

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
BIOTECNOLOGIA

**THAIANE FERREIRA DE LIMA**

**PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DE *Smilax campestris* Grisebach**

**Dourados, 2016.**

THAIANE FERREIRA DE LIMA

PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE  
*Smilax campestris* Grisebach

Trabalho de conclusão de curso submetido à  
Universidade Federal da Grande Dourados  
como parte dos requisitos necessários para  
obtenção do Grau de Bacharela em  
Biotecnologia. Sob a orientação da Profa.  
Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dourados, 2016.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

L732p	<p>Lima, Thaiane Ferreira de. Propriedade antimicrobiana e atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de <i>Smilax campestris</i> Grisebach. / Thaiane Ferreira de Lima. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 59f.</p> <p>Orientador: Kelly Mari Pires de Oliveira. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Plantas medicinais. 2. Japecanga. 3. Antimicrobiano. 4. Antioxidante. 5. Fitoquímica. I. Título.</p>
-------	---

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

Thaiane Ferreira de Lima

**PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO  
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Smilax campestris* Grisebach**

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal da Grande Dourados como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Bacharela em Biotecnologia. Sob a orientação da Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

Banca Examinadora:

---

Allan Belarmino Rodrigues - FACET/UFGD  
Examinador

---

Msc. Fabiana Gomes da Silva Dantas - FCBA/UFGD  
Examinadora

---

Msc. Renata Pires de Araújo - FCBA/UFGD  
Examinadora

---

Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira - FCBA/UFGD  
Orientadora

Dedico este trabalho a todos aqueles que fazem  
ou fizeram a diferença em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado força para concluir essa etapa da minha jornada.

Aos familiares, em especial meus pais, Rosângela e Adenilson, que sempre me apoiaram, incentivaram, motivaram e proporcionaram condições favoráveis em todas as horas e sem os quais, não teria conseguido chegar onde estou hoje, desde antes da escolha da minha profissão, até minha formação atual.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelly Mari de Oliveira, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela ajuda, atenção, paciência e contribuição à minha formação.

À minha co-orientadora Msc. Fabiana Gomes da Silva Dantas, pelas dicas e sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia Aplicada, Andressa, Bianca, Fernanda, Melina, Pamela, Vagner, Wellinton, que me proporcionaram horas de trabalho mais agradáveis, em especial à Fabiana, Adriana, Danny, Stephanie e Allan que me ajudaram desde o primeiro momento, auxiliando no decorrer da pesquisa, sempre com paciência, dedicação e bom humor.

As técnicas Renata e Suellen, por além de sempre se disponibilizarem para retirar as dúvidas frequentes sobre os equipamentos utilizados se tornarem valorosas amigas.

Ao curso de Biotecnologia, por além de ter me fornecido o conhecimento necessário, me proporcionou a companhia das melhores pessoas que tive o privilégio de chamar de amigos (irmãos), a Gleyce e Robson agradeço a vocês por terem aceitado a dividir essa jornada comigo.

À todos os meus amigos, em especial a Camilla, Cíntia, Daianny, Gleyce, Flávia, Marciel, Maury, Robson e Wellinton pelo apoio, paciência e por se manterem ao meu lado nos momentos bons e ruins durante todos esses anos. Suas companhias sempre me renovaram nos momentos difíceis.

E, por fim, a quem esteve sempre ao meu lado me aturando e acompanhando a cada passo dessa caminhada, ao meu namorado Luis Henrique, por toda a força e positivismo dados em todos os momentos, por todo o seu amor, carinho e capacidade de me acalmar. És também parte da minha base e dos nomes mais importantes a citar!

A todos vocês deixo a minha gratidão e o mais sincero pedido de desculpas pela minha ausência e falta de atenção!

Eu aprendi...  
...que ignorar os fatos não os altera;

Eu aprendi...  
...que quando você planeja se nivelar com alguém, apenas está permitindo que essa  
pessoa continue a magoar você;

Eu aprendi...  
...que o AMOR, e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;

Eu aprendi...  
...que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;

Eu aprendi...  
...que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;

Eu aprendi...  
...que as oportunidades nunca são perdidas; alguém vai aproveitar as que você perdeu.

Eu aprendi...  
...que quando o ancoradouro se torna amargo a felicidade vai aportar em outro lugar;

Eu aprendi...  
...que não posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a respeito;

Eu aprendi...  
...que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento  
ocorre quando você está escalando-a;

Eu aprendi...  
...que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer.

**William Shakespeare**

## RESUMO

As plantas medicinais representam uma alternativa econômica, acessível e aplicável a diversas patologias, especialmente nos países em desenvolvimento. Dentre elas, a *Smilax campestris* Grisebach utilizada comumente pela população no tratamento de gripes, febres e resfriados e em doenças causadas por microrganismos. Tendo em vista a crescente busca por novos agentes antimicrobianos, o aumento da resistência dos microrganismos patogênicos frente ao uso intensivo de produtos sintéticos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para 18 microrganismos de interesse clínico por meio da técnica de microdiluição em caldo e teste antioxidante foi realizado com o radical livre DPPH. Também foi realizada a quantificação de flavonoides, fenóis e taninos. O extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade para *Staphylococcus epidermidis* (CIM= 1000 µg/mL) e também demonstrou uma boa atividade antioxidante com uma IC<sub>50</sub> de 13,1±0,1 µg/mL<sup>-1</sup>. Obteve a concentração de flavonoides de 70,3±1,6 mg EQ/g, fenóis 123,9±1,0 mg EAG/g e taninos condensados 11,8±0,1 mg ECA/g. Os resultados mostraram que a utilização do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach pode ser uma alternativa promissora para o controle desse microrganismo patogênico e como uma ótima fonte de antioxidante natural.

**Palavras Chaves:** plantas medicinais, japecanga, antimicrobiano, antioxidante, fitoquímica.



## ABSTRACT

Medicinal plants represent an economical alternative, accessible and applicable to several diseases, especially in developing countries. Among them, people to treat flu, fevers, colds and diseases caused by microorganism commonly use the *Smilax campestris* Grisebach. In view of the growing search for new antimicrobial agents, increasing resistance of pathogenic microorganisms against the intensive use of synthetic products, this study aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for 18 microorganisms of clinical interest through the broth microdilution technique and antioxidant test was carried out with free radical DPPH. Also quantitation of flavonoids, phenols and tannins been performed. The ethanolic extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach showed activity for *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 1000 ug/mL), and has shown good antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> of 13.1±0.1 ug/ml<sup>-1</sup>. Obtained the concentration of flavonoids of 70.3±1.6 mg EQ/g, phenols 123.9±1.0 mg GAE/g and condensed tannins 11.8±0.1 mg ACE/g. The results showed that the use of ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach may be a promising alternative for the control of this pathogenic organism and as a great source of natural antioxidant.

**Key words:** medicinal plants, japecanga, antimicrobial, antioxidant, phytochemical.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Japacanga ou salsaparrilha, *Smilax campestris* Grisebach..... 14

**Figura 2.** Fatores relacionados à ação dos antimicrobianos..... 17

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estudos desenvolvidos com <i>Smilax campestris</i> Grisebach.....	15
<b>Tabela 2.</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL do extrato de <i>Smilax campestris</i> Grisebach.....	35
<b>Tabela 3.</b> Quantificação de flavonoides, fenóis, taninos condensados e atividade antioxidante do extrato de <i>Smilax campestris</i> Grisebach.....	37

## ABREVIACOES

**AlCl<sub>3</sub>**: Cloreto de Alumínio

**ANVISA**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC**: American Type Culture Collection

**CBM**: Concentrao Bactericida Mínima

**CFM**: Concentrao Fungicida Mínima

**CH<sub>3</sub>COOK**: Acetato de Potássio

**CIM**: Concentrao Inibitória Mínima

**CLSI**: Clinical and Laboratory Standards Institute

**DMSO**: Dimethyl Sulfoxide

**DPPH**: 1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila

**EAG**: Equivalente de ácido gálico

**EAT**: Equivalente de ácido tnico

**ECA**: Equivalente de catequina

**EQ**: Equivalente de quercetina

**EROs**: Espécies reativas ao oxignio

**h**: Hora

**IC<sub>50</sub>**: Concentrao capaz de reduzir em 50% da concentrao inicial de DPPH

**M**: Molar

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**: Carbonato de sódio

**nm**: Nanmetros

**OMS**: Organizao Mundial da Saúde

***Smilax campestris* Griseb.**: *Smilax campestris* Grisebach

**RPMI 1640**: Meio sinttico complexo criado pelo Roswell Park Memorial Institute

**µg**: Microgramas

**µL**: Microlitros

**°C**: Graus Celsius

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	12
<b>2. Objetivos</b> .....	13
2.1. Objetivo Geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
<b>3. Revisão de Literatura</b> .....	13
3.1. Plantas Medicinais.....	13
3.2. <i>Smilax campestris</i> Grisebach.....	14
3.3. Antimicrobianos Naturais.....	16
3.4. Antioxidantes.....	18
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	20
<b>5. Artigo Científico</b> .....	27
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Material Vegetal.....	30
2.2. Obtenção do Extrato Etanólico.....	30
2.3. Atividade Antimicrobiana.....	30
2.3.1. Microrganismos.....	30
2.3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	31
2.3.3 Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	32
2.4. Ensaio Antioxidante com o Radical Livre DPPH.....	32
2.5. Análise Quantitativa de Compostos Fitoquímicos.....	33
3. Resultados e Discussão.....	34
4. Conclusão.....	38
5. Referências Bibliográficas.....	39
<b>6. Anexos</b> .....	45

## 1. Introdução

A procura por novas drogas com atividade antimicrobiana tem sido uma constante preocupação devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, o ressurgimento de várias infecções que pareciam ter sido controladas e o preocupante aumento da resistência de microrganismos. Sendo assim, a busca por fitoterápicos no tratamento de muitas doenças é uma das alternativas mais utilizadas nos últimos anos, devido aos bons resultados que estes proporcionam (HÖFLING et al., 2011).

Pesquisas com plantas medicinais e suas propriedades têm proporcionado a produção de medicamentos com custos reduzidos e, conseqüentemente, mais acessíveis à população (LOPEZ, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz o uso de plantas medicinais para tratamento de alguma enfermidade, desse total 30% foi por indicação médica. Desta forma, a OMS tem recomendado o uso de produtos naturais como uma terapia alternativa a fim de reduzir os custos dos programas de saúde pública (SILVA et al., 2012).

