo realizada para obtenção de ações mais potentes dos antimicrobianos, sendo observado que os compostos em conjunto apresentam melhores resultados que isolados.

Os extratos foram considerados inativos para as linhagens de células tumorais humanas utilizadas: NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humana) , MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda). Apesar da ausência de atividade citotóxica *in vitro* frente a essas linhagens, não se pode descartar a atividade antitumoral desses extratos, pois pode se tratar de metabólitos ativados pelo metabolismo hepático, ou ainda podem apresentar atividade frente a outras linhagens tumorais humanas.

O resultado do presente estudo dá suporte ao uso popular dessas espécies de samambaia como agentes antimicrobianos. Apesar do potencial para o uso, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura sobre atividades biológicas e análise fitoquímica das espécies em questão. O perfil fitoquímico e a avaliação das propriedades biológicas de *A. serratum* não haviam sido relatados, até então, na literatura. Outros trabalhos precisam ser conduzidos na busca da identificação dos compostos químicos e das características biológicas das espécies estudadas.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AJAIB, M. *et al.* Ethnobotanical Studies of Herbs of Agra Valley Parachinar, Upper Kurram Agency, Pakistan. **International Journal of Biology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 71-83, 2014.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. sSupl, p. 678–689, 2006.
- ALLEY, M. C. *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, n. 3, p. 589-601, 1988.
- ALVARENGA, A. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.
- ANDRADE, J. M. M. *et al.* Chemical analysis, antioxidant, antichemotactic and monoamine oxidase inhibition effects of some pteridophytes from Brazil. **Pharmacognosy magazine**, v. 10, n. Suppl 1, p. S100, 2014.
- ARAUJO, J. D. de. Polarização epidemiológica no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 533-538, 2012.
- ARJONA, F. B. S.; MONTEZUMA, R.C. M.; SILVA, I.M. Aspectos etnobotânicos e biogeografia de espécies medicinais e/ou rituais comercializadas no mercado de Madureira, RJ. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia v. 8, n. 23, p. 41-50, 2007.
- BANERJEE, R. D.; SEN, S. P. Antibiotic activity of pteridophytes. **Economic Botany**, v. 34, n. 3, p. 284-298, 1980.
- BARROS, I. C. L.; ANDRADE, L. H. C. **Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)**. Recife: Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 1997.
- BARROS, I. C. L.; SILVA, M. B. C. Taxonomia, Padrão de Venação e Aparelhos Estomáticos de *Pteris schwackeana* Chris. (Pteridaceae/Pteridophyta). **Boletim da Sociedade Broteriana**, v.67, n. 2, p. 257-262, 1996.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BEHLING, E. V. *et al.* Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BELLEFRÖID, E. *et al.* The base number of 'loxoscapoid' *Asplenium* species and its implication for cytoevolution in Aspleniaceae. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 157–171, 2010.

BENKO-ISEPPON, A. M. *et al.* Ethnobotanical Uses of the Native Flora from Brazilian North-Eastern Region. **Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs**, p. 84, 2012.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytol.**, v.127, p.617–633, 2006.

BERK, S. *et al.* Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 44, p. 8902-8908, 2013.

BINDU, A. R.; JOSE, R.; AKHILA, S. Antimicrobial activity screening of *M. minuta* L. extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 10, 2014.

BOLDRIN, A. H. L.; PRADO, J. Pteridófitas terrestres e rupícolas do Forte dos Andradas, Guarujá, São Paulo, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 1-69, 2007.

BRAY, F. *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The lancet oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.

CABALLERO-GEORGE, C.; GUPTA, M. P. A quarter century of pharmacognostic research on Panamanian Flora: A review. **Planta Medica**, v. 77, p. 1189–1202, 2011.

CAPRA, R. S. *et al.* Preparados homeopáticos e ambiente de cultivo na produção e rendimento de quercetina em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.]. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 3, p. 566-573, 2014.

CHABNER, B. A.; BRUNTON, L.L.; KNOLLMANN, B.C. Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2011.

CHAI, T-T. *et al.* Antibacterial, anti-glucosidase, and antioxidant activities of selected highland ferns of Malaysia. **Botanical Studies**, v. 54, n. 1, p. 55, 2013.

CHAKRABORTY, R.; BIPLAB DE, N. D.; SEN, S. Antitussive, expectorant activity of *M. minuta* L., an Indian vegetable. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 4, n. 1, p. 61, 2013.

