

## **Estudo morfoanatômico, análise química e biológica do extrato metanólico das folhas de *Mabea angustifolia* Spruce ex Benth. (Euphorbiaceae)**

Morphoanatomical study, chemical and biological analysis of the methanol extract of the leaves of *Mabea angustifolia* Spruce ex Benth. (Euphorbiaceae)

Estudio morfoanatômico, análisis químico y biológico del extracto metanólico de las hojas de *Mabea angustifolia* Spruce ex Benth. (Euphorbiaceae)

Recebido: 19/09/2021 | Revisado: 28/09/2021 | Aceito: 02/10/2021 | Publicado: 04/10/2021

**Ívina Thayna Miranda Trindade**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1184-2241>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [ivinamiranda.17@gmail.com](mailto:ivinamiranda.17@gmail.com)

**Rafaela Rolim da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4960-9736>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [rafaelasilva097@gmail.com](mailto:rafaelasilva097@gmail.com)

**Isabel Reis Guesdon**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1372-250X>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [isabelbio@gmail.com](mailto:isabelbio@gmail.com)

**Maxwell Adriano Abegg**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0328-1122>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [maxabegg@gmail.com](mailto:maxabegg@gmail.com)

**Geone Maia Corrêa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9458-8305>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [geonemaia@ufam.edu.br](mailto:geonemaia@ufam.edu.br)

**Dominique Fernandes de Moura do Carmo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8835-1619>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [dominiquefmc@ufam.edu.br](mailto:dominiquefmc@ufam.edu.br)

### **Resumo**

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil químico do extrato metanólico (EMA-Met) das folhas de *Mabea angustifolia* Spruce ex Benth., sua ação biológica e descrever sua morfoanatomia. As folhas de *M. angustifolia* foram coletadas no município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. Em seguida, foram secas, trituradas e submetidas à extração com solventes em ordem crescente de polaridade. O extrato EMA-Met foi submetido às análises por espectrometria de massas (APCI-MS) e avaliado por triagem fitoquímica. A ação biológica dos extratos foi testada nas leveduras *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923, *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932 e nas bactérias *Salmonella* Lignieres 1900 spp., *Escherichia coli* (Migula 1895) e *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884. A análise morfoanatômica das folhas identificou características valiosas para a identificação da espécie, como a forma e margem foliar, número e posição de nectários e coléteres, tricomas tectores ramificados e células papilosas na face abaxial da epiderme. A análise fitoquímica revelou a presença de saponinas, taninos condensados, fenóis e flavonoides. A análise por APCI-MS permitiu identificar flavonoides de reconhecida atividade biológica na literatura, sendo dois O-glicosídeos da quercetina, o 3-O- $\alpha$ -L-arabinopirasil quercetina e a quercetina-3-O-glucuronídeo, além da quercetina e a miricetina-3-O-ramanosídeo. A solução do extrato na concentração de 10 mg/mL inibiu a *E. coli*, com diâmetro médio do halo de 5 mm, o halo de inibição para *C. albicans* apresentou diâmetro médio de 15 mm e para *C. parapsilosis* foi de 16 mm. Os resultados são promissores, evidenciando o potencial antimicrobiano de *M. angustifolia*.

**Palavras-chave:** APCI-MS; Atividade Antimicrobiana; Flavonoide.

### **Abstract**

This study aimed to evaluate the chemical profile of the methanol extract (EMA-Met) from the leaves of *Mabea angustifolia* Spruce ex Benth., its biological and describe its morfoanatomy. *M. angustifolia* leaves were collected in the municipality of Itacoatiara, Amazonas, Brazil. After, they were dried, ground and subjected to extraction with

solvents in increasing order of polarity. The EMA-Met extract was submitted to mass spectrometry analysis (APCI-MS) and evaluated by phytochemical screening. The biological action of the extracts was tested on *Candida albicans* (CP Robin) Berkhout 1923, *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932 and on *Salmonella Lignieres* 1900 spp., *Escherichia coli* (Migula 1895) and *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 bacteria. The morphoanatomical analysis of the leaves identified characteristics of diagnostic value for the species, such as leaf shape and margin, number and position of nectaries and colleters, branched tector trichomes and papillose cells on the abaxial surface of the epidermis. The phytochemical analysis revealed the presence of saponins, condensed tannins, phenols and flavonoids. The analysis by APCI-MS allowed the identification flavonoids of recognized biological activity in the literature, being two O-glycosides of quercetin, 3-O- $\alpha$ -L-arabinopirasil quercetin and quercetin-3-O-glucuronide, in addition to quercetin and myricetin-3-O-rhamnoside. The extract solution at a concentration of 10 mg/mL inhibited *E. coli*, with an average halo diameter of 5 mm, the inhibition halo for *C. albicans* presented a diameter mean of 15 mm and for *C. parapsilosis* it was 16 mm. The results are promising, showing the antimicrobial potential of *M. angustifolia*.

**Keywords:** APCI-MS; Atividade Antimicrobiana; Flavonoide.

### Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el perfil químico del extracto metanólico (EMA-Met) de las hojas de *Mabea angustifolia* Spruce ex Benth., Su acción biológica y describir su morfoanatomía. Se recolectaron hojas de *M. angustifolia* en municipio de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. En seguida, se secaron, se trituraron y se sometieron a extracción con solventes en orden creciente de polaridad. El extracto de EMA-Met se sometió a análisis de espectrometría de masas (APCI-MS) y se evaluó mediante cribado fitoquímico. La acción biológica de los extractos fue probada en *Candida albicans* (CP Robin) Berkhout 1923, *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932 y en *Salmonella Lignieres* 1900 spp., *Escherichia coli* (Migula 1895) y *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 bacterias. La morfoanatomía foliar identificaron características valiosas para la identificación de la especie, tales como forma y margen de la hoja, número y posición de nectarios y coléteres, tricomas tectores ramificados y células papilares en la superficie abaxial de la epidermis. El análisis fitoquímico reveló la presencia de saponinas, taninos condensados, fenoles y flavonoides. El análisis por APCI-MS permitió identificar compuestos flavonoides de reconocida actividad biológica en la literatura, siendo dos O-glucósidos de quercetina, 3-O- $\alpha$ -L-arabinopirasil quercetina y quercetina-3-O-glucurónido, además de quercetina y miricetina-3-O-rhamnoside. Se utilizó la técnica del pozo para verificar la actividad antimicrobiana de la muestra, la solución de extracto a una concentración de 10 mg / mL inhibió a *E. coli*, con un halo de diámetro promedio de 5 mm, el halo de inhibición para *C. albicans* presentó un diámetro promedio de 15 mm y para *C. parapsilosis* fue de 16 mm. Los resultados son prometedores y muestran el potencial antimicrobiano de *M. angustifolia*.