As plantas medicinais são muito utilizadas no Brasil. *Smilax campestris* Grisebach, popularmente conhecida como salsa-parrilha, é uma trepadeira frequentemente consumida na dieta e/ou fornecimento de matéria-prima para produção de material farmacêutico primário público (OZSOY et al., 2008).

Essa trepadeira é encontrada em regiões tropicais e subtropicais em diferentes locais do mundo. É comumente utilizada pela população na forma de infusões de suas folhas, raízes e rizomas no tratamento de doenças como a sífilis, gota, reumatismo, doenças da pele, asma, dores de dente, feridas, diuréticos, sudorífico, dor ocular, anti-inflamatórios, doenças vaginais causadas por fungos e como tônico refrescante para problemas digestivos (VANDERCOLME, 1947; MAGALHÃES, 1997; GARLET, 2000; MARTINS et al., 2012; RUGNA et al., 2013).

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante frente ao ensaio com o radical livre 1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila (DPPH), do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar a ação antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb. frente a bactérias e leveduras;
2. Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb.
3. Quantificar metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb.

## **3. Revisão bibliográfica**

### **3.1 Plantas Medicinais**

O Brasil possui uma grande biodiversidade e conseqüentemente tradição no uso de plantas medicinais como uma terapia alternativa no tratamento de inúmeras enfermidades (PIZZIOLO et al., 2011; SOARES, 2013). Apesar de ainda não haver comprovação de algumas das propriedades terapêuticas conferidas às plantas medicinais, 80% da população mundial depende de tratamentos com essas plantas para seus primeiros cuidados com a saúde. Assim, utilizam-se dos seus extratos e componentes ativos se baseando apenas nos resultados empíricos (PIZZIOLO et al., 2011; SOARES, 2013).

O efeito farmacológico encontrado em plantas medicinais é devido a substâncias químicas, que em sua maioria, são oriundas do seu metabolismo secundário, que possui uma função de relacionar a planta com o ambiente que a envolve. Essas substâncias do metabolismo secundário auxiliam as plantas na defesa química contra insetos e microrganismos ou podem interferir em processos simbióticos, apresentando grande importância para a adaptação e a propagação das espécies vegetais. Também são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas (DUARTE, 2006; OLIVEIRA et al., 2011; SOARES, 2013).

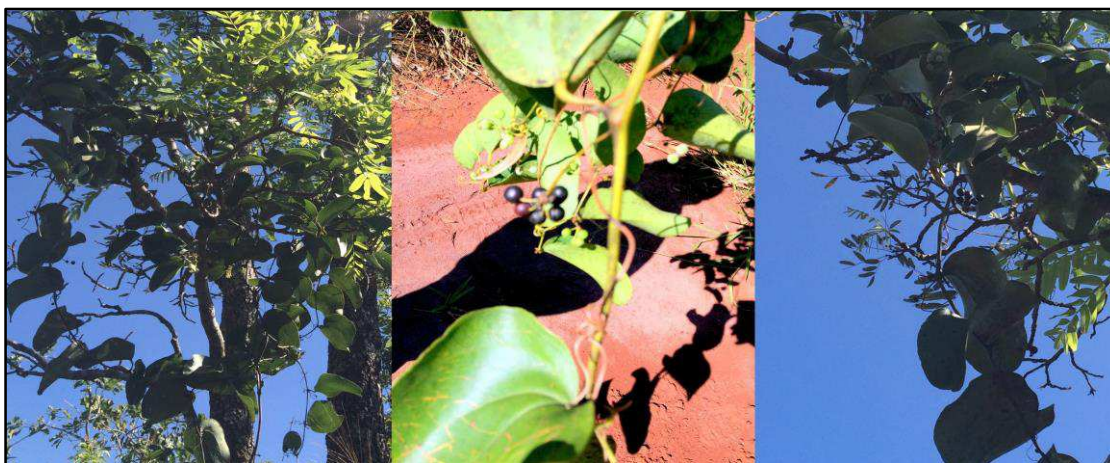
Muitos metabólitos secundários possuem grande valor comercial devido sua importância biológica (atividade antimicrobiana e antioxidante), exemplos de metabólitos secundários são o grupo dos compostos fenólicos, representado pelos alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos e cumarinas (AMORIM et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; LIMA NETO et al., 2015).

### 3.2 *Smilax campestris* Grisebach

O gênero *Smilax spp.* pertence à família Smilacaceae e possui aproximadamente 300 espécies (JUDD et al., 2009). No Brasil o gênero é representado aproximadamente por 30 espécies popularmente conhecidas como salsa-parrilha ou japecanga (SOUZA & LORENZI, 2005).

A espécie *Smilax campestris* Grisebach é uma trepadeira dióica, videira ou videira herbácea, que floresce no inverno e apresenta frutos na primavera e verão, as folhas são simples e alternas, possui pecíolos com gavinhas, venação acródroma primário; hastes mais espessas são rizóforos, caules aculeados e se encontra presente em vários países da América do Sul, distribuídas amplamente no Brasil (ANDREATA, 1997; RUGNA et al., 2013).

Ocorre em regiões temperadas e tropicais em bordas de florestas menos úmidas, particularmente em cerrados e florestas estacionais. No Brasil o uso de espécies da *Smilax spp.* para fins medicinais tem sido realizado desde o século 16, caracterizando como gênero mais importante da família (SOUZA & LORENZI, 2005; MEDEIROS et al., 2007; JUDD et al., 2009).



**Figura 1.** Japecanga ou salsaparrilha, *Smilax campestris* Grisebach (Fonte: Autor).



Popularmente é utilizada na forma de infusões de suas folhas, raízes para tratamento de doenças como a sífilis, gota, reumatismo, doenças da pele, asma, dores de dente, feridas, diuréticos, sudorífico, dor ocular e como tônico refrescante para problemas digestivos (VANDERCOLME, 1947; MARTINS et al., 2012; RUGNA et al., 2013).

Diversos estudos foram realizados para uma melhor descrição do seu potencial biológico, morfologia e taxonomia da espécie *Smilax campestris* Grisebach (Tabela 1.). A evolução nos estudos de metabólitos secundários da *Smilax campestris* demonstram a comprovação de efeitos farmacológicos presente em seus compostos de acordo com Rugna et al. (1999).

Outros estudos quantificaram a produção de flavonoides ou polifenóis de diversos órgãos observando se mantiveram constante ou não e se diferenciaram em perfil químico, sofrendo interferência da radiação solar, onde realizaram uma análise comparativa de extratos de plantas desenvolvidas em locais com alta radiação e outras com baixa e sempre distantes uma das outras para que não haja intervenções umas nas outras ocasionando erro experimental, outra fonte de variação considerada foi a herbivoria sofrida pelo ataque de predadores naturais da espécie vegetal (RUGNA et al., 2005; RUGNA et al., 2007; RUGNA et al., 2011).

**Tabela 1.** Estudos desenvolvidos com *Smilax campestris* Grisebach.

<b>Partes Utilizadas</b>	<b>Estudo Desenvolvido</b>	<b>Referencia</b>
Folhas, raízes e rizoforos	Diferenciar espécimes masculinos de femininos pela produção flavonoides.	Rugna et al., (2002)
Folhas	Capacidade antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por meio de difusão em ágar.	Coelho de Souza et al., (2004)
Folhas e raízes	Determinar a taxonomia química e incidência de linhagens toxinogênicas de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Fusarium</i>	Rizzo et al., (2004)
Folhas	Observar oscilações na concentração de polifenóis.	Rugna et al., (2008)
Raízes e rizoforos	Descrição da morfoanatomia dos órgãos vegetativos subterrâneos e avaliação de interferência ambiental	MARTINS et al., (2010)

Toda a planta	Descrição sobre a morfologia e estudo sobre a germinação	MARTINS et al., (2012)
Partes aéreas	Descrição da morfoanatomia dos órgãos vegetativos aéreos	MARTINS et al., (2013)

### 3.4 Antimicrobianos Naturais

Agentes antimicrobianos são produtos do metabolismo secundário que inibem e/ou destroem o processo de crescimento de outros organismos, mesmo quando usados em baixas concentrações, correspondem a uma classe de fármacos que é consumida frequentemente em hospitais e na comunidade. Entretanto não afetam somente aos pacientes que os utilizam, mas também interferem de forma significativa na ecologia microbiana presente no local (ANVISA, 2007; MELO et al., 2012).

Atualmente muitos microrganismos patogênicos estão a desenvolver resistência aos antibióticos disponíveis, devido a grande pressão da seleção natural (CASTILLO & LING, 2014). Os microrganismos já selecionados naturalmente que possuem os genes de resistência, em especial as bactérias, são capazes de transmitir esses genes entre populações da mesma espécie ou espécies diferentes estritamente relacionadas, através da disseminação de genes de um organismo para o outro sendo mediados por plasmídeos ou por transposons (MELO & PERUSSI, 2012; TORTORA et al., 2012).

Diversos são os mecanismos que oferecem resistência a antibióticos apresentados pelos microrganismos, ressaltando entre eles a arquitetura da parede celular modificada, que diminuem a concentração intracelular do antimicrobiano por meio da impermeabilização da parede ou devido às bombas de efluxo que o bombeiam ativamente para fora da célula; inativação do antimicrobiano pela destruição ou modificação do mesmo; a alteração do local de ação do antimicrobiano, modificando a proteína de mutação alvo de antimicrobianos para reduzir a eficiência de ligação (MELO & PERUSSI, 2012; CASTILLO & LING, 2014).

A resistência microbiana pode causar infecções muito difíceis de serem tratadas, permanecendo no local e favorecendo a proliferação de microrganismos. Esse evento ocorre em maior proporção em ambientes hospitalares onde a incidência do uso dessas drogas, é proposta em grande quantidade (KADOSAKI et al., 2012).

O fato de que o processo de ganho de resistência microbiana é frequentemente mais rápido que o método de desenvolvimento de novas drogas, estabelecendo uma

grande consequência que é a falta de tratamentos disponíveis para serem administrados como opção em último caso (GRILLO et al., 2013), carecendo ainda mais de novos antimicrobianos.