CHANG, Y. *et al.* Species diversity and reticulate evolution in the *Asplenium normale* complex (Aspleniaceae) in China and adjacent areas. **Taxon**, v. 62, n. 4, p. 673-687, 2013.

CHAUHAN, A. K.; KANG, S. C. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. **Research in microbiology**, v. 165, n. 7, p. 559-565, 2014.

COSTA, J. Y *et al.* Pteridófitas. Sistemática de Criptógamas. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em:  
<<http://www.criptogamas.ib.ufu.br/node/554>> Acesso em : 14 fev. 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.

CULBERSON, C. F. Chemical and botanical guide to lichen products. **The University of North Carolina Press: Chapel Hill**, p. 348, 1969.

CUNNINGHAM, A. B. African medicinal plants: setting priorities at the interface between conservation and primary healthcare. **People and plants working paper**. Unesco, Paris. v. 1, 1993.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DALL'ACQUA, S. *et al.* In vitro estrogenic activity of *Asplenium trichomanes* L. extracts and isolated compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 424-429, 2009.

DE BRITTO, A. J.; GRACELIN, D. H. S.; KUMAR, P. B. J. R. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in *M. minuta* Linn. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 800-805, 2013.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99, 2007.

DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. Principles of Medical Oncology. In: DEVITA, V. T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. 8 ed. USA: Lippincott-Williams & Wilkin, pp.337-343, 2008.

DESTA, B. Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 129-139, 1993.

DHANAM, S.; ELAYARAJ, B. Ethnomedicinal aspects of some weeds from paddy fields of Villupuram district in Tamil Nadu, India. **International Letters of Natural Sciences**, v. 14, 2014.

Di STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. Brasil: Unesp Fundação, 1995.

DÍAZ, W.; ORTEGA, F. Inventario de recursos botánicos útiles y potenciales de la cuenca del Río Morón, estado Carabobo, Venezuela. **ERNSTIA**, v. 16, n. 1, p. 31-67, 2006.

DOBLE, A. C. Functional analysis of the mrd operon in *Salmonella*: role in biology and pathogenicity. 2012. **Tese de Doutorado**. University of Newcastle Upon Tyne, 2012.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

FIRMO, W.C. A. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas medicinais: uma prospecção tecnológica. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 5, p. 1564-1573, 2014.

FRESHNEY, I.R. Culture of animal cells. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

FRITAH, S. *et al.* Sumoylation controls host anti-bacterial response to the gut invasive pathogen *Shigella flexneri*. **EMBO reports**, v. 15, n. 9, p. 965-972, 2014.

FUCHS, F. D.; WANNAMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C.; **Farmacologia clínica – fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GANESAN, S.; RAMAR PANDI, N.; BANUMATHI, N. Ethnomedicinal survey of Alagarkoil hills (reserved forest), Tamil nadu, India. **Ethno Leaflets**, v. 1, p. 1-19, 2007.

GARCÍA, A. A.; PÉREZ-URRIA CARRIL, E. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GEORGE, D. T. *et al.* The periplasmic enzyme, AnsB, of *Shigella flexneri* modulates bacterial adherence to host epithelial cells. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. 01-11, 2014.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. **Drug resistance updates**, v. 5, n. 5, p. 181-191, 2002.

GINI, T.G.; JOTHI, G.J. In vitro screening of antibacterial and antifungal activity of *Marsilea quadrifolia* (Marsileaceae) Linn. extract. **Advanced Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 3, n. 4, p. 313-329, 2015.

GÓES-NETO, L. A. A.; PIETROBOM, M. R. Aspleniaceae (Polypodiopsida) do corredor de biodiversidade do norte do Pará, Brasil: um fragmento do Centro de Endemismo Guiana. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 456-463, 2012.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p. 353-358, 2005.

GOPALAKRISHNAN, K; UDAYAKUMAR, R. Antimicrobial activity of *Marsilea quadrifolia* (L.) against some selected pathogenic microorganisms. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 9, p. 1046-1056, 2014.

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v.6, n.1, p.22-29, 1981.

GOTTLIEB, M.G.V.; MORASSUTTI, A.L. Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, p. 69-80, 2011.

GUENTHER, S. *et al.* Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 1, p. 66-72, 2012.

