

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

DEBORA MARINA BANDEIRA

"COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE
Podocarpus lambertii Klotzch ex Endl."

CASCADEL-PR
Fevereiro/2022

DEBORA MARINA BANDEIRA

"COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE
Podocarpus lambertii Klotzch ex Endl."

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Fabiana Gisele da Silva Pinto

Coorientadora: Juliana Moço Corrêa

CASCAVEL-PR

Fevereiro/2022

Ficha Catalográfica

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

BANDEIRA, DEBORA MARINA
"COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE
Podocarpus lambertii Klotzch ex Endl." / DEBORA MARINA
BANDEIRA; orientadora Fabiana Gisele da Silva Pinto;
coorientadora Juliana Moço Corrêa. -- Cascavel, 2022.
71 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação
e Manejo de Recursos Naturais, 2022.

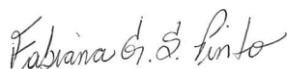
1. Bioativos. 2. Antibiofilme. 3. Atividade
Antimicrobiana. 4. Antioxidante. I. Pinto, Fabiana Gisele da
Silva, orient. II. Corrêa, Juliana Moço, coorient. III.
Titulo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEBORA MARINA BANDEIRA

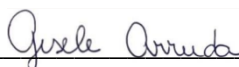
"COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE
Podocarpus lambertii Klotzch ex Endl."

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível de Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, pela comissão Examinadora composta pelos membros:



Prof^a. Dr^a. Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Prof^a. Dr^a. Gisele Arruda

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Francisco Beltrão
(UNIOESTE)



Prof. Dr. Odair Alberton

Universidade Paranaense - UNIPAR - Umuarama (UNIPAR)

Aprovada em 08 de março de 2021.

Local da defesa Via Remoto.

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

(Marthin Luther King)

DEDICATÓRIA

É chegado ao fim um ciclo de muitas risadas, choro, felicidade e frustrações.
Sendo assim, dedico este trabalho a todos que fizeram parte desta etapa da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da Vida e por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação nestes anos de 2020/2021 tão atípico e cheio de novos desafios. Aos meus pais Vlademir e Lizane e a meus irmãos, por todo incentivo e ajuda, pelos incentivos nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto me dedicava à realização deste trabalho.

A professora Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto, por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade, obrigada pelos conselhos, ajuda com meu processo de formação.

A Dra. Juliana Moço Corrêa pela amizade e por toda a paciência nas incansáveis vezes que gritei por ajuda, pelo companheirismo em embarcar nos novos desafios e obrigada por todos os ensinamentos tanto acadêmico, como pessoal.

A minhas colegas Larissa, Joelma, Andressa, com quem convivi entre meio alguns contratempos (e que lugar cheio de mulheres não tem?), mas cada uma com sua particularidade trocando experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como profissional. A Jéssica meu mais sincero obrigada! Por toda ajuda nos experimentos e por me aguentar surtando em casa.

Andreia Bonini (Bonì), com uma paciência enorme, sempre ajudando e resolvendo o problema de todos! Obrigada de coração por toda ajuda e cuidado com minha pessoa!

Aos professores Renata e Gerson da Universidade Estadual de Londrina por toda a recepção e ensinamento e por abrir os olhos para novos caminhos, muitíssimo obrigada!

Agradeço a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, ao Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais e ao Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia pela oportunidade e espaço para realizar esse trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa para realização da pesquisa. Aos verdadeiros amigos, mas principalmente a um deles que pelo exemplo, me ensinou princípios, a lidar com minhas crises de desespero, e a aceitar que não posso agradar a todos, assim me mostrando o quanto sou capaz. Meu eterno agradecimento.

SUMÁRIO

Resumo.....	10
Abstract	11
CAPÍTULO 1: Effect of solvente on extraction, characterization of bioactive compounds and biological activities of the leaves of <i>Podocarpus lambertii</i> Klotzch ex Endl.....	12
Abstract.....	12
Introduction.....	13
Methodology.....	13
<i>Collection and identification of <u>Podocarpus lambertii</u> leaves.....</i>	<i>14</i>
<i>Obtaining the essential oil (EO)</i>	<i>14</i>
<i>Obtaining plant extracts.....</i>	<i>14</i>
<i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)</i>	<i>15</i>
<i>Phytochemical screening of the extracts.....</i>	<i>15</i>
<i>Microorganisms used.....</i>	<i>16</i>
<i>Antimicrobial activity.....</i>	<i>16</i>
<i>Minimum inhibitory concentration (MIC) / Minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC)</i>	<i>16</i>
<i>Antioxidant activity.....</i>	<i>17</i>
<i>Activity of plant extracts and essential oil on the development of preformed biofilms.....</i>	<i>18</i>
<i>Crystal violet staining test.....</i>	<i>19</i>
<i>Testing the cell viability of the biofilms formed.....</i>	<i>20</i>
<i>Statistical analysis.....</i>	<i>20</i>
Results and Discussion.....	20
Yield.....	20
<i>Phytochemical prospection of the extracts.....</i>	<i>21</i>
<i>Characterization of the essential oil.....</i>	<i>22</i>