**Palabras clave:** APCI-MS; Actividad antimicrobiana; Flavonoide.

## 1. Introdução

As plantas, ainda hoje, tem sido um dos meios mais utilizados na medicina popular no controle de diversas doenças, mesmo com o desenvolvimento fármacos sintéticos (Veiga et al., 2005). A terapêutica pelo uso de plantas medicinais vem sendo bastante utilizada de forma eficaz em atendimento primário a saúde, com finalidade curativa ou preventiva (Maciel et al., 2002; Pilla et al., 2006; Pinto et al., 2006; Castro et al., 2009), estima-se que cerca de 75-80% da população, principalmente aqueles de países em desenvolvimento, utiliza desta prática na manutenção da saúde humana e melhoria na qualidade de vida (Parekh et al., 2005; Roy et al., 2013).

Euphorbiaceae Juss. é uma das famílias botânicas de maior importância econômica, agrupando cerca de 8.000 espécies (Webster, 1994). Entre seus diversos usos, o registro de plantas medicinais na família ganha considerável destaque (Lorenzi e Matos, 2002). Espécies de *Croton* L. são utilizadas na medicina popular, como antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, tripanocida e inseticida (Saviato et al., 2013). Outras atividades também são registradas em *Croton*, como antiinflamatória (Falcão et al., 2005), antidiabética (Barbosa-Filho et al., 2006) e antiulcerogênica (Almeida et al., 2002). Estas atividades estão associadas à presença de metabólicos secundários pertencentes aos sesquiterpenos, diterpenóides, triterpenóides pentacíclicos, esteroidais, flavonoides, alcaloides e lignina (Aguilar-Guadarrama; Rios, 2004; Salatino; Salatino; Negri, 2007). Outro gênero significativo é *Euphorbia* L., no qual já foi identificada atividade antiviral e antitumoral, e possivelmente, atividade antibacteriana, analgésica, entre outras, em virtude da presença flavonoides, alcaloides, taninos e terpenos (Ribeiro, 2014; Zhang et al., 2008; Avelar, 2010; Gaur et al, 2009).

A espécie *Mabea angustifolia* Spruce ex Benth. é um arbusto que pode atingir o hábito arbóreo, ocorrente em matas de terra firme, com folhas com lâminas elíptico-lanceoladas a lanceoladas, indumento marrom avermelhado e distribuído principalmente nos ramos e na nervura central. As inflorescências são pendentes e paniculiformes, com algumas flores pistiladas (femininas) na base da raque e numerosas flores estaminadas (masculinas) distalmente (Costa; Secco; Gurgel, 2018).

Dentre os caracteres morfológicos e anatômicos da família, as estruturas secretoras vem se destacando como importante marcador taxonômico, facilitando a distinção de espécie. A família Euphorbiaceae registra uma peculiar diversidade de estruturas que secretam diferentes compostos químicos, como nectários, laticíferos e coléteres (Metcalfe & Chalk, 1950; Vitarelli et al., 2015).

A atividade antibacteriana ainda não foi registrada em *Mabea* Aubl., porém, estudos com extrato fresco de *Euphorbia tirucalli* L., registrou inibição do crescimento das bactérias patogênicas *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren e Scott 1930, *Citrobacter freundii* (Braak 1928) Werkman e Gillen 1932, *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino et al. 1951) Sakazaki et al. 1963, *Serratia odorifera* Grimont et al. 1978, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 e *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884. (Vale & Orlanda, 2011). Na literatura, há também relatos de atividade antibacteriana do extrato das folhas de *Croton urucurana* Baill 1864 contra *Streptococcus pyogenes* Rosenbach 1884, *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter 1886) Trevisan 1887, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900, *Salmonella paratyphi* (ex Kayser 1902) Ezaki et al. 2000, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Winslow & Winslow 1908) Evans 1916 (Oliveira et al., 2008). Assim como o extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill 1864, apresentou atividade antimicrobiana contra a cepa *Enterococcus faecalis* (Andrewes & Horder 1906) Schleifer e Kilpper-Bälz 1984 (Braquehais et al., 2016). A ação antimicrobiana foi atribuída a alguns metabólitos secundários como cumarinas, fenóis, taninos, flavonoides (flavonóis e flavanonas), alcaloides e esteroides (Braquehais et al., 2016).

Diante do notório potencial da família e considerando as lacunas nos estudos do gênero *Mabea*, o trabalho objetivou ampliar o conhecimento botânico, químico e relacionado às atividades biológicas de *M. angustifolia*. O trabalho teve como objetivos descrever a morfoanatomia das folhas, avaliar o perfil químico do extrato metanólico das folhas e avaliar sua ação biológica para fungos e bactérias.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Identificação da planta e exsicata

As folhas da planta foram coletadas no mês de dezembro de 2018, nos arredores da cidade de Itacoatiara-AM A espécie foi identificada por especialistas e a exsicata encontra-se depositada no Herbário do Centro de Estudos Superiores de Itacoatiara (CESIT) na Universidade Estadual do Amazonas (UEA), número de registro- 0045.

### 2.2 Análise morfoanatômica

As folhas das amostras coletadas foram fixadas em FNT (formalina neutra tamponada) e SFF (sulfato ferroso em formalina neutra) (JOHANSEN, 1940) por aproximadamente 48 horas. Após serem submetidas a desidratação em série etílica foram armazenadas em álcool 70%. Fragmentos foliares foram cortados a mão livre bem, bem como submetidos à técnica da diafanização. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O'BRIEN et al., 1964) e Violeta Cristal (JOHANSEN, 1940), respectivamente. A detecção de óleo essencial foi realizada a partir do teste histoquímico de NADI ( $\alpha$ -naftol e cloridrato de dimetilparafenileno diamina) (DAVID e CARDE, 1964). Após montagem dos cortes em gelatina (KAISER, 1880), ou água, o laminário foi fotografado em microscópio de luz com adaptador para câmera fotográfica (Nikon A100) no laboratório de Botânica do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET).

### 2.3 Obtenção dos extratos metanólico das folhas de *M. angustifolia*

As folhas (200g) de *M. angustifolia* foram coletadas na área rural do município de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. Após serem coletadas, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar e trituradas em moinho até a obtenção de pó, o qual foi transferido para frascos até a preparação dos extratos. A extração foi realizada com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, após máxima extração dos constituintes por solvente, o extrato era decantado e filtrado em papel Whatman®, acrescentando um solvente de maior polaridade. Cada extrato filtrado foi concentrado em rotaevaporador a 40°C e a pressão reduzida, os resíduos obtidos nas sucessivas extrações foram separados e guardados, com exceção do extrato metanólico (**EMA-Met**) o qual foi submetido às análises descritas a seguir:

### 2.4 Prospecção fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica qualitativa para a detecção preliminar de metabólitos secundários foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Mattos (1997), Lima Neto e colaboradores (2015).

Para detecção de saponinas foi realizado o teste por agitação mecânica, onde 0,013mg de EMA-Met das folhas de *M. angustifolia* foi diluído em 10mL água destilada e submetido a agitação mecânica, o teste é considerado positivo se houver formação de espuma, por um período de 15 minutos, de forma persistente (Silva, 2017).

