

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

BRUNA MARIA PEREIRA DA COSTA CORDEIRO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS COM AÇÕES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *Spondias tuberosa*
ARRUDA (ANACARDIACEAE)**

RECIFE
2018

BRUNA MARIA PEREIRA DA COSTA CORDEIRO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS COM AÇÕES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *Spondias tuberosa*
ARRUDA (ANACARDIACEAE)**

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Dra. Nataly Diniz de Lima Santos

**RECIFE
2018**

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Cordeiro, Bruna Maria Pereira da Costa

Identificação e caracterização de compostos com ações antioxidante e antimicrobiana de folhas de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae)/ Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro – 2018.

87 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva
Coorientadora: Nataly Diniz de Lima Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2018.

Inclui referências e apêndice.

1. Lectina 2. Umbuzeiro 3. Candida I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.)
II. Santos, Nataly Diniz de Lima (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019- 160

BRUNA MARIA PEREIRA DA COSTA CORDEIRO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS COM AÇÕES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE FOLHAS DE *Spondias tuberosa*
ARRUDA (ANACARDIACEAE)**

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovada em: 27/02/2018

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Roberto Araújo Sá (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Alexandre Gomes da Silva (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof Dr Maria Betânia Melo de Oliveira (Membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho ao meu avô Humberto (*in memorian*), à minha vó Joana (*in memorian*), ao meu pai Humberto Filho (*in memorian*), à minha mãe Sônia, ao meu irmão Jorge e às minhas irmãs Aletah e Flávia.

AGRADECIMENTOS

Na vida nunca estamos sozinhos e sempre temos pessoas que Deus coloca em nossas vidas pra nos apoiar, e eu sou e serei eternamente grata às pessoas que passaram na minha vida, e àquelas que continuam nela ou em meu coração.

Primeiramente, quero agradecer a Deus e ao meu mentor espiritual, por me iluminarem, me protegerem e me darem forças pra seguir essa jornada.

Agradecer à minha mãe por ser uma mulher que me inspira todos os dias a ser cada vez melhor, por sempre me apoiar em tudo e ser tão presente em minha vida, por nunca desistir de mim e dos meus irmãos. A ela todo meu amor!

Ao meu irmão Jorge e às minhas irmãs Aletah e Flávia, por sempre acreditarem em mim, por aguentarem minhas reclamações em dias difíceis, por estarem ao lado em todos os momentos. Vocês são meu motivo por toda essa dedicação à vida acadêmica.

Ao meu pai, que de onde estiver está muito feliz por minhas conquistas. Ao meu avô Humberto, que quando eu era criança, sempre me dizia que queria uma doutora na família: VÔ VOU SER DOUTORA! A minha avó Joana, que nos momentos que mais precisei, sempre esteve presente me ajudando a concluir os estudos. Saudades eternas!

Gratidão é o que descreve o que sinto pela minha orientadora Prof. Dr^a Patrícia Paiva, por me acolher em seu laboratório no momento que mais precisei de direção no meu Doutorado, como sempre digo aos meus amigos de laboratório: Professora, a senhora é ÓTIMA!

À minha chefinha e co-orientadora Dr^a Nataly Santos, por todo apoio, ensinamento, e muita paciência comigo (sei que não fui fácil, perdão), sua presença em minha vida foi essencial. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Thiago Napoleão, por toda a colaboração, por ser essa pessoa tão gentil, amiga e presente na vida de todos os alunos do laboratório. Muita luz sempre em sua vida.

À Prof.^a Dr^a Márcia Vanusa, pelo convite para ser aluna dela no doutorado, no momento que eu não sabia mais o que fazer da vida. Serei eternamente grata pela oportunidade.

À Prof.^a Dr^a Maria Tereza Correia, por também me aceitar como aluna e pela colaboração.

Ao Dr. Alexandre, pelo apoio, confiança e contribuição na seleção e agora no final do doutorado.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio por toda a contribuição e amizade durante toda essa acadêmica.

Ao Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, por sempre abrir as portas do Laboratório de Produtos Naturais pra mim e por todos os ensinamentos.

A Dr^a Mônica Martins, Dr^a Rocio Santiago, e Prof. Dr. Emerson Peter, pela amizade, conselhos, apoio e ensinamentos que sempre escutei com muito carinho. Os levarei sempre comigo no coração.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Dayvid, Carlos, Robson, Poliana, Pollyana, Livia, Caio, Suellen, Jainaldo, Bernardo, Alcides, Benny, Thamara e Danilo, minha enorme gratidão por me ensinarem, pelo companheirismo e paciência que vocês tiveram por mim, por todos os momentos de risadas que tornaram meus dias mais fáceis, por aturar meus estresses, e tantas outras coisas que não cabem aqui.

Às minhas amigas do Laboratório de Produtos Naturais Joelma, Francinete, Aline, Ana Paula e Alexsandra por todo apoio e companhia e risadas na hora do almoço, momentos de discussões científicas saudáveis e boas risadas.

Aos técnicos Sr. João Virgínio e Bruno Veras que sempre estavam dispostos a me ajudar quando precisei.

À minha turma de mestrado que, sempre que podemos, estamos ajudando uns aos outros, dando força e torcendo sempre uns pelos outros. Uma amizade pra vida toda.

A todas as minhas amigas de infância e todos os meus amigos que torcem muito pelo meu sucesso e por todas as energias positivas enviadas pra mim.

A toda a minha família, tios, tias, primos (em especial a Josenildo por sempre estar ao meu lado) e primas pela torcida.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao órgão de fomento A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização e conclusão deste trabalho para encerrar o ciclo da minha vida acadêmica.

Todo conhecimento começa num sonho. O conhecimento nada mais é que a aventura pelo mar desconhecido, em busca da terra sonhada. Mas sonhar é coisa que não ensina. Brota das profundezas da terra. Como mestre, só posso então lhe dizer uma coisa: Conte-me seus sonhos para que sonhemos juntos”.

(Rubem Alves)

RESUMO

O objetivo foi identificar e caracterizar compostos com ação antioxidante e atividade antimicrobiana presentes em folhas de *S. tuberosa*, além disso, foi avaliado a forma de atuação: efeitos do extrato hexano na produção de superóxido, potencial da membrana mitocondrial e lisossomal, e da externalização da fosfatidilserina. Extrato hexânico (EH) das folhas teve sua composição química avaliada por cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear ^1H (RMN). O potencial antioxidante utilizou métodos de sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico]). Atividade antifúngica de EH foi avaliada contra espécies de *Candida* e de *Cryptococcus*. Adicionalmente, a atividade hemolítica foi avaliada. A partir de extrato salino do pecíolo das folhas, foi isolada por cromatografia em coluna de quitina uma lectina (StLPL, do inglês *S. tuberosa leaf petiole lectin*) e caracterizada quanto ao perfil em eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), especificidade de ligação a carboidratos, efeito de variações de temperatura e pH e presença de cátions divalentes na atividade hemaglutinante (AH). Ainda, a atividade antibacteriana da lectina contra fitopatógenos do gênero *Pectobacterium* foi investigada. EH contém flavonóides, taninos hidrolisáveis, saponinas e terpenos. O perfil em CLAE indicou a presença de hiperosídeo ($1,27 \pm 0,0128$ g%) e ácido gálico ($0,28 \pm 0,0076$ g%). O espectro de ^1H RMN mostrou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados. EH apresentou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH (IC_{50} : $234 \mu\text{g} / \text{mL}$) e ABTS (IC_{50} : $123,33 \mu\text{g} / \text{mL}$) e foi capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* com concentração mínima inibitória (CMI) de 2,0, 0,078, 0,78 e 3,12 mg/mL, respectivamente. O tratamento das células de *C. glabrata*, *C. gattii* e *C. neoformans* com EH resultou em aumento dos níveis mitocondriais do ânion superóxido, bem como causou hiperpolarização (*C. glabrata*) ou despolarização (*C. gattii* e *C. neoformans*) da membrana mitocondrial e comprometimento da membrana lisossomal. O extrato induziu apoptose das células de *C. gattii*. Foi detectada uma fraca atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos (EC_{50} : $740,8 \mu\text{g} / \text{mL}$). StLPL foi isolada com fator de purificação 1,49, apresentou uma única banda polipeptídica de aproximadamente 21 kDa em SDS-PAGE e sua AH foi inibida por fetuína. A lectina permaneceu ativa após aquecimento até 100°C e em ampla faixa de pH (3,0 a 12,0) e foi estimulada na presença de Mg^{2+} . StLPL apresentou atividade bacteriostática (CMI de 80 a $160 \mu\text{g} / \text{mL}$) contra *P. carotovorum brasiliensis*, *P. carotovorum carotovorum* e dois isolados (*Pectobacterium* sp.) obtidos de rúcula e alface. Ação

bactericida foi detectada contra o isolado de rúcula. Em conclusão, o extrato hexânico de folhas de *S. tuberosa* (contendo metabólitos secundários e ácidos graxos) apresentou atividade antioxidante moderada e ação antifúngica sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus* por causar danos a nível mitocondrial e lisossomal; ainda, o pecíolo das folhas contém StLPL, uma lectina termoestável ativa contra bactérias fitopatogênicas. Descritos pela primeira vez, os resultados demonstram o potencial do umbuzeiro em fornecer moléculas de relevância biomédica, estimulando sua valorização e conservação.

Palavras-chave: Umbuzeiro. *Candida*. *Cryptococcus*. Lectina. Hiperosídeo.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to identify and characterize compounds with antioxidant action and antimicrobial activity present in leaves of *S. tuberosa*. In addition, it was evaluated the effect of exutote hexane on superoxide production, mitochondrial and lysosomal membrane potential, and of externalization of phosphatidylserine. The hexane extract (HE) of the leaves had its chemical composition evaluated by thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and ^1H nuclear magnetic resonance (NMR). The antioxidant potential was evaluated by free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) and ABTS (2,2-azinobis- [3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid]) scavenging activities. Antifungal activity of HE was evaluated against *Candida* and *Cryptococcus* species. Additionally, the hemolytic activity was evaluated. A lectin (StPLL, *S. tuberosa* leaf petiole lectin) was isolated from leaf petiole extract by chitin column chromatography and was characterized for polyacrylamide gel electrophoresis profile under denaturing conditions (SDS-PAGE), carbohydrate binding specificity and effect of temperature and pH variations besides the presence of divalent cations in its haemagglutinating (HA) activity. Furthermore, the antibacterial activity of lectin against phytopathogens of the genus *Pectobacterium* was investigated. HE contained flavonoids, hydrolysable tannins, saponins and terpenes. The HPLC profile indicated the presence of hyperoside (1.27 ± 0.0128 g%) and gallic acid (0.28 ± 0.0076 g%). The ^1H NMR spectrum showed the presence of saturated and unsaturated fatty acids. HE showed antioxidant activity in the DPPH (IC_{50} : 234 $\mu\text{g/mL}$) and ABTS (IC_{50} : 123.33 $\mu\text{g/mL}$) assays and was able to inhibit the growth of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* with minimal concentration (MIC) of 2.0, 0.078, 0.78 and 3.12 mg/mL, respectively. The treatment of *C. glabrata*, *C. gattii* and *C. neoformans* cells with HE resulted in increased mitochondrial levels of the superoxide anion, as well as caused hyperpolarization (*C. glabrata*) or depolarization (*C. gattii* and *C. neoformans*) of the mitochondrial membrane, and lysosomal membrane damage. In addition, the extract induced apoptosis of *C. gattii* cells. A weak hemolytic activity was detected on human erythrocytes (EC_{50} : 740.8 $\mu\text{g/mL}$). StLPL was isolated with a purification factor of 1.49, presented a single polypeptide band of approximately 21 kDa in SDS-PAGE and its HA was inhibited by fetuin. The lectin remained active after heating at 100 °C and at a wide pH range (3.0 to 12.0) and was stimulated in the presence of Mg^{2+} . StLPL presented bacteriostatic activity (MIC of 80 to 160 $\mu\text{g/mL}$) against *P. carotovorum brasiliensis*, *P. carotovorum carotovorum* and two isolates (*Pectobacterium* sp.) obtained from arugula and lettuce. Bactericidal action was detected against the arugula isolate.

In conclusion, the hexane extract of leaves of *S. tuberosa* (containing secondary metabolites and fatty acids) showed moderate antioxidant activity and antifungal action on *Candida* and *Cryptococcus* species, causing damage at mitochondrial and lysosomal levels; also, the leaf petiole contains StLPL, a thermostable lectin active against phytopathogenic bacteria. Described for the first time the results demonstrate the potential of the umbuzeiro in providing molecules of biomedical relevance, stimulating its valorization and conservation.

Keywords: Umbuzeiro. *Candida*. *Cryptococcus*. Lectin. Hyperoside.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral de um tanino.....	24
Figura 2 - Estrutura geral das saponinas.....	26
Figura 3 - Estrutura básica de um flavonóide.....	28
Figura 4 - Estrutura química do hiperosídeo.....	30
Figura 5 - Biomas brasileiros.....	32
Figura 6 - Umbuzeiro.....	34
Figura 7 - Fruto de <i>Spondias tuberosa</i> . (A) Corte do fruto. (B) Higienização do umbu em hipoclorito de sódio.....	34

ARTIGO 1

Figure 1 - Effect of treatment with hexane extract from <i>S. tuberosa</i> leaves on mitochondrial superoxide anion levels of <i>C. gattii</i> (A) and <i>C. neoformans</i> (B)	48
Figure 2 - Effect of treatment with hexane extract from <i>S. tuberosa</i> leaves on mitochondrial membrane potential of <i>C. gattii</i> (A and B) and <i>C. neoformans</i> (C and D).....	50
Figure 3 - Effect of treatment with hexane extract from <i>S. tuberosa</i> leaves on lysosomal membrane stability of <i>C. gattii</i> (A and B) and <i>C. neoformans</i> (C and D).....	51
Figure 4 - Effect of treatment with hexane extract from <i>S. tuberosa</i> leaves on externalization of phosphatidylserine in <i>C. gattii</i> (A) and <i>C. neoformans</i> (B)..	51

ARTIGO 2

Figure 1 - Purification of <i>S. tuberosa</i> petiole leaf lectin (StPLL). Chromatography of extract on chitin column equilibrated with 0.15 M NaCl. Adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. The inset shows SDS-PAGE of StPLL.....	61
---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Table 1 - Summary of the purification of <i>S. tuberosa</i> petiole leaf lectin (StPLL).....	60
Table 2 - Antibacterial activity of <i>S. tuberosa</i> petiole leaf lectin (StPLL).....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	FUNGOS.....	18
2.2	FITOPATÓGENOS.....	19
2.3	COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS.....	20
2.3.1	Taninos.....	23
2.3.2	Terpenos.....	25
2.3.3	Saponinas.....	26
2.3.4	Flavonoides.....	28
2.4	PLANTAS DA CAATINGA.....	31
2.4.1	Família Anacardiaceae.....	33
2.4.1.1	A espécie <i>Spondias tuberosa</i> Arruda.....	33
2.4.1.2	Atividades biológicas de espécies de <i>Spondias</i>	36
2.5	LECTINAS.....	39
2.5.1	Atividade antimicrobiana de lectinas.....	40
3	ARTIGO 1 - ANTIFUNGAL ACTIVITY OF HEXANE EXTRACT FROM LEAVES OF <i>spondias tuberosa</i> ARRUDA AGAINST <i>Cryptococcus</i>.....	42
4	ARTIGO 2 - PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM <i>Spondias tuberosa</i> LEAF PETIOLE WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENS.....	55
5	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE - HEXANE EXTRACT FROM <i>Spondias tuberosa</i> (ANACARDIACEAE) LEAVES HAS ANTIOXIDANT ACTIVITY AND IS AN ANTI-<i>Candida</i> AGENT BY CAUSING MITOCHONDRIAL AND LYSOSOMAL DAMAGES.....	78

1 INTRODUÇÃO

São vários os problemas de saúde que afetam a população humana tais como infecções por microrganismos (fungos, bactérias e vírus), doenças imunológicas, inflamatórias, degenerativas, como Alzheimer e o Parkinson, e alguns tipos de câncer. Devido à evolução de algumas patologias e resistência de microrganismos a alguns medicamentos já existentes, e à necessidade de medidas adequadas para cura desses problemas, há uma grande busca por novas moléculas com potenciais terapêuticos para tratar, prevenir doenças, bem como, inibir e impedir o crescimento de microrganismos patógenos.

Assim como em seres humanos, existem microrganismos que afetam o desenvolvimento saudável da planta causando manchas foliares, cancos e antracnose comprometendo os órgãos aéreos das plantas (REIS; CASA, 1998; REIS et al., 2004). A perda de plantações está sendo frequente devido à falta de substâncias eficazes no combate a essas pragas, portanto, pesquisa vem sendo feitas a cerca de encontrar novas moléculas para solucionar este problema.

Essas moléculas estão sendo isoladas e purificadas de diversas fontes naturais, como plantas, animais e também microrganismos, e são chamadas de moléculas bioativas, ou produtos naturais. Já são descritas na literatura uma ampla variedade dessas moléculas, com diversas funções biológicas e com mecanismo de ação já elucidado. Dentre as ações farmacológicas já citadas estão às atividades antibacteriana, antifúngica, imunomoduladora, antioxidante, entre outras.

Estes compostos bioativos podem ser produzidos por vias metabólicas, e são produtos resultantes do metabolismo primário ou do metabolismo secundário. Os metabólitos primários são responsáveis pela estrutura, plasticidade e armazenamento de energia, tais como os lipídeos, carboidratos e proteínas; dentre essas últimas, são encontradas as lectinas, que são proteínas que se ligam a carboidratos e apresentam diversas atividades biológicas. Os metabólitos secundários contribuem para a adaptação e sobrevivências das espécies e são responsáveis pela proteção das plantas de agentes externos e por liberarem aroma, cor e sabor, servindo como atrativos para polinizadores. Eles são relacionados com processos químicos específicos para uma dada espécie ou família, portanto, não são universais. As diversas classes de metabólitos secundários apresentam inúmeras atividades biológicas.

Spondias tuberosa Arruda (umbuzeiro) aparece como uma fonte bastante promissora de compostos bioativos, pois seu uso popular tem sido descrito no tratamento de infecções, inflamações, e prevenções de doenças. É uma planta endêmica da região semiárida brasileira, e tem sobrevivência e produção adaptada sob condição de estresse hídrico. O umbuzeiro

consagra-se como uma espécie frutífera de grande importância econômica, social e ecológica para o semiárido nordestino.

Tradicionalmente, a casca do caule do umbuzeiro é utilizada para a lavagem de olhos infectados, e como digestivo e laxativo. Há, porém, poucas informações científicas a respeito de sua eficácia e segurança de uso. O umbu e outros tecidos do umbuzeiro são ricos em compostos antioxidantes, sendo considerada fonte de carotenóides, ácido ascórbico, compostos fenólicos, dentre outros.

Diante do contexto exposto acima, a presente tese teve como objetivo identificar bioatividades de extratos orgânicos e lectina de folhas de *S. tuberosa*, visando agregar informações ao seu potencial terapêutico, sendo o primeiro trabalho a relatar os efeitos antifugicos, antifitopatógenos e os mecanismos de ação de compostos e proteínas extraídos desta planta.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar compostos com ações antioxidante e antifúngica em folhas de *Spondias tuberosa*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato hexânico de folhas de *S. tuberosa*;
- Determinar e caracterizar a composição química do extrato hexânico por cromatografia de camada delgada e cromatografia de camada líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear;
- Avaliar o extrato hexânico quanto às atividades antioxidante, hemolítica e antifúngica contra espécies de *Candida*;
- Investigar mecanismos envolvidos na morte celular de *Candida glabrata* e *Cryptococcus* causada pelo extrato hexânico;
- Isolar e Purificar e caracterizar uma lectina a partir de extrato proteico do pecíolo das folhas de *S. tuberosa*;

- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina contra bactérias fitopatogênicas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FUNGOS

Fungos são seres eucariotos, possuem paredes celulares que contêm quitina e glucanos, sendo exemplos às leveduras, bolores e cogumelos. Tem papel fundamental na decomposição de matéria orgânica e nas trocas e ciclos de nutrientes. São utilizados como fontes de alimentação, como agentes levedantes no pão e na fermentação de alguns produtos como a cerveja, e o vinho, e também como antibióticos e agentes biológicos no controle de ervas daninhas. Porém entre tantos benefícios alguns fungos são patógenos a pessoas e animais, como espécies de *Candida* e *Cryptococcus* (LACAZ et al., 2002; ZOTTI et al., 2015; RIZZON, CUNHA, VILLAS-BOAS, 2017).

As infecções por *Candida*, tanto mucocutânea quanto sistêmica, têm aumentado significativamente nos últimos anos e representam a causa mais comum de infecções fúngicas invasivas (PAPON et al., 2013). Dentre as espécies de *Candida*, destaca-se a *Candida albicans*, um patógeno emergente, que causa doença invasiva em humanos e resistência a múltiplos fármacos, resultando em altos custos de saúde em todo o mundo (DADAR et al., 2018). A plasticidade fenotípica aumenta a capacidade de *C. albicans* sobreviver sob diferentes condições ambientais e de desenvolvimento. Esta propriedade do fungo é tipicamente baseada em padrões variáveis de expressão de genes influenciados pelas condições de crescimento (RAI et al., 2018).

Agentes antifúngicos azólicos, como o fluconazol, são amplamente utilizados na prática clínica contra candidíase (CAMPOY; ADRIO, 2017). No entanto, as terapias convencionais são limitadas e nem sempre são bem sucedidas, devido à alta resistência aos agentes antifúngicos clássicos e toxicidade aos hospedeiros. A elevada incidência de infecções fúngicas realça a necessidade de pesquisas de desenvolvimento de novas moléculas e produtos naturais com ação antifúngica (SALCI et al., 2018).

Várias plantas são utilizadas na medicina popular em diversos países para o tratamento de infecções por Cândida. As plantas tem em sua composição moléculas que são os responsáveis por causar seu efeito antifúngico, estes compostos têm sido isolados de plantas e testados in vitro para confirmação das suas ações terapêuticas. Entre os testes feitos para ação antifúngica está o teste de concentração mínima inibitória, que é a menor concentração de uma substância que consegue inibir o crescimento do fungo, entre algumas plantas já testadas estão: hortelã-pimenta (0,08 µg/mL), *Thymus villosus* (0,64 µg/mL), eucalipto (0,05 µg/mL), óleo de

capim-limão (0,06 µg/mL), *Cinnamomum zeylanicum*. (0,01 µg/mL), óleo de erva-de-gengibre (0,08 µg / mL) e coentro (0,2 µg/mL) (SOLIMAN et al, 2017).

Cryptococcus são fungos saprofíticos, que variam em sua forma, tamanho e estrutura dependendo do hospedeiro. Em condições de laboratório, medem cerca de 5-7 µm, mas algumas células chegam a medir 12 µm. São poliploides, constituídos por cápsulas reticuladas e parede celular mais grossa com a presença de quitina (OKAGAKI et al., 2010; ZARAGOZA et al., 2010). São encontradas células desses microrganismos em forma de leveduras, e também em forma de hifas e pseudo-hifas (MAGDITCH et al., 2012; WANG et al., 2012). Um dos fatores que podem estar ligados à resistência desses microrganismos a antifúngicos é a idade da célula: as células mais velhas são capazes de resistir à fagocitose e morte por fagócitos e são resistentes a drogas antifúngicas (BOUKLAS et al., 2013).

Cryptococcus gatti e *Cryptococcus neoformans* são responsáveis por causar criptococose e meningite criptocócica, infecções que são consideradas fatais para o hospedeiro, por atingirem o sistema nervoso central (SPRINGER et al., 2017; ALANIO et al., 2015). Esta infecção se dá pela inalação de células dessecadas ou por esporos. Os principais fatores que estão ligados à virulência desses fungos são a presença de uma cápsula de polissacarídeo, a produção de melanina e a capacidade de se reproduzir na temperatura corporal de 37°C (GUEVARA-CAMPOS et al., 2008). É uma doença que acomete frequentemente pacientes imunodeprimidos, o que pode ser um fator determinante para pacientes com AIDS (BASTOS et al., 2017).

Oliveira e colaboradores (2014) testaram o efeito antifúngico do extrato aquoso e do látex de *Euphorbia tirucalli* in vitro contra dez cepas de *C. neoformans*. A concentração mínima inibitória tanto do látex como do extrato variou de 3,2 a 411 µg/mL. Essas amostras não provocaram danos no DNA em células leucocitárias humanas, considerando as concentrações testadas.