O conhecimento dos princípios gerais que norteiam o uso de antimicrobianos, assim como das propriedades e características básicas dos antimicrobianos disponíveis, auxiliam a escolha terapêutica adequada, que permita o antimicrobiano exercer sua função de maneira adequada, para tal fim primeiramente deve-se atingir a concentração ideal, que seja capaz de atravessar a parede celular, manifestar afinidade pelo sítio de ligação no interior do microrganismo e por fim permanecer tempo suficiente para desempenhar seu efeito inibitório (Figura 2) (ANVISA, 2007; WOOLHOUSE & WARD, 2013).



**Figura 2.** Fatores relacionados à ação dos antimicrobianos (Adaptado de ANVISA, 2007).

A utilização dos mesmos antimicrobianos por longos períodos e indiscriminadamente proporciona um ambiente propício a resistência microbiana, tornando-se necessário a bioprospecção de propriedades antimicrobianas, impulsionando diferentes estudos de novas fontes naturais fornecedoras de antimicrobianos, uma alternativa eficaz e econômica aos fármacos industriais (VARGAS et al., 2004).

As plantas medicinais têm recebido grande importância na bioprospecção de antimicrobianos naturais, por isso tem aumentado os estudos que visam à utilização de produtos naturais com atividades biológicas. Como no estudo desenvolvido por Höfling et al. (2010) que avaliou extratos de diclorometano e metanol de algumas plantas (*Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Arrabidaea chica*, *Tabebuia avellanedae*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini*) contra linhagens do gênero *Candida* através de testes de

concentração inibitória mínima, buscando uma alternativa para o tratamento das linhagens já resistentes aos medicamentos comerciais. A pesquisa realizada por Bastos et al. (2011) também analisou plantas utilizadas na medicina popular da cidade de Fortaleza-CE, preparadas de forma caseira no tratamento de doenças infecciosas, averiguando seu potencial antimicrobiano nos testes *in vitro*.

Rocha et al. (2013) efetuou um estudo com extratos etílicos de folhas e cascas de seis plantas do semiárido paraibano, sendo elas: folhas e cascas de quixabeira (*Syderoxylum obtusifolium* Roem e Schult), ipê rosa (*Tabebuia pentaphylla* Vell.) e João-mole (*Guapira graciliflora* Mart.), e somente folhas de mororó (*Bauhinia forficata* Linn), angico (*Anadenanthera colubrina* Brenan) e umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), para verificar o potencial antimicrobiano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. A pesquisa desenvolvida por Rogatto et al. (2014) teve como foco caracterizar o potencial antimicrobiano da espécie vegetal *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer, onde o extrato etanólico foi avaliado por meio da técnica de difusão em ágar. Já no trabalho desenvolvido por Santos et al. (2015) foi realizado quatro frações do extrato etanólico de uma única planta (*Pouteria venosa*) para investigar o seu potencial antimicrobiano e citotóxico.

### 3.5 Antioxidantes

Substâncias capazes de impedir o estresse oxidativo, amenizando o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e/ou quelando íons metálicos, evitando a peroxidação lipídica são denominadas de antioxidantes, estas encontram-se presentes em alimentos de origem vegetal que são consumidos diariamente evitando efeitos negativos nas funções fisiológicas humanas (PIENIZ et al., 2009; CORONADO et al., 2015).

EROs ou radicais livres são subprodutos do metabolismo celular aeróbico (ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio), liberados durante a transição de elétrons pela rota de ação catalítica de enzimas, estando em quantidades adequadas atuam como moduladoras de processos biológicos internos, incluindo a sinalização da transdução, transcrição ou morte programada (CUI et al., 2004; PIENIZ et al., 2009; SOARES, 2013), porém quando estas se acumulam no organismo gera uma situação de estresse, onde o nosso organismo gera uma situação de desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes para se proteger, resultando no quadro de estresse oxidativo (DALLAQUA & DAMASCENO, 2011). Este quadro de estresse induzido por radicais livres está envolvido no envelhecimento acelerado, na patogênese de várias doenças

(SOARES, 2013) e diversas formas de dano celular, tais como peroxidação de lipídios de membrana, agressão as proteínas dos tecidos e membranas, as enzimas e DNA, desencadeando inúmeras doenças (BERNAUD & FUNCHAL, 2011), esse envolvimento é sugerido por muitas evidências bioquímicas, biológicas e clínicas (SOARES, 2013).

Para combater ou prevenir estes prejuízos, o organismo conta com defesas antioxidantes produzidos endogenamente ou fornecidas através da dieta, porém os componentes da dieta podem alterar o balanço antioxidante do organismo (BERNAUD & FUNCHAL, 2011). As células possuem muitas maneiras de controlar a produção de espécies reativas ao oxigênio que estão acumuladas no organismo (SOARES, 2013). Os antioxidantes agem nas três linhas de defesa orgânica contra as espécies reativas de oxigênio (SAMPAIO & ALMEIDA, 2009).

A primeira linha é a de prevenção, se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras (SAMPAIO & ALMEIDA, 2009), ingestão de antioxidantes endógenos enzimáticos, como o superóxido dismutase, a catalase e o sistema de glutatona, dentre elas, glutatona redutase e glutatona peroxidase. Existe também os antioxidantes não enzimáticos que são lipossolúveis e hidrossolúveis (DALLAQUA & DAMASCENO, 2011). A segunda linha é a interceptação, nessa fase é necessário a captura dos radicais livres já formados pelos antioxidantes antes que iniciem suas atividades prejudiciais (ROCK et al., 2000). A última linha é o reparo, realiza-se somente quando as linhas de defesas anteriores não são efetivas (ROCK et al., 2000).

Mais atenção tem se dado aos antioxidantes naturais que podem servir como uma medicina preventiva para proteger o organismo humano contra os radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas (SOARES, 2013). Diversos pesquisadores têm investigado plantas que possam possuir substâncias com efeito antioxidante devido aos conhecimentos adquiridos sobre a formação de EROs e os antioxidantes presentes em nosso organismo para se defender contra o estresse oxidativo exacerbado (DALLAQUA & DAMASCENO, 2011).

No estudo desenvolvido por Emerenciano et al. (2013) teve como objetivo desenvolver pesquisas com a espécie vegetal *Azadirachta indica*, onde realizaram-se análises para avaliarem a propriedade antioxidante, teores de umidade, cinzas, minerais, contribuindo com novos dados sobre essa planta utilizada na medicina e comercializada em vários países. Já no trabalho realizado por Assumpção et al. (2014) foi analisado a atividade antioxidante, composição química, compostos voláteis e estudos fitoquímicos

preliminar de compostos fenólicos e o potencial citotóxico da *Hancornia speciosa*, que se resalta pela excelente capacidade comercial.

Nascimento et al. (2015) efetuou pesquisas em busca de novos flavonoides com potencial antioxidante do extrato etanólico de folhas e talos *Margaritopsis carrascoana*, que não possuía até então perfil fitoquímico contribuindo com conhecimento para melhor descrição do gênero *Margaritopsis*. E Viana et al. (2015) desenvolveu estudos em busca da atividade antioxidante e determinação da composição fitoquímica de hortaliças não convencionais, como beldroega (*Portulaca oleracea*), bertalha (*Basella rubra*), caruru (*Amaranthus viridis*) peixinho (*Stachis lanata*) e azedinha (*Rumex acetosa*).

#### 4. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de Educação para a Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e o uso Racional de Antimicrobianos, RMcontrole. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2007. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm)>. Acesso em 4 de agosto de 2016.

AMORIM, E.L.C.; et al., simple and accurate procedure for determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Func. Eco.**, v.2, p. 88-94, 2008.

ANDREATA, R.H.P. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax Linnaeus* (Smilacaceae). **Pesqui. Bot.** 47: 7-244, 1997.

ASSUMPCÃO, C.F.; BACHIEGA, P.; MORZELLE, M.C.; NELSON, D.L.; NDIAYE, E.A.; RIOS, A.O.; SOUZA, E.C. Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. **Ciê. Ru.**, Santa Maria, v.44, n.7, p.1297-1303, 2014.

BASTOS, G.M.; NOGUEIRA, N.A.P.; SOARES, C.L.; MARTINS, M.R.; ROCHA, L.Q.; TEIXERA, A.B. In vitro determination of the antimicrobial potential of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. **J. B. and App. Phar. Sci.**, 32(1):113-120, ISSN 1808-4532, 2011.

BERNAUD, F.S.R.; FUNCHAL, C. Atividade antioxidante do açaí. **Nut. Bra.**-setembro/outubro 10(5), 2011.

CASTILLO, C.F.G.; LING, M.H.T. Resistant Traits in Digital Organisms Do Not Revert Preselection Status despite Extended Deselection: Implications to Microbial Antibiotics Resistance. **BioMed Res. Inter.**, 2014.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELIASABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J. Ethno.**, vol.90, p.135–143, 2004.

CORONADO, M.H.; VEGA Y LEÓN, S.; GUTIÉRREZ, R.T.; VÁZQUEZ, M.F.; RADILLA, C.V. Antioxidants: present perspective for the human health. **Rev Chil Nutr**, vol. 42, n.2, p.206-212, 2015.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; MURTHY, M.R.V. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Prog. Neu.-Psycho. & Bio. Psy.** 28, 771-799, 2004.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do *Diabetes mellitus* em animais: artigo de atualização. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.3, p.367-373, 2011.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana De Plantas Medicinai s E Aromáticas Utilizadas No Brasil. **MultiCie.**: Construindo a História dos Produtos Naturais #7, Outubro 2006.

EMERENCIANO, D.P.; CRUZ, A.M.F.; PEREIRA, J.D.S.; MOURA, M.F.V.; MACIEL, M.A.M. Determination of Antioxidant Property and Minerals Contained in the leaves of *Azadirachta indica* A. Juss. **Rev. Fit.** Rio de Janeiro, vol. 8(2): 73-160, 2013.

GARLET, T.M.B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brazil.** M.Sc. tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 211 pp, 2000.

GRILLO, V.T.R.S.; GONÇALVES, T.G.; CAMPOS, J.J.; PANIÁGUA, N.C.; TELES, C.B.G. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Rev. Cie. Far. Bás. Ap.**, 34(1): p.117-123, 2013.

HÖFLING, J.F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G.A.; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F.; FOGGIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Braz. J. Biol.**, vol. 70, no. 4, p. 1065-1068, 2010.

HÖFLING, J.F.; MARDEGAN, R.C.; ANIBAL, P.C.; FURLETTI, V.F.; FOGGIO, M.A. Evaluation of Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts Against Oral *Candida albicans* and Proteinases. **Mycop.**, v. 172, n. 8, p. 117–124, 2011.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Pl. Syst.: phyl. app.**, 3rd ed., 87893-407-2, 2009.