Para detecção de fenóis e taninos, o EMA-Met (0,011mg) foi depositado em um tubo de ensaio e hidratado com 10mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionadas 3 gotas de cloreto férrico 0,5 M agitando-o posteriormente. Foi feita a comparação com um teste em branco, usando água e cloreto férrico 0,5 M. A coloração verde resulta em taninos condensados e formação de precipitado de coloração azul mostra a presença de taninos hidrolisáveis (Silva, 2017).

Para a detecção de flavonóides, utilizou-se uma tira de papel de filtro e posteriormente a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de AlCl<sub>3</sub> 5%. O aparecimento de cor amarela sob luz UV 365 nm indicaria a presença de flavonóides.

### 2.5 Espectrometria de massas (EM)

A composição qualitativa e quantitativa do extrato EMA-Met foi realizada por EM. A amostra (1mg) foi dissolvida em seu respectivo solvente de extração. Após a completa dissolução, foi retirada uma alíquota para a infusão direta no espectrômetro de massas. A amostra foi injetada em duplicatas mediante inserção direta em um espectrômetro de massas ion trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific), utilizando como fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI), operando nos modos positivo e negativo. A amostra foi analisada na faixa de m/z de 600-1000 Da. As condições utilizadas do aparelho foram: sheath gas flow rate - 9 psi; auxiliary gas flow rate - 3 psi; sweep gas flow rate - 0 psi; spray voltage - 5 KV; capillary temp - 260 0C; capillary voltage - 26 V; tube lens - 120. Foi utilizado o loop de 5 µL e o fluxo de infusão de 25 µL/min de metanol grau HPLC.

### 2.6 Determinação da atividade antifúngica e antimicrobiana em meio sólido

O **EMA-Met** foi testado para as cepas de leveduras: *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout 1923 ATCC 183 188041 e *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice 1932 ATCC 220191, bem como para as bactérias patogênicas: *Escherichia coli* (Migula 1895) 184 ATCC 25922, *Salmonella* Lignieres 1900 spp. e *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (cepa de laboratório). As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud a 25° C por 48 horas e as bactérias em ágar Mueller-Hinton, a 37°C por 24 horas. Em cada cultura foi preparada suspensão celular equivalente a escala de MacFarland nº 1 para as leveduras

( $\approx 3 \times 10^8$  CFU/mL) e nº 0,5 para as bactérias ( $\approx 2 \times 10^8$  186 CFU/mL) (Vaz et al., 2009). A escala de McFarland foi preparada de acordo com a adaptação de Chapin 189 & Lauderdale (2003).

## 2.7 Ensaio antimicrobiano

Com auxílio de swab estéril, inoculou-se as suspensões padronizadas das cepas de leveduras e bactérias a fim de se obter um tapete de células para os testes de suscetibilidade. Obteve-se a concentração de 10 µg/mL do extrato seco por diluição com água/metanol (7:3). Utilizou-se uma alíquota de 10µL do extrato diluído em cada disco de aproximadamente 6 mm. Cada extrato foi testado em disco (triplicata) frente às 2 cepas de fungos e 2 cepas de bactérias potencialmente patogênicos.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Caracterização MorfoAnatômica

No campo, *Mabea angustifolia* se destaca por suas folhas dísticas e arquitetura dos ramos plagiotrópica e de ramificação dicotômica (Figura 1A), podendo atingir até 10 metros de altura. As folhas de *M. angustifolia* (Figuras 1B e C) são caracterizadas pelo limbo linear-lanceolado, nervação penínérvea, conforme descrito por Costa, Secco e Gurgel. (2018), diferindo de outras espécies ocorrentes no Amazonas como *M. paniculata* Spruce ex Benth, que apresenta folhas elíptico-lanceoladas. Apesar de Costa, Secco e Gurgel. (2018) classificarem a margem foliar de *Mabea angustifolia* como inteira a discretamente crenada, foi constatado que a margem foliar é dentada.

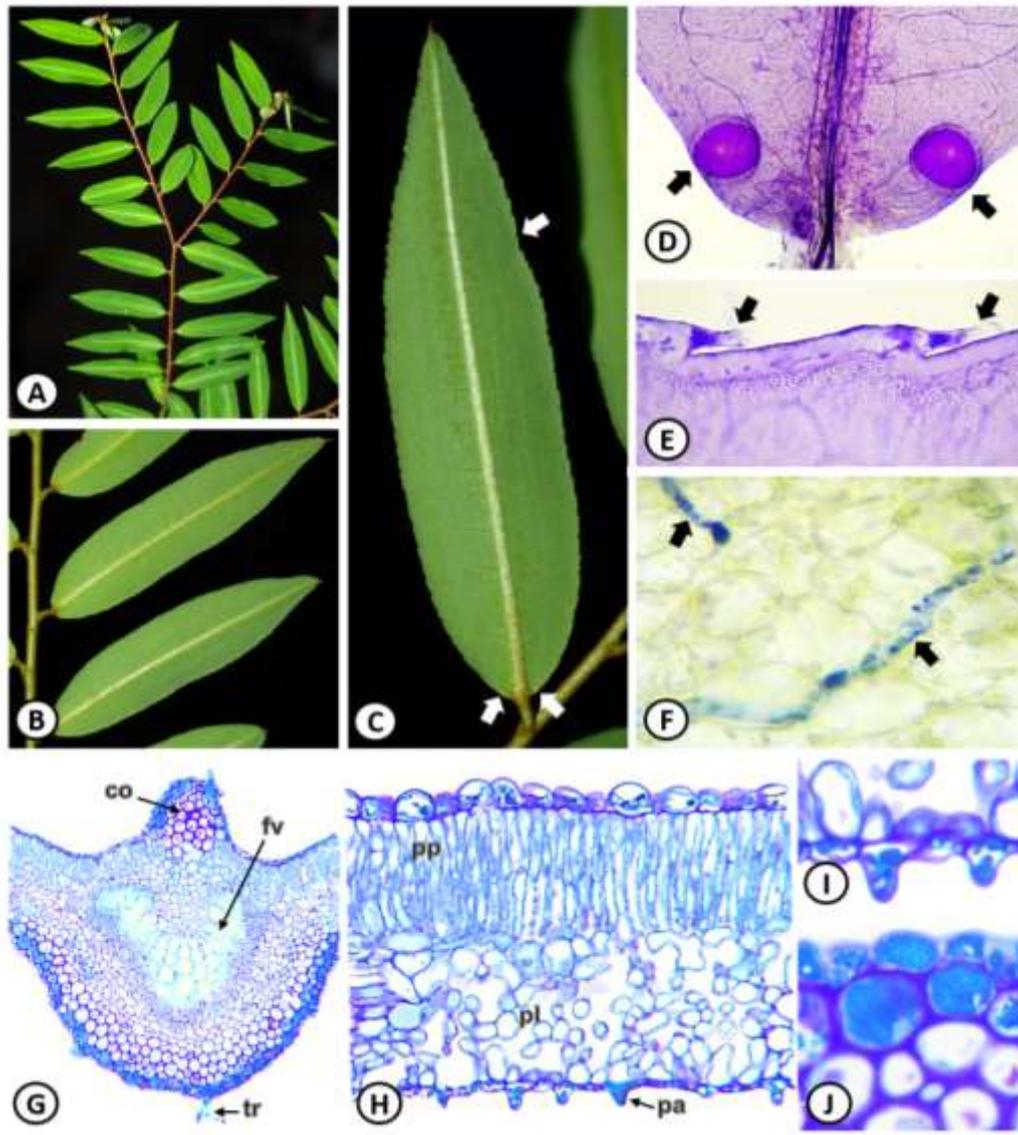
Além disso, foram observadas 2 a 3 (4) glândulas circulares na face abaxial da base do limbo foliar (Figuras 1C e 1D), dado negligenciado na literatura da espécie e de importância para a diagnose da espécie. A presença destas glândulas foliares é uma característica de importante ocorrência em Euphorbiaceae (Metcalfe; Chalk, 1950.). Tais estruturas são reconhecidas como nectários, produzindo secreção açucarada. Sua anatomia é constituída por uma epiderme secretora em paliçada, com uma cutícula espessa e parênquima secretor rico em cristais de Oxalato de Cálcio do tipo drusa, bem como os observados nas espécies *Mabea fistulifera* Mart. e *Croton cajucara* Benth (Mendonça et al., 2008; Almeida, 2015).