GUPTA, M. P. *et al.* Medical ethnobotany of the Teribes of Bocas del Toro, Panama. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 389-401, 2005.

HAIDER, S. *et al.* Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of ethanolic extract and its various fractions from *Adiantum capillus veneris* Linn. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 3, p. 741-747, 2011.

HO, R. *et al.* Ferns: From traditional uses to pharmaceutical development, chemical identification of active principles. In: FERNANDEZ, H.; REVILLA, M.A.; KUMAR, A. (editors). **Working with ferns: Issues and applications**. New York, USA: Springer, p. 321-346, 2010.

HUGHES, C. *et al.* Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* haemolysin. **Toxicon**, v. 20, n. 1, p. 247-252, 1982.

IMPERATO, F. Flavonol glycosides from ferns of the genera *Asplenium* and *Cheilanthes*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, n. 2, p. 161-166, 1989.

IMPERATO, F. Xanthone 2, 4-di-C-glycosides from *Asplenium adiantum-nigrum*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3839-3840, 1991.

IWASHINA, T. *et al.* New and rare flavonol glycosides from *Asplenium trichomanes-ramosum* as stable chemotaxonomic markers. **Biochemical systematics and ecology**, v. 23, n. 3, p. 283-290, 1995.

IWASHINA, T. *et al.* Flavonol glycosides from *Asplenium foreziense* and its five related taxa and *A. incisum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 665, p. 671, 2000.

IWASHINA, T.; MATSUMOTO, S. Flavonoid properties of six *Asplenium* species in Vanuatu and New Caledonia, and distribution of flavonoid and related compounds in *Asplenium*. **Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B**, v. 37, n.3, p. 133-145, 2011.

JOHNSON, D.M. Systematics of the new world species of *Marsilea* (Marsileaceae). **Systematic Botany Monographs**, p. 01-87, 1986.

JOHNSON, M.; IRUDAYARAJ, V. Pharmacognostical studies on three *Asplenium* species. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 10, p. 01-09, 2011.

KLEIN, T. *et al.* Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KONOWALCHUK, J. *et al.* Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. **Infection and immunity**, v. 20, n. 2, p. 575-577, 1978.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 651-666, 1999.

KRAMER, K.U.; VIANE, R.L.L. Aspleniaceae. In: KRAMER, K.U.; GREEN, P.S. (editors). **Pteridophytes and gymnosperms**. Berlin: Springer-Verlag, p. 52–57, 1990.

KULIP, J. *et al.* Medicinal plants in Maliau Basin, Sabah, Malaysia. **Journal of Tropical Biology and Conservation**, v. 6, p. 21-33, 2010.

LAI, H.Y.; LIM, Y.Y.; KIM, K.H. *Blechnum Orientale* Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.10, n.1, p.15, 2010.

LAI, H.Y.; LIM, Y.Y.; TAN, S.P. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 6, p. 1362-1366, 2009.

LEE, C.H.; SHIN, S.L. Functional Activities of Ferns for Human Health. In: **Working with Ferns**. New York: Springer, chapter 24, p. 347-359, 2010.

LEVINE M.M. *et al.* Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. **Nature Reviews Microbiology**. v. 5, n.7, p. 540-553, 2007.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH editora Ltda., 2014.

LI, Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. **Food and chemical toxicology**, v. 34, n. 9, p. 887-904, 1996.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 08/06/2015.

LORIAN,V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5 ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 512p., 2002.

LOURENÇO, J. D. S. **Samambaias da Estação Ecológica do Pau-Brasil**. Monografia. Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Paraíba, Brasil, 2012.

LOURENÇO, J. D. S.; XAVIER, S. R. S. Samambaias da Estação Ecológica do Pau-Brasil, Paraíba, Brasil. **Pesquisas: Botânica**, Porto Alegre, v. 64, p. 225-242, 2013.

MACIEL, M.A.M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACHADO, M.M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos in vitro da *Euphorbia tirucalli* L.** 2007. 105. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.

MACHADO, H. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MALDONADO-CONTRERAS, A. *et al.* *Drosophila* as a model for human infection of *Shigella flexneri*. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 1, p. 948.5, 2013.

MARIMUTHU ALIAS ANTONYSAMY, J. *et al.* Antioxidant, Larvicidal, and Cytotoxic Studies on *Asplenium aethiopicum* (Burm. f.) Becherer. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, 2014.