Alves e colaboradores (2017) testaram a atividade antifúngica do eugenol contra *C. gatti* e *C. neoformans*, e os resultados mostraram que não houve interação, quando associado entre eugenol e fluconazol e anfotericina B. O eugenol, sem a combinação, foi capaz de reduzir o diâmetro da célula e o tamanho da cápsula, aumentou a superfície/volume da célula e alterou a carga da superfície celular das cepas criptocócicas. Foi ainda detectado aumento de espécies reativas de oxigênio.

2.2 FITOPATÓGENOS

Fitopatógenos são microrganismos que causam doenças em plantas pela secreção de enzimas, toxinas, fitoreguladores, entre outras substâncias, ou até mesmo pela absorção de nutrientes da célula. Esses microrganismos podem causar bloqueio no transporte de água e de nutrientes desde as raízes às folhas ou o fluxo de seiva desde as folhas. Os fitopatógenos são fatores econômicos importantes devido às grandes perdas de plantas, cujo impacto depende do valor da cultura, da gravidade do problema, subespécie envolvida, condições ambientais, potencial de inóculo e manejo da cultura (MARIANO et al., 2005).

O gênero *Pectobacterium* é uma linhagem de bactérias necrotróficas, que atacam os tecidos da planta através da secreção de fatores de virulência conhecidos como efetores (proteínas que induzem morte celular) e enzimas que danificam a parede das células vegetais (LEE et al., 2014). Esses microrganismos causam doença em 24 famílias de angiospermas, como Solanaceae e Brassicaceae. Sobrevivem no solo, superfície e águas subterrâneas e têm sido associados a uma variedade de invertebrados (HARRISON et al., 1987, HOGAN et al., 2013).

Pectobacterium carotovorum subsp. *brasiliensis* (Pcb) é um microrganismo responsável por causar a doença chamada de talo oco ou de canela preta em plantas como o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) levando à perda de produção e/ou má qualidade dos frutos. Dias (2016) isolou seis (PM1, PM3, PM4, PM5, PM6 e PM9) cepas de *Streptomyces* visando encontrar um antagonista contra Pcb, e avaliar o efeito de redução da doença do talo oco em plantas de tomate. Os resultados mostram que PM3 foi o isolado mais eficiente quanto ao antagonismo contra Pcb, e o tratamento com *Streptomyces* modulou a atividade de enzimas relacionadas à defesa e diminuiu a incidência da doença do talo oco.

Um peptídeo sintético denominado LFchimera foi testado contra cinco bactérias fitopatogênicas, como *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* e *Pectobacterium carotovorum*. Os resultados revelaram para o teste em difusão em disco, que a LFchimera teve efeito contra todas as estirpes bacterianas de uma maneira dose-dependente com valores baixos de concentração mínima inibitória (4 µM) (CHAHARDOLI; FAZELI; GHABOOLI, 2018).

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS

Os produtos naturais são utilizados há séculos para o tratamento de diversas patologias pela população. Diversas atividades biológicas já estão descritas na literatura, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, antibiofilme, entre outras (ZIELINSKI

et al., 2014; MARISCO; PUNGARTNIK, 2015; ALEZANDRE et al., 2017). Por um tempo, o uso desses produtos perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, mas o alto custo destes fármacos e os seus efeitos colaterais contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia. Portanto, além da importância ecológica dos metabólitos naturais, devemos considerar também o seu potencial econômico (NA-BANGCHANG; KARBWANG, 2014; HERRMANN et al., 2016).

É chamado de droga todo vegetal, animal ou parte (órgão, tecidos) ou produtos derivados, que sofrem algum processo de coleta e preparo e possuam compostos com propriedades medicinais que sirvam de base para diversos medicamentos. Cada droga possui a presença de princípios ativos, que apresentam propriedades farmacêuticas (OLIVEIRA et al., 2007; YORK et al., 2016).

É de suma importância a identificação de novos compostos naturais, para conhecer a utilidade deles como candidatos a protótipos de fármacos inovadores que possam vir a atuar de forma mais específica e seletiva, com menos efeitos colaterais. Entre 1981 e 2014 foi aprovada uma grande quantidade de fármacos (43,6% de fármacos anti-infecciosos e 40,7% de agentes anticancerosos) baseados em produtos naturais ou seus derivados. Vários avanços têm sido realizados no estudo de novas moléculas e na síntese de novas drogas derivadas de produtos naturais, permitindo a formulação de novas metodologias mais acessíveis para estes estudos (HOFFMANN et al., 2013; ROBLES; ROMO, 2014; HARTWIG, 2016).

Há ainda uma limitação quanto à síntese em laboratório de compostos de origem natural, tendo em vista sua complexidade. Porém, existem estudos e um grande interesse das indústrias farmacêuticas sobre sínteses de produtos naturais em larga escala, além das modificações estruturais deles que podem aumentar o potencial biológico e a farmacocinética, tornando essas moléculas importantes medicamentos para combater várias infecções (TASKER; HERGENROTHER, 2016).

Os metabólitos primários são responsáveis pela estrutura, plasticidade e armazenamento de energia. Estes metabólitos são encarregados de todos os processos químicos que toda planta faz todos os dias para se desenvolver, sobreviver e reproduzir, tais como a fotossíntese, a glicólise, o ciclo do ácido cítrico, a síntese de aminoácidos, as transaminações, a síntese de proteínas, a síntese de materiais estruturais, a duplicação do material genético, a reprodução celular (crescimento), a absorção de nutrientes, entre outros. Também possuem ações biológicas que podem contribuir com o arsenal de agentes químicos usados em tratamentos terapêuticos, tais como proteínas ligadoras de carboidratos, chamadas de lectinas, que já tem seu potencial biológico contra bactérias e fungos e seu efeito imunomodulador descrito na literatura (NAPOLEÃO, 2012).

Os metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, e, em contraste com os primários, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presentes em todos eles. Estes constituintes químicos são extremamente diversos e cada família, gênero e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas que, por vezes, pode ser utilizada como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008).

Os metabólitos secundários são produzidos por diversas fontes biossintéticas, sendo as mais importantes a via do ácido chiquímico (fenóis, taninos e alcalóides aromáticos), ácido malônico (fenóis e alcaloides), ácido mevalônico (terpenos, esteróides e alcaloides) e acetil-coA (polipeptídios), como também podem ser produzidos através de moléculas intermediárias, através de reações anabólicas. Para que essas reações biossintéticas aconteçam, é consumida muita energia que é obtida através da glicólise e do ciclo do ácido cítrico (GÁRCIA; CARRIL, 2009; PETROVSKA, 2012).

Estes metabólitos podem ser divididos em três classes quimicamente diferentes: I) os terpenos, que se subdividem em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e os tetraterpenos, e têm a função de agentes germinadores, bem como responsáveis pelo aroma e proteção de plantas; II) os compostos fenólicos que são responsáveis pelo sabor, odor e coloração dos vegetais, grupo em que estão incluídos flavonoides e taninos; e III) os alcaloides que são compostos cíclicos com papel importante na formação e maturação das sementes, e são responsáveis pelo sabor amargo. Os alcaloides possuem efeito analgésico e atuam no sistema nervoso central de seres humanos, porém o uso inadequado pode conferir ao indivíduo dependência, se fazendo necessário o acompanhamento médico (VIZZOTO et al., 2010).

A síntese de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos; todos esses fatores alteram a quantidade e, muitas vezes, até a natureza dos constituintes presentes no tecido vegetal (GOBBO; LOPES, 2007).

A abrangente atuação dos metabólitos secundários dos vegetais mostra a necessidade e a importância do conhecimento sobre esses compostos. Entender a sua atuação pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca da solução para importantes problemas enfrentados atualmente como a resistência antimicrobiana às drogas sintéticas ou os prejuízos causados pelo uso desordenado de pesticidas (BEZERRA, 2008).

As plantas são utilizadas por muitos anos como medicamento para o tratamento de patologias humanas e seus potenciais terapêuticos já são conhecidos pela sabedoria popular,

como na comunidade ribeirinha na microrregião do Araguaia do Norte (Mato Grosso, Brasil), que tem o uso das plantas como o principal, e talvez único, recurso terapêutico para a prevenção e/ou tratamento de doenças. Foi investigado um total de 309 espécies de plantas pertencentes a 86 famílias, onde 73% são plantas nativas do Brasil, sendo a família Fabaceae a mais citada (RIBEIRO et al., 2017).

Embora exista um número vasto de pesquisas com plantas, somente cerca de 5% têm sido analisadas fitoquimicamente e seus aspectos biológicos têm uma porcentagem ainda menor de estudos, tendo em vista a quantidade enorme de espécies reconhecidas cientificamente, mais especificamente 250 a 550 mil, onde, no Brasil, no ano de 2009 estavam descritas apenas 8% de espécies nativas e 2% de espécies exóticas (CAVALCANTI, 2010; GUIMARÃES, 2015).

Atualmente existem diversos estudos científicos comprovando o conhecimento popular de várias plantas, de lugares com climas e solos diferentes. Folhas, caules, raízes, sementes, frutos, talos e cascas vêm sendo testados na comunidade científica quanto seus potenciais usos farmacêuticos, e as composições químicas também vêm sendo analisadas para o conhecimento da existência de novas moléculas presentes na natureza responsáveis por essas ações terapêuticas (RIBEIRO et al., 2017).

O Brasil apresenta uma rica biodiversidade, sendo uma fonte poderosa para pesquisas com plantas, distribuídas em seis biomas: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Pampa e Caatinga, este último sendo objeto de estudo deste trabalho e de diversos pesquisadores por possuir uma vegetação singular e bastante promissora, embora ainda seja pouco estudada e subestimada quanto sua capacidade como fonte de compostos naturais (TRETIN et al., 2011).

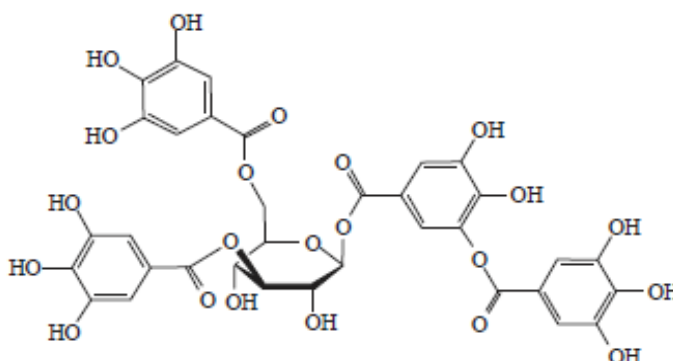
2.3.1 Taninos

Taninos são polifenóis solúveis em água, álcool e acetona e estão presentes em vegetais e frutas. Têm alto peso molecular e possuem grupos fenólicos e carboxílicos (Figura 1), que formam complexos com proteínas, carboidratos e alcaloides. São classificados como taninos hidrolisáveis e não hidrolisáveis: os primeiros podem sofrer hidrólise ácida, que libera ácidos fenólicos tais como gálico, cafeico, elágico e um açúcar. Já os taninos não hidrolisáveis ou condensados são polímeros formados por unidades de flavon-3-ols (catequinas) e flavan-3,4-diols (leucoantocianidinas) (SGARBIERI, 1996; SILVA; SILVA, 1999).

Os taninos condensados estão presentes em maior quantidade em fibras alimentares de diversos alimentos; em leguminosas, são conhecidos por causarem efeitos adversos na cor, no

sabor, no aroma e na qualidade nutricional dos alimentos, pois são de difícil digestão (CRUS; FLETCHER; PAJAK, 2014).

Figura 1- Estrutura geral de um tanino



Alguns estudos relatam que os taninos, por serem capazes de diminuir a conversão de nutrientes em novas substâncias para o organismo, têm influência na taxa de crescimento, eficiência alimentar, energia metabolizável líquida e digestibilidade proteica (CHUNG et al, 1998). Embora alguns estudos indiquem que certos tipos de câncer de esôfago estão relacionados ao consumo de taninos, existem também estudos que descrevem as atividades anticancerígena, antimutagênica, antioxidante e antimicrobiana (YILDIRIM; KUTLU, 2015).

Ribeiro e colaboradores (2018), testaram treze extratos de folhas de plantas do Cerrado, entre elas *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae), *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) e *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae), quanto à ação antimicrobiana contra bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp.). Os resultados mostram que os extratos aquosos de *C. brasiliense*, *S. brasiliensis* e *A. crassiflora* (6 mg/mL) e extrato etanólico de *C. brasiliensis* (0,27 mg/mL) e *S. brasiliensis* (0,17 mg/mL) mostraram efeitos contra *E. coli* e *Staphylococcus* spp. Os taninos foram observados como sendo os principais metabólitos nos extratos de folhas de *S. brasiliensis*.

Oudane e colaboradores (2017) isolaram e caracterizaram punicalagina, um tanino hidrolisável obtido a partir da casca amarela de romã (*Punica granatum*, pertencente à família Lythraceae), por cromatografia líquida de alta eficiência e a estrutura química da molécula foi confirmada em infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C e espectrometria de massa MALDI-TOF. Esse tanino apresentou atividade antioxidante por eliminação de radicais DPPH, sendo a IC_{50} ($1,9 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$) comparável ao do ácido tânico ($\text{IC}_{50} = 1,3 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$).

2.3.2 Terpenos

Terpenos são moléculas formadas por meio de duas rotas metabólicas distintas – via do mevalonato e via do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP). A estrutura química de um terpeno possui uma dupla ligação carbono-carbono sendo reconhecido como um hidrocarboneto insaturado (MURRY, 2011), mas se um terpeno contém oxigênio, o mesmo é denominado de terpenoide, podendo apresentar diferentes funções químicas, entre as quais: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos. Embora existam diferenças, eles têm a estrutura básica formada em blocos de cinco carbonos – unidades de isopreno (C_5H_8) – normalmente, ligadas entre si pela ordem “cabeça-a-cauda” (ligação 1-4) (LOMMIS; CROTEAU, 2014).

A classificação dos terpenos depende da quantidade de resíduos de isopreno: isopreno (1 isopreno; ex. hemiterpenos, utilizado para a fabricação de borracha), monoterpenos (2 isoprenos; ex. limoneno, responsável pelo aroma de frutas cítricas e também aroma floral), sesquiterpenos (3 isoprenos, presentes na essência de camomila), diterpenos (4 isoprenos, utilizados na produção de adoçante natural à base de stevia), triterpenos (6 isoprenos, encontrados no óleo de fígado de tubarão), tetraterpenos (8 isoprenos; ex. carotenoides como o β -caroteno, pigmento da cenoura), politerpenos (mais que 8 isoprenos, encontrados em látex) (LORENA; BICAS, 2016).

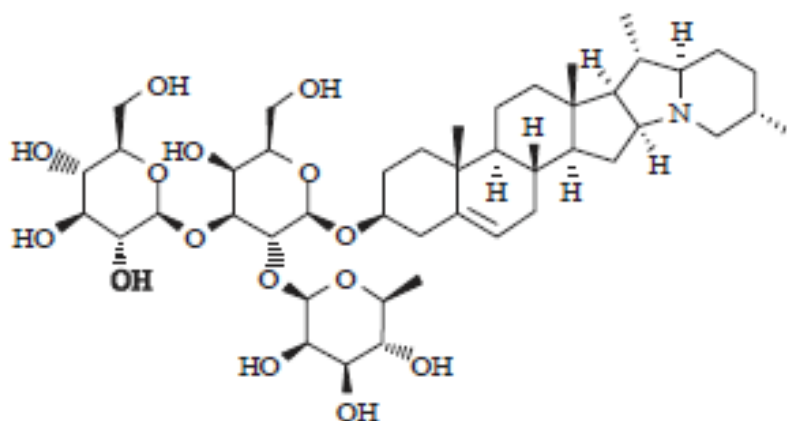
Os monoterpenos e sesquiterpenos têm estruturas com massa molecular menor e apresentam volatilidade acentuada, o que é de grande importância para o aroma principalmente de frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos. Moléculas maiores não são tão importantes para o aroma de plantas devido ao tamanho, porém os tetraterpenos (C_{40}) que possuem norisoprenoides de 10 e 13 carbonos ajudam no aroma de alguns produtos de origem vegetal (MENDES-PINTO, 2009; FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014).

Os terpenos estão presentes em óleos essenciais encontrados em plantas, animais, microrganismos, e contribuem para o aroma de plantas e seus frutos, e são utilizados para a fabricação de perfumes, cosméticos, e farmacêuticos. Além disso, são também utilizados nas indústrias alimentícias por contribuem no reforço ou na melhora da qualidade sensorial dos alimentos (RAVINDRA; KULKARNI, 2015).

2.3.3 Saponinas

Saponina é uma classe de metabólitos secundários encontrados não só em plantas como também em organismos marinhos. A estrutura química das saponinas é constituída por uma ou mais porções de glicosídeo hidrofílico juntamente com uma aglicona lipofílica e derivada e, finalmente, uma ou mais cadeias de açúcar (Figura 2). Tem propriedades detergentes e surfactantes e sua presença é caracterizada pela formação de espumas, de cor branca ou amarela, dismorfas e cristalizáveis. Destacam-se por ser expectorantes e laxantes, podendo ser encontradas em plantas como alcaçuz (anti-inflamatório), guaraná (estimulante) e aloe vera (anestésico, antiviral) além de participarem da defesa das plantas (VUONG et al., 2014).

Figura 2 - Estrutura geral das saponinas



Devido à diversidade estrutural das saponinas, diversas atividades biológicas são associadas a este grupo de metabólitos secundários, tornando-os importantes produtos naturais para o tratamento e prevenção de diversas patologias. Atividades antivirais, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e citotóxica são alguns exemplos de efeitos farmacológicos de saponinas (SPARG et al., 2004; BANG et al., 2005; PODOLAK et al., 2010; MUGFORD; OSBOURN, 2013).

Foi isolada uma saponina denominada de anagalisina C (AnC) de *Anagallis arvensis* L. (Primulaceae) e testada a atividade antifúngica e o efeito sinérgico com fluconazol frente a *Candida albicans*. Os resultados revelaram que este composto teve concentração mínima inibitória de 1 µg/mL e efeito sinérgico (SOBERÓN et al., 2017).

Os extratos em acetato de etila e acetona de raízes de *Dipsacus asper* foram testados como antifúngicos *in vivo* contra os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* e *Rhizoctonia solani*. Ambos os extratos, a 1.000 µg/mL, eliminaram o desenvolvimento de 90% do bolor cinzento do tomateiro (BCT) e queima tardia do tomilho

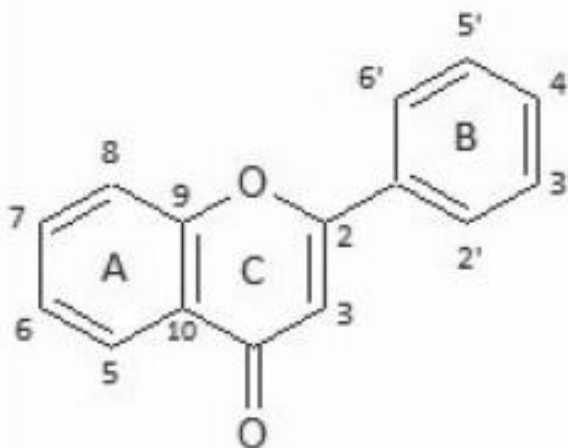
(QTT). Foram isoladas das raízes de *D. asper* e identificadas quatro substâncias e entre elas uma saponina denominada colchiside (3-O- β -D xilopiranosil-23-O-p-D-glucopiranosil-28-O-p-D-(6-O-acetil)-glucopiranosil-hederagenina). Colchiside suprimiu, moderadamente, o desenvolvimento de BCT, mas apresentou pouco efeito contra a outra doença (CHOI et al., 2016).

Ravi e colaboradores (2016) obtiveram um extrato bruto aquoso contendo saponina a partir de folhas de *Abutilon indicum* e analisaram o potencial antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* (MTCC: 3160) e *Escherichia coli* (MTCC: 443) e antioxidante, pelo método de DPPH. O extrato foi submetido à análise de cromatografia gasosa em espectrometria de massa (GC-MS). A análise de GC-MS sugeriu uma molécula benzeno-1-4-bis (fenilmetil), com um peso molecular de 258 g/mol como principal componente do extrato. O extrato demonstrou 96,16% de atividade de eliminação de radicais livres a 2,5 mg/mL de concentração e atividade antibacteriana significativa com um valor de concentração mínima inibitória de 1,11 mg/mL.

2.3.4 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos que podem possuir um ou mais anéis aromáticos, e são uma combinação de um açúcar e um grupo hidroxil (OH), a estrutura básica dessa classe de metabólitos é formada por 15 átomos de carbono na forma C6–C3–C6, baseada no núcleo de dois anéis benzênicos, A e B, ligados a um anel pirano C, como mostra a Figura 3.

Figura 3 - Estrutura básica de um flavonóide



São conhecidas 6 classes de flavonoides, devido à variação estrutural do anel C, flavanonas, flavonois (ex. quercetina), flavona (ex. luteolina), flavanóis (ex. catequina), isoflavonas (ex. genisteína) e antocianidinas (ex. cianidina) (BERNARDES; PEÇANHA; OLIVEIRA, 2010; JOHNSTON, 2015; KOIRALA et al., 2016). São moléculas que podem ser descritas como polares fracas e podem sofrer degradação em meio alcalino na presença de oxigênio. Apresentam forte absorção de luz UV, devido à presença de ligações duplas conjugadas nos anéis aromáticos (HARBONE, 1994).

Os flavonoides são sintetizados a partir das vias dos fenilpropanóides, que inclui rotas mistas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido mevalônico, que são sintetizadas pela enzima chalcona. Podem ser observadas várias modificações: adição ou redução, hidroxilação, metilação de grupos hidroxila ou do núcleo dos flavonoides, dimerização (produzindo biflavonóides), bem como glicosilação de grupos hidroxila (produzindo O-glicosídeos) ou do núcleo dos flavonóides (produzindo C-glicosídeos) (POZZI, 2007).

Devido a estas modificações, as funções dos flavonóides nas plantas são bem diversificadas, atuando na proteção contra a incidência de raios ultravioleta (UV) e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização, controle da ação de hormônios vegetais, atuando como agentes alelopáticos e como inibidores de enzimas. No que diz respeito às atividades farmacológicas são descritas propriedades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, fotoprotetora, entre outras (SAVI et al 2017) .

A flavona, e seus derivados 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona e 6-hidroxiavona, foram submetidos à avaliação de atividades antibacteriana, antioxidante, efeitos farmacológicos e toxicológicos. Os resultados obtidos revelaram que estes compostos são agonistas a integridade da membrana e inibidores da permeabilidade da membrana, antagonistas do receptor de anafilatoxina, inibidores de quinase e peroxidase, com potencial antimutagênico e capacidade vasoprotetora. Também apresentaram moderada ação antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas e moderada ação antioxidante (MONTENEGRO, 2015).

Cho e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antibiofilme contra três cepas de *Staphylococcus aureus in vivo*, em modelo de infecção do nematóide *Caenorhabditis elegans*, e atividade hemolítica de quatro vinhos tintos e dois vinhos brancos, que contêm, entre outros metabólitos, flavonoides. Apenas os quatro vinhos tintos mostraram inibição da formação do biofilme, nas concentrações de 0,5-2,0%, sem causar hemólise, o que sugere que os flavonoides

que estavam presentes nos vinhos tintos, juntamente com outros compostos foram responsáveis por esta atividade.

Os extratos metanólicos de quatro plantas da Argélia (*Asteriscus graveolens*, *Cymbopogon schoenanthus*, *Panicum turgidum* e *Pituranthos scoparius*) foi submetido à avaliação fitoquímica, antioxidante e hemolítica. Na análise fitoquímica foi demonstrada a presença de flavonoides, taninos catéquicos, alcaloides e saponinas, com exceção dos alcaloides no extrato de *Cymbopogon schoenanthus*. O extrato de *A. graveolens* ($26,97 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$) teve melhor atividade antioxidante quando analisado pelo método do DPPH que o extrato de *C. schoenanthus* ($56,83 \pm 1,53 \mu\text{g/mL}$) e *P. scoparius* ($73,73 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$). Os resultados para o teste de hemólise apresentaram que as espécies testadas têm baixo efeito hemolítico (HADDOUCHI et al., 2016).