<i>Antimicrobial activity</i>	24
<i>Antioxidant activity</i>	26
<i>Evaluation of the activity of plant extracts on preformed bacterial biofilm(irreversible fixation)</i>	29
Conclusions.....	32
References.....	33
CAPÍTULO 2: Prospecção fitoquímica, antioxidante, microbiológica e biofilmes dos extratos de <i>Podocarpus lambertii</i> Klotzch ex Endl	44
Resumo.....	44
Introdução.....	45
Metodologia.....	46
Resultados e Discussão.....	52
Conclusão.....	62
Referências.....	63

RESUMO

Alguns ensaios deste estudo com a espécie *Podocarpus lambertii* são inéditos pelo fato de ser uma planta nativa brasileira usada tradicionalmente em reflorestamento, estudos em relação ao seu potencial biológico, é quase que nulo, quando comparado com outras espécies do gênero. Assim o objetivo deste estudo foi realizar a prospecção fitoquímica através de reações colorimétricas, para determinar os metabólitos secundários presente nos extratos vegetais solúveis em acetona (EAc), acetato de etila (EAE), hexano (EHx), metanol (EM) etanol (EE) e óleo essencial (OE). Este estudo é o primeiro com objetivo de determinar o perfil fitoquímico do óleo essencial (OE) e dos extratos vegetais das folhas de *Podocarpus lambertii*, avaliar a atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo, atividade antioxidante pelo método do 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH) e atividade sobre biofilmes bacterianos pré-formados. O rendimento do OE foi de 0,36% e dos extratos metanólico (EM) de 14,9 %, etanólico (EE) de 9,76 %, EAc (6.76%), EAE (7.60%) e EHx (4.51%). A composição química do OE foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e identificou 16 compostos, sendo os majoritários: Manool, 13-epi- (30,30%), Rimueno (Rosa-5,15-dieno) (26,02%). A prospecção fitoquímica dos extratos revelou a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, saponinas e taninos. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Salmonella enterica* Abaetetuba, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*). Em relação a atividade antioxidante os extratos EAc e EM, apresentaram elevada porcentagem de sequestro de radicais DPPH. Já o OE apresentou baixa atividade antimicrobiana e antioxidante. Foi observada elevada atividade antibiofilme (<50%) do EM e redução da biomassa do biofilme formado sobre a maioria das cepas testadas. Os resultados sugerem que os extratos vegetais de *P. lambertii* são uma fonte alternativa promissora de compostos bioativos naturais para o controle de micro-organismos resistentes, além de contribuir para o conhecimento da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Bioativos. Antibiofilme. Produtos Naturais. Biomoléculas. Radicais livres.

ABSTRACT

Some essays in this study with the species *Podocarpus lambertii* are unprecedented because it is a Brazilian native plant traditionally used in reforestation, studies in relation to its biological potential are almost null when compared to other species of the genus. Thus, the aim of this study was to carry out phytochemical prospecting through colorimetric reactions, to determine the secondary metabolites present in plant extracts soluble in acetone (EAc), ethyl acetate (EAE), hexane (EHx), methanol (EM) ethanol (EE) and essential oil (EO). This study is the first to determine the phytochemical profile of essential oil (EO) and plant extracts from the leaves of *Podocarpus lambertii*, evaluate the antimicrobial activity by the broth microdilution technique, antioxidant activity by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and activity on preformed bacterial biofilms. The yield of EO was 0.36% and EM (14.9%), EE (9.76%), EAc (6.76%), EAE (7.60%) and EHx (4.51%) extracts. The chemical composition of the EO was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and identified 16 compounds, the major ones being: Manool, 13-epi- (30.30%), Rimuene (26.02%). The phytochemical exploration of the extracts revealed the presence of alkaloids, flavonoids, steroids, saponins and tannins. All extracts showed antimicrobial activity on the microorganisms tested (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Salmonella enterica* Abaetetuba, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*). Regarding antioxidant activity, EAc and EM extracts showed a high percentage of DPPH radical scavenging. The OE had low antimicrobial and antioxidant activity. High antibiofilm activity (<50%) of EM and a reduction in the biomass of the biofilm formed on most strains tested were observed. The results suggest that plant extracts of *P. lambertii* are a promising alternative source of natural bioactive compounds for the control of resistant microorganisms, in addition to contributing to the knowledge of the species.