MARINI, M.B. *et al.* **Avaliação da atividade antineoplásica de espécies vegetais ocorrentes no Brasil**. In: Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica (Confict), 9., 2012. Resumo. Rio de Janeiro:Essentia Editora, 2012. Disponível em: <<http://essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/confict/article/view/2284>> Acesso em: 15 fev. 2015.

MCCLELLAND, M. *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 852-856, 2001.

MICKEL, J. T.; SMITH, A. R. The Pteridophytes of Mexico. **Memoirs of The New York Botanical Garden**, v. 88, 1055p., 2004.

MITHRAJA, M.J. *et al.* Phytochemical studies on *Azolla pinnata* R. Br., *M. minuta* L. and *Salvinia molesta* Mitch. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. S26-S29, 2011.

MONTEIRO, J.M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MORAIS-BRAGA, M. F.B. *et al.* Antimicrobial and modulatory activity of ethanol extract of the leaves from *Lygodium venustum* Sw. **American Fern Journal**, v. 102, n. 2, p. 154-160, 2012.

MORAN, R. C. Diversity, biogeography, and floristics. In: RANKER, T.A.; HAUFLE, C.H. (editores). In: **Biology and evolution of ferns and lycophytes**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 367-394, 2008.

MORAN, R.C. *Asplenium*. In: MORAN, R.C. (editor). **Géneros Neotropicales de Helechos y Licofitas** – Una guía para estudiantes. San José, Organización para Estudios Tropicales, p. 134, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUNDIM, G. J. *et al.* Avaliação da presença de *Staphylococcus aureus* nos leitos do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à posição no colchão antes e após a limpeza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 685-8, 2003.

NAGARAJAN, G.; DE BRITTO, A. J. Evaluation of antibacterial activity of different parts of medicinal fern—*M. minuta* L. **Life sciences leaflets**, v. 49, p. 34-37, 2014.

NASCIMENTO, G.G.F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247-56, 2000.

NAGHIBI, F. *et al.* Cytotoxic activity evaluation of some medicinal plants, selected from Iranian traditional medicine Pharmacopoeia to treat cancer and related disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 230-239, 2014.

NATARAJAN, A. *et al.* A study on ethnomedicinal plants of Kalavai, Vellore District, Tamil Nadu, India. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 01, p. 99-102, 2013.

NAVARRETE, H. *et al.* Helechos. In: MORAES, M. *et al.* **Botánica Económica de los Andes Centrales**. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, p. 385-411, 2006.

NEWMAN, D.J. *et al.* Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Current cancer drug targets**, v. 2, n. 4, p. 279-308, 2002.

NICOLAOU, K.C.; MONTAGNON, T. **Molecules that changed the world**. 1. ed. San Diego (Califórnia): Wiley-VCH, cap.13, 2008.

NOGUEIRA, T.M.O. **Caracterização da atividade antinociceptiva do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* Lam. em modelos experimentais de dor inflamatória**. Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, 2010.

NOSTRO, A. *et al.* Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymoL. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Microorganismos em praias arenosas expostas: importância, aspectos metodológicos e estado da arte para o sul do Brasil. **Oecologia Brasiliensis**, v. 3, n. 1, 1997.

OLIVEIRA, I.S.D.; DE LIMA, C.M. Análise do uso racional de antimicrobianos do hospital público da zona norte de Aracaju. **Cadernos de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde (ISSN 1980-1769)**, v. 12, n. 12, p. 53-71, 2010.

ONDO, J.P. *et al.* Phytochemical screening, total phenolic content and antiradical activity of *Asplenium africanum* (Aspleniaceae) and fruit of *Megaphrinium macrostachyum* (Marantaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol**, v. 3, n. 08, p. 92-96, 2013.

ONODERA, N. T. *et al.* Genome sequence of *Shigella flexneri* serotype 5a strain M90T Sm. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 3022-3022, 2012.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. In: **Seminars in pediatric infectious diseases**. WB Saunders, p. 125-136, 2005.

OHLSEN, D. J. **Molecular systematics, biogeography, and taxonomy of the fern family Aspleniaceae in Australasia and the south-west Pacific**. Tese (Pós- doutorado), School of Botany, 2014.