Ximena americana, mais conhecida como ambuí, ameixa do Brasil ou ameixa do mato, tem atividades fitoterapêuticas já descritas na literatura, porém ainda são poucas as informações acerca da composição química desta espécie. Almeida e colaboradores (2015) fizeram análises fitoquímicas dos frutos destas espécies em vários estágios de maturação e encontraram que o fruto verde continha flavonoides, em maior teor ($22,07\text{mg}/100\text{g}$), entre outras classes de compostos encontrados. Atividade antioxidante foi comprovada, provavelmente devido à presença dos flavonoides.

Avaliações da composição química, atividade antifúngica, antioxidante e anticolinesterase foram realizadas para extratos etanólicos da casca e folhas de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae). Os resultados revelaram a presença de flavonoides e ácidos fenólicos e uma fraca atividade antifúngica, porém, os extratos demonstraram um bom efeito modulador do fluconazol conseguindo aumentar a atividade desse fármaco contra *Candida tropicalis*; também foram detectadas atividade antioxidante, com uma EC_{50} de $119,85 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$, e uma atividade anti-colinesterase significativa com uma zona de inibição de 1,0 cm (MORAIS, 2016).

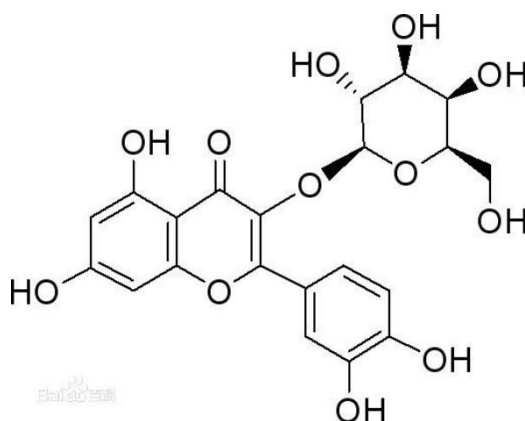
O extrato etanólico (a 50%) obtido a partir das folhas *Hedera helix* foi avaliado quanto à presença e quantidade de polifenóis, esteróis e atividade antifúngica *in vitro* contra fungos fitopatogênicos. O extrato mostrou, na sua composição, a presença de rutina, quercetina e kaempferol na amostra não hidrolisada e quercetina e kaempferol na amostra hidrolisada. A atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis tulipae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*, *Penicillium gladioli* e *Sclerotinia sclerotiorum* foi detectada (ROSCA-CASIAN et al., 2017).

Jaisinghani (2017) avaliou a atividade antibacteriana da quercetina, um flavonoide presente em frutas e vegetais. Para as seis bactérias testadas, a quercetina inibiu *S. aureus*, *P. aeruginosa* a uma concentração de 20 µg/mL, enquanto *P. vulgaris* e *E. coli* foram inibidos na concentração de 300 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente.

Luteolina é um flavonoide que está presente em cebolas, brócolis, entre outros alimentos, e é um antioxidante, que possui também atividades antiinflamatória e anticancerígena. Este flavonoide é capaz de inibir a proliferação de células cancerosas *in vitro* e *in vivo*, bloqueando o ciclo celular e induzindo apoptose (PRABHUE; VISWANATHAN, 2014).

Outro flavonóide já descritos na literatura, é o hiperosídeo, que também pode ser chamado de hiperina ou quercetina-3-O-galactosídeo. É um flavonóide glicosilado e pode ser encontrado em diversas espécies de plantas. Pode ser caracterizado como um pó amarelo e é uma molécula hidrofílica (ZHENG et al., 2012; JIA et al., 2012; KHANAVI et al., 2013). A estrutura do hiperosídeo pode ser observada na figura 4.

Figura 4 - Estrutura química do hiperosídeo



Entre os primeiros estudos com o hiperosídeo estão os de Chen e colaboradores (1994) e Chen e Ma (1999), que evidenciaram que ele diminui o conteúdo intracelular de Ca^{2+} , bloqueando os canais de Ca^{2+} em células musculares papilares, inibindo o influxo induzido tanto por noradrenalina, serotonina ou glutamato em cérebro de ratos neonatos. A partir disto, diversos trabalhos já foram publicados sobre o hiperosídeo e suas ações terapêuticas, bem como sua ação farmacocinética. Entre as atividades já descritas, encontram-se: inibição da proliferação de células de osteocarcinoma (ZHANG et al., 2014a), capacidade de citoproteção (ZHANG et al., 2011), atividade antioxidante (RAINHA et al., 2013; LIAUDANSKAS et al., 2014), anti-inflamatória (SÜNTAR et al., 2010; MANSOUR et al., 2014), e também atuação no sistema nervoso central atuando na ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D_2

(HAAS et al., 2011). As atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica também já são relatadas em extratos de plantas que continham o hiperosídeo como composto principal (SANTOS et al., 2014; ZHANG et al., 2014b).

Morais et al. (2016) isolaram e quantificaram o hiperosídeo da fração acetato de etila de partes aéreas de *Solidago chilensis* Meyen, constatando um teor desse flavonóide de 5,42%. O hiperosídeo também é encontrado na espécie *Hypericum perforatum* L., que é uma planta perene, e seus extratos orgânicos e aquosos têm sido utilizados na fitoterapia e em testes pré-clínicos para o tratamento e prevenção de diversas doenças por ter uma ação nefroprotetora, atividade antioxidante, antifúngica, ansiolítica, antiviral e cicatrizante (MORAES et al., 2014).

Zou e colaboradores (2017) mostraram que o hiperosídeo possui ação anti-fibrose e função hepatoprotetora dos fígados. Também tentaram elucidar o possível mecanismo de ação do hiperosídeo na fibrose hepática e viram que este composto aumentou a atividade das enzimas antioxidantes e desintoxicantes da fase II através da ativação do Nrf2 translocado nos camundongos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono.

Roudone e colaboradores (2017) avaliaram o conteúdo de fenois totais, a capacidade redutora de ferro total e a atividade antioxidante da casca e da polpa da maçã, e encontraram quantidades significativas de flavonoides, entre os quais o hiperosídeo.

2.4 PLANTAS DA CAATINGA

O bioma Caatinga (Figura 5) envolve os estados do Maranhão, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e Norte de Minas Gerais, ocupando uma área de 844. 453 quilômetros quadrados, com temperatura média anual de 27°C e baixa umidade (AGRA, et al., 2008; BRASIL, 2014).

Figura 5 - Biomas brasileiros



Fonte: ibge.com.br

A vegetação é adaptada às condições climáticas do local, o período de seca é duradouro e o inverno é basicamente chuvoso. Até 2008 foram registrados um total de 650 espécies vegetais pertencentes a 407 gêneros e 111 famílias, bem como seus usos medicinais. São encontrados vegetais superiores e também pteridófitas. Grande parte da vegetação é exclusivamente brasileira (AGRA et al., 2008; ALMEIDA, 2015; CORDEIRO et al., 2015).

Nas plantas encontradas na Caatinga estão presentes os flavonóides, compostos fenólicos, taninos, alcaloides, terpenos e sesquiterpenos, além de óleos essenciais. Mesmo ainda sendo pouco estudada, já são descritas na literatura diversas atividades biológicas dessa vegetação, tais como: antibacteriana (ARAÚJO et al., 2017), anti-inflamatória (BONIFACE et al., 2017), antibiofilme (TRENTIN et al., 2014), antioxidante (SANTOS et al., 2016; PAREDES et al., 2016), antiparasitária (VIEIRA et al., 2016), antifúngica, (SOARES et al., 2016), dentre outras.

Entre as famílias de plantas existentes na Caatinga já conhecidas, encontra-se a Anacardiaceae, que possui 81 gêneros, subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeae, Semecarpeae e Spondiadeae, e aproximadamente 800 espécies, que habitam ambientes secos a úmidos, nas regiões tropicais e subtropicais espalhadas pelo mundo (CORREIA et al., 2006; LUZ, 2011).

2.4.1 Família Anacardiaceae

As espécies da família Anacardiaceae geralmente são arbustos ou árvores. A maioria delas apresentam frutos ou pseudofrutos, que são comestíveis e fazem parte da dieta de muitas pessoas, por serem ricos em nutrientes, consistindo também em fontes de rendas para algumas famílias. Além disso, servem também para a decoração de muitos jardins. Existem aproximadamente 32 gêneros em todo o continente americano e já foram identificados e registrados no Brasil, 14 gêneros com aproximadamente 57 espécies desta família, sendo 14 destas exclusivas do país (SILVA-LUZ; PIRANI, 2010; SANTOS, 2010; LUZ, 2011).

Plantas das tribos Anacardieae, Rhoeae e Semecarpeae são responsáveis por causar dermatites de contato, e isso se deve pela composição química dessas plantas, que é, na sua grande maioria, de compostos fenólicos e catecólicos, presentes em quase todas as partes das plantas (caule, folhas, frutos, sementes, raízes) (GUIMARÃES, 2015). Até o momento já foram descritos vários flavonoides de plantas desta família, tais como: lanneaflavonol e dihidrolanneaflavol (*Lannea alata*), quercetina (*Shinus lentiscifolius*, GEHRKE, 2013), e lanaroflavona (*Camptosperma panamense*) (WENIGER, 2004).

A Spondiadeae é uma tribo que inclui o gênero *Spondias*, que foi criado por Linnaeus, considerado o primeiro da família Anacardiaceae. Fazem parte deste gênero 18 espécies nativas da América tropical, da Ásia e de Madagascar e, dentre essas, sete ocorrem no Brasil, que são: *Spondias mombim*, *S. tuberosa*, *S. admirabilis*, *S. expeditionaria*, *S. macrocarpa*, *S. testudinis* e *S. venulosa* (MITCHELL; DALLY, 2015).

2.4.1.1 A espécie *Spondias tuberosa* Arruda

Euclides da Cunha (1984), em seu livro, "Os Sertões", descreve a importância do umbuzeiro (*Spondias tuberosa*, Figura 6) para os sertanejos:

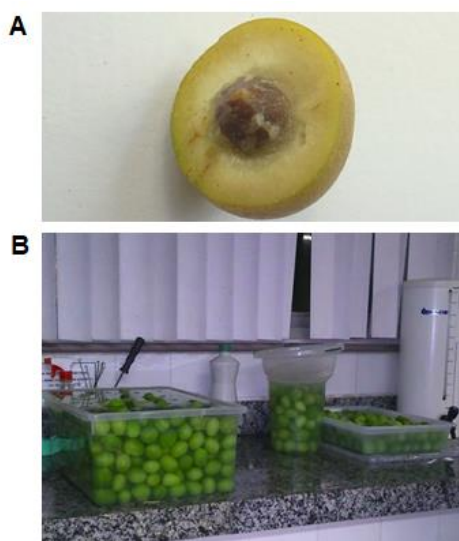
“Umbuzeiro é a árvore sagrada do sertão. Sócio fiel das rápidas horas felizes e longos dias amargos dos vaqueiros. Representa o mais frisante exemplo de adaptação da flora sertaneja”.

Figura 6 - Umbuzeiro



O nome umbuzeiro ou imbuzeiro é derivado da palavra *ymb-u* do tupi-guarani, que significa: "a árvore que dá água", pois possui xilopódios adaptados para a estação seca, onde armazenam água e minerais para sua sobrevivência e para dar início ao processo de floração e folhas (BARRETO; CASTRO, 2010; CAVALCANTI, 2010). É considerada uma árvore sagrada pelos indígenas e pelos moradores da região da Caatinga, além de ser fonte de sustento para muitas famílias dessa região (LINS-NETO et al., 2010). No entanto, o fruto (Figura 7A), chamado umbu, é de período sazonal curto e elevada perecibilidade. Por este motivo, uma das melhores formas que os agricultores possuem para evitar as perdas pós-colheita é o seu processamento, que vai desde a limpeza do fruto com hipoclorito de sódio para descontaminação, ao armazenamento em formas de polpas em freezers (Figura 7B).

Figura 7 - Fruto de *Spondias Tuberosa*. (A) Corte Do Fruto. (B) Higienização do umbu em hipoclorito de Sódio



Segundo Gomes e colaboradores (2010), cerca de 50% da produção do umbu é destinada à produção de polpa, geléias e doces sendo 40% da produção não aproveitada. O extrativismo do umbu é a maneira mais tradicional de exploração. Foram coletadas 7.980 toneladas de umbu em 2012 no nordeste Brasileiro, com 87% de coleta no estado da Bahia, 5% em Pernambuco e 3% no Rio Grande do Norte. O restante da produção (4%) foi proveniente dos estados de Minas Gerais, Paraíba, Piauí, Ceará e Alagoas (SOARES, 2014).

Apesar de ser fonte de alimentos para a população, ruminantes, polinizadores e dispersores, e ser fonte de renda para agricultores, o umbuzeiro sofre várias ameaças naturais e antrópicas que podem levar a sua extinção ou diminuição de sua população, como excesso de luz, calor, estresse hídrico, herbívoros e extração de madeira. Mesmo com pouca capacidade de se regenerar, o umbu não entra para a lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza porque estes fatores não são critérios para caracterizá-lo como espécie ameaçada. Acredita-se que em alguns lugares a *S. tuberosa* já pode ter sido extinta. Sendo assim, é importante que se faça uma avaliação completa da população de *S. tuberosa* e de todas as ameaças sofridas por esta espécie (MERTENS et al., 2017).

Diversos estudos estão sendo realizadas para investigar o potencial de aplicação da *S. tuberosa* na medicina, agricultura e nutrição, por ser fonte de vitaminas C, B, B1, compostos fenólicos, proteínas, taninos e minerais (ALMEIDA et al., 2010; LINS NETO et al., 2010; FERREIRA JÚNIOR et al., 2011).

Já existem muitos trabalhos acerca da composição química de *S. tuberosa*, porém, devido a mudança de clima, localidade e uso de fertilizantes, o conteúdo pode variar. Por isso é preciso mais pesquisas sobre a composição química do umbuzeiro, para que possa aumentar o arsenal de novos compostos bioativos com efeitos terapêuticos (BORGES et al., 2007).

Diante disso, Borges e colaboradores (2007), avaliaram as características químicas das sementes de dois cultivos diferentes em 2 fases de maturação e analisaram o perfil dos ácidos graxos e minerais. Não houve diferença entre as sementes, o rendimento foi de cerca de 10% e as dimensões de comprimento foram de 1,48 a 2,11 cm e largura de 0,76 a 1,16 cm. O teor médio de lipídios era de 55% dos quais 69% eram insaturados e o teor médio de proteína era de 24%. As sementes continham os minerais: P, K, Mg, Fe e Cu. Com estes resultados é possível dizer que o óleo ou as sementes poderiam ser usados para produtos alimentares se nenhum agente tóxico for encontrado.

Bastos e colaboradores (2016) analisaram as características físico-químicas do umbu e puderam observar que a polpa concentrada apresentou as seguintes propriedades: pH 2,43, sólidos solúveis 15,5 °Brix, acidez 3,11 g ácido cítrico/100 g, proteínas totais 1,28% m/v,

vitamina C 4,36 mg/100 g, açúcares redutores 6,08% m/v, açúcares totais 13,55% m/v, açúcares não redutores 7,46% m/v e cinzas 0,42% m/v.

Guimarães (2015) fez um estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico da casca, folhas e talos. Os extratos etanólicos foram particionados através de cromatografia líquida a vácuo, obtendo-se as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica. No extrato etanólico concentrado das folhas foi identificado um derivado quinol denominado 2,4,6-trihidroxi- 4-(hidroximetil) ciclohexa-2,5-dien-1-ona. Durante a preparação da fração metanólica do extrato das folhas, foi identificado o flavonoide quercetina 3-O- α -L-raminopiranosil (1'' $\rightarrow$ 6'')- β -glucopiranosídeo (rutina). A fração acetato de etila dos talos também foi submetida a procedimentos cromatográficos que resultaram na identificação do trans-p-cumarato de eicosanila. Também foi feita a análise de óleos fixos que mostrou a presença de ácidos palmítico, esteárico e triacontanoico.

2.4.1.2 Atividades biológicas de espécies de *Spondias*

Silva (2016b) testou a atividade anti-inflamatória e antiviral do extrato etanólico de *S. mombim*. No teste antiinflamatório o extrato inibiu (50,4%) a liberação da mieloperoxidase na concentração de 100 μ g/mL. O extrato apresentou citotoxicidade na concentração de 200 μ g/mL em neutrófilos e para células VERO foi determinada uma CC₅₀ de 1680 μ g/mL. Na atividade antiviral contra herpes simples tipo 1, o extrato foi mais potente com CI₅₀= 342,5 μ g/mL em relação a geraniina (marcador bioativo) (CI₅₀= 417,5 μ g/mL).

Lima (2016) avaliou o potencial antibacteriano do extrato aquoso de *S. mombim* frente a bactérias bucais planctônicas (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*) através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima de aderência (CIMA), e obteve os seguintes resultados: o extrato inibiu o crescimento bacteriano e ainda impediu a aderência dos microrganismos à parede do tubo de vidro mostrando-se superior, nessas duas análises, ao digluconato de clorexidina (padrão). Também foi observado que o extrato exibiu ação bactericida após 2 h de contato com *S. mutans*, enquanto o mesmo extrato, em sua CMI, exibiu efeito bactericida somente após 4 h de contato com *S. oralis*.

O extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombim* e suas frações (hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e resíduos aquosos) foram avaliados quanto a sua ação antiinflamatória, utilizando o modelo peritonite induzida por carragenina, e antioxidante, e os resultados obtidos demonstram que o extrato teve uma boa atividade antiinflamatória nas concentrações 100, 200, 300 500 mg/mL e a fração acetato de etila se destacou como sendo a

melhor fração. No teste antioxidante tanto o extrato como as frações tiveram resultado significativo, com uma taxa de 66 - 76% de sequestro dos radicais livres no método de DPPH (CABRAL et al., 2016).

Akinmoladun et al. (2014) avaliaram as propriedades antidenaturação e antioxidante de extrato metanólico das folhas de *S. mombim*, bem como da fração rica em saponina e da fração rica em flavonóides. Esses autores tiveram como resultados uma alta atividade antioxidante da fração éter, enquanto o extrato metanólico, a fração rica em flavonoide e a fração rica em saponina inibiram significativamente a degradação de desoxirribose.

Iqbal e colaboradores (2016) testaram o efeito hepatoprotetor (em modelo de toxicidade causada por etanol) dos extratos em éter de petróleo, clorofórmio, etanol e acetona de *S. pinnata* em ratos por parâmetros bioquímicos e oxidativos. Os resultados mostraram que os extratos em acetona e etanol impediram o aumento nos níveis séricos de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, colesterol, bilirrubina e malondialdeído, e diminuição na glutatona, na catalase, na superóxido dismutase e na albumina reduzida. Eles também atenuaram o dano ao DNA induzido pelo etanol. Os resultados do estudo foram bem apoiados pelas observações histopatológicas.

O extrato etanólico bruto da folha de *S. pinnata* e diferentes partições foram avaliadas quanto às possíveis atividades de estabilização trombolítica de membrana. Entre as partições testadas, a fração solúvel em acetato de etila apresentou maior porcentagem de lise de coágulo (58,06%) em comparação com a exibida por estreptoquinase (69,23%) e água (3,0%). Estas frações também inibem significativamente a hemólise da membrana de eritrócitos humanos tanto induzida por solução hipotônica ($65,33 \pm 0,50\%$) quanto pelo calor ($56,22 \pm 0,69$), em comparação com o ácido acetilsalicílico ($75,92 \pm 29\%$) e ($71,12 \pm 0,26\%$). Foi possível concluir, a partir deste estudo que existe uma correlação entre a quantidade de flavonóides ($132,27 \pm 0,25\%$) com as atividades testadas (UDDIN et al., 2016).

S. pinnata foi submetida à extração com acetona, metanol e uma mistura de solventes e passou por uma caracterização nutricional completa e demonstrou ser fonte de energia (348 kcal/100g), compostos fenólicos, antioxidantes naturais e minerais. É também uma fonte moderada de ácido ascórbico, ácido málico, cálcio, fósforo e outros nutrientes. A atividade antioxidante dos extratos foi detectada. O extrato da mistura de solvente apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e capacidade de inibição de α -amilase. A análise do sabor volátil mostrou miristinato de isopropilo como um composto principal seguido de outros monoterpenos e sesquiterpenos (SATPATHY et al., 2011).

Spondias purpurea, mais conhecida como ciriguela, é uma árvore nativa do México, do Norte do Peru e do Brasil, particularmente em zonas semi-áridas. Esta árvore exsuda um polissacarídeo solúvel em água, constituído por um esqueleto de galactano (1→3) substituído em unidades de C6 com D-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-ramnose e ácido glucurônico. O polissacarídeo brasileiro difere do venezuelano quanto à quantidade de ácido e arabinose, bem como a presença de fucose e glicose. A D-galactose (1→6) confere ao polissacarídeo a capacidade peculiar de se ligar a lectinas após a reticulação com epícloridrina. O gel obtido foi capaz de reter especificamente as lectinas ligadoras de galactose isoladas de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia*, *Erythrina velutina* e *Ricinus communis*. Por outro lado, não foram retidas lectinas ligadoras de glicose (TEIXEIRA et al., 2007).

Engels e colaboradores (2012) caracterizaram a composição química da *S. purpurea* por cromatografia de alta performance e espectrometria de massas com ionização de eletrospray. O sistema analítico permitiu a separação de 21 compostos fenólicos em menos de 20 min e entre esses compostos foram identificados O-glicosídeos de quercetina, kaempferol, kaempferide e ramnetina, contribuindo para o estudo desta espécie, pois até o momento não tinham sido publicados dados sobre a composição química deste fruto.

O extrato bruto dos frutos de *S. purpurea* foi testado quanto a sua capacidade fotoprotetora contra raios UVA e UVB, seu potencial antioxidante, e também sua ação antimicrobiana, por ser rico em compostos fenólicos, taninos, ácidos fenólicos e flavonoides. O extrato de ciriguela apresentou um efeito protetor contra raios UVB e UVA. Na análise em HPLC foram identificadas, entre outros compostos, a rutina e quercetina (SILVA et al., 2016a).

Santos (2014) avaliou a composição química de quatro extratos vegetais (metanólico, hexânico, acetato de etila e clorofórmico) de sementes de *S. tuberosa*. O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado e o extrato hexânico foi o único que não mostrou-se tóxico para as artemias. O extrato em acetato de etila demonstrou ser mais ativo quanto à atividade antioxidante, seguido do extrato clorofórmico. O extrato clorofórmico foi submetido à transesterificação, com isso obteve-se onze ésteres metílicos, além de uma mistura de sitosterol e estigmasterol. Do extrato em acetato de etila foi isolado o 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF). Do extrato hexânico foi isolado uma mistura de triglicerídeos que foi submetida à reação de saponificação seguida de esterificação obtendo-se assim, nove ésteres.

Siqueira e colaboradores (2016) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico de *S. tuberosa* e analisaram o perfil fitoquímico por HPLC-DAD e HPLC-MS. Foram encontrados no extrato ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina e isoquercitrina. A resposta inflamatória à carragenana foi significativamente reduzida nos ensaios de edema de

pata e peritonite em camundongos. No ensaio com edema da pata traseira, a ação edematogênica foi reduzida em até 63,6% e a atividade de mieloperoxidase teve total inibição. A migração celular total para a cavidade peritoneal foi reduzida em até 65%.

O extrato metanólico e o extrato diclorometano da polpa do umbu foram submetidos a análises biológicas. O extrato metanólico apresentou alta atividade antioxidante nos ensaios DPPH, ABTS e ORAC, bem como a atividade de inibição da acetilcolinesterase (AChE). O extrato diclorometano mostrou-se como agente de prevenção do câncer, com indução de quinona redutase em células Hepa1c1c7 (ZERAÍK et al., 2016).

Pinto e colaboradores (2015) purificaram uma peroxidase do xilopódio do umbu, que mostrou atividade ótima em pH de 6,0 a 7,0 e alta resistência térmica após incubação a 70 °C durante 6 min. A atividade enzimática presente em extrato bruto foi mais resistente ao calor do que na sua forma purificada. O teste com íons metálicos mostrou que esta peroxidase foi inibida por Mn^{2+} e estimulada por Ca^{2+} e Mg^{2+} .