KEY WORDS: Bioactive. Antibiofilms. Natural Products. Biomolecules. Free radicals.

CAPITULO 1: Effect of solvent on extraction, characterization of bioactive compounds and biological activities of the leaves of *Podocarpus lambertii* Klotzch ex Endl.

Debora Marina Bandeira^{ab}, Juliana Moço Correa^{ab}, Larissa Valéria Laskoski^{ab}, Joelma Marques Batista^{ab}, Jéssica Rosset^a, Willian Ferreira da Costa^c, Lilian Huang Kuo^d, Fabiana Gisele da Silva Pinto^{ab*}

^a Laboratory of Microbiology and Biotechnology, State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

^b Postgraduate Program in Conservation and Management of Natural Resources, State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

^c Department of Chemistry, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

^d Department of Land, Environment Agriculture and Forest, University of Padua, Italy.

* fabiana.pinto@unioeste.br.

Rua Universitária, 1619 – Universitário, Cascavel, Paraná – Brasil CEP: 85819-110.

ABSTRACT

Podocarpus species exhibit anti-inflammatory, antiseptic, astringent activities, and are useful in the treatment of fevers, asthma, coughs, and headaches. This study is the first with the objective of determining the effect of solvent extraction, characterization of bioactive compounds of the essential oil (EO) and plant extracts of *Podocarpus lambertii* leaves, as well as evaluating the antimicrobial activity by the broth microdilution technique, antioxidant activity by the 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) method and activity on preformed bacterial biofilms. The yield of the EO was 0.36%, of the methanolic (ME) extracts 14.9% and ethanolic (EE) extracts 9.76%. The analysis of EO (GC-MS) identified 16 compounds: the major components were Manool, 13-epi- (30.30%), Rimuene (Rosa-5,15-diene) (26.02%) and Caryophyllene (11.34%). The phytochemical prospection of the extracts revealed the presence of alkaloids, flavonoids, steroids, and tannins. The extracts showed high antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, and high antioxidant activity of the ME, with the percentage of DPPH radical sequestration of 84%. The EO presented low antimicrobial and antioxidant activity. The ME showed high antibiofilm activity and reduction of the biomass of the biofilm formed most of the bacterial strains tested. The results suggest that the plant extracts of *P. lambertii* are a promising alternative source of natural bioactive compounds for the control of resistant microorganisms, besides contributing to the knowledge of the species.

Keywords: Antibiofilm. GC-MS analysis. Podocarpaceae. DPPH. Antimicrobial activity. Antioxidant activity

1. Introduction

The current problems related to the use of synthetic compounds and pathogen resistance, present as an efficient alternative the use of secondary metabolites of plants, because they are a considerable source of bioactive products. In this sense, the Brazilian territory is a promising source for presenting about a third of the world flora and only 1% of the potential was investigated. Thus making relevant the investigation of the therapeutic, chemical, pharmacological or industrial potential of the Brazilian flora (Gonçalves et al., 2005; Bouzidi et al., 2016; WHO, 2011, Mazzari e Pietro, 2014; Jesus, et al., 2020; Rosa et al., 2020).

Plant extracts and essential oils extracted from medicinal plants are rich sources of bioactive constituents and are used by humanity in traditional medicine for the treatment of various diseases (WHO, 2011). These bioactive compounds can be extracted from plants by different solvents and extraction methods (Souza et al., 2020) and shown various biological activities such as anti-inflammatory (Hutchings et al., 1996), antimicrobial (Toledo et al., 2020), antibiofilm (Sharma, Misba e Khan 2019), among many other properties.

The species *Podocarpus lambertii* (Pinheiro-bravo) is a typical plant of the southern region of Brazil, its distribution zone is limited to the Araucaria zone (Carvalho, 2004; Carvalho et al. 2013; Iganci and Dorneles, 2019). The medicinal use of this species consists of popular knowledge where the cooking of the leaves is used to combat anemia and the leaf bud is made syrup, fortifying, and stimulant (Korbes, 1995). The study of this species is still initial and as a result, little is known from the scientific point of view of the pharmacological and chemical potential of this plant.

Therefore, the use of natural products emerges as a viable alternative for disease control and/or product formulation, since they have low cost and high availability. The search for new bioactive compounds has become one of the main objectives of many researchers (Bezerra et al., 2017). Furthermore, the objective of this study was to analyze chemical composition of leaves, as well as to evaluate antimicrobial activity, its antioxidant potential, and its action on biofilm.