PALAVRA, F. *et al.* Infecção associada aos cuidados de saúde – problema emergente num Serviço de Neurologia. **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, n.4, p. 613-624, 2010.

PANDA, S.S. *et al.* Antimicrobial activities and phytochemical investigation of some native pteridophytes. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 1, p. 43-45, 2014.

PASSOS, C.S. *et al.* Terpenoids with activity in the central nervous system (CNS). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 140-149, 2009.

PAWAR, S. D. *et al.* Intra-species comparison of *M.minuta* Linn. and *Marsilea quadrifolia* Linn. using rapd markers to analyze the genetic variations. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 6, Issue 2, p. 78-80, 2014.

PAZHANI, G. P. *et al.* Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in eastern India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 681-684, 2004.

PEPSI, A.; BEN, C. P.; JEEVA, S. Phytochemical analysis of four traditionally important aquatic species. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 66-69, 2012.

PERUMAL, G. Ethnomedicinal Use of Pteridophyte from Kolli Hills, Namakkal District, Tamil Nadu, India. **Ethnobotanical leaflets**, v. 2010, n. 2, p. 161-172, 2010.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, p. 12-15, 1998.

POSEY, D. A. In: Ribeiro, B. G.; **Suma Etnológica Brasileira-1: Etnobiologia**. Petrópolis: Editora Vozes, 1986.

PRADO, J.; SYLVESTRE, L. Samambaias e Licófitas in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128483>>. Acesso em: 10/06/2015.

PRIMACK, R.B. **Essentials of conservation biology**. Massachusetts, Sunderland. 546p., 1993.

PUEBLA, G.G.; PRÁMPARO, M.B.; GANDOLFO, M.A. Aquatic ferns from the Upper Cretaceous Loncoche Formation, Mendoza, central-western, Argentina. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 2, p. 577-588, 2015.

QADIR, M. I. *et al.* Natural Hepatoprotectives: Alternative Medicines for Hepatitis. **Rajiv Gandhi University of Health Sciences Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, issue 4, 2013.

QUADRI-SPINELLI, T. *et al.* Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*. **Planta medica**, v. 66, n. 8, p. 728-733, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REGALADO GABANCHO, L.; SÁNCHEZ VILLAVERDE, C. On the floristic relationships between Cuba and other Tropical regions based on the distribution of Cuban *Asplenium* L. species (Aspleniaceae, Pteridophyta). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 60, n. 2, p. 395-404, 2003.

REINALDO, R. C. P. S. ; SARAIVA, A. F. S. ; SANTIAGO, A. C. P. Samambaias e Licófitas da Chapada do Araripe. In: Ulysses Paulino de Albuquerque; Marcos Vinicius Meiado. (Org.). **Sociobiodiversidade na Chapada do Araripe**. 1 ed. Recife/Bauru: Nupeea, v. 1, p. 85-102, 2015.

RIPA, F.A. *et al.* Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of crude extract of *Marsilea quadrifolia*. **European Journal of Scientific Research**, v. 33, n. 1, p. 123-129, 2009.

RODRIGUES, F. A. R. *et al.* Mefloquine–oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, n.1, p. 126–131, 2014.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, n. 13, p. 28-32, 2000.

SANSONETTI, P. J. Molecular and cellular basis of Eucaryotic Cell Invasion by *Shigella flexneri*. In: HOOK, M.; SWITALSKI, L.(Eds.). **Microbial Adhesion and Invasion**. New York: Springer- Verlag, 1992. p. 183-192.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto e Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SARKER, M.A.Q. *et al.* Comparative study on antitumor activity of three pteridophytes ethanol extracts. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 6, p. 1661-1671, 2011.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SCOTLAND, S. M. *et al.* Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. **The Lancet**, v. 315, n. 8159, p. 90, 1980.

SEN, A.; GHOSH, P. D. A note on the ethnobotanical studies of some pteridophytes in Assam. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 10, n. 2, p. 292-295, 2011.

SHARMA, D. *et al.* Antimicrobial activity of selected Cryptogams from Solan region. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 6, p. 448-454, 2013.

SCHULTES, R. E. The role of the ethnobotanist in the search for new medicinal plants. **Lloydia**, v. 25, p. 257-266, 1962.

SMITH, A. R. *et al.* A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 705-731, 2006.

SINGH, M. *et al.* Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 115, n. 2, p. 327-329, 2008.