KADOSAKI, L.L.; SOUSA, S.F.; BORGES, J.C.M. Analysis of use and bacterial resistance to antimicrobial in level hospital. **Bra. J. Pha.**, 93(2): 128-135, 2012.

LIMA NETO, G.A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W.T.; FERREIRA, W.R.; DIAS DA SILVA, Y.S.A.; PAZIN, G.V.; VIOLANTE, I.M.P. Quantification of secondary metabolites and antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants from the Cerrado of the Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

MAGALHÃES, R.G. Plantas medicinais na região do Alto Uruguai, RS: conhecimentos de João Martins Fiúza, “Sarampião”. M.Sc. thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 172p, 1997.

MARTINS, A.R.; PÜTZ, N.; SOARES, A.N.; BOMBO, A.B.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. New approaches to underground systems in Brazilian *Smilax* species (Smilacaceae). **J. T. Bot. Soc.**, 137(2–3): p.220-235, 2010.



MARTINS, A.R.; BOMBO, A.B.; SOARES, A.N.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. Aerial stem and leaf morphoanatomy of some species of *Smilax*. **Bra. J. Pha.**, 23(4): 576-584, 2013.

MARTINS, A.R.; SOARES, A.N.; BOMBO, A.B.; FIDELIS, A.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. Germination and seedling morphology of four South American *Smilax* (Smilacaceae). **Int. J. Trop. Biol.** ISSN-0034-7744, vol.60 (1): 495-504, 2012.

MEDEIROS, M.F.T.; VALLE, L.S.; ANDREATA, R.H.P. Histórico e o uso da “salsa parrilha” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento. **Rev. Bra. Bioc.**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 27-29, jul. 2007.

MELO, V.V.; DUARTE, I.P.; SOARES, A.Q. **G. Antim.** 1.ed. - Goiânia, 2012. 62 p.

MELO, W.C.M.A.; PERUSSI, J.R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Rev. Cie. Far. Bás. Ap.**, 2012. 33(3): 331-340 p.

NASCIMENTO, R.R.G.; MONTEIRO, J.A.; PIMENTA, A.T.A.; TREVISAN, M.T.S.; BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, E.B.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S. New flavonoids from *Margaritopsis carrascoana* with antioxidant activity. **Quim. Nova**, vol. 38, No. 1, 60-65, 2015.

OLIVEIRA, L.S.; MUZITANO, M.F.; COUTINHO, M.A.S.; MELO, G.O.; COSTA, S.S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Int. Sci. Pla.**, ano.4, n.17, ISSN 1679-9844, p.54-74, 2011.

OZSOY, N.; CAN, A.; YANARDAG, R.; AKEV, N. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110(3), 571e583, 2008.

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V.R.; ESTEFANEL, V.; ANDREAZZA, R. In vitro assessment of the antioxidant potential of fruits and vegetables. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 33, n. 2, p. 552-559, 2009.

PIZZIOLO, V.R.; BRASILEIRO, B.G.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.1, p.98-109, 2011.

RIZZO, I.; VEDOYA, G.; MAURUTTO, S.; HAIDUKOWSKI, M.; VARSASKY, E. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. **Micro. Res.**, vol.159, p.113–120, 2004.

ROCHA, E.A.L.S.S.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVÃO, D.M.B.M.; COSTA, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **J. Bas. App. Phar. Sci.**, 34(3):351-355 ISSN 1808-4532, 2013.

ROCK, C.L.; MICHAEL, C.W.; REYNOLDS, R.K.; RUFFIN, M.T. Prevention of cervix cancer Crit. **Rev Oncol Hematol.** 33(3):169-85, 2000.

ROGATTO, J.M.; FERREIRA, M.C.C.; ONO, R.M.; CARVALHO, L.C.; SOARES, D.F.; VIEIRA, D.C.M.; CHAVASCO, J.K. Caracterização do potencial antimicrobiano de *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer. **Rev. Uni. V. Rio Verde**, Três Corações, v. 12, n. 1, p. 886-894, 2014.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Estudio Variacional de Flavonoles en Ejemplares Masculinos y Femeninos de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Acta Farm. Bom.**, vol. 21 (2): p.119-21, 2002.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Fitoquímica comparativa de flavonoides en los diferentes órganos de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Dom.**, vol.21: p.17–23, 2005.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Phenological variations of polyphenols in *Smilax campestris* (Smilacaceae). **Turk J Bot**, v.37: p.350-354 © TÜBİTAK doi:10.3906/bot-1112-15, 2013.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Progress in studies on flavonols from *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Acta Hort.**, vol.501: p.191–194, 1999.

RUGNA, A.Z.; RICCO, R.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Efectos de la radiación solar sobre la producción de polifenoles en ejemplares femeninos de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Latin Ame. J. Pha.**, vol.26: p.420–423, 2007.

RUGNA, A.Z.; RICCO, R.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Variaciones cualicuantitativas en la producción de polifenoles en hojas de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) sanas y atacadas por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. (Heliconidae). **Dom.**, vol.27: p.27–33, 2011.

RUGNA, A.Z.; RICCO, R.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) según su grado de desarrollo. **Latin Ame. J. Pha.**, vol.27: p.247–9, 2008.

SAMPAIO, L.C.; ALMEIDA, C. F. Vitaminas Antioxidantes na Prevenção do Câncer do Colo Uterino. **Rev. Bra. Canc.**; 55(3): 289-296, 2009.

SANTOS, R.F.E.P.; SILVA, I.S.M.; VERÍSSIMO, R.C.S.S.; LÚCIO, I.M.L.; CAMPESATTO, E.A.; CONSERVA, L.M.; BASTOS, M.L.A. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.3, p.367-373, 2015.

SILVA, S.M.F.Q. *et al.* Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Cie. S. Col.**, v. 17, n. 6, p. 1649-1656, 2012.

SOARES, J.J. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Fundação Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, 05-6639, CDD-581.012. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Micro.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VANDERCOLME, E. História botânica e terapêutica das salsaparrilhas. **Rev. Flora Med.** 7: 316-524, 1947

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M.S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Cie. R.**, v.34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VIANA, M.M.S.; CARLOS, L.A.; SILVA, E.C.; PEREIRA, S.M.F.; OLIVEIRA, D.B.; ASSIS, M.L.V. Composição fitoquímica e potencial antioxidante em hortaliças não convencionais. **Hort. Bra.**, vol. 33: p.504-509, 2015.

WOOLHOUSE, M.E.J.; WARD, M.J. Sources of Antimicrobial Resistance. **Sci.** Vol. 341 no. 6153 pp. 1460-1461. DOI: 10.1126/science.1243444, 2013.

## 5. Artigo Científico

### Propriedade antimicrobiana e atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach.

XXX<sup>1</sup>, XXX, XXX

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal da Grande, Dourados, Brasil.

#### RESUMO

Dentre as plantas medicinais, a *Smilax campestris* Grisebach utilizada comumente pela população no tratamento de gripes, febres e resfriados e em doenças causadas por microrganismos por ser uma alternativa econômica e acessível. Tendo em vista a crescente busca por novos agentes antimicrobianos, o aumento da resistência dos microrganismos patogênicos frente ao uso intensivo de produtos sintéticos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para 18 microrganismos de interesse clínico por meio da técnica de microdiluição em caldo e teste antioxidante foi realizado com o radical livre cromóforo DPPH. Também foi realizada a quantificação de flavonoides, fenóis e taninos. O extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade para *Staphylococcus epidermidis* (CIM= 1000 µg/mL) e também demonstrou uma boa atividade antioxidante com uma IC<sub>50</sub> de 13,1±0,1 µg/mL<sup>-1</sup>. Obteve a concentração de flavonoides de 70,3±1,6 mg EQ/g, fenóis 123,9±1,0 mg EAG/g e taninos condensados 11,8±0,1 mg ECA/g. Os resultados demonstraram que a utilização do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach pode ser uma alternativa propícia para o controle desse microrganismo patogênico e como uma ótima fonte de antioxidante natural.

**Palavras Chaves:** plantas medicinais/ japecanga/ antimicrobiano/ antioxidante/ fitoquímica.

## ABSTRACT

Among the medicinal plants, the *Smilax campestris* Grisebach used commonly by the population in the treatment of colds, fevers and colds and diseases caused by microorganisms to be an economical and affordable alternative. In view of the growing search for new antimicrobial agents, increasing resistance of pathogenic microorganisms against the intensive use of synthetic products, this study aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for 18 microorganisms of clinical interest through the broth microdilution technique and antioxidant test was carried out with free radical DPPH chromophore. Also quantitation of flavonoids, phenols and tannins been performed. The ethanolic extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach showed activity for *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 1000 ug/mL), and has shown good antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> of 13.1±0.1 ug/ml<sup>-1</sup>. Obtained the concentration of flavonoids of 70.3±1.6 mg EQ/g, phenols 123.9±1.0 mg GAE/g and condensed tannins 11.8±0.1 mg ACE/g. The results showed that the use of the ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach might be a suitable alternative for the control of this pathogenic organism and as a great source of natural antioxidant.

**Key words:** medicinal plants/ japecanga/ antimicrobial/ antioxidant/ phytochemical.

## 1. Introdução

Muitos microrganismos possuem capacidade genética de conseguir ganhar resistência a antibióticos comumente usados em tratamentos terapêuticos convencionais [1], impulsionando o desenvolvimento de novos estudos na área da bioprospecção de antimicrobianos naturais.

A utilização de plantas medicinais como fitoterápicos tem ganhando destaque na busca de antimicrobianos naturais, pois estes possuem custos reduzidos podendo ser associados a tratamentos primários na saúde pública [2, 3, 4, 5]. Outro ponto que lhes agrega interesse é sua colaboração como fonte de matéria prima para fármacos, devido a presença de diversos constituintes químicos oriundos de seu metabolismo secundário, como sendo os taninos que são encontrados em maior quantidade e os alcaloides em concentrações menores [6, 7].

O gênero *Smilax* ssp. possui cerca de 300 espécies, normalmente encontradas em regiões com de clima subtropical e tropical ao longo do mundo. São usadas como alimento e para o tratamento de enfermidades como terapia alternativa primária, por meio de infusões de seus órgãos vegetativos [8].