2. Methodology

2.1 Collection and identification of *Podocarpus lambertii* leaves

The collection of leaves was carried out in the Paulo Gorski ecological park, located in the municipality of Cascavel, western region of the state of Paraná, (24°57'51.61 "S and 53°26'14.80 "O). The collections carried out random days, in the morning period, between 08:00 am (morning), 12:00 pm (noon), in both rainy and dry periods, between the months of August 2019 and March 2020. An exsiccate of the plant was delivered to the Herbarium of the State University of Western Paraná (UNOP) for botanical identification and registration UNOP10730.

2.2 Obtaining the essential oil (EO)

The EO was obtained according to the methodology proposed by Weber et al. (2014), the leaves were dried in an oven with air circulation at 40°C for 96 hours, and ground in a Willey type knife mill, with a 0.42 mm membrane of granulometry. Then, 10 g of the dried plant material of *P. lambertii* was added to 100 mL of distilled water 1:10 (w/v). The solution was placed in a Clevenger apparatus (Fisatom, model 202E) following the water vapor dragging method for approximately 4 hours at a temperature of 100°C. The percentage of essential oil yield (%) was calculated by the equation: $\% = \frac{OE(g)}{MV(g)} \times 100$, where OE is total essential extracted (grams) and MV, dried and ground plant mass (grams). Subsequently, the EO obtained was stored in conical bottom tubes protected from light in a freezer at 4°C until the tests were performed.

2.3 Obtaining plant extracts

The preparation of the extracts was performed according to the methodology proposed by Pandini et al. (2015). The dried plant material was added in the proportion of 10 g for each 100 mL of methanol P.A (ME) or ethanol P. A. (EE) (Dynamic brand) and kept in rotary shaker at 220 rpm for 24 hours. After this period, the solution was filtered using Whatman n°1 filter paper and centrifuged in conical tubes at 3800 rpm for 15 minutes. Then, the supernatant of the extracts was submitted to rotary evaporation for total elimination of the

solvents. The crude extracts were stored protected from light in a freezer at 4°C. The yield was calculated as a function of the mass of extract and the mass of raw material, in grams of material used.

2.4 Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)

The Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) analysis was performed by the Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Laboratory - COMCAP, of the State University of Maringá (UEM), Paraná, Brazil. Analysis of the constituents of the EO of *P. lambertii* was performed using a Thermo-Finnigan GC-MS system, composed of a GC FOCUS gas chromatograph (Thermo Electron), coupled to a DSQ II mass spectrometer (Thermo Electron) and a TriPlus AS automatic injector (Thermo Electron). Chromatographic separation was performed with an HP-5ms fused silica capillary column (30 m length, 0.25 and 0.25 μm film ID; composition 5% phenyl- 95% dimethylpolysiloxane). The injector temperature was 250° C. The samples and alkane standards were injected at a split rate of 1:25. The temperature programming used was 50° C maintained for 2 min, increasing in temperature to 180° C at a rate of 2° C.min⁻¹ and followed by an increase to 290° C at a rate of 5° C. min⁻¹. The interface between GC and MS was maintained at 270° C and the temperature of the ionization source of the mass spectrometer was 250° C. Identification of the compounds was carried out by comparing to the retention times obtained from the literature (Lazari, Skaltsa and Constantinidis, 2000; Adams, 2000; Yu et al, 2007; Babushok, Linstrom and Zenkevich, 2011; Oliveira et al. 2019) and through their Retention Indices.

2.5 Phytochemical screening of the extracts

The qualitative phytochemical prospection for secondary metabolites present in the extracts followed the methodology of Matos (1997) with modifications. Colorimetric visualization tests and/or precipitate formation after the addition of specific reagents were performed. The classes of secondary metabolites identified were: saponins from reaction with distilled water and hydrochloric acid P.A. steroids and triterpenoids through Liebermann-Burchard

reaction; tannins through reaction with ferric chloride and coumarins through fluorescence reaction with potassium hydroxide; anthocyanins, anthocyanidins, aurones, chalcones, flavanonols, flavones, flavonols and xanthones (flavonoids) from pH changes in the medium; alkaloids using Dragendorff reagent.

2.6 Microorganisms used

The experimental assays were performed in the Microbiology and Biotechnology Laboratory (LAMIBI) of the State University of Western Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel/PR. The EO and extracts were tested against different microorganisms from the *American Type Culture Collection* (ATCC) collection being three Gram negative strains: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* Enteritidis (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), four Gram- positive: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) *Listeria monocytogenes* (ATCC 1911) and one yeast *Candida albicans* (ATCC 10231).