Na margem da folha, no ápice de cada dente, foi registrado a ocorrência de um coléter (Figura 1E), o que também foi observado em *Mabea fistulifera* (Almeida & Paiva, 2019). O coléter observado em ambas espécies é do tipo padrão e Almeida e Paiva. (2019) registraram identificaram natureza mucilagínosa da secreção.

Outra característica relevante é a produção de látex, sendo branco nas espécies do gênero *Mabea*, enquanto em algumas espécies de *Croton* pode ser incolor (observação pessoal). Os laticíferos presentes nas folhas (Figuras 1F) são do tipo não articulados, e seu conteúdo registrou resultado positivo no teste de NADI, sinalizando a secreção de óleo essencial no látex (Figura 1J). Devido a diversidade de estruturas secretoras na família Euphorbiaceae, esta fonte de caracteres se mostra valiosa na diferenciação e identificação da espécie (Vitarreli et al., 2015).

A nervura central quando observada em corte transversal apresenta forma bicôncava, possuindo uma faixa de colênquima subepidérmico em ambas as faces e um a três feixes vasculares (Figura 1G). Tricomas tectores dendríticos multicelulares e ramificados são observados em ambas as faces, tal característica também foi observada por Bezerra (2011) em *Mabea uleana* Pax & K.Hoffm. O mesofilo é dorsiventral (Figura 1H) composto por parênquima paliçádico unisseriado, enquanto o parênquima lacunoso é formado por cerca de 5 a 7 camadas de células de formato alongado com grandes espaços intercelulares. A face adaxial da epiderme (Figura 1H) é formada por células epidérmicas de formato tabular, com a parede periclinal externa convexa. Na face abaxial, as células epidérmicas são papilosas com projeções em forma de cúpula (Figura 1H e I), diferentemente de *M. uleana* que possui papilas nas duas faces da epiderme como descrito por Barros (2011). Foram observadas evidências do acúmulo de compostos fenólicos nas células da epiderme (Figura 1I e J).

**Figura 1:** Aspectos morfoanatômicos das folhas de *Mabea angustifolia*. **A:** Aspecto geral dos ramos **B:** Distribuição das folha. **C:** Detalhe da face abaxial, evidenciando a margem dentada e o par de nectários na base. **D:** Folha diafanizada mostrando par de nectários próximo a margem da base da folha; **E:** e a distribuição dos coléteres no ápice dos dentes marginais da folha. **F:** Laticíferos exibindo reação positiva ao teste de NADI, evidenciando óleo essencial corado em azul. **G:** Corte transversal da nervura central, colênquima (cq), feixe vascular (fv), tricoma dendrítico (tr). **H:** Corte transversal da folha, mostrando mesofilo dorsiventral com parênquima paliádico (pp) e parênquima lacunoso (pl) e a faces da epiderme, sendo evidente a ocorrência de papilas (pa) na face abaxial. **I e J:** Detalhe do acúmulo de composto fenólicos no interior das células da epiderme.



Fonte: Autores.

### 3.2 Análise fitoquímica preliminar

O resultado da prospecção fitoquímica preliminar dos grupos de metabólitos secundários do **EMA-Met** foi positivo para saponinas, taninos condensados, fenóis e fenólicos (Tabela 1), estas classes sugerem potencialidade para atividade antimicrobiana (Okeke, 2001; Souza et al., 2013), além de apresentarem outras atividades biológicas, por exemplo, as saponinas apresentam atividades anti-inflamatória, hemolítica, molusquicida, antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antiviral e antiparasitária, os compostos fenólicos são antioxidantes, anti-inflamatórios, também

possuem ação antibacteriana, antifúngica, antiinfeciosa e antiprotozoária (Rocha et al., 2011), para os flavonoides muitos estudos já comprovaram atividade antioxidante, antiinflamatória, antiulcerogênica, antimicrobiana (Pinto et al., 2000), hepatoprotetora, antiviral e anticarcinogênica (Middleton Junior et al., 2000). Tais informações indicam a importância em realizar a identificação de grupos de metabólitos secundários em espécies botânicas para estas possam ser estudadas quanto ao seu potencial biológico.

**Tabela 1:** Classes de metabólitos secundários encontrados no EMA-Met.

Classes de metabólitos secundários	Extrato metanólico das folhas
Saponinas	+
Taninos condensados	+
Taninos hidrolisáveis	-
Fenóis	+
Flavonoides	+