SINGH, A.P. *et al.* Perspectives of Pteridophytes Biodiversity: a source of economy elevation. In: National Conference on Biodiversity, Development and poverty alleviation, Uttar Pradesh State Biodiversity Board, 2010. p. 46-49. Disponível em: <<http://uspbdb.org/pdf/Souvenir2010/7.pdf>>. Acesso em 10 de outubro 2014.

SINGH, G.; KUMAR, J. Studies on indigenous traditional knowledge of some aquatic and marshy wild edible plants used by the munda tribe of district Khunti, Jharkhand, India. **International Journal of Bioassays**, v. 3, n. 02, p. 1738-1743, 2014.

SINGH, B.P.; UPADHYAY, R. Medicinal Pteridophytes of Madhya Pradesh. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 4, p. 65-68, 2014.

SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P. G. A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 705–731, 2006.

SMITH, D.M.; HARBORNE, J. B. Xanthones in the Appalachian *Asplenium* complex. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2117-2119, 1971.

SPRINGFIELD, E. P. *et al.* An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 434-439, 2003.

SOUZA, T.M. *et al.* Cytotoxic and Tripanocide Activities of *Pityrogramma calomelanos* (L.) Link. **American Fern Journal**, v. 102, n. 3, p. 198-207, 2012.

SYLVESTRE, L. 2012. Aspleniaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB090776>>. Acesso em: 04/08/2015.

TAVARES, J.V. C. *et al.* *M. minuta* L. (Marsileaceae): nova ocorrência para a Amazônia brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 9, n. 3, p. 687-692, 2014.

TAVARES, C.; SAKATA, R. Cafeína para el tratamiento del dolor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 62, n. 3, p. 387-401, 2012.

TOMŠÍK, P. Ferns and Lycopods- A potential treasury of anticancer agents but also a carcinogenic Hazard. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 6, p. 798-810, 2014.

TORPDAHL, M. *et al.* Human isolates of Salmonella enterica serovar Typhimurium from Taiwan displayed significantly higher levels of antimicrobial resistance than those from Denmark. **International journal of food microbiology**, v. 161, n. 2, p. 69-75, 2013.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2007.

VAN ANDEL, T. ; HAVINGA, R. Sustainability aspects of commercial medicinal plant harvesting in Suriname. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 8, p. 1540-1545, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-13, 2008.

VERHOEF, J. *et al.* A Dutch approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 461-466, 1999.

VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Lichen Enzymology. In: GALUN, M. (ed.). **CRC Handbook of Lichenology**. Flórida: CRC Press Inc., 1988. v. 1, p. 239-284.

VOET D.; VOET, J. G.; PRATT C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, Washington: ASM Press, 2003.

WANG, L.; HE, Z. R. Advances in medical components of pteridophytes. **Chinese Wild Plant Resources**, v. 25, issue 3, p. 01-04, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines**. 2. ed. Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015. **Câncer**. [Em linha]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 10/03/2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2008. **Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world?** [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>>. Acesso em: 10/03/2015.

WINDISCH, P.G. **Pteridófitas da Região Norte Ocidental do Estado de São Paulo** - Guia para excursões. 2. ed. Campus de São José do Rio Preto- SP: UNESP, 110 p.,1992.

WINDISCH, P. G. Marsileaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>> Acesso em: 20/08/2013.

WINDISCH, P.G. Marsileaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB91505>>. Acesso em: 09/06/2015.

WU, T-C; KAO, W-Y. Ecophysiological traits of leaves of three *Marsilea* species distributed in different geographical regions. **Taiwania**, v. 56, n. 4, p. 279-286, 2011.