2.3 LECTINAS

Lectinas são proteínas de origem não imune, que se ligam a carboidratos específicos (por exemplo: manose, ácido siálico, fucose, N-acetilglicosamina, galactose/N-acetilgalactosamina, glicanos complexos, glicoproteínas), inclusive presentes em membranas celulares, sendo capazes de aglutinar células. A palavra lectina vem de "*lectus*" e refere-se à capacidade de ligar seletivamente a carboidratos. As lectinas diferem entre si devido à composição aminoácídica, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (SHARON; LIS, 2004). Os estudos referentes às lectinas foram iniciados por Stillmark em 1888, com extratos de sementes de *Ricinus communis* (mamona), observando a aglutinação de eritrócitos causada por uma proteína chamada de ricina.

As lectinas são encontradas em microrganismos, animais e vegetais. Essas proteínas têm sido isoladas, purificadas e caracterizadas de diversas famílias de plantas, incluindo a família Anacardiaceae (GOMES et al., 2013). Essas proteínas podem ser isoladas e purificadas de folhas, cascas, flores, raízes, tubérculos, bulbos, e mais frequentemente de sementes (COELHO; SILVA, 2000; COSTA et al., 2010; CHARUNGCHITRAK et al., 2011). Para detectar a presença de lectinas em amostras é preciso fazer testes de aglutinação sendo o mais comum o teste de atividade hemaglutinante, onde as amostras são incubadas com eritrócitos. Quando ocorre a aglutinação forma-se uma rede, visível a olho nu.

A primeira etapa para o isolamento dessas proteínas, para posteriormente serem testados os efeitos biológicos, é a extração. Em seguida, o extrato pode ser submetido a um fracionamento proteico (*salting-out*) para purificação parcial. Após estas etapas, são utilizadas as cromatografias de coluna (afinidade, troca iônica ou gel filtração). Um método utilizado para confirmação da purificação de uma proteína é a eletroforese, esse é um método analítico que também define a natureza da proteína quanto a presença de subunidades, peso molecular e ponto isolétrico (COELHO et al., 2012; LEHNINGER, 2014).

Devido à capacidade das lectinas em se ligarem a carboidratos e glicoconjugados, elas possuem uma vasta aplicação em diagnóstico e terapêutica, agindo como biomarcadores para detectar células anormais, tanto em testes *in vivo* como *in vitro* (COELHO et al., 2017) e apresentando ações antibacteriana (MOURA et al., 2016), antifúngica (PROCÓPIO et al., 2017), antiviral (MITCHELL et al., 2017) e antitumoral (QUIROGA et al., 2015).

2.3.1 Atividade antimicrobiana de lectinas

Moura e colaboradores (2015) investigaram a atividade antibacteriana de WSMoL, uma lectina extraída de sementes de *Moringa oleifera*. Os microrganismos testados para esta atividade foram *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. pumillus*, *B. megaterium*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *P. stutzeri* e *Serratia marcescens*. Os resultados demonstraram inibição do crescimento bacteriano, indução da aglutinação e extravasamento de proteínas de células de todas as cepas. Ação bactericida foi encontrada para *Bacillus* sp., *B. pumillus*, *B. megaterium*, *P. fluorescens* e *S. marcescens*. Com 6 h de incubação, pode ser visto o efeito bacteriostático. Através da microscopia de fluorescência foi demonstrado que a WSMoL causou perda de integridade celular de *S. marcescens*.

Gomes e colaboradores (2012), testaram a atividade antifúngica de quatro lectinas: Dviol, DRL, ConBr e LSL extraídas de sementes *Dioclea violacea*, *D. rostrata*, *Canavalia brasiliensis* e *Lonchocarpus sericeus*, respectivamente, frente a leveduras coletadas de secreção vaginal dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Kloeckera*. A lectina LSL não foi ativa frente às leveduras testadas, já as lectinas Dviol, DRL, ConBr mostraram forte atividade antifúngica.

Carvalho e colaboradores (2015) isolaram e caracterizaram uma lectina de sementes de *Apuleia leiocarpa*, uma planta da Caatinga, com peso de 55,8 kDa, com atividade antibacteriana. A ApulSL apresentou efeitos bactericida e bacteriostático contra espécies Gram-

positivas e Gram- negativas, com maior efeito em três linhagens de *Xanthomonas campestris*, com valores de CMI 11,2 a 22,5 µg/mL e CMB de 22,5 µg/mL).

Gomes e colaboradores (2013), isolaram uma lectina de *Shinus terebinthifolius*, denominada de SteLL, e testaram a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteridis*, bem como antifúngica contra *C. albicans*. Esta lectina mostrou-se ativa contra todos os microrganismos testados, com melhor concentração mínima inibitória (CMI= 0.45 µg/mL) para *S. enteridis*, melhor concentração mínima bactericida (6.5 µg/mL) para *S. aureus*, e concentração mínima fungicida de 26 µg/mL frente à levedura testada.

Procópio e colaboradores (2017) isolaram a lectina CasuL, de folhas de *Calliandra surinamensis*, uma proteína ácida (pI 5.82), termo-estável, com massa molecular de 48 kDa, e avaliaram as propriedades antimicrobiana e antibiofilme. A lectina demonstrou efeito bacteriostático (CMI 6,25 a 800µg/mL) e foi capaz de reduzir a formação de biofilmes por *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (isolados não resistentes e resistentes à oxacilina). CasuL mostrou atividade antifúngica contra *Candida krusei* causando alterações na morfologia celular e danos à parede celular.

3 ANTIFUNGAL ACTIVITY OF HEXANE EXTRACT FROM LEAVES OF *Spondias tuberosa* ARRUDA AGAINST *Cryptococcus*

Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro^a, Nataly Diniz de Lima Santos^a, Alexsander Rodrigues Carvalho Junior^b, Julliana Ribeiro Alves dos Santos^b, Amanda Dias de Araújo^a, Alexandre Gomes da Silva^{c,d}, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Márcia Vanusa da Silva^{a,c}, Luís Cláudio Nascimento da Silva^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Universidade CEUMA, 65075-120, São Luís, Maranhão, Brazil.*

^c*Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, 58429-970, Campina Grande, Paraíba, Brazil.*

^d*Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic systemic mycosis, subacute or chronic, of worldwide distribution caused by two species of fungi, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. There are reports of cryptococcal resistance to antifungal drugs, whose arsenal for the treatment is quite limited to three older drugs. In this work we evaluated the antifungal action of a hexane extract from *Spondias tuberosa* (a Caatinga plant) leaves against standard and clinical isolates of *C. neoformans* and *C. gattii*. The extract was prepared in a Soxhlet apparatus. Antifungal activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). Putative effects of the hexane extract on mitochondrial superoxide production, mitochondrial membrane potential, lysosomal membrane, and on externalization of phosphatidylserine were assessed by flow cytometry. The hexane extract inhibited the growth of standard and clinical isolates of *C. neoformans* with MIC of 0.78 mg/mL as well as of standard and clinical isolates of *C. gattii* with MIC of 3.12 mg/mL. The extract treatment significantly increased the production of high levels of mitochondrial superoxide anion in both species and induced depolarization of mitochondrial membrane. Damage on lysosomal membrane was also detected for both *C. gattii* and *C. neoformans*. Phosphatidylserine externalization was detected only for *C. gattii* cells treated with the extract, indicating the induction of apoptosis. In conclusion, the *S. tuberosa* leaf extract evaluated here showed antifungal activity against *Cryptococcus* species by inducing damages at mitochondrial and lysosomal levels.

Keywords: cryptococcosis; oxidative stress; mitochondrial depolarization; apoptosis.

INTRODUCTION

Cryptococcosis is an opportunistic systemic mycosis, subacute or chronic, of worldwide distribution, caused by fungi of the genus *Cryptococcus* (Sorrell et al., 2016; Kwon-Chung et al., 2014). This disease is caused previously by two species of fungi, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* (Perfect & Bicanic, 2015), naturally encapsulated basidiomycetes whose virulence is associated with the production of oxidases, proteases and their antiphagocytic capacity obtained by the properties of the capsular polysaccharide (Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Subramanian & Mathai, 2005; Severo et al., 2009). The its infection is caused by the inhalation of fungal propagules found in the environment (Pizani e Dos Santos, 2017).

In the environment, *C. neoformans* is found in areas frequented by pigeons, chickens and other species of birds; especially in pigeon droppings (Ajello, 1958) (Kwon-Chung & Bennett, 1984). The precise link between *C. neoformans* and the birds is not yet well defined, but studies say that pigeons are the main propagators of the disease and because of their high body temperature (40 and 42°C), that exceeds the growth temperature of the fungus, they are not infected (Khan et al., 1978; Gazzoni, 2008). *C. gattii*, on the other hand, is mainly found in regions of tropical and subtropical climate, in rural areas and especially in eucalyptus trees and to a wide diversity of trees, such as spruce and oak (Mitchell et al., 2011; Chayakulkeeree & Perfect, 2006; Gallanis et al., 2010).

The infection caused by these cosmopolitan agents is currently considered of high clinical importance because cryptococcosis it is one of the most prevalent systemic infections worldwide, given after the appearance of the HIV virus that causes in humans the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (Park et al., 2011; Almeida & Machado, 2015). Cryptococcosis by *C. neoformans* is the most frequent infection and occurs in cases of individuals with immunosuppression, on the other hand, *C. gattii* presents as primary agent, manifesting mainly in immunocompetent individuals (Morales, 2009).

According to the individual's immunological situation, several clinical forms can make up the condition of the patients. From this, the individual can develop an asymptomatic and self-limiting primary pulmonary complex whose fungal cells are eliminated by the immune system, but when disseminated, the Central Nervous System is the preferred and target organ of the disease (neurocryptococcosis), causing an infection of the meninges (meningoencephalitis) and the brain tissue, often accompanied by elevated intracranial

pressure; particularly affecting immunosuppressed patients and those with HIV (Severo et al., 2009; Nguyen et al., 2010; Springer et al., 2013; Alanio et al., 2015).

The treatment strategy of the disease may be different according to the type of risk group as HIV patients and in transplanted patients. These special needs also exist because in patients with AIDS, cryptococcosis usually presents nonspecific clinical symptoms, making it more difficult for the doctor (Da Silva & Gagliani, 2014) (Perfect et al., 2010). Besides that, there are reports of cryptococcal resistance to antifungal drugs (Kwon-Chung et al., 2014), whose arsenal for the treatment is quite limited to three older drugs: amphotericin B, 5-fluorocytosine (5FC) and fluconazole (Perfect et al., 2010). Other conditions may interfere with the effectiveness of the treatment, for example, the use of amphotericin B may cause adverse effects such as nephrotoxicity and anemia, while 5FC also presents difficulties for its cost and its availability, not being registered in any African country, and causes bone marrow toxicity (Loyse et al., 2013).

Spondias tuberosa is an endemic plant in the Caatinga region and has been the target of research about its therapeutic use for several diseases including antimicrobial effects by having the presence of secondary compounds known in the literature as being fungicides or fungistatic (Neto et al., 2010). Knowing the difficulties of treatment and the clinical importance of cryptococcosis, the discovery of new agents with antifungal action for the treatment of patients infected with this organism is necessary (May et al., 2015). The study of molecules from plants is an alternative for the treatment or prevention of infections caused by *Cryptococcus*. The objective of this work was to test hexane leaf extract of *S. tuberosa* against *Cryptococcus* species.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

Leaves of *S. tuberosa*, were collected at the *Parque Nacional do Catimbau* (08°37'23" S, 37°09'21" W), Buíque, Pernambuco. The plant material was identified and a voucher specimen was deposited at the *Instituto Agrônômico de Pernambuco*, Recife Brazil, under the reference number 91,090. Plant collection was authorized (number 16806) by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from Brazilian Ministry of Environment.

EXTRACT PREPARATION

The leaves were dried in a forced air convection oven at 45 °C until constant weight. After drying, they were powdered using Willye-type mill (model TE650; Tecnal, Brazil) and the powder was stored protected from light and moisture at 28 °C until use. The extract was prepared in a Soxhlet apparatus using 100 g of the powdered leaves and 1 L of *n*-hexane. The solvent was evaporated at 75 rpm and 64.4 °C in an IKA HB10 rotary-evaporator. The resulting material after solvent evaporation corresponded to the hexane extract.

CRYPTOCOCCUS STRAINS AND STUDY DESIGN

For determination of minimum inhibitory concentration (MIC) one reference strain of *C.gattii* (ATCC 24065) and one reference strain of *C. neoformans* (ATCC 24067), that were obtained from the Culture Collection of the University of Georgia (Atlanta, GA, United States), were used. In addition, one clinical isolate of each species (*C. gattii* 547 and *C. neoformans* RN01) obtained from the Culture Collection of the Mycology Laboratory/ICB-UFGM, were also used in this study. Isolates were maintained on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) at 4°C. Prior to each test, the strains were subcultured on SDA for 48 h at 37°C. The reference strains of each species were chosen for further experiments.

DETERMINATION OF THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)

The MIC was determined by the antifungal microdilution susceptibility standard test proposed by the CLSI M27-A3 method (Institute Clinical and Laboratory Standards, 2008). The inoculum was prepared in sterile saline and the transmittance of the suspensions was adjusted to 75–77% (530 nm), followed by further dilution in RPMI-1640 buffered with MOPS (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) medium to achieve 1.0×10^3 to 5.0×10^3 CFU/mL. After two-fold serial dilution of the extract, the plates were incubated at 35 °C for 48 h. The MIC was determined by adding 0.01% of resazurin solution and the plates were incubated at 35 °C for 18 h. Any color change from blue to pink was taken as yeast growth.

FLOW CYTOMETRY

Fluorescent probes were used in order to analysis of putative effects of the hexane extract on mitochondrial superoxide production (MitoSOX Red mitochondrial superoxide

indicator; Molecular Probes), the mitochondrial membrane potential (rhodamine 123), lysosomal membrane (acridine orange), and on externalization of phosphatidylserine (FITC-labelled Annexin V) of *C.gatii* and *C. neomorfans*. In all these assays, yeast cells were resuspended at a density of 1×10^6 cells/mL in RPMI-1640 medium supplemented with MOPS. The extract was added at the concentrations of 2×MIC and 4×MIC, and the cells were incubated at 37°C.

For measurement of mitochondrial superoxide production, the extract was added and after 1 h the medium was removed and the cells were washed using PBS. Then the MitoSOX reagent (5 µM) was added and the samples were incubated for 10 minutes at 37°C, protected from light. The cells were washed with warm buffer (three times) and analyzed by flow cytometry (BD Accuri™, United States; FL3 channel).

In other assays, cells were incubated with extract for 12 h and then washed with PBS and stained with 1 µg/mL acridine orange (in the dark for 20 min), 10 µg/mL rhodamine 123 (in the dark for 10 min) or FITC-labeled annexin V (following the manufacturer's instructions). After the incubation, yeast cells were washed and analyzed by flow cytometry (FL3 channel and FL1 channel for acridine orange and rhodamine 123). A minimum of 10,000 events were analyzed in each condition. Changes in the fluorescent intensity of rhodamine 123 were quantified using the variation index (VI) obtained by the equation $(MT-MC)/MC$, where MC is the mean of fluorescent intensity of control and MT the mean of treated cells. Negative values of VI correspond to membrane depolarization of mitochondrion, while positive values indicate membrane hyperpolarization.

STATISTICAL ANALYSIS

Data from flow cytometry were analyzed by One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test to determine the statistical significance. A *p*-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The hexane extract used in this work was the same employed by Cordeiro et al. (submitted) to evaluate the antioxidant and anti-*Candida* activities. This extract contains flavonoids, hydrolysable tannins, saponins, terpenes and unsaturated fatty acids. The presence of gallic acid (0.28 ± 0.0076 g%) and hyperoside (1.27 ± 0.0128 g%) was detected. In this work,

the extract was evaluated for antifungal activity against *C. neoformans* and *C. gattii* strains and mechanisms involved were investigated.

ANTI-*Cryptococcus* EFFECT OF THE EXTRACT

The hexane extract inhibited the growth of all *Cryptococcus* strains tested. The MIC values were 0.78 mg/mL for *C. neoformans* ATCC 24067 and RN01 strains and 3.12 mg/mL for *C. gattii* ATCC 24065 and 547 strains. Baptista et al. (2015) reported the antifungal activity of hexane extracts from *Lavandula stoechas subsp. luisieri* and *Lavandula pedunculata* against *C. neoformans*. Lemos et al. (2005) evaluated the antifungal potential of extracts prepared with ethyl acetate, ethanol, hexane and chloroform from *Ocimum gratissimum*. All the extracts were active against 25 strains of *C. neoformans*, being the chloroform extract the most active, inhibiting the growth of 23 strains with MIC of 62.5 µg/mL.

EXTRACT TREATMENT INCREASED THE LEVELS OF MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE ANION

Two strains of *Cryptococcus*, *C. gattii* e *C. neoformans* (one for each studied species) were selected in order to provide insights into the subcellular events related to the actions of hexane extract. Initially, the levels of superoxide anion in the yeast mitochondria were evaluated after 1-h contact with this extract. As expected, low levels of fluorescence were detected in untreated cells. The extract treatment significantly increased the production of high levels of mitochondrial superoxide anion in both species (Figure 1). For *C. gattii*, the mean fluorescence emissions in cells treated with the extract at 2×MIC and 4×MIC were 5.7 folds and 6.5 folds higher, respectively. Similarly, the fluorescence levels increased 3.8 folds (2×MIC) and 5.1 folds (4×MIC) as result of extract treatment in *C. neoformans*.

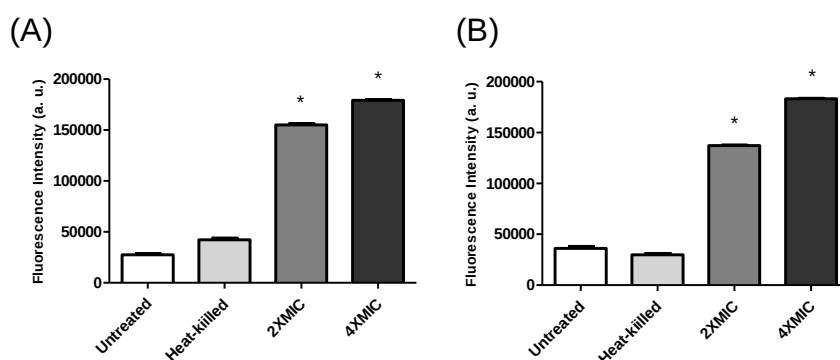


Figure 1 - Effect of treatment with hexane extract from *S. tuberosa* leaves on mitochondrial superoxide anion levels of *C. gattii* (A) and *C. neoformans* (B). (*) Significant difference in relation to untreated cells.

Alves et al. (2017) evaluated the activity of eugenol against *C. gattii* and *C. neoformans* and found that there was an increase in the level of reactive oxygen species, which led to lipid peroxidation, depolarization of mitochondrial membrane and damage to the integrity of lysosomal membrane.

THE EXTRACT INDUCES DEPOLARIZATION OF *Cryptococcus* MITOCHONDRIAL MEMBRANE

Given the effects of the extract on ROS production, we attempted to evaluate the mitochondrial status after a longer period contact (18 h) of *Cryptococcus* with the extract. The alterations in mitochondrial functions were evaluated by the Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$) using the variation index (VI). As expected, untreated cells (positive control) showed high levels of fluorescence emission at FL, as they have healthy mitochondria able to incorporate the probe (Figure 2). In contrast, heat-killed cells showed a significant reduction in the fluorescence emission which resulted in negative VI values. The treatment with the extract also induced the depolarization of mitochondrial membrane of both *C. gattii* (-0.89 and -0.93 for HE at 2×MIC and 4×MIC, respectively) and *C. neoformans* (-0.92 and -0.97 for HE at 2×MIC and 4×MIC, respectively).

THE EXTRACT INDUCES DAMAGE ON LYSOSOMAL MEMBRANE OF *C. gattii* AND *C. neoformans*

The effects of the extract on the integrity lysosomal membrane of *C. gattii* and *C. neoformans* were analyzed by incorporation of acridine orange. Untreated cells from both

species exhibited strong levels of fluorescence emission, confirming that these cells had intact lysosomes. When the yeasts were submitted to heat treatment lysosomal membranes lose their ability to retain the probe. The extract also affected the lysosomal membranes integrity of *C. gattii* and *C. neoformans*. For *C. gattii*, the fluorescence emission reduced 37.58% and 40.30% when the cells were incubated with the extract at 2×MIC and 4×MIC, respectively. The same pattern was observed for *C. neoformans* (reductions of 65.03% and 31.76% for extract at 2×MIC and 4×MIC, respectively) (Figure 3).

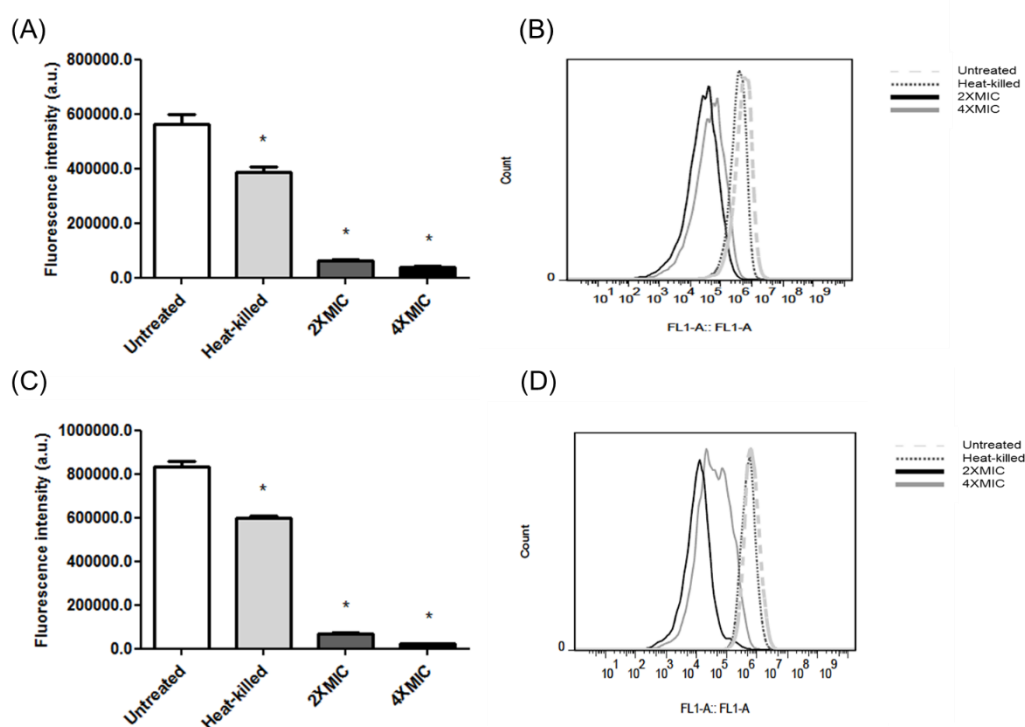


Figure 2 - Effect of treatment with hexane extract from *S. tuberosa* leaves on mitochondrial membrane potential of *C. gattii* (A and B) and *C. neoformans* (C and D). (*) Significant difference in relation to untreated cells.

THE EXTRACT INCREASED THE EXTERNALIZATION OF PHOSPHATIDYLSERINE IN *Cryptococcus gattii*

Increased ROS levels have always been considered to play a key role in mediating programmed cell death like apoptosis. Given this, we examined the extent of phosphatidylserine externalization in *C. gattii* and *C. neoformans* by using flow cytometry in conjunction with FITC-labeled annexin V. The percentage of annexin V-labelled cells was around 1% in untreated yeasts from both species (Figure 4), while the heat treatment increased this number for 30% and 20% for *C. gattii* and *C. neoformans*. The extract only significantly increased the

percentage of FITC-labeled annexin V cells in *C. gattii* when added at 4×MIC. No effects were observed in the externalization of phosphatidylserine for the treatment of *C. neoformans* with the extract. These differences could be explained by the respective dose used for each strain along with the physiological particularities of each species.