As infusões feitas a partir de *Smilax campestris* Grisebach são comumente empregadas na medicina popular, as de suas partes aéreas são produzidas bebidas tônicas, refrescantes e digestivas, enquanto que suas partes subterrâneas são preparadas para tratamento de sífilis, reumatismo, diurético, sudorífico, antirreumático, em certas doenças da pele, tratamento da psoríase e antioxidante [9, 10, 11]. No entanto, ainda não temos relatos sobre a sua atividade antimicrobiana. Desta forma o nosso objetivo foi avaliar a atividade antimicrobiana e atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Material Vegetal**

As folhas de *Smilax campestris* Grisebach foram coletadas na Fazenda Santa Madalena (S 22°14'33.8'' W 054°48'56.1''), durante os meses de agosto a setembro de 2014. A exsiccata foi identificada no número de registro 5243, e depositada no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados.

### **2.2. Obtenção do Extrato Etanólico**

As folhas de *Smilax campestris* Grisebach foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 30°C por sete dias. Após a secagem o material foi pulverizado em moinho de facas, pesado e armazenado em local seco sem umidade. O material botânico seco e pulverizado foi misturado em 1000 mL de álcool etílico absoluto a 99,5% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e deixado à temperatura de 25°C por 72h, com agitações ocasionais. A solução foi filtrada e após foi completamente evaporada à 35°C, em rota-evaporador (Rotaevapor R – 215) e liofilizada em liofilizador (E-C MicroModulyo) acoplado a bomba de vácuo (valuPump VLP80 Savant). Após liofilizada foi devidamente identificada e armazenada (Laboratório de Microbiologia Aplicada).

### **2.3. Atividade Antimicrobiana**

#### **2.3.1. Microrganismos**

Foram testados microrganismos provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Candida*



*albicans* (ATCC 90028), *Candida dubliniensis* (ATCC MYA 646), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida krusei* (ATCC 6558), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

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

A Concentração Inibitória Mínima do extrato foi determinada por meio de técnica de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes do *Clinical Laboratory Standards Institute* [12, 13].

As bactérias foram cultivadas em ágar Triptona de Soja (Himedia) à 37°C por 24 h e a concentração do inóculo foi ajustado para  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, já as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia) e incubados à 35°C por 48 h e a concentração do inóculo foi ajustado para  $2,5 \times 10^8$  UFC/mL. O extrato etanólico foi dissolvido em Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) e realizado diluições em série (1: 2) com o caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para leveduras e caldo Müller Hinton (Himedia) para bactérias obtendo as concentrações de 1,9 µg/mL à 1000µg/mL. As concentrações dos extratos e o inóculo dos microrganismos foram distribuídas em placas de microdiluição com 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) e incubadas a 35°C por 48 horas para leveduras e 37°C por 24 horas para bactérias. Para o controle do ensaio das bactérias foi utilizado o antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich) e para leveduras o antifúngico fluconazol (Sigma-Aldrich).

A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato no qual os microrganismos não apresentaram crescimento visível após incubação [14]. Assim, foram considerados os seguintes parâmetros para avaliar o potencial antimicrobiano do extrato: concentração inferior a  $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ , a atividade antimicrobiana boa; 100 a  $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$  a atividade antimicrobiana moderada; 500 a  $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$  a atividade antimicrobiana fraca e superior a  $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$  do extrato é considerada inativa [15].

O teste foi realizado em triplicata e em três momentos diferentes.

### **2.3.3 Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com Bagiu et al., 2012 [16]. Alíquotas da placa de microdiluição do CIM foram transferidas para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco), para avaliação da ação fungicida e para avaliação bactericida foram transferidas alíquotas para uma placa de Petri contendo ágar Müller Hinton (Himedia). As placas foram incubadas a  $35^\circ \text{C}$  por 48 horas para avaliação fungicida e a  $37^\circ \text{C}$  por 24 horas para avaliação bactericida. A CFM e a CBM foram definidas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de colônias.

### **2.4. Ensaio Antioxidante com o Radical Livre 1,1 – difenil–2 picril–hidrazila (DPPH)**

O teste antioxidante com o radical livre DPPH (1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila) foi utilizado para determinar a atividade antioxidante empregando uma solução de  $40 \mu\text{g/mL}$  de DPPH preparado em metanol. A amostra foi analisada empregando diferentes concentrações do extrato, sendo 10 a  $200 \mu\text{g/mL}^{-1}$  (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175,  $200 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ) [17]. Para cada 1 mL de solução DPPH foram adicionados 0,5 mL da

solução preparada. A mistura foi agitada imediatamente após a adição de DPPH e deixada em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, foi realizada leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm. Através das absorvâncias foi calculado o percentual de inibição (PI) conforme Kumaran e Karunakaran, 2006 [18], resultando na concentração de IC<sub>50</sub>, concentração capaz de reduzir em 50% da concentração inicial de DPPH.

Todos os testes foram realizados em triplicata.

## **2.5. Análise Quantitativa de Compostos Fitoquímicos**

A quantificação de flavonoides foi realizada pelo método descrito por Lin e Tang, 2007 [19]. 0,1g de extrato foi dissolvida em 100 mL de água deionizada e uma alíquota (500 µL) desta solução foi acrescentada com 1,5 mL de álcool a 95%, 0,1 mL de hexa-hidrato de cloreto de alumínio 10% (AlCl<sub>3</sub>), 0,1 mL de acetato de potássio 1 M (CH<sub>3</sub>COOK), e 2,8 mL de água deionizada, incubados à temperatura ambiente por 40 minutos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 415 nm. Os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de quercetina (mg QE) por grama de extrato etanólico.

Fenóis foram ensaiados com as mesmas amostras utilizadas na quantificação dos flavonoides, conforme Djeridane et al., 2006 [20]. A cada 100 µL de amostra foi adicionado 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada, incubadas à temperatura ambiente durante 1 min. Após 1 min, foi adicionado a esta solução, 1,5 mL de carbonato de sódio a 20% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e incubadas por 2 horas no escuro, à temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi realizada com comprimento de onda de 760 nm. Os resultados são expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por grama de extrato etanólico. Os taninos foram quantificados utilizando a reação de

vanilina, de acordo com Broadhurst e Jones, 1978 e adaptada por Agostini-Costa et al., 1999 [21, 22]. 5 mL de reagente recém-preparado de vanilina (vanilina-HCl-metanol 4:10:86) foi adicionado em cada tubo de ensaio e foi acrescentado 1 mL de extrato em cada tubo, agitando em vórtex por 30 segundos. A reação foi mantida em repouso por 15 minutos e fez-se a leitura da absorbância a 490 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de catequina equivalente (mg CAE) por grama de extrato.

Todos os testes aplicados foram realizados em triplicata.

### 3. Resultados e Discussão

O extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade antimicrobiana para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* com uma concentração inibitória mínima de 1000 µg/mL. Para os demais microrganismos testados, o extrato etanólico não apresentou atividade dentro das concentrações testadas (Tabela 2.). A espécie mais encontrada do gênero *Staphylococcus* em infecções hospitalares é o *Staphylococcus epidermidis*, presente na pele humana, normalmente inofensivo, porém é um patógeno oportunista. *Staphylococcus epidermidis* causa infecções severas em neonatos, indivíduos com imunidade baixa internados por longos períodos, além de ser causador de cerca de 50 a 70% das infecções relacionadas com cateteres [23, 24].

Coelho de Souza e colaboradores (2004) [25] avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico das partes aéreas, de *Smilax campestris* Grisebach pela técnica de difusão em disco e verificaram que os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram perfil de resistência ao extrato.

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL do extrato de *Smilax campestris* Grisebach.

Microrganismos	<i>Smilax campestris</i> Griseb.			FLU**	AMP*	CLO
	CIM	CFM	CBM	CIM	CIM	CIM
<b>Leveduras</b>						
<i>Candida albicans</i>	-	-	o	2	o	o
<i>Candida dubliniensis</i>	-	-	o	0,25	o	o
<i>Candida glabrata</i>	-	-	o	8	o	o
<i>Candida krusei</i>	-	-	o	32	o	o
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	o	2	o	o
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	o	1	o	o
<b>Gram positiva</b>						
<i>Bacillus cereus</i>	-	o	-	o	32	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	o	-	o	32	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1000	o	-	o	64	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	o	-	o	0,25	0,25
<b>Gram negativa</b>						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	o	-	o	-	2
<i>Escherichia coli</i>	-	o	-	o	32	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	o	-	o	0,25	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	o	-	o	64	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	o	-	o	32	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	o	-	o	-	64
<i>Proteus mirabilis</i>	-	o	-	o	32	8
<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	o	-	o	32	2
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	o	-	o	32	2

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; (-): Ausência de atividade antimicrobiana; (o): Não testado; AMP: Ampicilina; FLU: Fluconazol; CLO: Cloranfenicol.

Esses dados sugerem que variação na atividade antimicrobiana com extratos da mesma espécie pode estar relacionada a diferentes fatores como: tipo de solvente utilizado no processo de extração, condições de sazonalidade e características da matéria-prima [26].

Estudos realizados com outras espécies vegetais contra *Staphylococcus epidermidis* constataram valores de concentração inibitória mínima inferiores a evidenciada neste trabalho, como: 250 µg/mL [27] e 100 µg/mL<sup>-1</sup> [28].

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio com radical cromóforo DPPH, que expressa o resultado obtido por meio da IC<sub>50</sub> que representa a quantidade necessária de amostra para redução de 50% da concentração inicial de DPPH, onde o menor valor simboliza a maior capacidade antioxidante do extrato [29]. O extrato etanólico de *Smilax campestris* Grisebach apresentou uma boa atividade IC<sub>50</sub> de 13,1±0,1 µg/mL<sup>-1</sup> (Tabela 3.), quando comparado com a vitamina C (IC<sub>50</sub> de 6,13 µg/mL<sup>-1</sup>) e o flavonoide rutina (IC<sub>50</sub> de 6,71 µg/mL<sup>-1</sup>), que são considerados potentes antioxidantes.

Ao e colaboradores (2011) [8] avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de rizomas e raízes de diferentes frações *Smilax sebeana* Miq., e obtiveram os seguintes resultados: fração hexano IC<sub>50</sub> 7,5 mg/mL; acetato de etila IC<sub>50</sub> 71,7 mg/mL; de, n-butanol IC<sub>50</sub> 50,8 mg/mL e extrato aquoso IC<sub>50</sub> 4,8 mg/mL.