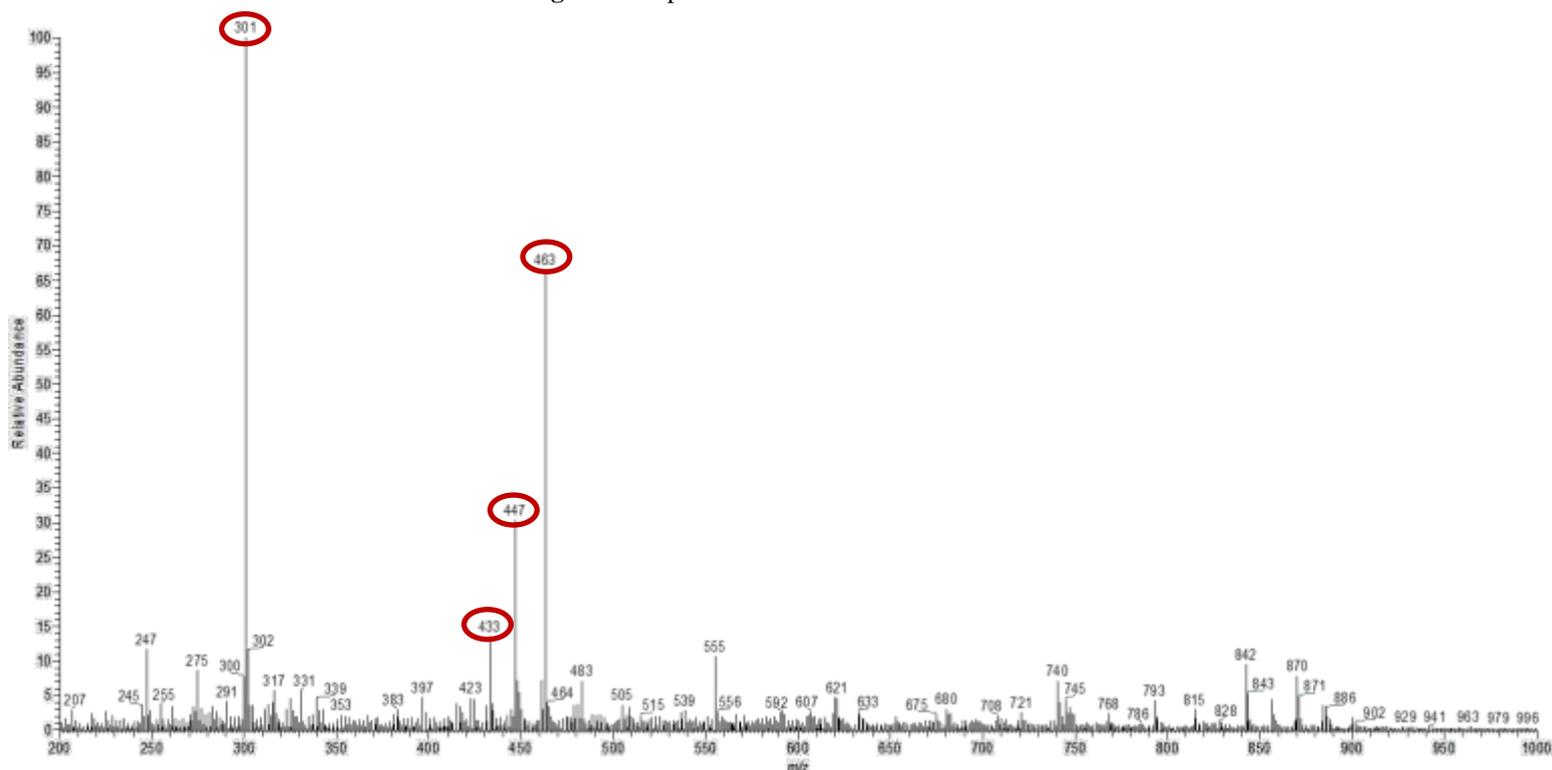
\* (+) Presença / Reagente  
(-) Ausência / Não reagente  
Fonte: Autores.

### 3.3 Análise por Espectrometria em massas por ionização química à pressão atmosférica (APCI-MS)

A técnica de ionização química à pressão atmosférica – APCI foi empregada com o objetivo de identificar metabólitos secundários presentes no extrato EMA-Met, sem haver, necessariamente, o isolamento destes compostos. Os estudos de fragmentações de constituintes presentes nos extratos, importantes para a identificação de produtos naturais, foram realizados por espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MS<sup>2</sup>). Os espectros de massas foram realizados tanto no modo de ionização positivo quanto negativo, dependendo das classes dos compostos em análise. Constatou-se que o modo negativo é mais adequado para compostos fenólicos uma vez que as características ácidas dos mesmos favorecem a perda de um próton levando aos íons [M - H].

Foram observados padrões de fragmentação característicos de perda de açúcares em O-glicosídeos, relativo a perdas do ácido glicurônico [M - H - 146]<sup>-</sup> (Hertog et al., 1992; Colombo et al., 2008). No espectro de íons totais do extrato metanólico- EMA-Met (Figura 2) foi possível identificar quatro flavonoides com valores de *m/z* em 447, 463, 433, 301 u.m.a.

**Figura 2:** Espectro de íons totais de EMA-Met.



Fonte: Autores.

A presença de ácido glucurônico ligado a aglicona quercetina, apesar de rara, pode ser observada pela fragmentação do íon  $[M-H]^-$  de  $m/z$  447 formando o íon de  $m/z$  301, relativo à quercetina, após perda de 146 unidades de massa característico de ramanose. Verificou-se um peso molecular 448u para esta substância. A formação fragmentada do íon de  $m/z$  301 pode ser atribuída a ligação acetal entre a quercetina ( $m/z$  301) e o açúcar (SANTOS et al., 2005). Portanto, o pico de  $m/z$  447 foi inferido como o flavonóide quercetina 3-O-glicuronídeo.

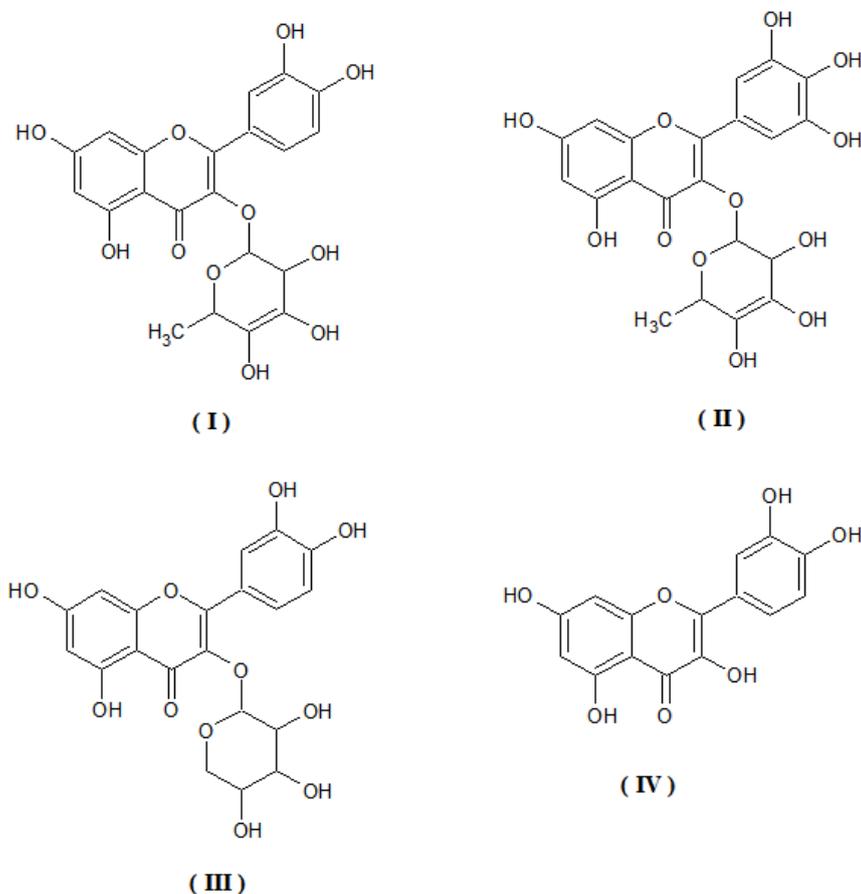
A fragmentação do íon molecular 463 originou íon de  $m/z$  316 característico de aglicona miricetina após a perda do açúcar ramanose. Tal substância já havia sido isolada do extrato butanólico de *Croton campestris* St. Hill 1827 obtida com  $m/z$  463 (100%) fornecendo um peso molecular 464 u (SANTOS et al., 2005).