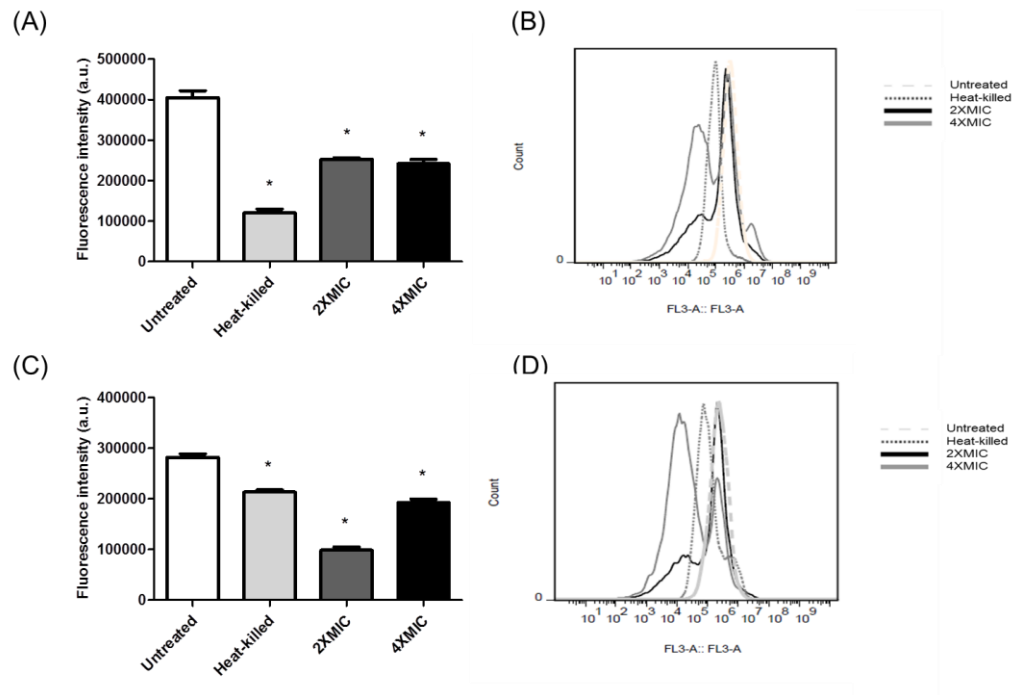


Figure 3 - Effect of treatment with hexane extract from *S. tuberosa* leaves on lysosomal membrane stability of *C. gattii* (A and B) and *C. neoformans* (C and D). (*) Significant difference in relation to untreated cells.

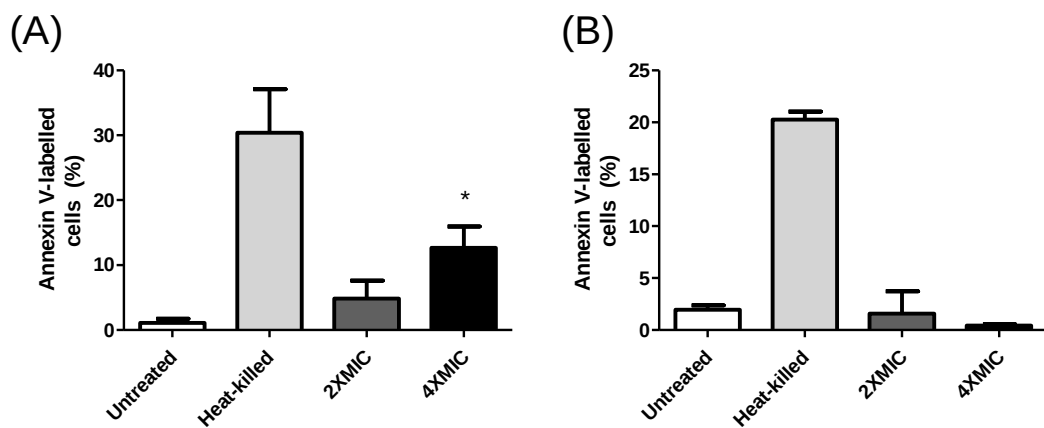


Figure 4 - Effect of treatment with hexane extract from *S. tuberosa* leaves on externalization of phosphatidylserine in *C. gattii* (A) and *C. neoformans* (B). (*) Significant difference in relation to untreated cells.

CONCLUSION

The hexane extract from *S. tuberosa* leaf showed antifungal activity against *Cryptococcus* species by inducing damages at mitochondrial and lysosomal levels. This is first time tests have been done with *S. tuberosa* species to *Cryptococcus* species, which is of great importance for future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financial support (446902/2014-4) and investigator research grants (MTSC, THN, PMGP). We are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. BMPCC would like to thank CAPES for graduate scholarship. The authors are also grateful to Dr. Carlos Eduardo Sales da Silva for technical assistance.

REFERENCES

- ALANIO, A., VERNEL-PAUILLAC, F., STURNY-LECLRE, A. and DROMER, F. *Cryptococcus neoformans* Host Adaptation: Toward Biological Evidence of Dormancy. **mBio** 6, e02580-14, 2015.
- ALVES, JÚNIA. C. O. et al. Eugenol Induces Phenotypic Alterations and Increases the Oxidative **Burst in Cryptococcus**. Volume 8 , 2419, 2017.
- AJELLO L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soil. **Am J Hyg**, v.67, p.72–77, 1958.
- BAPTISTA et al. Antioxidant and Antimycotic Activities of Two Native Lavandula Species from Portugal. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2015.
- CHAYAKULKEEREE, M., and Perfect, J. R. Cryptococcosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.** 20, 507–544. 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: third informational supplement**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

- GALANIS, E., MACDOUGALL, L., KIDD, S., & MORSHED, M. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p. 251–257, 2010.
- GAZZONI, A.F.; SEVERO, C.B.; BARRA, M.B.; SEVERO, L.C. Atypical micromorphology and uncommon location of cryptococcosis: a histopathologic study using special histochemical techniques (one case report). **Mycopathologia** v. 167, p. 197–202, 2008.
- KHAN, Z.U.; RANDAWA, H.S.; SANDHU, R.S. Carriage of *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons. **J Med Microbiol**, v.11, p.215–218, 1977.
- KRONSTAD, J.W.; ATTARIAN et al. **Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* 484 breaks out of the opportunistic box**. *Nat Rev Microbiol* 9: 193–203. 2011.
- KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z. A.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y.S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 7, a019460, 2014.
- LEMOES, J. A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O.D.E, F., PAULA, J. R., FERRI, P. H., SOUZA, L. K., et al. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. towards *Cryptococcus neoformans*. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz** 100, 55–58, 2005.
- LOYSE, A. M. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **Personal View**, v.13, 2013.
- MAY, R.C.; STONE, NRH, WIESNER, DL, BICANIC, T & NIELSEN, K . *Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen* **Nature Reviews Microbiology**, vol 14, no. 2, pp. 106–117. 2016.
- MITCHELL, T.G.; CASTANEDA E, NIERSEN K, WANKE BMSL. 2011. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast* (ed. Heitman J, et al.), pp. 237–259. **ASM**, Washington, DC.
- NETO, E.M.F.L., PERONI, N., ALBUQUERQUE, U. Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Economic Botany**, v.64, p.11–21. 2010.
- NGUYEN, B.K. et al. Honey bee colony loss in Belgium during the 2008–9 winter. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 49, 2010.
- OLSSON, M., RUNDQUIST, I., AND BRUNK, U. Flow cytofluorometry of lysosomal acridine orange uptake by living cultured cells. Effect of trypsinization and starvation. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. A** v.95, p.159–165, 1987.

PARK, B.J, LOCKHART, S.R, BRANDT, M.E, CHILLER, T.M. Public health importance of cryptococcal disease: Epidemiology, burden, and control. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast* (ed. Heitman J, et al.), p. 585–593. **ASM**, Washington, DC, 2011.

PERFECT, J.R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now. **Fungal Genet Biol.** 78:49-54, 2015.

SEVERO, C.B.; GAZZONI, A.F; SEVERO, L.C. Capítulo 3: criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.11, p.1136- 1144, 2009.

SPRINGER, D. J., SAINI, D., BYRNES, E. J., HEITMAN, J. & FROTHINGHAM, R. Development of an aerosol model of *Cryptococcus reveals* humidity as an important factor affecting the viability of *Cryptococcus* during aerosolization. **PLoS One** 8, e69804 (2013).

SORRELL, T. C.; JUILLARD, P. G.; DJORDJEVIC, J. T.; KAUFMAN-FRANCIS, K.; DIETMANN, A.; MILONIG, A.; COMBES, V.; GRAU, G. e. *Cryptococcal transmigration* across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes Infect**, v. 18, n.1, p. 57-67 2016.

4 PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM *Spondias tuberosa* LEAF PETIOLE WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENS

Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro^a, Poliana Karla Amorim^a, Robson Raion de Vasconcelos Alves^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Alexandre Gomes da Silva^{b,c}, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Roberto Araújo Sá^d, Ana Rosa Peixoto^e, Márcia Vanusa da Silva^{a,b}, Thiago Henrique Napoleão^a, Nataly Diniz de Lima Santos^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, 58429-970, Campina Grande, Paraíba, Brazil.*

^c*Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^d*Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Pernambuco, Brazil.*

^e*Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, Bahia, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

ABSTRACT

Lectins are carbohydrate-binding proteins that possess several biological properties, such as antimicrobial activity. *Spondias tuberosa* Arruda is a plant typical of the Caatinga, semi-arid region of Northeast Brazil. There is still little knowledge about bioactive compounds of this plant, this is the first time that a lectin in *S. tuberosa* has been isolated and identified. This work aimed to purify and characterize a lectin from the petioles of the leaves of *S. tuberosa* (StPLL). In addition, the antibacterial activity of lectin against phytopathogenic isolates of *Pectobacterium* was evaluated. StPLL was isolated (purification factor: 1.49) from the saline extract by chromatography on chitin column. SDS-PAGE revealed a single polypeptide band of approximately 21 kDa for StPLL. The lectin had its hemagglutinating activity inhibited by fetuin and stable to heating until 100 °C. StPLL was active at a broad pH range (3 to 12) and its HA was stimulated in the presence of Mg^{2+} . StPLL showed bacteriostatic activity (MIC from 80 to 160 µg/mL) against *P. carotovorum brasiliensis*, *P. carotovorum carotovorum* and *Pectobacterium* sp. isolates from arugula (UNEB-25) and lettuce (UNEB-28). Bactericidal activity was detected only against *Pectobacterium* sp. UNEB-25. In conclusion, the petioles of *S. tuberosa* leaves contain a chitin-binding and thermostable lectin with antibacterial activity against phytopathogenic species.

Keywords: phytopathogens; lectin; umbuzeiro; *Pectobacterium*.

INTRODUCTION

Lectins are proteins that bind to specific carbohydrates, such as monosaccharides, polysaccharides and oligosaccharide moieties of glycoconjugates. They are present in microorganisms, animals, and plants (seeds, fruits, barks, roots, leaves). These proteins can be identified through erythrocyte agglutination assay (hemagglutinating activity) (Coelho et al, 2012; Paiva et al 2011) and have been targets of studies due to their several biological activities, such as antimicrobial, insecticide, anticancer, antiviral, and immunomodulatory (Moura et al., 2015; Silva et al., 2014, Patriota et al., 2017; Lima et al., 2018).

The genus *Pectobacterium* is a lineage of necrotrophic bacteria that attack plant tissues through the secretion of virulence factors and enzymes that damage the wall of plant cells (Lee et al., 2014). These microorganisms cause disease in 24 families of angiosperms, such as Solanaceae and Brassicaceae. They survive in soil, surface and groundwater and have been

associated with a variety of invertebrates (Harrison et al., 1987, Hogan et al., 2013). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* is a microorganism responsible for causing the disease called hollow stalk or black cinnamon in plants such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leading to loss of fruit production and/or poor quality (Mariano et al., 2005).

Spondias tuberosa Arruda, popularly known as “umbuzeiro” or “imbuzeiro”, is a plant typical of the Caatinga, semi-arid region of Northeast Brazil. It is a source of income for many farmers, and also serves as food for many animals. Its roots have an enormous capacity to store water. Its fruits, leaves, stems, petioles, and seeds are rich in phenolic compounds, vitamin C, minerals, tannins, terpenes and proteins. Several properties are already known in traditional medicine and already proven in the literature, such as: antimicrobial activity, antifungal, antiviral, antioxidants. Some compounds have already been extracted and identified, such as quercetin and rutin, but there is still little knowledge about the amount, classes and therapeutic actions of the bioactive compounds present in this plant (Neto et al., 2010)

This work aimed to purify and characterize a lectin from the petioles of *S. tuberosa* leaves (StPLL). In addition, it was evaluated the antibacterial activity of the lectin against *Pectobacterium* isolates.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

Leaves of *S. tuberosa* were collected at the *Parque Nacional do Catimbau* (08°37'23" S, 37°09'21" W), Buíque, Pernambuco. The plant material was identified and a voucher specimen was deposited at the *Instituto Agrônômico de Pernambuco*, Recife Brazil, under the reference number 91,090. Plant collection was authorized (number 16806) by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from Brazilian Ministry of Environment.

LECTIN PURIFICATION

The petioles were detached from dried leaves (45 °C until constant weight) and powdered using a blender. The powder was added to 0.15 M NaCl (in the proportion of 10%, w/v) and the suspension was stirred during 16 h at 28°C. Next, the material was passed through

filter paper and centrifuged (9,000 *g*, 15 min, 4 °C). The supernatant corresponded to the saline extract.

The extract was loaded onto a chitin (Sigma-Aldrich, USA) column (7.5 × 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.3 mL/min. The column was washed with the equilibrating solution and the adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. Fractions of 2 mL were collected and absorbance at 280 nm was monitored using a GeneQuant™ 1300 spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, USA). The HA of all fractions was determined as described in section 2.4 after dialysis. The peak of adsorbed proteins was dialyzed against distilled water for eluent removal and evaluated for protein concentration and electrophoretic profile as described below. This peak corresponded to the isolated *S. tuberosa* petiole leaf lectin (StPLL).

PROTEIN CONCENTRATION

Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using a standard curve (31.25–500 µg/mL) of bovine serum albumin.

HEMAGGLUTINATING ACTIVITY (HA) ASSAY

The presence of lectins along the purification steps was monitored by the HA assay performed as described by Procópio et al. (2017b). Rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967) were used. The sample (50 µL) was serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl in a row of a 96-well microplate and then 50 µL of the erythrocyte suspension were added to each well. Erythrocytes incubated only in 0.15 M NaCl were used as control. The number of HA units corresponded to the reciprocal of the highest sample dilution that promoted full agglutination of erythrocytes. Specific HA (SHA) was defined as the ratio between HA and the protein concentration (mg/mL). The erythrocytes were collected as approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFPE (process 23076.033782/2015-70).

HA inhibition assay was performed using 0.2 M monosaccharides (glucose, mannose, fructose, and *N*-acetyl-D-glucosamine) and 0.5 mg/mL glycoproteins (fetuin and ovalbumin). In these assays, the 0.15 M NaCl solution was replaced by the carbohydrate/glycoprotein solutions and a incubation step of 15 min was included before the addition of erythrocytes.

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (PAGE)

The sample (100 µg) was submitted to PAGE in presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) in 12% (w/v) acrylamide gel prepared according to Laemmli (1970). Polypeptide bands of the lectin and molecular mass markers (bovine serum albumin, 66 kDa, ovalbumin, 45 kDa, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa, bovine carbonic anhydrase, 29 kDa, bovine trypsinogen, 24 kDa, soybean trypsin inhibitor, 20.1 kDa, α -lactalbumin, 14.4 kDa) were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 10% (v/v) acetic acid.

EFFECTS OF TEMPERATURE, PH AND IONS ON LECTIN HA

To evaluate the thermostability of the lectin, it was incubated at different temperatures (30–100 °C) for 30 min prior to the HA assay. For pH stability, the lectin was incubated in different buffers with pH values between 4.0 and 12.0 for 12 h at 4 °C and then HA was determined. Finally, the HA of StPLL was determined in presence of 20 mM CaCl₂ or MgCl₂ ions.

MICROORGANISMS

The phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum brasiliensis* UNEB-23, *Pectobacterium carotovorum carotovorum* UNEB-2, *Pectobacterium* sp. isolated from arugula UNEB-25, and *Pectobacterium* sp. isolated from lettuce UNEB-28 were obtained from the Phytopathology Laboratory of the *Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais* from the *Universidade do Estado da Bahia*. The bacteria were grown in Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDA) overnight at 37 °C. The colonies were suspended in sterile 0.15 M NaCl and the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was adjusted to equivalent of 10⁶ colony-forming units (CFU) per mL.

ANTIMICROBIAL ASSAY

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of StPLL were determined by the broth microdilution test. In 96-well microtiter plates, the sample (passed through a 0.22 µm PVDF syringe filter) was added (80 µL) into the third well, from which it was serially diluted in sterile Milli-Q water to the twelfth well of the same row. Subsequently, 40 µL of NYD medium was added to all wells, except the first, which was filled with 200 µL of the culture medium

(corresponding to the sterility control). Finally, the microbial suspension (80 μ L; 10^6 CFU/mL) was added from the second well until the last well in the row. The second well (containing microorganisms in the absence of the sample) corresponded to the 100% growth control. Plates were incubated at 37 °C and OD₆₀₀ was measured at time zero and after 24 h of incubation. The MIC corresponded to the lowest concentration of StPLL capable of promoting a reduction $\geq 50\%$ in OD₆₀₀ as compared with the 100% growth control.

For the determination of MBC, aliquots (10 μ L) of the wells containing StPLL concentrations $\geq$ MIC were inoculated into petri plates containing NYDA, which were subsequently incubated at 37 °C for 24 h. The MBC corresponded to the lowest concentration of StPLL capable of reducing the number of CFU by 99.9% in regard with the initial inoculum. Each assay was performed in triplicate and three independent experiments were performed.

RESULTS AND DISCUSSION

The saline extract showed high HA and the protein concentration (Table 1). Chromatography of the extract on chitin column (Figure 1) resulted in a peak of non-adsorbed proteins (P1) that were not able to agglutinate erythrocytes and a peak of proteins that bound to the chitin matrix (P2) and showed HA higher than that of the extract (Table 1), resulting in a purification factor of 1.49. SDS-PAGE of P2 revealed a single polypeptide band of approximately 21 kDa (Figure 1, inset), revealing the homogeneity of the preparation. Then, P2 was denominated StPLL.

Table 1 - Summary of the purification of *s. tuberosa* petiole leaf lectin (StPLL)

Sample	Protein (mg/mL)	HA	Specific HA	Purification factor
Extract	24.7	512	20.8	1.0
StPLL	0.516	16	31.00	1.49

HA: hemagglutinating activity. Purification factor corresponds to the ratio between the specific HA in the step and the specific HA of the extract.

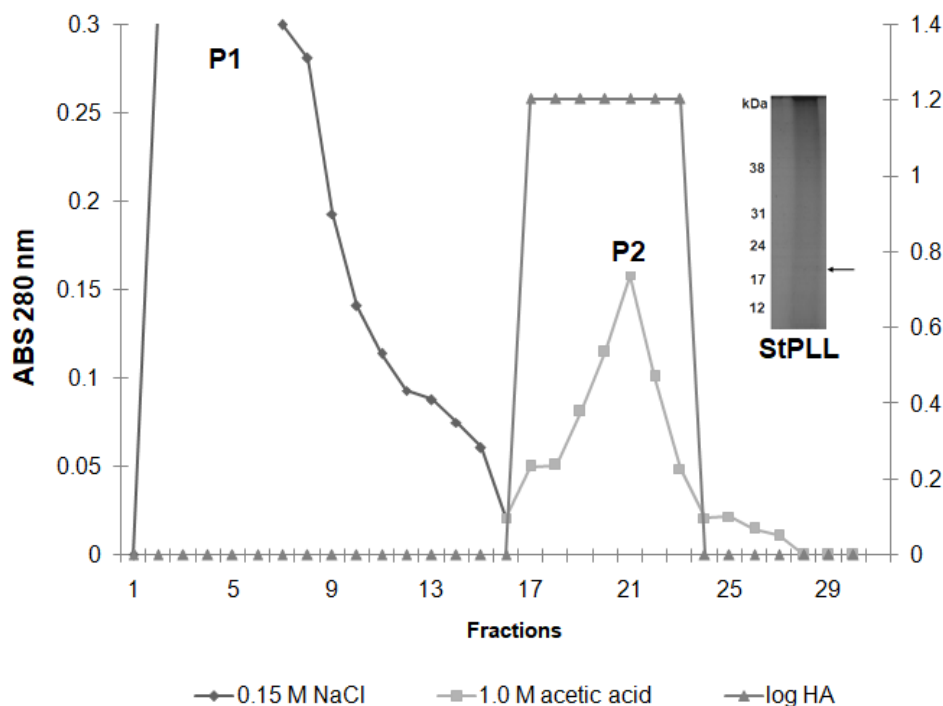


Figure 1 - Purification of *S. tuberosa* petiole leaf lectin (StPLL). Chromatography of extract on chitin column equilibrated with 0.15 M NaCl. Adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. The inset shows SDS-PAGE of StPLL.

To date, there are no reports in the literature of the presence of lectins in *S. tuberosa*, so this work is extremely important for the contribution of a new agent against plant pathogen species. However, lectins have already been purified from other species of plants belonging to the family Anacardiaceae. Three chitin binding lectins were isolated from *M. urundeuva* tissues, which showed insecticidal activity against *Nasutitermes corniger* and *A. aegypti* (Sá et al., 2008, 2009; Napoleão et al., 2011). Gomes et al. (2013) also purified a chitin-binding lectin from the leaves of *Schinus terebinthifolius* (SteLL). Lectin capable of interacting with fetuin was also isolated from the bark of *Anacardium occidentale* (Maciel et al., 2012).

The results of this work show that StPLL had its activity inhibited only by fetuin. Some lectins showed a preference or are only able to bind complex sugars, such as the oligosaccharide moiety of glycoproteins. Similarly to StPLL, the lectins from *Alpinia purpurata* inflorescence and *Microgramma vacciniifolia* frond had their HA only inhibited by glycoproteins (Brito et al., 2017; Patriota et al., 2017).

StPLL maintained its ability to agglutinate erythrocytes after heating at all the temperatures tested. The thermostability of lectins is not uncommon. Lectins from *M. urundeuva* bark, heartwood and leaf as well as from *Moringa oleifera* seeds remained active even after heating at 100 °C (Coelho et al., 2009; Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2011).

The lectin was active at all the pH values (3 to 12) and its HA was stimulated in the presence of Mg^{2+} . These results indicate that StPLL may be useful for evaluations in many assay conditions and that the addition of magnesium ions may be employed to potentiate its carbohydrate-binding ability. The lectin from *A. purpurata* inflorescences is also stimulated by divalent cations (Brito et al., 2017).

StPLL showed bacteriostatic activity against all the *Pectobacterium* isolates (Table 2). However, bactericide activity was detected only against *Pectobacterium* sp. UNEB-25. These results are very interesting since the current strategies use in chemical control of these phytopathogens have been not effective (Gardam et al., 2007).

The antibacterial activity of lectins may be a consequence of the interaction with teicuronic and theicuronic acids, peptideoglycans and lipopolysaccharides of the cell wall. The lectins can form pores on the surface of the bacterial or fungal cells, causing leakage of the cellular content (Paiva et al., 2010; Moura et al., 2015). In addition, these proteins can affect physiological processes of the microorganisms due to their interaction with glycoconjugates in the membrane of the microorganism which can generate intracellular responses, resulting in inhibition of growth and/or death (Gomes et al., 2014; Iordache et al., 2015).

Table 2- Antibacterial activity of *S. tuberosa* petiole leaf lectin (StPLL)

Bacteria	StPLL ($\mu\text{g/mL}$)	
	MIC	MBC
<i>Pectobacterium carotovorum brasiliensis</i>	80	ND
<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i>	80	ND
<i>Pectobacterium</i> sp. UNEB-25 (arugula)	80	160
<i>Pectobacterium</i> sp. UNEB-28 (lettuce)	160	ND

MIC: minimal inhibitory concentration. MBC: minimal bactericidal concentration. ND: not detected.

CONCLUSION

The petioles of *S. tuberosa* leaves contain a chitin-binding and thermostable lectin with antibacterial activity against phytopathogenic species. The isolation of this bioactive protein stimulates future studies on their biotechnological potential and the conservation of the plant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financial support (446902/2014-4) and investigator research grants (MTSC, THN, PMGP). We are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. BMPCC would like to thank CAPES for graduate scholarship. The authors are also grateful to Dr. Carlos Eduardo Sales da Silva for technical assistance.