Seo e colaboradores (2012) [30] também avaliaram o potencial antioxidante de diferentes frações do extratos da *Smilax china*, e obtiveram os seguintes dados: metanol IC<sub>50</sub> 97.40 ± 7.09 µg/mL; etanol IC<sub>50</sub> 49,93 ± 1,88 µg/mL; acetona IC<sub>50</sub> 85.74 ± 0.39 µg/mL; água IC<sub>50</sub> 1,006.63 ± 5.28 µg/mL. Já no trabalho desenvolvido com extrato de *Smilax macrophylla* em diferentes solventes, Zubair e colaboradores (2013) [31], obteve os seguintes resultados n-hexano IC<sub>50</sub> 72,3 ± 0,15 µg/mL; clorofórmio IC<sub>50</sub> 55,2 ± 0,09 µg/mL; acetato de etila IC<sub>50</sub> 42,4 ± 0,10 µg/mL; n-butanol IC<sub>50</sub> 48,3 ± 0,07 µg/mL;

metanol absoluto  $IC_{50}$   $33,4 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ ; metanol a 95%  $IC_{50}$   $38,1 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$  e metanol a 90%  $IC_{50}$   $45,8 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ .

Com base nos resultados das três espécies de *Smilax* apresentados acima, podemos verificar que o  $IC_{50}$  do extrato etanólico de *Smilax campestris* obtido pelo teste de DPPH neste estudo apresentou uma boa atividade antioxidante quando comparado com as demais espécies do mesmo gênero.

**Tabela 3.** Quantificação de flavonoides, fenóis, taninos condensados e atividade antioxidante do extrato etanólico de *Smilax campestris* Grisebach.

Espécie Vegetal	Análise Fitoquímica			Atividade Antioxidante
	Flavonoides (mg EQ/g)	Fenóis (mg EAG/g)	Taninos Condensados (mg ECA/g)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ )
<i>Smilax campestris</i> Griseb.	$70,3 \pm 1,6$	$123,9 \pm 1,0$	$11,8 \pm 0,1$	$13,1 \pm 0,1$

EQ: Equivalente de quercetina; EAG: Equivalente de ácido gálico; ECA: Equivalente de catequina;  $IC_{50}$ : Concentração inibitória de 50% do DPPH.

Em relação a triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach, obteve-se a concentração de flavonoides de  $70,3 \pm 1,6$  mg EQ/g, fenóis  $123,9 \pm 1,0$  mg EAG/g e taninos condensados  $11,8 \pm 0,1$  mg ECA/g (Tabela 3).

Rugna e colaboradores (2013) [11] avaliaram a variação fenotípica de polifenóis de *Smilax campestris* Grisebach coletadas em Puerto Gaboto e San Jerónimo na Argentina e obtiveram resultados diferentes (flavonoides  $308.5 \pm 9.98 \mu\text{g EQ/g}$  e fenóis  $16.76 \pm 0.84$  mg EAT/g) dos encontrados nesse estudo. Estes dados evidenciam que fatores como clima, solo e região podem interferir na produção desses metabólitos.

No trabalho desenvolvido por Seo e colaboradores (2012) [30] quantificaram fenóis totais do extrato da espécie vegetal *Smilax china* em diferentes solventes, obtiveram resultados de  $105.81 \pm 0.4$  mg EAG/g em metanol,  $105.74 \pm 0.04$  mg EAG/g em etanol,  $96.23 \pm 0.26$  mg EAG/g em acetona e  $16.64 \pm 0.30$  mg EAG/g em água.

Zubair e colaboradores (2013) [31], obtiveram os seguintes resultados na quantificação de flavonoides para extrato *Smilax macrophylla* extraído em n-hexano  $1.2 \pm 0.03$  mg ECA/g, clorofórmio  $4.9 \pm 0.04$  mg ECA/g, acetato de etila  $4.0 \pm 0.03$  mg ECA/g, n-butanol  $4.1 \pm 0.04$  mg ECA/g, metanol absoluto  $5.4 \pm 0.10$  mg ECA/g, metanol a 95%  $2.5 \pm 0.05$  mg ECA/g, metanol a 90%  $3.4 \pm 0.04$  mg ECA/g; e para quantificação de fenóis obteve em n-hexano  $2.2 \pm 0.04$  mg EAG/g, clorofórmio  $4.1 \pm 0.06$  mg EAG/g, acetato de etila  $5.2 \pm 0.05$  mg EAG/g, n-butanol  $3.4 \pm 0.05$  mg EAG/g, metanol absoluto  $6.2 \pm 0.10$  mg EAG/g, metanol a 95%  $5.5 \pm 0.05$  mg EAG/g, metanol a 90%  $2.4 \pm 0.06$  mg EAG/g.

Assim, observa-se que nos trabalhos realizados com plantas do mesmo gênero *Smilax* a concentração de flavonoides e fenóis é inferior à obtida no extrato em estudo, o que justifica seu maior potencial antioxidante em relação as demais espécies.

#### 4. Conclusão

O estudo mostrou que o extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* e atividade antioxidante quando comparado com os controles testados.

Pode-se verificar que ação antimicrobiana e antioxidante está relacionada com a concentração dos compostos fenólicos e flavonoides quantificados pela triagem fitoquímica. Também pode-se observar que características, como, região, clima, solo podem influenciar nas atividades biológicas das plantas.

Por se tratar de uma espécie vegetal indicada pela medicina popular como terapia alternativa para o tratamento de sífilis, gota, reumatismo, doenças de pele, asma, dores de dente, feridas, diuréticos, sudorífico, dor ocular, anti-inflamatórios, doenças vaginais



causadas por fungos e como tônico refrescante para problemas digestivos, torna-se necessário a continuação de estudos para examinar novas propriedades biológicas da *Smilax campestris* Grisebach. Testes relacionados à ação citotóxica, genotóxica e mutagênica também devem ser realizados afim de assegurar a utilização segura do extrato como tratamento alternativo de enfermidades bem como ser utilizado como fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos.

## 5. Referências Bibliográficas

- [1] ROGATTO, J. M., FERREIRA, M. C. C., ONO, R. M., CARVALHO, L. C., et al., 2014. Caracterização do potencial antimicrobiano de *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 12, n. 1, p. 886-894.
- [2] NASCIMENTO, G. G. F., LOCATELLI, J., FREITAS, P. C. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256.
- [3] AMOROSO, M. C. M. 2002. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n. 2, p.189-203.
- [4] CANSIAN, R. L., MOSSI, A. J., PAROUL, N., TONIAZZO, G., et al., 2010. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL.) ROWHER). **Perspectiva, Erechim**, v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.

[5] SANTOS, R. L., GUIMARÃES, G. P., NOBRE, M. S. C., PORTELA, A. S. 2011. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.486-91.

[6] CARVALHO, A. A. T., SAMPAIO, M. C. C., SAMPAIO, F. C., MELO, A. F. M., et al., 2002. Atividade Antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.

[7] LIMA NETO, G. A., KAFFASHI, S., LUIZ, W. T., FERREIRA, W. R., et al., 2015. Quantification of secondary metabolites and antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants from the Cerrado of the Mato Grosso. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

[8] AO, C., HIGA, T., KHANH, T. D., UPADHYAY, A., et al., 2011. Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq. **Food Science and Technology**, vol.44, p.1681-1686.

[9] RUGNA, A. Z., RICCO, R., GURNI, A. A., WAGNER, M. L., 2008. Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) según su grado de desarrollo. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol.27: p.247-9.

[10] RUGNA, A. Z., RICCO, R., GURNI, A. A., WAGNER, M. L., 2011. Variaciones cualicuantitativas en la producción de polifenoles en hojas de *Smilax campestris* Griseb.

(Smilacaceae) sanas y atacadas por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. (Heliconidae). **Dominguezia**, vol.27: p.27–33.

[11] RUGNA, A. Z., GURNI, A. A., WAGNER, M. L., 2013. Phenological variations of polyphenols in *Smilax campestris* (Smilacaceae). **Turk Journal of Botanic**, v.37: p.350-354 © TÜBİTAK doi:10.3906/bot-1112-15.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, 2008. “Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard”, 3. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.

[13] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-S4. 4th ed.; Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.

[14] PANGHAL, M., KAUSHAL, V., YADAV, J., 2011. In vitro antimicrobial activity of ten medical plants against clinical isolates of oral cancer cases. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, p. 21-31.

[15] ARAÚJO, M. G. F., HILÁRIO, F., NOGUEIRA, L. G., VILEGAS, W., et al., 2011. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. **Molecules**, vol. 16, p.10479-10490.

[16] BAGIU, R. V., VLAICU, B., BUTNARIU, M., 2012. Chemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 1426-1436.

[17] CARDOSO, C. A. L., SALVADOR, M. J., CARVALHO, E., COELHO, R. G., 2013. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (Impresso), v. 72, p. 324-330.

[18] KUMARAN, A., KARUNAKARAN, R. J., 2006. Nitric Oxide Radical Scavenging Active Components From *Phyllanthus emblica* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, 61: 1. doi:10.1007/s11130-006-0001-0.

[19] LIN, J. Y., TANG, C. Y., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry** 101: 140-147. doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.014.

[20] DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTTASSOUNA, D., et al., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry** 97: 654-660. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.028.

[21] BROADHURST, R. B., JONES, W. T., 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 29(9): 788-794. DOI: 10.1002/jsfa.2740290908.

[22] AGOSTINI-COSTA, T. D. S., GARRITI, D. D. S., LIMA, L., FREIRE, S., et al., 1999. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 17(2): 167-176. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v17i2.13789>.

[23] PINHEIRO, L., BRITO, C. I., PEREIRA, V. C., DE OLIVEIRA, A., et al., 2014. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 871-878.

[24] SCHAEFFER, C. R., WOODS, K. M., LONGO, G. M., KIEDROWSKI, M. R., et al., 2015. Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. **Infect Immun**, vol.83, p.214 –226.

[25] COELHO DE SOUZA, G., HAAS, A. P. S., VON POSER, G. L., SCHAPOVAL, E. E. S., et al., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.90, p.135–143.

[26] OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., et al., 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da

concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.301-07.

[27] ALEIXO, A. A., HERRERA, K. M. S., RIBEIRO, R. I. M. A., LIMA, L. A. R. S., et al., 2013. Antibacterial activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) against bacteria of medical interest. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.5, p. 731-734.