O pico  $m/z$  433 pode ser verificado como sendo 3-O- $\alpha$ -L-arabinopirasil quercetina. Do espectro de massas obteve-se íons  $m/z$  433 que corresponde a um peso molecular de 434. Com as fragmentações obteve-se o íon  $m/z$  300, a partir da perda de 133 u.m.a. Tal fragmentação também pode ser atribuída a ligação acetal entre a quercetina ( $m/z$  301) e o açúcar (SANTOS et al., 2005).

O pico base em  $m/z$  301 é também o pico do íon molecular  $[M - H]^-$ , e foi identificado como a quercetina (Figura 2). Os padrões de fragmentação foram observados através da perda de 17 u.m.a, ( $m/z$  284), que corresponde à perda de uma molécula de água, bem como pelo fragmento de pico  $m/z$  163  $[M - H - 138]^-$  correspondente à fragmentação do anel heterocíclico via Retro-DielsAlder (RDA) (Cuyckens et al., 2004; Jaiswal et al., 2012).

Assim, foi possível identificar quatro compostos fenólicos pertencente a classes de flavonoides sendo dois O-glicosídeos da quercetina, o 3-O- $\alpha$ -L-arabinopirasil quercetina e a quercetina-3-O-glucuronídeo, mais a quercetina e a miricetina-3-O-ramanosídeo.

**Figura 3:** Substâncias identificadas no extrato EMA-Met. (I) Quercetina-3-O-glucuronídeo. (II) Miricetina-3-O-ramanosídeo. (III) 3-O- $\alpha$ -L-arabinopirasil quercetina. (IV) Quercetina.



Fonte: Autores.

### 3.4 Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Os resultados obtidos evidenciaram o potencial de inibição microbiana frente às linhagens testadas de acordo com a técnica de difusão em disco (Tabela 2). A bactéria *E.coli* apresentou sensibilidade ao extrato **EMA-Met** apresentando média de halos de inibição de 5 mm, já para as leveduras o extrato apresentou expressiva atividade antifúngica inibição, com média de diâmetros de inibição de 15 mm para *C. albicans* e 16 mm para *C. parapsilosis*

**Tabela 2:** Diâmetro de inibição do crescimento de bactérias e fungos avaliados pelo teste de poço.

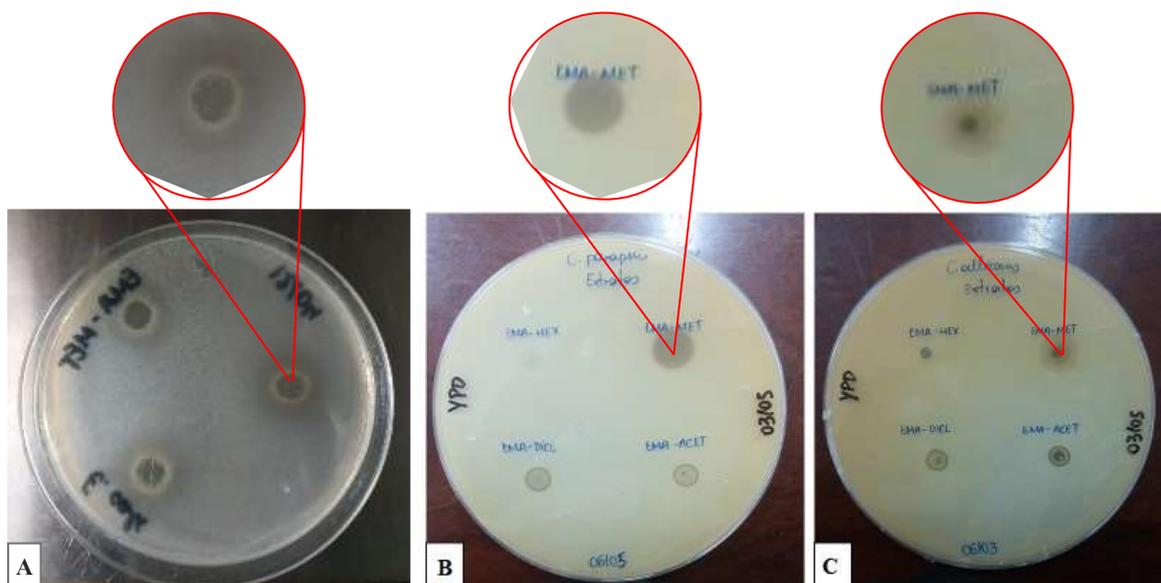
Microrganismos	Extrato / Halo de Inibição
	EMA-Met (mm)
<i>E. coli</i>	5
<i>Salmonella spp.</i>	NI
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI
<i>C. albicans</i>	15
<i>C. parapsilosis</i>	16

NI: Não houve inibição. Fonte: Autores.

Determinadas classes de metabólitos secundários são constantemente responsabilizadas pela ação antimicrobiana dos extratos vegetais, entre os quais podem ser citados os ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, alcaloides, óleos essenciais e terpenos (Cushnie & Lamb, 2005; Monteiro et al., 2005), neste trabalho foram identificados os metabólitos flavonóides, fenólicos, taninos condensados e saponinas no EMA-Met, a presença destas classes podem justificar as inibições observadas para a bactéria *E. coli* e leveduras *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Figura 4), no entanto, novos estudos devem ser realizados para identificação de outros constituintes na espécie, além da realização do fracionamento do extrato ativo, isolamento e testagem do (s) composto (s) isolados nos ensaios antimicrobianos.

Os flavonoides inibem o crescimento de fungos e bactérias por serem capazes de formar complexos com proteínas solúveis e a parede celular dos fungos e bactérias (Souza, 2017). Assim, a atividade antifúngica constada pode ser explicada também por este metabólito possuir ampla capacidade em inibir a germinação de esporos patogênicos, como acontece naturalmente nas plantas, e devido sua natureza lipofílica que o torna capaz de romper as membranas dos fungos (Salas et al., 2011; Flambó, 2013). Quanto ao efeito antibacteriano, possivelmente pela presença de flavonoides, é atribuída a grupos fenólicos hidroxilo que são afins a proteínas e, conseqüentemente, agem como inibidores de enzimas bacterianas, e também, interferem nas suas vias anabólicas (Alcaráz et al., 2000; Àvila et al., 2008; Flambó, 2013;).

**Figura 4:** Halos de inibição do ensaio antimicrobiano. (A) Halos de inibição do EMA-Met frente a *E. coli* (B) Halo de inibição do EMA-Met frente a *C. parapsilosis* e (C) Halos de inibição do EMA-Met frente a *C. albicans*.



Fonte: Autores.

A ação antimicrobiana dos taninos, aqui identificadas através da prospecção, pode ser elucidada a partir de três hipóteses. A primeira, supõe que este metabólito inibe enzimas bacteriana e fúngicas, unida ou não com sua capacidade de formar complexos com os substratos dessas enzimas. A segunda hipótese, provém da ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, que em consequência modifica o metabolismo destes, e a terceira é fundamentada em sua capacidade de se complexar com íons metálicos, diminuindo a quantidade de íons disponíveis que são essenciais para o metabolismo microbiano (Scalbert, 1991; Pereira et al., 2015).