REFERENCES

- BRITO et al. Lectin from in florescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts On immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine & Pharmacology**. 94, 865-872. 2017.
- COELHO, J. S. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae, **Chemosphere** 77, 934–938. 2009.
- COELHO, L.C.B. B. et al. **Protein Purification by Affinity Chromatography**. 2012.
- GARDAN, L., COUY, C., CHRISTEN, R., & GALAN, J. E. (2003). Evaluation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. **International. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 381–391. 2003.
- GOMES, F.S., PROCOPIO, T.F., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C.B.B. AND PAIVA, P.M.G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**. 114, 672–679. 2013.
- HARRISON, M.D, FRANC GD, MADDOX DA, MICHAUD JE, MCCARTERZORNER NJ. Presence of *Erwinia carotovora* in surface water in North America. **The Journal of applied bacteriology Society for Applied Bacteriology** 62 565–570. 1987.
- HOGAN, C.S.; MOLE, B. M.; GRANT, S. R. WILLIS, D. K. The Type III Secreted Effector DspE Is Required Early in *Solanum tuberosum* Leaf Infection by *Pectobacterium carotovorum* to Cause Cell Death and Requires Wx(3–6)D/E Motifs. **PLoS ONE** 8(6): e65534. 2013.
- IONDACHE, F., M. IONITA, L.I. MITREA, C. FAFANEATA, A. Pop, Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current Pharmaceutical Biotechnology** 16, 152–161 2015.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature** 227, 680–685. 1970.
- LEE, DONG, H. et al. Genetic Diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Isolated in Korea. **The Plant Pathology journal** . 30(2) : 117-124 2014.
- LIMA, T. A. ; DORNELLES, L. P. ; OLIVEIRA, A. P. S. ; GUEDES, C. C. S. ; SOUZA, S. O. ; SÁ, R. A. ; ZINGALI, R. B. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PAIVA, P. M. G. . Binding targets of termiticidal lectins from the bark and leaf of *Myracrodruon urundeuva* in the gut of *Nasutitermes corniger* workers. **Pest Management Science**, doi:10.1002/ps.4847, p. 1-7, 2018.
- LOWRY, O. H. N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193, 265–275. 1951.
- MARIANO, ROSA DE, L. R. BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS PECTINOLÍTICAS DOS GÊNEROS *Pectobacterium* E *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 2, p.121-153, 2005.
- MACIEL, M. I. S. ; CAVALCANTI, M. S. M. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PAIVA, P. M. G. ; CATANHO, M. T. J. A. ; COELHO, L. C. B. B. *Anacardium occidentale* bark lectin: purification, immobilization as an affinity model and influence in the uptake of Technetium-99M by rat adipocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 580-591, 2012.
- MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T.H.;CORIOLANO, M.C.; PAIVA, P.M.; FIGUEIREDO, R.C; COELHO, L.C. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p. 666-76, 2015.
- NAPOLEÃO, T.H.. et al. Termiticidal activity of lectins from T.F. *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms, **International Biodeterioration and Biodegradation**. 65, 52–59. 2011.
- NETO, E.M.F.L., PERONI, N., ALBUQUERQUE, U., 2010. Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. *Economic Botany* 64, 11-21.
- PAIVA, P. M. G., PONTUAL, E. V., NAPOLEÃO, T. H., COELHO, L. C. B. B. Lectins and trypsin inhibitors from plants: Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae, first ed., **Nova Science Publishers, Inc.**, New York, 2013.
- PAIVA, P. M. G. T. H. et al. PLANT COMPOUNDS WITH *AEDES AEGYPTI* LARVICIDAL ACTIVITY AND OTHER BIOLOGICAL PROPERTIES. **In: Bioprocess Sciences and Technology**. Cap. 11. pp. 271-296, 2011.

- PAIVA, P.M.G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants, in: A.Mendez-Villas (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, **Formatex Research Center**, Badajoz, pp. 396–406. 2010.
- PAMPHILE, J. A.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-51, 2014.
- PAREDES, P.F.M. et al. Screening of bioactivities and toxicity of *Cnidoscolus quercifolius* pohl. **J. Evid. Based Complementary Altern.Med**, p.1–9, 2016.
- PATRIOTA et al. A Trypsin Inhibitor from *Tecoma stans* Leaves Inhibits Growth and Promotes ATP Depletion and Lipid Peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- PATRIOTA et al. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**.S0141-8130, 2017.
- PROCÓPIO, et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, 419–429. 2017.
- SÁ, R.A., et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**. 43, 85–95. 2009.
- Silva,P.M.; Napoleão, T.H.; Silva, L.C.P.B.B.; Fortes, D.T.O.; Lima, T. A.; Zingali, R. B.; Pontual, E. V.; Araujo, J. M.; Medeiros, P. L.; Rodrigues, C. G.; Gomes, F. S.; Paiva, P. M. G. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**,v.27,p.695-702,2016.

5 CONCLUSÕES

- Extrato hexânico de folhas de *S. tuberosa*, contendo flavonoides (dentre eles o hiperosídeo), hydrolysable tannins (ácido gálico), saponinas, terpenos e e ácidos graxos) apresentou atividade antioxidante moderada sobre os radicais DPPH e ABTS. O extrato apresentou atividade antifúngica sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. A ação antifúngica contra *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* envolve causar danos a nível mitocondrial e lisossomal. Ainda, o extrato não apresentou atividade hemolítica, um indicativo da segurança do seu uso.
- O pecíolo das folhas contém StLPL, uma lectina ligadora de quitina, termoestável e ativa contra bactérias fitopatogênicas do gênero *Pectobacterium*.
- Os resultados demonstram o potencial do umbuzeiro em fornecer moléculas de relevância biomédica e na agricultura, estimulando sua valorização e conservação.

REFERÊNCIAS

- AGBAGWA, O. E.; FRANK-PETERSIDE, N. Effect of raw commercial honeys from Nigeria on selected pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 1801-1803, 2010.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2008
- AKINMOLADUN, A. C.; KHAN, M. F.; SARKAR, J.; FAROMBI, E. O.; MAURYA, R. Distinct radical scavenging and antiproliferative properties of *Spondias mombin* and antioxidant activity-guided isolation of quercetin-3-O--D-glucopyranoside and undec1-ene. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 17, p. 506-513, 2015.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R., RAMOS, M.A., AMORIM, E.L.C. and ALBUQUERQUE, U.P.A. Comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of Northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674-684, 2010.
- ALMEIDA, C. L. B. de. Estudo químico e farmacológico de frutos silvestres obtidos de Mato Grosso e Santa Catarina. 2015. 66 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí**, Itajaí.
- ALVES, JÚNIA. C. O. et al. **Eugenol Induces Phenotypic Alterations and Increases the Oxidative Burst in *Cryptococcus***. Volume 8 , 2419. 2017.
- ARAÚJO, F. M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**. v. 105, p. 203-206, 2017.
- BANG, S.C., J.H. LEE, G.Y. SONG, D.H. KIM, M.Y. YOON AND B.Z. Ahn. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. 53: 1451-1454. 2005
- BASTOS, J. S., MARTINEZ, E. A., SOUZA, S. M. A. Physicochemical characteristics of commercial umbu pulp. (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara): Concentration effect. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.03, p. 11 - 16, 2016.
- BEZERRA, C. S.; OLIVEIRA, C.F.R.; MACHADO, O.L.T.; MELLO, G.S.V.; PITTA, M.G. R.; REGO, M. J. B. M.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; RIBEIRO, S.F.F.; GOMES, V. M.; SILVA, O.N.; MARIA-NETO, S., FRANCO, O. L.; MACEDO, M. L. R. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 729-803, 2016.
- BERNARDES, N. R., PESSANHA, F. F., OLIVEIRA, D. B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. **CIÊNCIA E CULTURA - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB** v. 6, nº 2. 2010

BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de Mimosa tenuiflora (Wild) Poiret e Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido). Patos, PB: Universidade Federal de Campina Grande, p. 62, 2008.

BONIFACE, P. K; BAPTISTA, S. F.; KAISER, C. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A., GOMES, R. C. M.; CAVALCANTI, N. B. Chemical composition of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) seeds. **Quimica Nova**, v. 30, p.49-52, 2007.

BOUKLAS, T. et al. Old *Cryptococcus neoformans* 988 cells contribute to virulence 989 in chronic cryptococcosis. **MBio** 4, e00455-13. 2013.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses, In: Buchanan, B.B.; Gruissen, W., & Jones L.R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, **American Society of Plant Physiologists**, New York, p. 1158-1203, 2000.

CABRAL, B. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 26. Pag. 304- 3011. 2016.

CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p.86-96, 2017.

CARVALHO, A.D.S. et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p.402–408, 2015

CAVALCANTI, N. B., RESENDE, G.M.; BRITO, L.T.L. 2010.O Crescimento de Plantas de Imbuzeiro (*Spondias tuberosa* ARRUDA) no semiárido de Pernambuco. **Engenharia Ambiental**, vol. 7, no. 3, pp. 21-31, 2010.

CHARUNGCHITRAK, S., PETSOM, A., SANGVANICH, P. e KARNCHANATAT, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v. 126, p.1025–1032. 2011.

CHEN, Z.W.; MA, C.G.; FANG, M.; XU S.Y. The blocking effect of hyperin on the inward flow of calcium ion. **Yao Xue Xue Bao**, v. 29, p.15-9, 1994.

CHEN, Z.W.; MA, C.G. Effects of hyperin on free intracellular calcium in dissociated neonatal rat brain cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, p. 27- 30, 1999.

CHO, H. S.; LEE, J- H.; CHO, M. H.; LEE, J. Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. **Biofouling**, v. 31, p. 1–11, 2015.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple Method to Purify Milligram Quantities of the Galactose-Specific Lectin from the Leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical analysis**. 11, 295–300, 2000.

COELHO, L.C.B. B. et al. **Protein Purification by Affinity Chromatography**. 2012.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 22 pages. 2017.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 2006.

COSTA, R.M.P.B. et al. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 526-533, 2010.

CRUZ, CRISTINA, D. FLETCHER, GRAHAM, C., PAJAK, MARTA, A. Tannins and Extracts of Fruit Byproducts: Antibacterial Activity against Foodborne Bacteria and Antioxidant Capacity. **Journal of agriculture and food chemistry**. 2014.

CUNHA, Euclides da. **Os Sertões**. São Paulo: Três, 1984

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHAMA, K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, in press, doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028, 2018.

DIAS, MAILA. P. **Caracterização De Isolados De *Streptomyces Spp.* Como Rizobactérias Promotoras De Crescimento E De Resistência À *Pectobacterium Carotovorum Subsp. Brasiliensis* Em Plantas De *Solanum Lycopersicum (L.)***. Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular. 2016.

ENGELS, C. et al. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, p. 557-562, 2012.

FERREIRA-JÚNIOR, W.S., LADIO, A.H.; ALBUQUERQUE, U.P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 238- 252, 2011.

GÁRCIA, A. A., CARRIL, E.P. U. Metabolismo secundário de plantas. *Reduça (biologia). Serie Fisiologia vegetal*, Madrid. V. 2, n. 3, p. 119-145. 2009.

GEHRKE, I. T. S. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 486–491, 2013.

GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

GOMES, F. C.; PROCÓPIO, T. F.; COELHO; PAIVA, P.M.G. Antimicrobial lectin *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1364-5072, 2012.

GOMES, BRUNO SEVERO et al. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, 770-778 ISSN 1517-8382. 2012.

GUEVARA-CAMPOS J, GONZÁLEZ-GUEVARA L, URBÁEZ-CANO J, FERMÍN S. Meningoencefalitis por *Criptococcus neoformans* em escolares imunocompetentes. 2008.

GUIMARÃES, AMANDA, L. Estudo fitoquímico e biológico in vitro de *Spondias tuberosa* arruda (Anacardiaceae). Dissertação de mestrado. 2015. Universidade federal do Vale de São Francisco. 2015.

HAAS, J.S.; STOLZ, E.D.; BETTI, A.H.; STEIN, A.C.; SCHRIPEMA, J.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2 like receptors activation. **Planta Medica**, v. 77, p. 334-339, 2011.

HADDOUCHI, F.; CHAOUICHE, T.M.; HALLA N. Phytochemical screening, antioxidant activities and hemolytic power of four Saharan plants from Algeria. *Phytothérapie*.

HARBORNE, J. B. Comparative Biochemistry of Flavonoids. **Academic Press**, New York, 1967.

HARRISONMD, FRANC GD, MADDOX DA, MICHAUD JE, MCCARTERZORNER NJ. Presence of *Erwinia carotovora* in surface water in North America. **The Journal of applied bacteriology Society for Applied Bacteriology** 62 565–570. 1987.

HARTWIG, J. F. Evolution of C–H Bond Functionalization from Methane to Methodology. **Journal of the America Chemical Society**, v.138, p.2–24, 2016.

HERMANN, J.; FAYAD A. A.; MULLER, R. Natural products from myxobacteria: novel metabolites and bioactivities. **Natural product Reports**, v.34, p. 135-160, 2017.

HOFFMANN, T.; MULLER, S.; NADMID, S.; GARCIA, R.; MULLER, R. Microsclerodermins from Terrestrial Myxobacteria: An Intriguing Biosynthesis Likely Connected to a Sponge Symbiont. **Journal of America Chemical Society**, v.135, p.16904–16911, 2013.

HOGAN C.S, MOLE B.M, GRANT S.R, WILLIS D.K, CHARKOWSKI, A.O. The Type III Secreted Effector DspE Is Required Early in *Solau m tuberosum* Leaf Infection by *Pectobacterium carotovorum* to Cause Cell Death and Requires Wx(3–6)D/E Motifs. **PLoS ONE** 8(6): e65534. 2013.

HOWARD, R. A. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) (Combretaceae: Combretaceae). **The Scientific World Journal**, 2012.

IQBAL, S. S.; MUJAHID, MD.; KASHIF, S. M.; KHALID, M., BADRUDDIN, ARIF, M. ; BAGGA, P.; AKHTAR, J.; RAHMAN, MD. A. Protection of hepatotoxicity using *Spondias pinnata* by prevention of ethanol-induced oxidative stress, DNA-damage and altered biochemical markers in Wistar rats. **Integrative Medicine Research**, v. 5, p.267–275, 2016.

JIA, Y.; MA, X.-M.; YUN, F.; FAN, L.; WANG, N.; LIU, Z.-H. Apparent oil/water partition coefficients of hyperoside and its in situ intestinal absorption kinetics in rats. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 43, p. 934-939, 2012.

- JOHNSTON, Graham. A. R. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. **Neurochemistry International** 89. P. 120e125. 2015.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. – **Tratado de Micologia médica**; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier. 1104p. illus. ISBN 85-7378-123-8. 2012.
- LEE, DONG, H. et al. Genetic Diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Isolated in Korea. **The Plant Pathology journal** . 30(2) : 117-124 2014.
- LI, S.; ZHANG, Z.; CAIN, A.; WANG, B.; LONG, M.; TAYLOR, J. Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolated from *Camptotheca acuminata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 32–37, 2005.
- LIAUDANSKAS, M.; VISKELIS, P.; RAUDONIS, R.; KVIKLYS, D.; USELIS, N.; JANULIS, V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. **The Scientific World Journal**, DOI: 10.1155/2014/306217, 2014.
- LIMA, EMANUELLE LOUYDE FERREIRA DE. Triagem fitoquímica e ação antibacteriana de *Spondias mombin* L. sobre bactérias bucais planctônicas. NATAL , 2016.
- LINS NETO, E.M.F.L., PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U.P. Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the semi-arid Region of Northeastern Brazil. **Economic Botany**, vol. 64, no. 1, pp. 11-21, 2010.
- LUZ, C. L. S. Anacardiaceae R. Br. na flora fanerogâmica do estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- KING-THOM CHUNG , TIT YEE WONG , CHENG-I WEI , YAO-WEN HUANG & YUAN LIN Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 38:6, 421-464. 1998.
- KOIRALA NIRANJAN, THUAN NGUYEN HUY, GHIMIRE GOPAL PRASAD, THANG DUONG VAN, SOHNG JAE KYUNG. Methylation of flavonoids: chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and Microbial Technology**. 2016.
- MAGDITCH, D. A., LIU, T. B., XUE, C. & IDNURM, A. DNA mutations mediate microevolution between host-adapted forms of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**. V8, e1002936. 2012.
- MANSOUR, S.; DJEBLI, N.; OZKAN, E.E.; MAT, A. In vivo antiinflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7(Suppl 1), p. 514-520, 2014.
- MARIANO, ROSA DE, L. R. BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS PECTINOLÍTICAS DOS GÊNEROS *Pectobacterium* E *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 2, p.121-153, 2005.

MARISCO, G.; PUNGARTNIK, C. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): traditional uses, chemical composition and biological activities. **Scientia Amazonia** v.4, p. 10-18, 2015.

MERTENS, J.; GERMER, J.; FILHO, J.A. S.; SAUERBORN, J. *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), a threatened tree of the Brazilian Caatinga. **Brazilian Journal Biologyc.** v. 77, p. 542-552, 2017.

MONTENEGRO, Camila de A. Bioprospecção dos efeitos tóxicos, antibacterianos e antioxidantes da flavona e de seus derivados hidroxilados. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2015.

MORAIS, S. M. et al. Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract. **South African Journal of Botany**. 2016.

MORENO, E. et al. Chemical Constituents of the New Endophytic Fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and Their Anti-Parasitic Activity. **Natural Product Communications**, v.6, p.835–840, 2011.

MCMURRY, J. 7º Ed. **Química Orgânica - Combo**. São Paulo: Cengage Learning, 1344. 2011.

MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. **PhytoKeys**, n. 55, p. 1-92, 2015.

MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T.H.; CORIOLANO, M.C.; PAIVA, P.M.; FIGUEIREDO, R.C; COELHO, L.C. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p. 666-76, 2015.

MUGFORD, A. OSBOURN. Saponin Synthesis and Function, Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: **New Concepts and Experimental Approaches**.

NAPOLEÃO, THIAGO H. **Atividade Inseticida E Mecanismos De Ação De Lectinas De *Myracrodruon Urundeuva* Contra *Nasutitermes corniger* *Aedes aegypti* E *Sitophilus zeamais***. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. 2012.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell 960 interactions and pathogenicity. **PLoS Pathogene**, e1000953. 2010.

OLIVERIA, Luís Flávio S. de. Antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* strains and genotoxicity assessment in human leukocyte cells of *Euphorbia tirucalli* L. **Brazilian Journal of Microbiology** 45, 4, 1349-1355 (2014).

PAPON, N., COURDAVAULT, V., CLASTRE, M., BENNETT, R. J. Emerging and emerged pathogenic candida species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PloS Pathogens**, v.9, doi: 10.1371/journal.ppat.1003550, 2013.

PETROVSKA, BB. Historical review of medicinal plants usage. **Phcog rev.** 6: 1-5. 2012.

PINTO, M. S. T. et al. Purification and characterization of a peroxidase present in xilopodium exsudates of umbu plants (*Spondias tuberosa* A.) **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 1838-1845, 2015.

PODOLAK I, GALANTY A, SOBOLEWSKA D Saponins as cytotoxic agents: a review. **Phytochem Rev** 6: 425–474. 2010.

PRABHU S., VISWANATHAN S. A Review on Biomedical Properties of The Antioxidant Luteolin. **Annals of Plant Sciences**, 3 (04), 674-685. 2014.

PROCÓPIO, et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419–429, 2017.

QUIROGA, A. V., BARRIO, D. A., AÑÓN, M. C. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. **LWT—Food Science and Technology**, v. 60, p. 478–485, 2015.

RAI, L.S., SINGHA, R., BRAHMA,P., SANYAL, K. Epigenetic determinants of phenotypic plasticity in candida albicans. **Fungal Biology Reviews**, v.32, p. 10-19, 2018.

RAINHA, N.; KOCI, K.; COELHO, A.V.; LIMA, E.; BAPTISTA, J.; FERNANDES-FERREIRA, M. HPLC-UV-ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidante properties of Hypericum undulatum shoot cultures and wild-growing plants. **Phytochemistry**, v. 86, p. 83-91, 2013.

RAVI, L., MANASVI, V., LAKSHMI B, P. Antibacterial and antioxidant activity of saponin from *Abutilon indicum* leaves. **Vol 9, Suppl. 3**, 2016.

RIBEIRO, R. V. BIESKI, I. G. C.;BALOGUN, S. O.; MARTINS, D.T.O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil.**Journal of Ethnopharmacology**, v.205, p.69-102, 2017.

RIBEIRO et al.Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus spp.*And *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research** 14:32. 2018.

RIZZON, Mariluza Z., CUNHA, Gladis F., VILLA-BOAS, Valquíria. Fermentação do Pão e do Vinho: Uma Proposta de Ação Interdisciplinar. **SCIENTIA CUM INDUSTRIA**.V. 5, N. 3, PP. 129 —136, 2017.

ROBLES, O.; ROMO, D. Chemo- and site-selective derivatizations of natural products enabling biological studies. **Natural Products Reports**, v.31, p.318–334, 2014.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental e Molecular Pathology**, v. 93, p. 428-433, 2012.

SANTOS, M. M. P. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos vegetais das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annuum*, e de análogos sintéticos da capsaicina, frente a os microrganismos da cavidade oral.** Tese

(Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes –RJ, 2010.

SANTOS, A. F. S., SILVA, M. D. C., NAPOLEÃO, T. H., PAIVA, P. M. G. CORREIA, M. T. S. COELHO, L. C. B. B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current Topics in Peptide & Protein Research**, v.15, p. 41-62, 2014.

SANTOS, K. A.; FILHO, O. P. A.; AGUIAR, C. M.; MILINSK, M. C.; SAMPAIO, S. C.; PALÚ, F.; SILVA, E. A. Chemical composition, antioxidant activity and thermal analysis of oil extracted from favela (*Cnidoscolus quercifolius*) seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p.368–373, 2017.

SARAH Z. TASKER AND PAUL J. HERGENROTHER. Taming reactive benzyne. **Nature Chemistry**, v. 9, 2017 .

SATPATHY, G.; TYAGI, Y. K.; RAJINDER, K. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. **Food Research International**, v. 44, p. 2076–2087, 2011.

SAVI, PATRICIA, R. S. Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região Sul do Brasil. **Demetra: alimentação, nutrição e saúde**. 12(1); 275-287. 2017.

SHANKAR, J. et al. Using Bayesian modelling to investigate factors governing antibiotic-induced *Candida albicans* colonization of the GI tract. **Scientific Reports**, v.5, 2015.

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, p. 53-62, 2004.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 70-77, 2010.

SILVA, R. V., COSTA, S. C.C., BRANCO, C. R. C., BRANCO, A. In vitro photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. Peel Crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation. **Industrial Crops and Products**. V. 83. PAG. 509–514. 2016a.

SILVA, THIALA S. J. Desenvolvimento e otimização do extrato padronizado de *Spondias mombin* (cajazeira): atividades anti-inflamatória e anti-herpes do extrato e da geraniina. **Dissertação (Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará)**, 2016b.

SPARG SG, LIGHT ME, VAN STADEN J Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal Ethnopharmacol** 94:219–243. 2004.

SPRINGER New York, Editors: **Thomas J. Bach**, Michel Rohmer. 2013.

SIQUEIRA, E. M., DA S. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC/DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. 2016.

SOBERÓN, J. R. et al. ANTIFUNGAL ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF EXTRACTS AND TRITERPENOID SAPONINS OBTAINED FROM THE AERIAL PARTS OF ANAGALLIS ARVENSIS L, **Journal of Ethnopharmacology**.

SOARES, F.M.S. Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.UMBU (fruto). **Conab**. Agosto, 2014.

SOARES , B. V.; NEVES, L. R.; FERREIRA, D. O.; OLIVEIRA, M. S. B.; CHAVES , F. C. M. ; CHAGAS, E. C.; GONÇALVES, R. A.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 49-56, 2017.

SÜNTAR, I. P. et al. Investigation on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 468-477, 2010.

TASKER, S. Z., HERGENROTHER, P. J. Natural products: Taming reactive benzyne. **Nature Chemistry**, v.9, p. 504-506, 2017.

TEXEIRA, D. et al. *Spondias purpurea* Exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. **Carbohydrate polymers**, v.70, p.369–377, 2007.

TRETIN, DANIELA, S. et al. MEDICINAL PLANTS FROM BRAZILIAN CAATINGA: ANTIBIOFILM AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**. v. 27, n. 3. 2014.

TSAL, C. C., EMAU, P., JIANG, Y., AGY, M.B., SHATTOCK, R.J., SCHMIDT, A., MORTON, W.R., GUSTAFSON, K.R., BOYD, M.R. Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infections in vaginal transmission models. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 20, p.11–18, 2004.