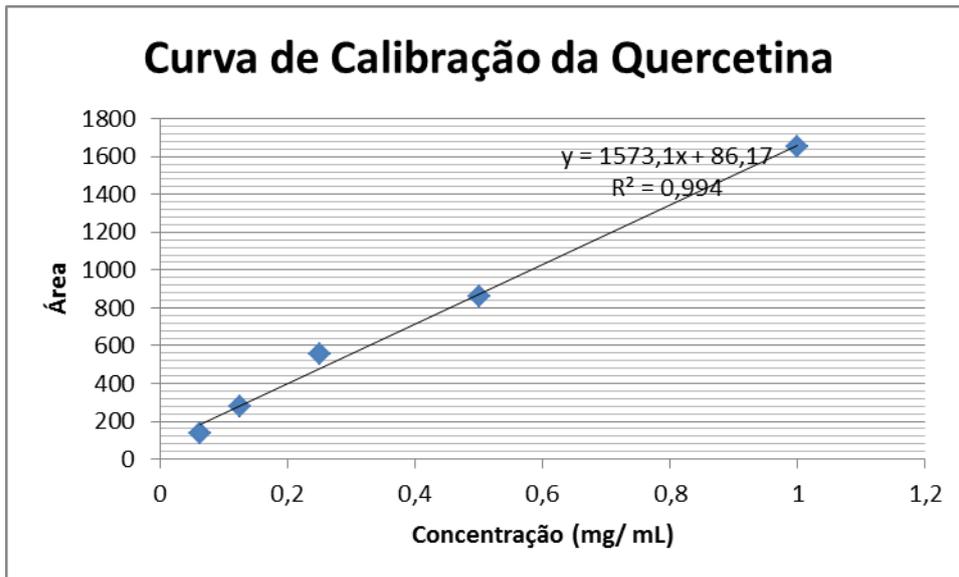
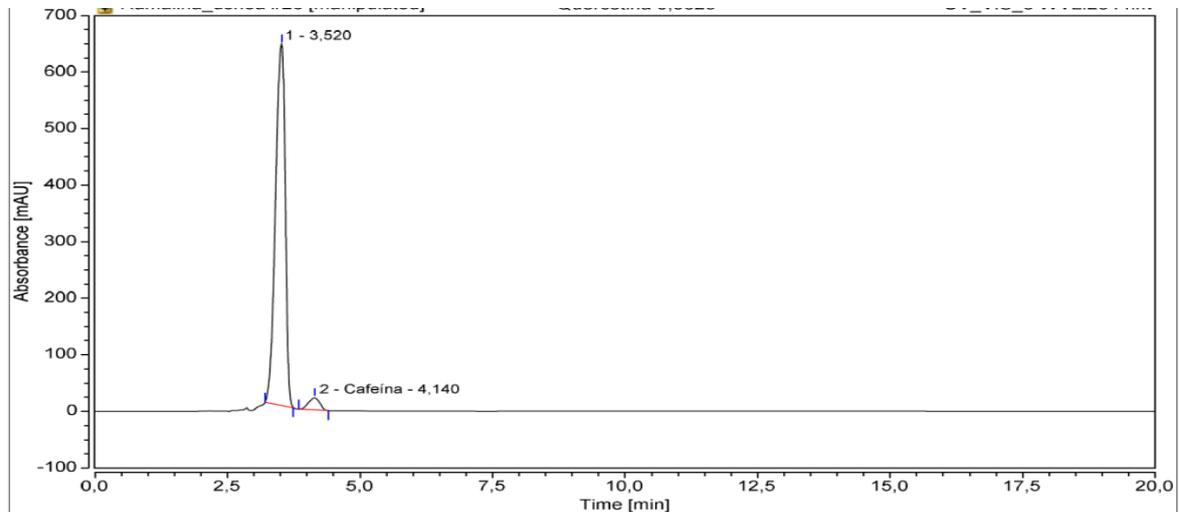
## APÊNDICES

**Apêndice I** - Esquema de montagem da atividade antibacteriana na placa de microdiluição de 96 poços.

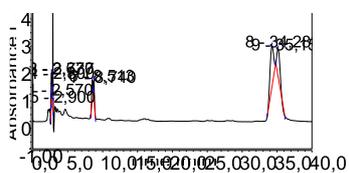
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	M	M	M	M	M	M	M+B+O	M+B+O	M+B+O	M+B+O	M+B+O	M+B+O
<b>B</b>	M+B	M+B	M+B	M+B	M+B	M+B	M+B+C	M+B+C	M+B+C	M+B+C	M+B+C	M+B+C
<b>C</b>	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B
		+B	+B	+B	+B	+B						
<b>D</b>	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B
		+B	+B	+B	+B	+B						
<b>E</b>	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B	M+A+B
		+B	+B	+B	+B	+B						
<b>F</b>	M+M	M+M	M+	M+	M+	M+	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B
		+B	M+B	M+B	M+B	M+B						
<b>G</b>	M+M	M+M	M+	M+	M+	M+	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B
		+B	M+B	M+B	M+B	M+B						
<b>H</b>	M+M	M+M	M+	M+	M+	M+	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B	M+M+B
		+B	M+B	M+B	M+B	M+B						