As saponinas, detectados também na prospecção, dispõem de um comportamento anfifílico, ou seja, possuem duas regiões, sendo uma hidrofóbica e outra hidrofílica, e sua capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e

fosfolipídios de membranas propiciam ações biológicas variadas. Essas ações biológicas sobre as membranas celulares podem alterar a permeabilidade ou até mesmo destruí-la. (Schenkel et al., 2001; Castejon, 2011).

Os compostos identificados no **EMA-Met**, através da análise por espectrometria de massas, possivelmente, também, foram responsáveis pelas atividades antimicrobianas observadas, a literatura reporta o amplo espectro de atividades biológicas encontradas para a quercetina e derivados, dentre eles cita-se a atividade antimicrobiana (Dogan et al., 2015; Gutteridge, 1995). De acordo com estudos realizados por Thakur e colaboradores. (2016), extratos ricos em quercetina, oriundos das espécies *Berberis aristata* L. (Berberidaceae) e *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae), melhoraram a eficácia de antibióticos de terceira linha contra *E. coli*. Em outras pesquisas foi comprovada a atividade sinérgica da quercetina contra a metilina, amoxicilina, cloxacilina, penicilina G, tetraciclina, sulfadiazina e ceftidima contra *Staphylococcus* spp., *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* (Siriwong et al., 2016).

Sholkamy e colaboradores. (2020) identificaram um derivado da quercetina 3-O glicosídeo como responsável pela atividade antimicrobiana contra uma ampla gama microorganismos, dentre eles a bactéria *Escherichia coli* ATCC-7839 e a levedura *Candida albicans*, tais estudos comprovam a eficácia da quercetina e derivados como antimicrobiano.

#### 4. Conclusão

As análises morfoanatômicas nas folhas de *Mabea angustifolia* mostraram a presença de diversas estruturas que possuem importância taxonômica para reconhecimento da espécie como o formato das células da epiderme, a localização dos nectários e a presença de coléteres nas margens das folhas.

A partir da triagem fitoquímica do extrato metanólico foi possível identificar metabólitos secundários, como taninos condensados, fenólicos, flavonoides e saponinas, comumente presentes em diversas espécies na família a qual o gênero *Mabea* pertence.

A espectrometria em massas possibilitou a identificação de flavonoides como quercetina, 3-O- $\alpha$ -L-arabinopirasil quercetina, quercetina-3-O-glucuronídeo e miricetina-3-O-ramanosídeo.

Os resultados dos ensaios biológicos mostraram o potencial antimicrobiano do EMA-Met frente à bactéria *Escherichia coli* e às leveduras *C. albicans* e *C. parapsilosi*. O extrato foi capaz de produzir uma média de halos de inibição de 5 mm para *E.coli* e expressiva atividade antifúngica com médias de halo de inibição de 15 mm para *C. albicans* e 16 mm para *C. parapsilosi*. Estes resultados foram correlacionados com os metabólitos identificados na amostra, corroborando com os dados na literatura acerca das atividades antimicrobianas encontradas para as classes de flavonoides, fenólicos, taninos e saponinas.

As informações obtidas neste trabalho estimulam a continuidade do estudo, visando o isolamento das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas observadas.

#### Referencias

- Aguilar-Guadarrama, A. B. & Rios, M. Y. (2004). Three New Sesquiterpenes from *Croton arboreus*. *Journal of Natural Products*, 67(5), 914–917.
- Alcaráz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomás, F. & Ferreti, F. H. (2000). Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicilin – resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of theoretical Biology*, 205 (2), 231 – 240.
- Almeida, A. B. A., Miotto, A. M.; Nunes, D. S., Spadari-Bratfisch, R. C. & Souza-Brito, A. R. M. (2002). Mechanism of antiulcerogenic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 105-110.
- Almeida, A. L. & Paiva, E. A. S. (2019). Colleters in *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): anatomy and biology of the secretory process. *Flora*, [S.L.], 258, 151439.
- Almeida, A. L. *Nectários em inflorescências de Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae): anatomia e composição química do néctar, 30 f (2015). Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- Avelar, B. A. *Detecção in vitro de citocinas intracitoplasmáticas (interferon gama, fator de necrose tumoral, interleucina 4 e interleucina 10) em leucócitos humanos tratados com extrato bruto diluído de Euphorbia tirucalli*. 54 f. (2010). Dissertação (Mestrado do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.
- Ávila, P. H., Smânia, E. F. A., Monache, F. D. & Júnior, A. S. (2008). Structure – activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16 (22), 9790 – 9794.
- Barbosa-Filho, J. M., Medeiros, K. C. P., Diniz, M. F. F. M., Batista, L. M., Athayde-Filho, P. F., Silva, M. S., Cunha, E. V. L., Almeida, J. R. G. S. & Quintans-Júnior, L. J. (2006). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 258-285.
- Barros, D. A. D., Alvarenga, M. A., Gottlieb, O. R. & Gottlieb, H. E. (1982). Naringenin coumaroylglucosides from *Mabea caudata*. *Phytochemistry*, 21 (8), 2107-2109.
- Bezerra, C. S. (2011). *Morfoanatomia foliar de espécies do gênero Mabea (EUPHORBIACEAE)*. Relatório de pesquisa. Biologia Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Amazonas.
- Braquehais, I. D., Vasconcelos, F. R., Ribeiro, A. R. C., Silva, A. R. A., Franca, M. G. A., Lima, D. R., Paiva, C. F., Guedes, M. I. F. & Magalhães, F. E. A. (2016) Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18 (21), 582-587.
- Brooks, G., Evans, A. T., Markby, D. P., Harrison, M. E., Baldwin, M. A. & Evansi, F. J. (1990). An ingenane diterpene from belizian *Mabea excelsa*. *Phytochemistry*, 29 (5), 1615-1617.
- Castejon, F. V. (2011). Taninos e Saponinas. *Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação–Universidade Federal de Goiás, Goiânia*. 30, 1292-1298.
- Castro, A. P., Fraxe, T. J. P., Santiago, J. L., Matos, R. B., & Pinto, I. C. (2009). Os Sistemas Agroflorestais como Alternativa de Sustentabilidade em Ecossistemas de Várzea no Amazonas. *Acta Amazônica*, 39(2), 279 – 288.
- Costa, J. L. C. DA., Secco, R. S. & Gurgel, E. S. C. (2018). Flora das cangas da serra dos Carajás, Pará, Brasil: Euphorbiaceae. *Rodriguésia*, 69 (1), 59-75.
- Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5), 343-356.
- Cuyckens, F. & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39 (1), 1-15.
- David, R. & Carde, J. P. (1964). Coloration differentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l. Academie des Sciences Paris*. 258, 1338–1340.
- Dogan, Z., Kocahan, S., Erdemli, E., Köse, E., Yılmaz, I., Ekincioglu, Z., Ekinci, N. & Türköz, Y. (2015). Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. *Cytotechnology*. 67 (6), 1031–1038.
- Falcão, H. S., Lima, I. O., Santos, V. L., Dantas, H. F., Diniz, M. F. F. M., Barbosa-Filho, J. M. & Batista, L. M. (2005). Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 381-39.
- Flambó, F. A. L. P. (2013). *Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde. Porto.
- Garcez, W., Garcez, F., Pellicciari, I., Hara, S., Ferreira, F., Nakasse, L. & Siqueira, J. (1997). A Bioactive Naringenin Coumaroyl Glucoside from *Mabea fistulifera* subsp. *robusta*. *Planta Medica*, 63 (04), 386-386.
- Gaur, K., Rana, A. C., Nema, R. K., Kori, M. L. & Sharma, C. S. (2009). Antiinflammatory and analgesic activity of hydro-alcoholic leaves extract of *Euphorbia neriifolia* Linn. *Asian J Pharm Clin Res*, 2 (1), 26–28.
- Gutteridge, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. (1995) *Clinical chemistry*, 41 (12), 1819–1828.
- Jaiswal, R., Jayasinghe, L. & Kuhnert, N. (2012). Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC–MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 47 (4), 502-515.
- Johansen, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Company.
- Kaiser, E. (1880). Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. *Botanisch Zentralb*, 180, 25-26.
- Lima, G. A., Kaffashi, S., Luiz, W. T.; Ferreira, W. R., Dias Da Silva, Y. S. A., Pazin, G. V. & Violante, I. M. P. (2015). Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Plantas*, 17 (4), 1069-1077.
- Lorenzi, H. E. & Matos, F. J. (2002). *Plantas medicinais no Brasil / Nativas e exóticas*. Instituto Plantarum.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga J.R., V. F., Grynberg, N. F. & Chevarria, A. (2002). Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Química Nova*, 25 (3), 429-438.
- Matos, F. J. A. (1997). *Introdução à Fitoquímica Experimental*. (2a ed.), Edições UFC.
- Mendonça, M. S., Ilkiu-Borges, F. & Souza, M. C. (2008). Anatomia foliar de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, 10 (2), 18-25.