UDDIN, J.; ISLAM,MD.N. ; ALI,MD.H.; KHAN, S. A.; LABU, Z. K. Correlation of Thrombolytic and Membrane Stabilizing Activities with Total Flavonoid Content Aerial Parts of *Spondias pinnata*. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v.19, p. 48-52, 2016.

VECHIA, C.A.D. ; MORAIS, B. ; SCHONELL, A.P. ; DIEL, K.A.P. ; FAUST, C.; MENIN,C.; GOMES, D.B.; ROMAN, JUNIOR W.A. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). 288. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v. 18,p. 288- 296, 2016.

VIEIRA, P.D.B., et al. Caatinga plants: Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** (2016)

VIZZOTO, MARCIA; KROLOW, ANA CRISTINA; WEBER, GISELE EVA BRUCH. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância /Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).ISSN 1516-8840.

VUONG, Q.V., S. HIRUN, T.L.K. CHUEN, C.D. GOLDSMITH AND S. MURCHIE *et al.* Antioxidant and anticancer capacity of saponin-enriched *Carica papaya* leaf extracts. **International Journal Food Science Technology**. 50: 169-177. 2014.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phitochemistry. **Chromatographic Science Series**. v. 99, 2008.

WANG, L., ZHAI, B. & LIN, X. The link between morphotype transition and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogene**8, e1002765. 2012.

YILDIRIM, ISIL, KUTLU, TURKAN. Anticancer Agents: Saponin and Tannin. **International Journal of Biological Chemistry** 9 (6): 332-340, 2015

YORK, L. M.; CARMINATI, A.; MOONEY, S.J.; RITZ, K.; BENNETT, M. J. The holistic rhizosphere: Integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 3629-3643. 2016.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS** 962 **Pathog**6, e1000945. 2010.

ZERAIK, M. L. et al. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 396–405, 2016.

ZHANG, L.; CHENG, X.R.; HU, J.J.; SUN, L.; DU, G.H. Neuroprotective effects of hyperoside on sodium azide-induced apoptosis in PC12 cells. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, p. 0450–0455, 2011.

ZHANG, F.; ZHOU, H.; WILSON, B.C.; SHI, J.S.; HONG, J.S.; GAO, H.M. Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, p. 213–217, 2012.

ZHANG, Y.; LUO, Z.; WANG, D.; HE, F.; LI, D. Phytochemical profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the leaves of *Zanthoxy lumbungeoanum*. **The Scientific World Journal**, p. 1-13, 2014a.

ZHANG, Y.; LUO, Z.; WANG, D.; HE, F.; LI, D. Phytochemical profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the leaves of *Zanthoxy lumbungeoanum*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-13, 2014b.

ZHANG, N.; YING, M.D.; WU, Y.P.; ZHOU, Z.H.; YE, Z.M.; LI, H.; LIN, D.S. Hyperoside, a flavonoid compound, inhibits proliferation and stimulates osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells. **Plos One**, v. 9, e98973, 2014c.

ZHAO, J.; FU, Y.; LUO, M.; ZU, Y.; WANG, W.; ZHAO, C.; GU, C. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajaninstilbene acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.4314-9, 2012.

ZIELINSK.; A.A.F.; AVILA, S.; ITO, V.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.; & HAMINIUK, C. W. I. The association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, an In

Vitro Antioxidants Activity of frozen fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics. **Journal of Food Science**.79, 2014.

ZOTTI, SANDRA C., FLECK, BRUNA T., ELI, PABLO L., BERNARDI- WENZEL, JULIANA. In Vitro Biocontrol Of *Didymella Bryoniae* By Endophytic Fungi Isolated From *Piper Amalago* L. **LEAVES**. Vol.23,n.1,pp.05-10. 2015

ZOU, L.; CHEN, S.; LI, L.; WU, T.The protective effect of hyperoside on carbon tetrachloride-induced chronicliver fibrosis in mice via upregulation of Nrf2. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.69, p.451-460, 2017.

APÊNDICE - HEXANE EXTRACT FROM *Spondias tuberosa* (ANACARDIACEAE) LEAVES HAS ANTIOXIDANT ACTIVITY AND IS AN ANTI-*Candida* AGENT BY CAUSING MITOCHONDRIAL AND LYSOSOMAL DAMAGES

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages

Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro¹, Nataly Diniz de Lima Santos¹, Magda Rhayanny Assunção Ferreira², Larissa Cardoso Corrêa de Araújo¹, Alexandre Rodrigues Carvalho Junior³, Alan Diego da Conceição Santos⁴, Ana Paula de Oliveira⁴, Alexandre Gomes da Silva^{5,6}, Emerson Peter da Silva Falcão⁷, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida⁴, Luís Cláudio Nascimento da Silva³, Luiz Alberto Lira Soares², Thiago Henrique Napoleão¹, Márcia Vanusa da Silva^{1,6} and Patrícia Maria Guedes Paiva^{1*}

Abstract

Background: *Spondias tuberosa* is a plant that produces a fruit crop with high economic relevance at Brazilian Caatinga. Its roots and leaves are used in folk medicine.

Methods: Chemical composition of a hexane extract from *S. tuberosa* leaves was evaluated by thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and ¹H nuclear magnetic resonance (NMR). Antioxidant potential was investigated by DPPH and ABTS assays. Antifungal action on *Candida* species was evaluated determining the minimal inhibitory concentration (MIC₅₀) and putative mechanisms were determined by flow cytometry analysis. In addition, hemolytic activity on human erythrocytes was assessed and the concentration required to promote 50% hemolysis (EC₅₀) was determined.

Results: Phytochemical analysis by TLC showed the presence of flavonoids, hydrolysable tannins, saponins and terpenes. The HPLC profile of the extract suggested the presence of gallic acid (0.28 ± 0.01 g%) and hyperoside (1.27 ± 0.01 g%). The representative ¹H NMR spectrum showed saturated and unsaturated fatty acids among the main components. The extract showed weak and moderate antioxidant activity in DPPH (IC₅₀: 234.00 µg/mL) and ABTS (IC₅₀: 123.33 µg/mL) assays, respectively. It was able to inhibit the growth of *C. albicans* and *C. glabrata* with MIC₅₀ of 2.0 and 0.078 mg/mL, respectively. The treatment of *C. glabrata* cells with the extract increased levels of mitochondrial superoxide anion, caused hyperpolarization of mitochondrial membrane, and compromised the lysosomal membrane. Weak hemolytic activity (EC₅₀: 740.8 µg/mL) was detected.

Conclusion: The results demonstrate the pharmacological potential of the extract as antioxidant and antifungal agent, aggregating biotechnological value to this plant and stimulating its conservation.

Keywords: *Spondias tuberosa*, Hyperoside, Gallic acid, Fatty acids, Antifungal activity

* Correspondence: ppaivaufpe@yahoo.com.br

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Brazil has one of the world highest levels of plant diversity and the north and northeast regions of the country concentrate much of this diversity. In the semi-arid region of northeastern Brazil (known as Caatinga) there are several kinds of plants employed in popular culture for the treatment of human diseases. In spite of the great diversity of Caatinga, there are still few studies on the potential of bioactive compounds coming from the plants of this region [1–3].

Spondias tuberosa Arruda, popularly known as “umbuzeiro” or “imbuzeiro”, is an endemic plant of Caatinga, adapted to survive and produce fruits even under hydric and salt stress [4]. Several medicinal properties of *S. tuberosa* have been described, including treatment of digestive disorders, diabetes, menstrual cramps, diarrhea, inflammation of the kidneys, bacterial infections, and foot pain [5–7]. Tannins and flavonoids are found in the bark [8] and the fruits contain anthocyanins, ascorbic acid, minerals, flavonoids and carotenoids [9]. The high tannin content and the presence of natural antioxidants give to *S. tuberosa* fruits a functional appeal [10]. Hydro-ethanolic extract of leaves from *S. tuberosa* containing chlorogenic acid, caffeic acid, rutin and isoquercitrin demonstrated anti-inflammatory action [11]. Methanolic extract of the leaves showed in vitro activity against several strains of Gram-negative bacteria [2].

The chemical characterization of plant extracts allows the identification of chemical markers and suggests potential bioactivities that can be investigated. For example, flavonoids are secondary metabolites that have great pharmacological importance, since they act in the prevention of degenerative diseases. Among the biological properties described for these compounds, it can be highlighted cytotoxic, thrombolytic, anti-inflammatory, antitumor, vasorelaxant and antioxidant activities [11–13]. Other phenolic compounds such as tannins and anthocyanins are also considered important antioxidant agents. Natural antioxidants play an important role in health care as they provide protection from oxidative stress and associated diseases [14].

Natural products have also been considered an important source of bioactive compounds against infectious diseases [11]. Fungal infections have increased gradually over the last 30 years, becoming one of the more relevant public health problems. *Candida* yeasts are among the main etiological agents of invasive fungal infections, which are responsible for high mortality and morbidity rates throughout the world [15–17]. These fungi have developed resistance mechanisms against antibiotics, favoring the persistence and progression of the infection even when antifungal therapy is adequately performed [18]. *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* are among the most prevalent causes of candidiasis [19, 20].

In this context, this work reports the chemical composition of a hexane extract from leaves of *S. tuberosa* as well as the evaluation of the antioxidant potential and antifungal action on *Candida* species. Mechanisms involved in the antifungal activity against the most sensitive species were investigated. In addition, hemolytic activity was assessed as safety parameter to determine whether the extract would be able to damage erythrocytes membrane.

Methods

Materials

Leaves of *S. tuberosa* were collected at the *Parque Nacional do Catimbau* (Coordinates 08°37'23" S, 37°09'21" W), Buíque, Pernambuco. The plant material was identified by Dr. Alexandre Gomes da Silva, and a voucher specimen was deposited at the *Instituto Agrônomo de Pernambuco*, Recife, Brazil, under the reference number 91,090. Plant collection was authorized (number 16806) by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from Brazilian Ministry of Environment. The access was recorded (A1503A6) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen).

Stored cultures of *Candida albicans* (URM 5901, from ungual scales), *Candida parapsilosis* (URM 6951, clinical isolate), *Candida glabrata* (URM 4246, from blood of AIDS patient), and *Candida krusei* (URM 6391, from human blood) were obtained from the Culture Collection of the University Recife Mycologia (URM), *Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE).

Extract preparation

The leaves were dried in a forced air convection oven at 45 °C until constant weight. After drying, they were powdered using Willye-type mill (model TE650; Tecnal, Brazil) and the powder was stored protected from light and moisture at 28 °C until use. The extract was prepared in a Soxhlet apparatus using 100 g of the powdered leaves and 1 L of *n*-hexane. The solvent was evaporated at 75 rpm and 64.4 °C in a HB10 rotary-evaporator (IKA Works, Wilmington, NC, USA). The resulting material after solvent evaporation corresponded to the extract.

Thin-layer chromatography

An amount of 1 mg of the extract was dissolved in 1 mL of methanol. The sample was taken to the ultrasound for 30 min for complete solubilization. All standards (Table 1) were used at the concentration of 1 mg/mL in methanol. The sample and standards were applied manually on silica gel 60-F254 chromatography plates (Macherey-Nagel, Germany) and the different mobile phases and chromogenic agents used are shown in Table 1 [21–23]. The

Table 1 Elution systems, chromogenic agents, and standards used in the phytochemical analysis of the hexane extract from *Spondias tuberosa* leaves with thin-layer chromatography (TLC)

Classes	Mobile phase	Chromogenic agent	Standards
Polyphenols (Hydrolysable tannins)	90:5:5	NEU + PEG	Gallic acid and Ellagic acid (Sigma-Aldrich, USA)
Condensed tannins	90:5:5	Chloridric vanillin	Catechin (Sigma-Aldrich, USA)
Flavonoids	90:5:5	NEU + PEG	Quercetin and Rutin (Sigma-Aldrich, USA)
Cinnamic derivatives	90:5:5	NEU + PEG	Caffeic acid and Chlorogenic acid (Sigma-Aldrich, USA)
Terpenes and steroids	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β-sitosterol (Sigma-Aldrich, USA)
Coumarins	50:50:50	KOH + Δ	Coumarin (Phytolab, Brazil)
Saponins	100:11:11:26	Lieberman-Burchard + Δ	Escin (Sigma-Aldrich, USA)
Reducing sugars	50:20:10:10	Thymol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-fructose (ChromaDex, USA)
Alkaloids	50:6.75:5	Dragendorf	Pilocarpine nitrate (Sigma-Aldrich, USA)
Antraquinones	50:6.75:5	HNO ₃ + KOH 10%	Sennoside A (Sigma-Aldrich, USA)

Systems: 90:5:5 – ethyl acetate: formic acid: water; 70:30 – toluene: acetate; 50:50:50 – ethyl ether: ethyl acetate: 10% acetic acid (saturation); 100:11:11:26 – ethyl acetate: acetic acid: formic acid: water; 50:20:10:10 – ethyl acetate: acetic acid: formic acid: water; 50:6.75:5 – ethyl acetate: methanol: water. NEU Neu's reagent. PEG polyethylene glycol

following secondary metabolites classes were investigated: steroids, flavonoids (aglycones and heterosides), cinnamic derivatives, mono-, tri- and sesquiterpenes, alkaloids and coumarins.

High-performance liquid chromatography coupled to diode array detector (HPLC-DAD) analysis

The extract was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in an Ultimate 3000 coupled to a diode array detector (DAD) and equipped with a binary pump (HPG-3x00RS), degasser and automatic sampler with a loop of 20 µL (ACC-3000). All these equipments were from Thermo Fisher Scientific (USA). An amount of 0.25 g of the hexane extract was weighed, transferred to a 25-mL volumetric flask and diluted with methanol. The solution was taken to the sonicator during 15 min to complete solubilization (stock solution). After solubilization, an aliquot (1 mL) of the stock solution was transferred to a 10-mL volumetric flask and the volume was completed with ultrapure water (Purelab⁺, Elga LabWater, USA). Hyperoside (HWI Analytic GmbH, Germany) and gallic acid (Sigma-Aldrich, USA) solutions (1 mg/mL in methanol) were used as standards. The sample solution and standard solutions were filtered (0.45 µm PVDF membrane). The chromatography was performed in a Dionex[®] C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm d.i., 5 µm) equipped with a Phenomenex[®] C₁₈ pre-column (4 mm × 3.9 µm) at 26 °C. The wavelengths were set at 270 and 350 nm for detection of hydrolysable tannins and flavonoids, respectively. The mobile phase was composed by ultrapure water (A) and methanol (B), both acidified with 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid, and the flow rate was adjusted to 0.8 mL/min. The following gradient program was used: 0–10 min, 5–20% B; 10–13.5 min, 20–25% B; 13.5–18 min, 25–40% B; 18–25 min, 40–80% B; 25–30 min, 80% B; 30–34 min, 80–5% B; 34–36 min, 5% B. The data were analyzed and processed

using the software Chromeleon 6.8 (Dionex, Thermo Fisher Scientific, USA). The peaks of substances in the hexane extract were identified by comparing the retention times, UV spectra and subsequently, by spiking the sample with a small amount of the standards. The contents of hyperoside and gallic acid in the extract were calculated based on calibration curve obtained by chromatography of each standard at different concentrations: hyperoside – $y = 3.8841x - 11.663$ ($R^2 = 0.9987$); gallic acid – $y = 1.2097x - 0.9732$ ($R^2 = 0.9996$). The results were expressed as mean ± standard deviation.

Nuclear magnetic resonance (NMR) experiments

One-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were acquired in deuterated dimethylsulfoxide (DMSO- d_6), using NMR Bruker AVANCE III 400 spectrometer, operating at 9.4 Tesla, observing ¹H and ¹³C nuclei at 400 and 100 MHz, respectively. The spectrometer was equipped with 5-mm multinuclear direct detection probe (BBO). Due to the low sample concentration and the presence of water in the deuterated solvent, ¹H NMR spectra were acquired through *zg* (classical pulse sequence) and *zgpg* (for water signal suppression). Besides, one-bond heteronuclear (¹H-¹³C) and homonuclear (¹H-¹H) correlations were assessed by HSQC and COSY experiments. ¹H and ¹³C NMR chemical shifts are given in ppm referenced to TMS- d_4 signal at 0.00 ppm.

Antioxidant activity

Free radical scavenging activity by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay

Antioxidant activity of the hexane extract was evaluated by the DPPH scavenging assay according to Mascato et al. [24], with some modifications. The hexane extract was diluted in methanol to reach concentrations ranging from 15.625 to 1000 µg/mL. In each assay, 270 µL of the DPPH

solution (23.6 µg/mL in methanol, prepared on the day of the analysis) was added to the sample (30 µL). Methanol (30 µL) was used in the negative control. After 30 min in the dark, the reduction of DPPH was determined by measuring the colorimetric change at 517 nm. Ascorbic acid (0.5, 1, 2, 3 and 4 µg/mL, in ethanol) was used as standard. The antioxidant concentration required to decrease 50% of the DPPH present (IC_{50}) was determined by exponential regression analysis. Two independent experiments were performed in triplicate. Samples were classified according to the IC_{50} as follows: $IC_{50} < 50$ µg/mL, very strong antioxidant; $50 < IC_{50} < 100$ µg/mL, strong antioxidant; $101 < IC_{50} < 150$ µg/mL, moderate antioxidant; $IC_{50} > 150$ µg/mL, weak antioxidant [25].

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] assay

The radical $ABTS^+$ was generated by oxidation of an ABTS solution (7 mM) with 2.45 mM potassium persulfate solution. The mixture was allowed to react for 12 h in the dark at 25 °C before use. For the test, the $ABTS^+$ stock solution (1 mL) was diluted in 60 mL of methanol to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. Next, 2.7 mL of this solution was added to 0.3 mL of 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 µg/mL Trolox® (standard) solutions prepared in methanol or 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 µg/mL of extract. The absorbance was taken 6 min after the adding of the radical at 734 nm. The test was performed in triplicate. The extract concentration required to decrease 50% of the $ABTS^+$ content (IC_{50}) was determined by linear regression. Samples were classified according to the IC_{50} as described in the previous section.

Antifungal assay

The yeasts were cultured in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) at 28 °C for 16 h under gentle shaking. Next, the optical density at 600 nm (OD_{600}) of the cultures was adjusted in order to correspond to 3×10^6 CFU/mL. In each row of a 96-well microplate, 100 µL of the hexane extract (8.0 mg/mL) were serially diluted (1:1) in SDB and 20 µL of yeast culture were added to each well. Wells containing only the culture medium were used as sterility control while the 100% growth control contained the microorganism in culture medium. In addition, it was performed a blank composed by the extract diluted in culture medium. The OD_{600} was recorded at time zero and after incubation at 28 °C for 24 h. The increase in OD_{600} was considered as fungal growth. The minimal inhibitory concentration (MIC_{50}) corresponded to the lowest extract concentration able to promote a reduction higher or equal to 50% in growth. Each assay was achieved in triplicate and three independent experiments were performed.

The supernatant (10 µL) from each well containing the extract at concentration higher or equal to the MIC_{50}

was transferred to Sabouraud-Dextrose Agar plates and incubated for 24 h. The minimal fungicidal concentration (MFC) corresponded to the lowest extract concentration able to reduce the number of CFU in 99.9%. Each assay was carried out in triplicate in three independent experiments.

Flow cytometry analysis

Fluorescent probes were used in order to analyze putative effects of the extract on mitochondrial superoxide production, the mitochondrial membrane potential, and lysosomal membrane of *C. glabrata* cells. In all these assays, yeast cells were resuspended at a density of 1×10^6 cells/mL in RPMI-1640 medium supplemented with MOPS. The extract was added at the concentrations of $2 \times MIC$ (0.156 mg/mL) or $4 \times MIC$ (0.312 mg/mL), and the cells were incubated at 28 °C.

For measurement of mitochondrial superoxide production, the extract was added and, after 1 h, the medium was removed, and the cells were washed using PBS. Then the MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 5 µM was added and the samples were incubated for 10 min at 37 °C, protected from light. The cells were washed with warm buffer (three times) and analyzed by flow cytometry (FL3 channel, Accuri™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

In other assays, cells were incubated with extract for 12 h and then washed with PBS and stained with 1 µg/mL acridine orange (lysosomal dye) in the dark for 20 min or 10 µg/mL rhodamine 123 (to assay mitochondrial membrane potential change) in the dark for 10 min. After the incubation, yeast cells were washed and analyzed by flow cytometry (FL3 channel and FL1 channel for acridine orange and rhodamine 123, respectively). A minimum of 10,000 events were analyzed in each condition. Changes in the fluorescent intensity of rhodamine 123 were quantified using the variation index (VI) obtained by the eq. $(MT-MC)/MC$, where MC is the mean of fluorescent intensity of control and MT the mean of treated cells. Negative values of VI correspond to membrane depolarization of mitochondria, while positive values indicate membrane hyperpolarization.

Hemolytic assay

The hexane extract was evaluated for hemolytic activity in 96-well microplates according to Costa-Lotufo et al. [26]. Each well received 100 µL of a 0.85% (w/v) NaCl solution containing 10 mM $CaCl_2$. Next, samples (100 µL) of the extract at 10 to 2500 µg/mL were added to the wells. Finally, each well received 100 µL of a 2% (v/v) suspension of human erythrocytes in 0.85% saline containing 10 mM $CaCl_2$. In negative control, 150 µL of the saline solution plus 50 µL of 5% (v/v) DMSO were plated. Positive

control (to obtain 100% hemolysis) contained 20 μ L of 0.1% (v/v) Triton X-100 in 180 μ L of saline solution. After incubation for 1 h at 27 °C and centrifugation, the supernatant was discarded, and the amount of released hemoglobin was measured by absorbance at 540 nm. Three independent experiments were performed in triplicate. Extract was considered active whether the EC_{50} value was lower than 200 μ g/mL [26].

Statistical analysis

Standard deviations (SD) were calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and data were expressed as a mean of replicates $\pm$ SD. Significant differences between treatment groups were analysed by Student's *t*-test (significance at $p < 0.05$) using Origin 6.0 program.

Results

The phytochemical analysis by TLC of the hexane extract from *S. tuberosa* leaves showed the presence of flavonoids, hydrolysable tannins, saponins and terpenes. The HPLC profile of the extract at 270 nm (Fig. 1A, a) showed three main peaks (retention times 10.197, 25.403 and 26.223 min). The first peak probably corresponded to gallic acid (peak 1), in comparison with retention time of the standard (10.23 min; Fig. 1A, b). The chromatogram at 350 nm (Fig. 1B, a) showed main a peak at 25.433 min, which corresponds to a flavonoid (peak 2) since it was also observed at 270 nm. According to the retention time of the standard hyperoside (Fig. 1B, b), this peak is similar to this compound. These results were confirmed by the increase in the area after spiking the extract with the standards gallic acid (Fig. 1A, c) and hyperoside (Fig. 1B, c). The equivalent contents of

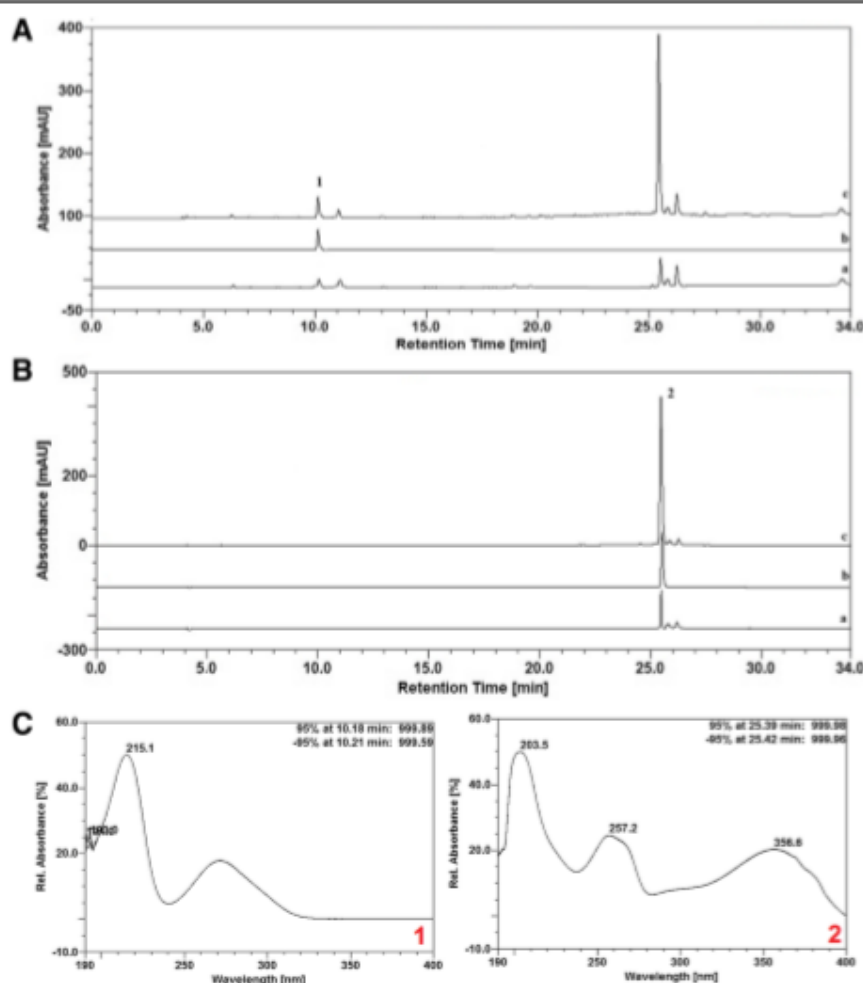


Fig. 1 HPLC-DAD analysis of hexane extract from *Spondias tuberosa* leaf. Chromatographic fingerprint at 270 (a) and 350 (b) nm showed the presence of gallic acid (1) and hyperoside (2), as indicated by the retention times. c Scanning spectra of peaks 1 and 2

hyperoside and gallic acid calculated were 1.27 ± 0.01 g% and 0.28 ± 0.01 g%, respectively.