[28] DUARTE, A. F. S., HIROTA, B. C. K., OLIVEIRA, V. B., CAMPOS, R., et al., 2014. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl. (Rubiaceae). **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, vol.35(4): p.607-614.

[29] TREVISAN, R. R., 2010. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (jacq.) Sargent Ulmaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

[30] SEO, H. K., LEE, J. H., KIM, H. S., LEE, C. K., et al., 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of *Smilax china* L. leaf extracts. **Food Science Biotechnology**. 21(6): 1723-1727.

[31] ZUBAIR, M., RIZWAN, K., RASHID, U., SAEED, R., et al., 2013. GC/MS profiling, in vitro antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Smilax macrophylla* leaves. **Arabian Journal of Chemistry**.

## 6. Anexo

### Normas do Periódico: **Journal of Basic Microbiology**

Instructions to authors (2016)

Authors are requested to follow these instructions carefully.

Manuscripts not prepared accordingly will be returned to authors and this will inevitably lead to a delay in the editorial processing of the manuscript.

1. Aims and scope
2. General terms of publication
3. Online submission of manuscripts
4. Author Licensing Service (WALS)
5. Types of contributions
6. Organization of manuscripts
7. Guidelines for the preparation of electronic data
8. Revised manuscripts
9. Proofs and reprints
10. NIH authors
11. Reporting specific data

#### 1 Aims and scope

The Journal of Basic Microbiology (JBM) publishes primary research papers on bacteria, archaea, fungi, algae, protozoans, phages, viruses, viroids and prions.

Special emphasis is given to innovative results and new principles in basic research. This includes dealing with

- microbial interactions (pathogenic, mutualistic, environmental),
- ecology,

– physiology,



– genetics and cell biology/development,

– new methodologies, i.e., especially new imaging technologies (e.g., video-fluorescence microscopy, immunofluorescence of modern TEM applications) and novel molecular biology methods (e.g., PCR-based gene targeting).

Types of publication: original research papers, short communications, method papers and reviews will be accepted for publication after strict peer-review.

## 2 General terms of publication

The author vouches that the work has not been published elsewhere, either completely, in part, or in any other form and that the manuscript has not been submitted to another journal. The submitting author (listed under

“Correspondence”) accepts the responsibility of having included as coauthors all persons appropriate and none inappropriate. The submitting author certifies that all coauthors have seen a draft copy of the manuscript and agree with its publication.

All scientific contributions will be peer-reviewed on the criteria of originality and quality. Authors are requested to suggest three to five potential referees, including their e-mail addresses. It is also possible to name individuals whom they wish to be excluded from the review process. On acceptance, papers may be subjected to editorial changes and acceptance is provisionally, specifically for submission of high quality artwork.

A revised paper will retain its original date of receipt only if it is resubmitted to the Editors within the indicated time after revision was requested. Responsibility for the factual accuracy of a paper rests entirely with the author. Upon acceptance of the manuscript the corresponding author will have to complete the license agreement on behalf of all authors of the paper (for further details, please see Section 4).

It is the authors’ responsibility to obtain permissions for reproduction of figures, tables, or text from published work.

The publisher of a journal or book is the copyright owner from whom the written permission must be obtained.

Permission from authors is also encouraged as a professional courtesy.

Manuscripts and artwork will not be returned following publication.

Please note that after acceptance of a paper changes or additions to the manuscript and its data are not permitted.

Errors in published papers should be submitted directly to the publisher.

JBM publishes articles in English. Manuscripts must be grammatically and linguistically correct, and authors less familiar with English usage are advised to seek the help of English-speaking colleagues. American spelling is preferred. Should authors who are not native English speakers wish assistance with style, grammar and vocabulary, professional language and manuscript editing service is provided by Wiley. For detailed information and instructions please go to: <http://wileyeditingservices.com/en/>. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at [www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html](http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html). Language polishing can maximize the accuracy and impact of the submission and help to communicate clearly and concisely the contents to the readers, editors and reviewers of JBM.

Please note that if the manuscript describes experiments using animals, the permission of the national or local authorities (giving the permission or accreditation number of the laboratory and of the investigator) should be stated. If no such rules or permission are stipulated in the particular country, this must also be mentioned in the paper. In the case of human studies, it should be stated that local ethical committee approval has been received and that the informed consent of all participating subjects was obtained.

### 3 Online submission of manuscripts

#### 3.1 General

Effective with the 2013 volume, this journal is being published in an online-only format, i.e. printed issues are no longer available. No cost is distributed to authors for the publication of color images in the online-only edition.

#### 3.2 How to submit

JBM offers a web-based manuscript submission and peer review system. This service guarantees fast and safe submission of manuscripts and rapid assessment process. Usage of this system is obligatory, conventional submission of manuscripts is not accepted.

To submit your manuscript online, please proceed along the following steps:

- Prepare your manuscript and illustrations in the appropriate format, according to the instructions given below (see Sections 5 to 9). Please also make sure that your paper conforms to the scientific and style instructions of JBM as given herein. You can also find a link to these instructions at the submission site at

<http://mc.manuscriptcentral.com/jbm> or on the homepage of the journal at <http://www.jbm-journal.com> under the link “Author Guidelines”.

- If you have not already done so, create an account for yourself in the system at the submission site, <http://mc.manuscriptcentral.com/jbm> by clicking on the “Create an Account” button.

• Please be sure to study the “Instructions and Forms” on the journal homepage carefully, and then let the system guide you through the submission process. Online help is available to you at all times. You are also able to exit/re-enter at any stage before finally “submitting” your work. All submissions are kept strictly confidential. For additional questions you may contact the Editorial Office at [mayursula@hotmail.com](mailto:mayursula@hotmail.com).

To monitor the progress of your manuscript throughout the review process, just login periodically and check your Author Center.

#### Cover Letter

The manuscript should be accompanied by a letter of transmittal that should state why the paper is suitable for publication in the Journal and include the following FIVE statements:

1. All authors concur with the submission.
2. The work has not been published elsewhere, either completely, in part, or in another form.
3. The manuscript has not been submitted to another journal and will not be published elsewhere. Publication in any reasonably retrievable source constitutes prior publication. Meeting abstracts or preprints as well as academic theses do not constitute prior publication.
4. The manuscript does/does not contain experiments using animals. The permission of the national or local authorities (giving the permission or the accreditation no. of the laboratory and of the investigator) should be stated if animal experiments are included. If no such rules or permissions have been implicated in the particular country, this must be stated.
5. The manuscript does/does not contain human studies. If such studies are included, it should be stated that local Ethical Committee approval was received for the studies and that the informed consent of all participating subjects was obtained.

Permission statements relating to points 4 and 5 have to be included in the text of the manuscript.

#### 4 Author Licensing Service (WALS)

If your paper is accepted, the corresponding author will receive an e-mail prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html)

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open

Access Agreements (OAA):

- \_ Creative Commons Attribution License OAA
- \_ Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
- \_ Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements, please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements. For more information on this policy and the journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## 5 Types of contributions

Four types of scientific contributions are considered for publication:

1. Research Papers describing complete investigations. Unsolicited original papers should not exceed approximately 6.500 words; this includes references, figure legends and tables. Manuscripts may not have been published previously, except in the form of a preliminary communication (see also above). Manuscripts that have been submitted for publication with another journal where they are under review are not acceptable. The submitting corresponding author is responsible for consent of all co-authors with publication.
2. Reviews will be invited by the Editor. Authors wishing to submit a review article should send a brief outline of its contents to the Editor-in-Chief before the manuscript is drafted. Reviews will undergo the normal reviewing process after submission even if invited.
3. Short Communications describing results that are brief, timely and/or of such importance that rapid publication is warranted. Premature publication of results within a larger study are

not acceptable. These manuscripts should bear the words “Short Communication” immediately above the title on the first page. Short communications should not exceed 2.500 words and contain no more than two figures and one table.

4. Method papers will describe the development of a novel method or an improvement or noteworthy modification of an already existing technique or platform used in biotechnology. These manuscripts should bear the words “Method Paper” immediately above the title on the first page. A method paper is a short (no more than two pages when published) description written in a continuous style with no more than two figures and one table.

## 6 Organization of manuscripts

Manuscripts should be submitted in English. American spelling should be used throughout. Manuscripts must be typewritten with double spacing (including references, tables, legends, etc.) using a page setup that leaves margins of 3.5 cm on all sides.

### Contents of first page of manuscript

The first page of the manuscript should contain only the following:

1. Manuscript title: Title of the paper containing only the most important keywords pertaining to the subject matter.

Only standard abbreviations should be used in the title.

2. Author names: Full names (including first name) of all authors of the paper.

3. Affiliations: Name of institute (or company) with name of city and country. If the publication originates from several institutes the affiliations of all authors should be clearly stated by using superscript numbers after the author names and before the institutes.

4. Keywords: A minimum of 3 keywords is required, do not select more than 5.

5. Correspondence: Full name, title and full postal address of the corresponding author to whom all correspondence (including galley proofs) is to be sent. This should include the e-mail address.

6. Abbreviations: A list of abbreviations used in the paper excluding the standard abbreviations.

### Abstract

The second and (if necessary) third page of the manuscript should contain the abstract only. This must be self-explanatory and intelligible without reference to the text. It should not exceed 200 words. Only standard abbreviations are allowed. The text should not be subdivided.

## Division into sections

Research papers should be divided into the following sections:

“1 Introduction”: containing a description of the problem under investigation and a brief survey of the existing literature on the subject.

“2 Materials and methods”: for special materials and equipment, the manufacturer’s name and if possible the location should be provided.

“3 Results” containing subheadings for the main results provided.

“4 Discussion” without subheadings and without a separate section “Conclusions”.

“5 References” containing the approximately 30 to 50 most relevant and current citations.

For Short Communications: Sections 3 and 4 are replaced by a combined "Results and discussion" and should then be followed by a short section entitled “Concluding remarks”. Subdivisions of sections should be indicated by subheadings.

## References

References, including those in tables and figure legends, should be numbered sequentially in the order in which they appear in the text. The numbers should be set in square brackets in the text i.e. [2, 18]. References are to be collected in numerical order at the end of the manuscript under the heading “References”, they should also be typed with double spacing throughout.

Titles of journals should be abbreviated according to the practice of Chemical Abstracts. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. The DOI for the reference should be included at the end of the reference, if no print reference is available. Abstracts and posters in meetings books must not be cited unless they are generally accessible.