- Metcalfe, C. R. & Chalk, L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with note on economic uses*. London: Oxford University Press.
- Middleton Junior, E., Kandaswami, C. & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52 (4), 673-751.
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P., Araújo, E. L. & Amorim, E. L. C. (2005). Taninos: uma abordagem química à ecologia. *Química Nova*, 28 (5), 892-896.
- O'Brien, T. P., Feder, N. & McCully, M. E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59 (2), 367-373.
- Okeke, M. I., Iroegbu, C. U., Eze, E. N., Okoli, A. S. & Esimone, C. O. (2001) Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *Journal Of Ethnopharmacology*, [S.L.], 78, (2-3), 119-127.
- Oliveira, I. S., Lima, J. C. S., Silva, R. M. & Martins, D. T. O. (2008). Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [S.L.], 18 (4), 587-593.
- Parekh, J.; Jadeja, D. & Chanda, S. (2005). Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turkish Journal of Biology*, 29 (4), 203-210.
- Pereira, A. V., Azevêdo, T. K. B., Higino, S. S. S., Santana, G. M., Trevisan, L. F. A., Azevedo, S. S., Pereira, M. V. & Paula, A. F. R. (2015). Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. *Agropecuária Técnica*, 36 (1), 121-127.
- Pilla, M. A. C., Amorozo, M. C. M. & Furlan, A. (2006). Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. *Acta botânica brasileira*. 20(4), 789-802.
- Pinto, E. P. P., Amorozo, M. C. M. & Furlan, A. (2006). Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, Brasil. *Acta Botanica Brasileira*. 20 (4), 751-762.
- Ribeiro, G. E. (2014). *Triagem fitoquímica, atividade antimicrobiana, antioxidante e citotoxicidade de extratos hidroetanólicos de Euphorbia cotinifolia (Leiteiro vermelho)*. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.
- Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. B., Vieira, R. F., Silva, J. P. & Agostini-Costa, T. S. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, [S.L.], 33 (4), 1215-1221.
- Roy, S., Choudhury, M. D. & Paul, S. B. (2013). In Vitro antibacterial activity of *Alocasia decipiens* Schott. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (1), 155-157.
- Salas, P. M., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M. & Resnik, S. L. (2011). Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124 (4), 1411 – 1415.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F. & Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18 (1), 11-33.
- Santos, P. M. L. dos.; Schripsema, J. & Kuster, R. M. (2005). Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(4), 321-325.
- Savietto, J. P., Furlan, C. M., Motta, L. B., Salatino, M. L. F., Carvalho, J. E., Ruiz, A. L., Salatino, A. & Santos, D. Y. (2013). Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23, 662-667.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry, Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- Schenkel, E. P., Gosmann, G. & Athayde, M. L. Saponinas. In: Simões, C. M.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (2001). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC. cap.27, 597-619.
- Sholkamy, E. N., Ahmed, M. S., Yasser, M. M. & Mostafa, A. A. (2020). Antimicrobial quercetin 3 – O – glucoside derivated isolated from *Streptomyces antibioticus* strain ess\_amA8. *Journal of King Saud University - Science*, 32 (3), 1838-1844.
- Silva, J. A. G. (2017). *Investigação fitoquímica e biológica de folhas do Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae)* / Jéssica de Andrade Gomes Silva. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Silva, T. L. (2005). *Estudos fitoquímico e alelopático dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas e do caule de Mabea fistulifera subsp. Robusta*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Pará.
- Siriwong, S., Teethaisong, Y., Thumanu, K., Dunkhunthod, B. & Eumkeb, G. (2016). The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 17 (1), 9–52.
- Souza, M. H. O. (2017). *Prospecção fitoquímica, identificação e avaliação da atividade microbiológica de metabólitos secundários da Annona mucosa Jacq.* Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Maranhão, São Luis.
- Souza, R. K. D., Mendonça, A. C. A. M. & Silva, M. A. P. (2013). Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Mediciniais*, 18 (1), 140-156.
- Thakur, P., Chawla, R., Narula, A., Goel, R., Arora, R. & Sharma, R. K. (2016). In vitro bactericidal activity of *Berberis aristata* extract against clinical isolates of carbapenem resistant *Escherichia coli*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 13(3), 229–237.

Vale, V. V. & Orlanda, J. F. F. (2011). Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). *Scientia Plena*, 7, (4).

Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C. & Maciel, M. A. M. (2005). Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28 (3), 519-528.

Vitarelli, N.C., Riina, R., Caruzo, M. B.R., Cordeiro, I., Fuertes-Aguilar, J. & Meira, R. M. S. A. (2015). Foliar secretory structures in Crotonaeae (Euphorbiaceae): diversity, anatomy, and evolutionary significance. *American Journal of Botany*, 102 (6), 833-847.

Webster, G. L. (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 81, 33-144.

Zhang, W. K., Xu, J. K., Zhang, X. Q., Yao, X. S. & Ye, W. C. (2008). Chemical constituents with antibacterial activity from *Euphorbia sororia*. *Natural product research*, 22 (4), 353-359.