The representative ^1H NMR spectrum of hexane extract of *S. tuberosa* leaves revealed typical signals of fatty acid methyl esters (Fig. 2), which is expected for an extract obtained using a non-polar solvent. The resonances related to aliphatic hydrogens of all fatty acids can also be visualized in the figure. Methylene groups appeared at 1.16–1.35 ppm, while the signal at 1.49 ppm corresponds to β carbonyl group hydrogens. Characteristic resonances of methylene α -olefins of all unsaturated fatty acids were observed at 1.98 ppm. The presence of methylene hydrogens between two olefins and α carbonyl hydrogens could be noticed at 2.77 and 2.34 ppm, respectively. The signal at 0.84 ppm corresponds to methyl groups of all fatty acids, except for the methylic hydrogens of *n*-3 polyunsaturated acyl groups that are easily identified as a triplet at 1.06 ppm [27, 28]. It should be pointed out that the fatty acid acyl chains are not esterified to glycerol backbone, as typical signals of it were not observed. Another way of corroborating such information would be by checking the signal around 3.67 ppm, which is associated with the methoxy group of fatty acid methyl esters. However, in our experiment the residual water signal compromised the obtainment of such information. Finally, the signal at 5.33 ppm (olefinic hydrogens) connected to the carbon at 129.5 ppm indicated the presence of unsaturated fatty acids. The presence of hydrogens of phenolic compounds could be observed by signals between 6 and 8 ppm.

The hexane extract was evaluated for antioxidant activity by the DPPH scavenging assay. The results showed that the increase in the extract concentration led to

higher inhibition of this free radical. An IC_{50} value of 234 $\mu\text{g/mL}$ was calculated. The results from ABTS assay showed that the IC_{50} values were 123.33 and 1.72 $\mu\text{g/mL}$ for the hexane extract and the positive control Trolox[®], respectively.

The antifungal assays showed that the hexane extract was able to inhibit the growth of *C. albicans* and *C. glabrata* with MIC_{50} values of 2.0 and 0.078 mg/mL, respectively. *Candida parapsilosis* and *C. krusei* did not have their growth affected by the extract. Fungicidal effect was not detected.

The effect of the extract on superoxide production by *C. glabrata* cells was evaluated. The results (Fig. 3A) showed that low levels of fluorescence were detected in untreated cells while high levels of mitochondrial superoxide anion were induced by treatment with the extract for 1 h (5.8 and 5.2 folds for $2 \times \text{MIC}_{50}$ and $4 \times \text{MIC}_{50}$, respectively, when compared with untreated yeasts). No statistical differences were observed between the amount of superoxide induced by the two concentrations tested.

Alterations in mitochondrial functions induced by the extract were evaluated by measuring changes the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) using the variation index (VI). Healthy cells incorporated the probe rhodamine 123 and showed high levels of fluorescence emission. The fluorescence intensity was significantly increased by extract treatment when compared with untreated cells (Fig. 3B), resulting in positive VI values (7.65 folds for $2 \times \text{MIC}_{50}$ and 5.15 folds for $4 \times \text{MIC}_{50}$).

The lysosomal function was analyzed using an acridine orange-based assay. As expected, the yeast cells that were not treated with the extract exhibited a strong fluorescence

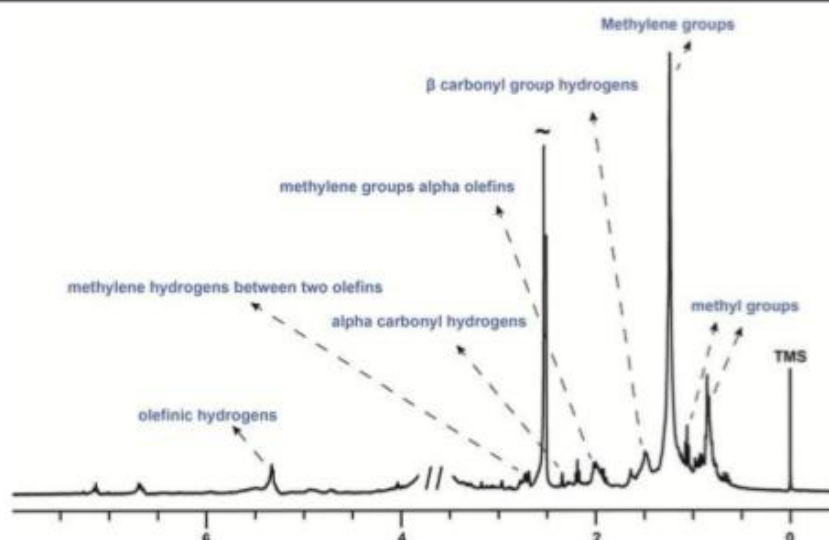
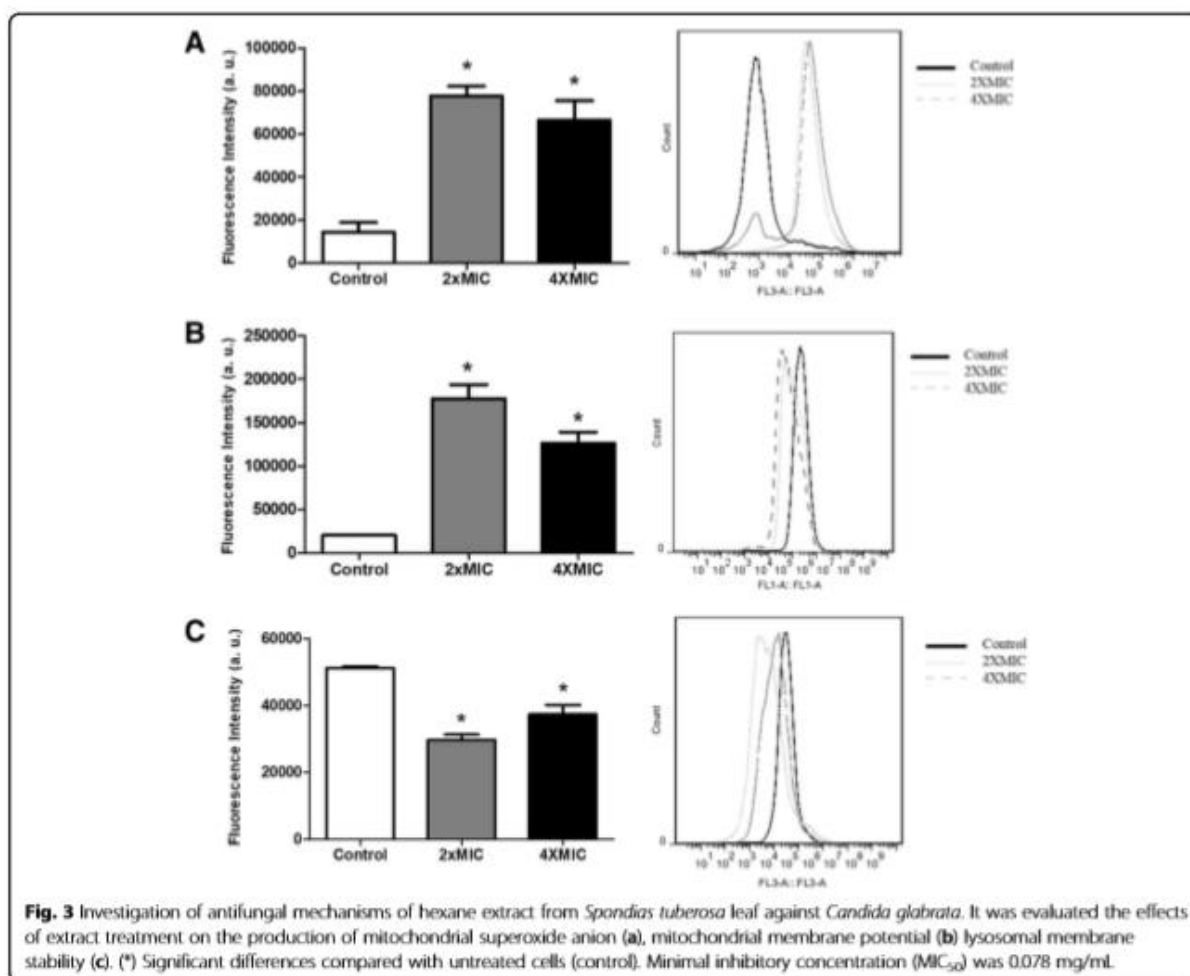


Fig. 2 Representative ^1H NMR spectrum of hexane extract of *Spondias tuberosa* leaf



emission, confirming that these cells had intact lysosomes. On the other hand, the extract treatment compromised the lysosomal membrane of *C. glabrata*, as seen by the lower levels of fluorescence emission than control cells (Fig. 3C). The fluorescence emission reduced 41.98% and 26.91% when the cells were incubated with the extract at 2× MIC₅₀ and 4× MIC₅₀, respectively.

The hexane extract was also evaluated for hemolytic activity against human erythrocytes. The EC₅₀ value determined was 740.8 ± 61.09 µg/mL.

Discussion

Many works have studied the chemical composition and biological activities of extracts from *S. tuberosa* tissues, including the leaves, obtained using polar organic solvents. For example, methanolic extract from *S. tuberosa* leaves contained phenols, tannins, flavones, flavonoids, leucoanthocyanidins and saponins [2] and Uchôa et al. [29] reported that extracts from the leaves of *S. tuberosa* in methanol and ethyl acetate were rich in flavonoids and

triterpenes as well as also contained cinnamic derivatives. Analysis of a hydroethanolic extract from leaves of this plant also evidenced the presence of flavonoids [11]. In the present work, we aimed to evaluate the composition of an extract from *S. tuberosa* leaves obtained with hexane, a non-polar solvent. Interestingly, the classes of compounds detected by TLC were also present in the extracts mentioned above, produced using solvents with higher polarity. Particularly, the presence of flavonoids and hydrolysable tannins in the hexane extract caught our attention and stimulated a more in-depth evaluation by HPLC analysis. Indeed, the presence of compounds similar to gallic acid and hyperoside was confirmed.

Siqueira et al. [11] showed through HPLC-DAD analysis that a hydroethanolic extract of *S. tuberosa* leaves presented a large number of phenolic compounds and derivatives of flavonoids; they identified the presence of chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, and isoquercitrin. Silva et al. [2] identified the presence of rutin, quercetin and ellagic acid in the methanolic extract of *S. tuberosa*

leaves. These compounds were not detected in the hexane extract of *S. tuberosa* leaves described herein, which is probably due to the chemical characteristic of the hexane, which did not favor the extraction of high content of polar compounds. In spite of this, a specific flavonoid (probably hyperoside or a very similar compound) was efficiently extracted from the leaves using this solvent. The hyperoside is the 3-*O*-galactoside of quercetin and has been described in the literature as anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant agent. In addition, this compound was shown to act in the protection of liver fibrosis and prevention of memory deficit [30–32].

According to the classification of Fidrianny et al. [25], the hexane extract of *S. tuberosa* leaves is considered a weak DPPH scavenger. However, the hexane extract from *S. tuberosa* leaves showed higher DPPH scavenging activity than extracts of *Spondias pinnata*, which showed IC_{50} ranging from 0.73 to 0.59 mg/mL [33]. The hyperoside possesses DPPH scavenging activity with an IC_{50} of 27.5 mM [34] and polyunsaturated fatty acids may act as antioxidants [35]. Thus, flavonoids and fatty acids may be involved in the antioxidant property of the hexane extract of *S. tuberosa* leaves.

According to the results from ABTS assay, the extract is a moderate antioxidant. Floegel et al. [36] reported that high-pigmented and hydrophilic antioxidants in a variety of foods were better reflected by the ABTS assay in comparison with the DPPH assay. Indeed, the hexane extract of *S. tuberosa* leaves used in this work is highly pigmented and one of its main compounds is similar to hyperoside, a water-soluble compound. This may explain the better result obtained with ABTS in comparison with DPPH assay. The antioxidant properties of hyperoside have been demonstrated; for example, it protected endothelial cells against oxidative damage by hydrogen peroxide [37].

The hexane extract showed an interesting activity against *C. glabrata*, as seen by its low MIC_{50} value. Dal'Agnol et al. [38] reported that crude extracts of *Hypericum* containing the hyperoside showed no activity against yeasts. On the other hand, polyunsaturated fatty acids have demonstrated antifungal properties against *Candida* species [39].

Given the highest activity of the hexane extract against *C. glabrata* (as seen by its low MIC_{50} value), we attempted to analyze some subcellular alterations induced by this extract. The results demonstrate that the extract induced the production of mitochondrial superoxide anion and hyperpolarization of mitochondrial membrane. In addition, the extract damaged the lysosomal membrane of *C. glabrata* cells. Lysosomal membrane damage leads to release of cathepsins from into the cytosol where they participate in apoptosis signaling [40].

According to Costa-Lotufo et al. [26], a sample must present $EC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ to be considered hemolytic.

Thus, the hexane extract from *S. tuberosa* leaves is considered no hemolytic, which is initial evidence to determine its safety.

Conclusion

A hexane extract from *S. tuberosa* leaves containing flavonoids, hydrolysable tannins, saponins, terpenes and unsaturated fatty acids showed moderate antioxidant activity and antifungal effect on *C. glabrata*. Antifungal mechanisms against *C. glabrata* include increase in levels of mitochondrial superoxide anion, hyperpolarization of mitochondrial membrane, and damage to the lysosomal membrane. The extract showed weak hemolytic activity, which is important information for future studies to be performed at in vivo conditions. The results demonstrate the pharmacological potential of the extract, aggregating biotechnological value to this plant and stimulating its conservation.

Abbreviations

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid; CFU: Colony-forming units; DMSO: Dimethylsulfoxide; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EC_{50} : Effective concentration required to promote 50% hemolysis; HPLC-DAD: High-performance liquid chromatography coupled to diode array detector analysis; IC_{50} : concentration required to decrease 50% of the free radical content; ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; MFC: Minimal fungicidal concentration; MIC_{50} : Minimal concentration required to inhibit growth in at least 50%; NEU: Neu's reagent; NMR: Nuclear magnetic resonance; OD: Optical density; PBS: Phosphate-buffered saline; PEG: Polyethylene glycol; SDB: Sabouraud Dextrose Broth; SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado; TLC: Thin-layer chromatography; UFPE: Universidade Federal de Pernambuco; URM: University Recife Mycologia (culture collection); Vi: Variation index

Acknowledgments

The authors are also grateful to Dr. Carlos Eduardo Sales da Silva for technical assistance.

Funding

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support (446902/2014–4) and investigator research grants (MTSC, JRGSa, THIN, PMGP). They are also grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0493-4.03/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. BMPCC would like to thank CAPES for graduate scholarship. The funding body had no role in the design of the study, collection, analysis, interpretation of data, and writing the manuscript.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

BMPCC, AGS, MTSC, MVS, and PMGP conceptualized the study. BMPCC and NDLS prepared the extract. BMPCC and LCCA performed the antioxidant, antifungal and hemolytic assays. MRAS, EPSF and LALS performed the TLC and HPLC experiments and contributed to interpretation of the data. ADCS, APO and JRGSa performed the NMR experiments and interpreted the data. ARCI and LCNS performed all the flow cytometry analysis. BMPCC, NDLS, THIN and PMGP analyzed all the data. BMPCC, NDLS, MRAS, JRGSa, LCNS, THIN and PMGP drafted the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The Ethics Committee on Humans Experimentation of the Universidade Federal de Pernambuco approved the protocols (68393217.0.0000.5208) used to collect blood for hemolytic analysis. All participants signed an informed consent.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil. ²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50740-520, Brazil. ³Universidade CEUMA, São Luís, Maranhão 65075-120, Brazil. ⁴Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco 56304-205, Brazil. ⁵Departamento de Antibióticos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil. ⁶Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Paraíba 58429-970, Brazil. ⁷Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco 55608-680, Brazil.

Received: 13 July 2018 Accepted: 9 October 2018

Published online: 19 October 2018

References

- Albuquerque UP, Monteiro JM, Almeida CFCBR, Florentino ATN, Ferraz JSF. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil – a look at their conservation and sustainable use. *Environ Monit Assess*. 2007;125:281–90.
- Silva ARA, Morais SM, Marques MMM, Oliveira DF, Barros CC, Almeida RR, Vieira IGP, Guedes MF. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from northeastern Brazil. *Pharm Biol*. 2012;50:740–6.
- Vieira PDB, Silva NLF, Silva GN, Silva DB, Lopes NP, Gnoatto SCB, Silva MV, Macedo AJ, Bastida J, Tasca T. Caatinga plants: natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26:2229–36.
- Silva EC, Nogueira RIMCN, Araújo FP, Melo NF, Neto ADA. Physiological responses to salt stress in young umbu plants. *Environ Exp Bot*. 2008;63:147–57.
- Agra MF, Baracho GS, Silva NK, Basilio ULD, Coelho VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007;111:383–95.
- Neto EMFL, Peroni N, Albuquerque U. Traditional knowledge and management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): an endemic species from the semi-arid region of northeastern Brazil. *Econ Bot*. 2010; 64:11–21.
- Ferreira Júnior WS, Ladio AH, Albuquerque AUP. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian northeast. *J Ethnopharmacol*. 2011;138:238–52.
- Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque AUP. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J Ethnopharmacol*. 2008;120:72–80.
- Rufino MDSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem*. 2010;121(4):996–1002.
- Zeraik ML, Queiroz EF, Marcourt L, Cidet O, Castro-Gamboa IC, Silva DHS, Cuendet M, Bolzani VS, Wollender J-L. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. *J Funct Foods*. 2016;21:396–405.
- Siqueira EMS, Félix-Silva J, Araújo LML, Fernandes JM, Cabral B, Gomes JAS, Roque AA, Tomaz JC, Lopes NP, Fernandes-Pedrosa MF, Giordania RB, Zucolotto SM. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. *Biomed Chromatogr*. 2016;30:1656–65.
- Islam SMA, Ahmed KT, Manik MK, Wahid MA, Kamal CSI. A comparative study of the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic potential of the fruits and leaves of *Spondias dulcis*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3:682–91.
- Cabral B, Siqueira EMS, Bitencourt MAQ, Lima MCJS, Lima AK, Ortmann CF, Chaves VC, Fernandes-Pedrosa MF, Rocha HAO, Scoretti KC, Reginatto FH, Giordani RB, Zucolotto SM. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. *Rev Bras Farmacogn*. 2016; 26:304–11.
- López V, Akerreta S, Casanova E, García-Mina JM, Cervero RY, Calvo ML. In vitro antioxidant and anti-*Rhizopus* activities of Lamiaceae herbal extracts. *Plant Foods Hum Nutr*. 2007;62:151–5.
- Khan MSA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarat J. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. In: Ahmad I, Owais M, Shahid M, Aqil F, editors. *Combating fungal infections, problems and remedy*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.
- Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect*. 2013;20:42–8.
- Bitar I, Khalaf RA, Harastani H, Tokajian S. Identification, typing, antifungal resistance profile, and biofilm formation of *Candida albicans* isolates from Lebanese hospital patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:931372.
- Kolaczowska A, Kolaczowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans* *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71:1438–50.
- Yiqing T, Jianguo T. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. *Microbiol Res*. 2017;198:27–35.
- Sharifzadeh A, Khosravi AR, Shokri H, Tari PS. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. *Microb Pathog*. 2017;107:390–6.
- Roberts EH, Cartwright RA, Wood DJ. The flavonols of tea. *J Sci Food Agric*. 1956;7:637–46.
- Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis*. New York: Springer; 1995.
- Harborne JB. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman & Hall; 1998.
- Mascato DRLH, Monteiro JB, Passarinho MM, Galeno DML, Cruz RJ, Ortiz C, Morales L, Lima ES, Carvalho RP. Evaluation of antioxidant capacity of *Solanum sessiliflorum* (Cubiu) extract: an in vitro assay. *J Nutr Metab*. 2015; 2015:364185.
- Fidrianny I, Rukya A, Ruslan K. Antioxidant activities of various fruit extracts from three *Solanum* sp. using DPPH and ABTS method and correlation with phenolic, flavonoid and carotenoid content. *J Chem. Pharm. Res*. 2015;7:666–72.
- Costa-Lotufo LV, Khan MTH, Ather A, Wilke DV, Jimenez PC, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *J Ethnopharmacol*. 2005;99:21–30.
- Mello VM, Oliveira FCC, Fraga WG, Nascimento CJ, Suarez PAZ. Determination of the content of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel samples obtained by esterification using ¹H-NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem*. 2008;46:1051–4.
- Nestor G, Bankelors J, Schlechtriem C, Brännäs E, Pickova J, Sandström C. High-resolution ¹H magic angle spinning NMR spectroscopy of intact arctic char (*Salvelinus alpinus*) muscle. Quantitative analysis on n-3 fatty acids, EPA and DHA. *J Agric Food Chem*. 2010;58:10799–803.
- Uchôa ADA, Oliveira WF, Pereira APC, Silva AG, Cordeiro BMPC, Malafaia CB, Almeida CMA, Silva NH, Albuquerque JFC, Silva MV, Correia MTS. Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Amuda leaves extracts. *Am J Plant Sci*. 2015;6:3038–44.
- Raudoné L, Raudonis R, Janulis V, Viskelis P. Quality evaluation of different preparations of dry extracts of birch (*Betula pendula* Roth) leaves. *Nat Prod Res*. 2014;28:1645–8.
- Gong Y, Yang Y, Chen X, Yang M, Huang D, Yang R, Zhou L, Li C, Xiong Q, Xiong Z. Hyperoside protects against chronic mild stress-induced learning and memory deficits. *Biomed Pharmacother*. 2017;91:831–40.
- Zou L, Chen S, Li L, Wu T. The protective effect of hyperoside on carbon tetrachloride-induced chronic liver fibrosis in mice via upregulation of Nrf2. *Exp Toxicol Pathol*. 2017;69:451–60.
- Satpathy G, Tyagi YK, Gupta RK. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. *Food Res Int*. 2011;44:2076–87.
- Sukito A, Tachibana S. Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents. *Pak J Biol Sci*. 2014;17:999–1006.
- Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visoli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol Res*. 2008;57:451–5.
- Floegel A, Kim D-Q, Chung S-I, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal*. 2011;24:1043–8.

37. Li ZL, Liu JC, Hu J, Li XQ, Wang SW, Yi DH, Zhao MG. Protective effects of hyperoside against human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *J Ethnopharmacol.* 2012;139:388–94.
38. Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nor C, Sarmiento L, Lamb L, Hass M, Von Poser G, Schapoval EES. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine.* 2003;10:511–6.
39. Thibane VS, Ellis R, Hugo A, Albertyn J, van Rensburg WJ, van Wyk PW, Kock JL, Pohl CH. Polyunsaturated fatty acids cause apoptosis in *C. albicans* and *C. dubliniensis* biofilms. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2012;1820:1463–8.
40. Johansson A-C, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Öllinger K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis.* 2010;15:527–40.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