Please note that website addresses must not be included as a reference but should be inserted in the text directly after the data to which they refer in brackets followed by the date of last access.

Responsibility for the accuracy of bibliographic references rests entirely with the author. Lack of compliance with the regulations will lead to unsubmission of the manuscript by the Editorial Office.

Please note the following examples:

Journals:

[1] Villegas, L.B., Amoroso, M.J., de Figueroa, L.I., 2009. Responses of *Candida fukuyamaensis* RCL-3 and *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 to copper stress. *J. Basic Microbiol.*, 49, 395-403.

[2] Leiter, E., Bálint, M., Miskei, M., Orosz, E., et al., 2015. Stress tolerances of nullmutants of function-unknown genes encoding menadione stress responsive proteins in *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.*, DOI

10.1002/jobm.201500500.

Note that

- Papers with multiple authors should be limited to listing the first five authors. In case there are more than 5 authors, only the names of the first four authors should be given, followed by et al.
- Papers published online in advance of print should be cited with their DOI.
- Other serial publications should be cited in the same manner as journals.

Books:

[3] Felten, J., Martin, F., Legue, V., 2012. Signaling in ectomycorrhizal symbiosis. In: Perotto, S., Baluška, F. (Eds.), *Signaling and Communication in Plant Symbiosis*. Springer, Heidelberg, pp. 123-142.

[4] Green, M.R., Sambrook, J., 2012. *Molecular Cloning: a Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Acknowledgments

Acknowledgments as well as information regarding funding sources should be provided in a separate paragraph at the end of the text (before “5 References”).

Conflict of Interest Statement

All authors must declare financial/commercial conflicts of interest. Even if there is none, this should be stated in a separate paragraph following the acknowledgements section. This is a mandatory requirement for all types of articles.

Tables

Tables with suitable captions at the top and numbered with Arabic numerals should be collected at the end of the text on separate sheets (one page per table). Column headings should be kept as brief as possible and indicate units.

Footnotes to tables should be indicated a), b), c) etc. and typed on the same page as the table.

### Supporting information

Extensive tables (more than 5 typewritten pages) should be published online as supporting information. This material will not be typeset so authors should prepare this in the final form submitted as pdf. Supporting information will be made freely available on the web (similar to the table of contents and the article abstracts). Authors are permitted to place this material on their homepages when they are setting up a link to the fulltext version of the article on Wiley Online Library.

Further, other files may be submitted as supporting information (e.g., animations, video sequences). Please contact the Editorial Office at [mayursula@hotmail.com](mailto:mayursula@hotmail.com) for suitable file formats. All supporting information will also undergo the peer review process. Thus, this material has to be submitted electronically along with the main body of the article. It is in the hands of the Editor-in-Chief to decide which part(s) of the manuscript will be published as supporting information.

### Figures and legends

Diagrams and photographs should be submitted as separate files. Upon acceptance of the paper hardcopies of fine quality suitable for reproduction should be sent to the Editorial Office at [mayursula@hotmail.com](mailto:mayursula@hotmail.com). Figures should be numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their appearance. Figures should not be larger than a manuscript page. Numbers and symbols inscribed must be large enough to be legible after reduction in size. Each figure is to be accompanied by a legend, which should be self-explanatory. The legends should not appear under the figures but be collected and typewritten with double spacing after the references.

- Please make sure that lettering is sufficiently large since it must remain legible after the required reduction of the figure from its original size to 8 cm in width (letter size after reproduction about 2 mm).

### Structural formulae and equations

Structural formulae should be drawn in the manuscript at the position where they belong. They may be numbered in the order of their appearance with Arabic numerals in parentheses.

### Abbreviations

Abbreviations are hindrances to a reader working in a field other than that of the author, and to abstractors. Therefore, their use should be restricted to an absolute minimum. Abbreviations should be introduced at first occurrence in the main text only when repeatedly used. Abbreviations used only in a table or a figure may be defined in the legend. No abbreviations should be used in the title, abstract and keywords.



## 7 Guidelines for the preparation of electronic data

Please follow the instructions in Section 6 “Organization of manuscripts” when preparing the electronic version of the manuscript and ensure that data are given in the order and the correct style for the journal.

- Data should be typed unjustified, without hyphenation except for compound words. Use carriage returns only to end headings and paragraphs; spacing will be introduced by the typesetter.
- Do not use the space bar to make indents; where these are required (e.g., tables) use the TAB key.
- If working in Word for Windows, please create special characters through Insert/Symbol.
- All submissions will be converted to PDF format during the upload process. The system automatically generates one PDF file which contains all parts of the manuscript.
- Most major word processing formats (including .doc, .docx) are accepted.
- All figures should preferably be in TIFF or EPS format. If these formats are not available, kindly submit figures files in their original format. Each figure should be given in a separate file. After acceptance, resolution is checked and Figures with less than 300 dpi are unsubmitted. Please be sure to have sufficiently resolved material when preparing the submission already.

## 8 Revised manuscripts

The revised manuscript, as a file, on which all alterations are clearly marked and visible, should be submitted via the submission site, <http://mc.manuscriptcentral.com/jbm>. The option to create and submit a revised manuscript will be available when appropriate. The revised manuscript must be accompanied by a point-by-point letter summarizing the changes that have been made in response to the referees’ comments.

Please note that when revised manuscripts are submitted online, only the changed files need to be replaced. The generated PDF is used for re-evaluating the manuscript. On acceptance a clean word file is required.

## 9 Proofs and reprints

Before publication authors will receive page proofs via e-mail in PDF low resolution file format, together with a sheet including instructions and a reprint order form, also as PDF files. The proofs should be carefully corrected following the instructions. In particular, authors should answer any editing queries. The reprint order form should be filled out

(even if reprints are not required), and both should be submitted online or returned by e-mail along with the

corrected proofs.

Authors will be charged for extensive alterations of their article. Reprints can be ordered at prices shown on the reprint order form.

#### 10 NIH Authors

On behalf of our authors who are NIH grantees, Wiley will deposit in PMC and make public after 12 months the peer reviewed version of the author's manuscript. By assuming this responsibility, we will ensure our authors are in compliance with the NIH request, as well as make certain the appropriate version of the manuscript is deposited. We await the release by PMC of the protocols regarding manuscript submission. We reserve the right to change or rescind this policy.

#### Institutions

Wiley has arrangements with certain academic institutions to permit the deposit of the Accepted Version in the institutional repository after an embargo period. Details of such arrangements are set out at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

#### For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will sign the Open Access Agreement ([www.wiley.com/go/ctalsweinheimglobaloaa](http://www.wiley.com/go/ctalsweinheimglobaloaa)) which offers a choice of the:

Creative Commons Attribution License

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust or members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## 11 Reporting specific data

### Chemical structures

Structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw.

Structure drawing preferences are as follows:

- As drawing settings select: chain angle 120° bond spacing 18% of width fixed length 14.4 points (0.508 cm, 0.2 in.)

bold width 2.0 points (0.071 cm, 0.0278 in.) line width 0.6 point (0.021 cm, 0.0084 in.) margin width 1.6 points (0.056 cm, 0.0222 in.)

- hash spacing 2.5 points (0.088 cm, 0.0347 in.)

- As text setting select: font, Arial or Helvetica; size, 10 pt.

- Under the preferences choose: units, points; tolerances, 3 pixels.

- Under page setup choose: paper, US Letter; scale, 100%.

- Using the ChemDraw ruler or appropriate margin settings, create structure blocks, schemes, and equations having maximum widths of 11.3 cm (one-column format) or 23.6 cm (two column format). Note: if the foregoing preferences are selected as cm values, the ChemDraw ruler is calibrated in cm. Also note that a standard sheet of paper is only 21.6 cm wide, so all graphics submitted in two column format must be prepared and printed in landscape mode.

- Use boldface type for compound numbers but not for atom labels or captions.

- Authors using other drawing packages should, as far as possible, modify their program's parameters to reflect the above guidelines.

### Physical and other data

It is important that novel compounds, either synthetic or isolated/produced from natural sources, be characterized completely and unambiguously. Supporting data normally include physical form, melting point (if solid), UV/IR spectra if appropriate, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, mass spectral data, and optical rotations or CD information (when compounds have chiral centers).

Any particular substance must have its identity confirmed by at least two methods; that means, in practice, comparison of chromatographic and spectroscopic data (which may include GC, MS, IR, and NMR) with those of an authentic sample. If only one method has been applied, the identification has to be labeled as "tentative": This is also valid in case of identification performed only by comparison of literature data.

Equations should be numbered consecutively and referred to in the text; e.g. "defined as in Eq. (1)".

Physical data should be quoted with decimal points (e.g. 25.8 J/K × mol), and arranged as follows where possible – but in any event in the same order within the manuscript (when measurement conditions remain unchanged they need only be mentioned once, for instance in the column headings): m.p./b.p. 20 °C;  $[\alpha]_{20D} = -13.5$  (c = 0.2 in acetone); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, [D8]THF, 25 °C, TMS):  $\delta = 1.3$  (q, 3J(H,H) = 8 Hz, 2 H; CH<sub>2</sub>), 0.9 ppm (t, 3J(H,H) = 8 Hz, 3 H; CH<sub>3</sub>); IR(Nujol):  $\nu = 1790$  cm<sup>-1</sup> (C=O); UV/VIS (n-hexane):  $\lambda_{\max}(\epsilon) = 320$  (5000), 270 nm (12 000); MS (70 eV): m/z (%):

108 (20) [M<sup>+</sup>], 107 (60) [M<sup>+</sup>-H], 91 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>]. Plane angles in products of units can have either ° or deg as the unit.

Nomenclature, symbols, and units: The rules and recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), the International Union of Biochemistry (IUB), and the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) should be adhered to.

Nucleotide and protein sequences: New nucleotide data must be submitted and deposited in a database (e.g.

GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin>) and an accession number needs to be included within the paper before it can be accepted for publication. . If requested the database will withhold release of data until publication. For special types of submissions (e.g., genomes, bulk submissions etc.) additional submission systems are available.

Proteins Protein sequences, which have been determined by direct sequencing of the protein, must be submitted to Swiss-Prot at the EMBL Outstation – The European Bioinformatics Institute (datasubs@ebi.ac.uk) or GenBank. Results from characterization experiments should also be submitted to Swiss-Prot at the EBI. This can include such information as function, subcellular location, subunit etc.