→  
**Diluição seriada 1:2**

**M**- meio; **M+B**- meio e inóculo bacteriano; **M+A**- meio e extrato *A. serratum*; **M+M** - meio e extrato *M.minuta*; **M+A+B**- meio, extrato *A. serratum* e inóculo bacteriano; **M+M+B**- meio, extrato *M.minuta* e inóculo bacteriano; **M+B+O**- meio, inóculo bacteriano, oxacilina; **M+B+C**- meio, inóculo bacteriano, cloranfenicol.

**Apêndice II - Curva de calibração de Quercetina.****Apêndice III - Cromatograma de CLAE do padrão Quercetina (0,0625 mg/mL) a 254 nm.**

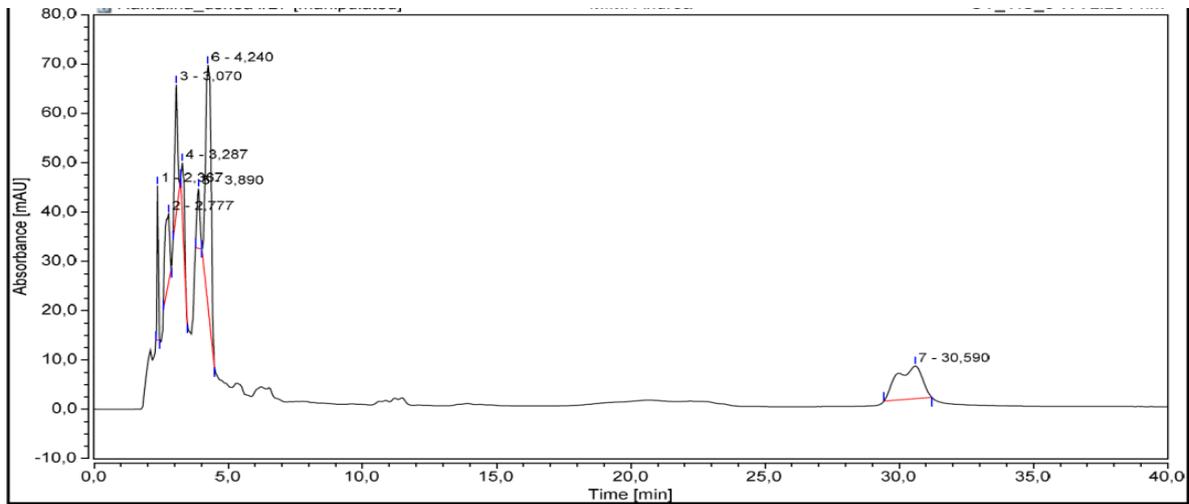
**Apêndice IV** - Cromatograma de CLAE do extrato alcoólico de *Asplenium serratum* a 254nm, em Tr. entre 0,0 a 40,0 min.



**Apêndice V** - Valores de tempo de retenção (Tr - min), área e área relativa dos picos do cromatograma de CLAE, a 254 nm, do extrato alcoólico de *Asplenium serratum*.

Picos	Tempo de retenção (min)	Área (mAU*min)	Área relativa (%)
1	2,570	0,034	1,98
2	2,670	0,059	3,46
3	2,737	0,030	1,77
4	2,800	0,004	0,21
5	2,900	0,000	0,01
6	8,513	0,117	6,87
7	8,740	0,070	4,11
8	34,283	0,898	52,86
9	35,153	0,488	28,74

**Apêndice VI** - Cromatograma de CLAE do extrato alcoólico de *Marsilea minuta* a 254nm, em Tr. entre 0,0 a 40,0 min.



**Apêndice VII** - Valores de tempo de retenção (Tr - min), área e área relativa dos picos do cromatograma de CLAE, a 254 nm, do extrato alcoólico de *Marsilea minuta*.

Picos	Tempo de retenção (min)	Área (mAU*min)	Área relativa (%)
1	2,36	0,149	4,99
2	2,77	0,309	10,33
3	3,07	0,315	10,52
4	3,28	0,165	5,53
5	3,89	0,157	5,24
6	4,24	1,183	39,47
7	30,59	0,717	23,92