2.7 Antimicrobial activity

For the antimicrobial activity test, the microorganisms were recovered in Brain Heart Infusion (BHI) enrichment broth (Kasvi) and incubated for 24 h at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. After this period, the strains were reported in Muller Hinton Agar (MHA) medium (Kasvi) and standardized in saline solution (0.85%) resulting in a final concentration of 1×10^5 CFU. mL⁻¹ for bacteria and 1×10^6 CFU. mL⁻¹ for yeast according to the McFarland scale.

2.7.1 Minimum inhibitory concentration (MIC) / Minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

The antimicrobial activity of EO and extracts of *P. lambertii* was evaluated following the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) and Scur et al., (2014) standards with modifications and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed by broth microdilution method. OE, ME and

EE were solubilized in methanol (P.A), filtered and diluted in Muller Hinton Broth (MHB). In the 96-well flat-bottomed microplates (Olen), 150 μL of MHB was dispensed in all wells, 150 μL of the OE and plant extract was added in the first well, with serial dilutions at concentrations of 7000-3.41 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for OE and 200 - 0.09 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ for the extracts. Then, an aliquot of 20 μL with microorganisms was added at $1 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ in each well and the plates were incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours. For the positive control was used the commercial antibiotic gentamicin (bacteria) and the antifungal nystatin (*C. albicans*) at the same concentrations tested in experiments. As a negative control the inoculum was added to the MHB without the presence of oil/extract to verify the viability of the microorganism tested. As colorimetric developer it was used 20 μL of triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution (Vetec) at 0.5% in each well of the plate. The presence of red coloration was interpreted as negative evidence of the inhibitory effect. The MIC assay was performed in triplicate, being possible to determine the lowest concentration of the EO and extracts able to inhibit microbial growth. After incubation, turbidity was observed and each well received a 20 μL aliquot of triphenyl tetrazolium chloride (TTC) to reveal the inhibition or not of bacteria. After performing the MIC assay, before the addition of TTC, a 2 μL aliquot was removed and inoculated in MHA for the determination of MBC/MFC and the plates were incubated for 24 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$, observing the bacterial growth.

The MIC and MBC/MFC were classified according to Araújo (2010) and Pandini et al. (2015), with the activity of 4 classes: high ($<12.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), moderate ($12.5 \text{ to } 25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), low ($50 \text{ to } 100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and very low ($>100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and for the essential oil the classification follows the criteria proposed by Sartoratto et al. (2004), being the activity considered low ($7000 \text{ to } 3500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), moderate ($1700 \text{ to } 875 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), high ($437.5 \text{ to } 218.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) or very high ($<109.375 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

2.8 Antioxidant activity

The antioxidant activity was analyzed according to the methodologies proposed by Weber et al. (2014) with modifications, by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical reduction method. For the determination of the percentage antioxidant activity (%AA), the sample was prepared with 1 mg of

OE/extracts and 1 mL of methanol P.A. in 1.5 mL conical tube, homogenized in a tube shaker for 30 seconds. A 0.1 mL aliquot was transferred 3.9 mL of 0.2 mM DPPH methanolic solution and homogenized. The readings were measured in a spectrophotometer (Femto, 600plus) with absorbance of 515 nm and monitored every minute the reduction until complete stabilization, making up the pre-test assay. The final absorbance Reading for the calculation was expressed by: $I\%: \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$, is the absorbance of the control and Abs1 is the absorbance of the sample.

After obtaining the %AA of the EO and extracts, the concentrations used to obtain the CI₅₀ (amount of antioxidant substance necessary to reduce the initial concentration of DPPH by 50%) were defined. To define the concentrations, the values of %AA were based on the values obtained in the pre-test assay; when this was higher than 80%, the following concentrations were used: 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1 mg.mL⁻¹; below 80%, the concentrations were 1; 2.5; 5.0; 7.5 and 10 mg.mL⁻¹. The readings of all reactions were performed using methanol as blank, free radical reagent (DPPH) and methanol as negative control and butylated hydroxytoluene (BHT) (Synth) as positive control at concentrations of (0.05, 0.025, 0.01, 0.005 and 0.0025 mg.mL⁻¹). The calibration of the spectrophotometer was performed with methyl alcohol. The tests were performed in triplicate. The data obtained by calculations of DPPH radical scavenging capacity and CI₅₀ were evaluated using the Tukey 5% test (p<0.05), using the Sisvar software. The experiments were performed in triplicate of samples and assays.

2.9.1 Activity of plant extracts and essential oil on the development of preformed biofilms

The potential of EE, ME and EO was evaluated on biofilm development (24 hours - irreversible fixation). Briefly, a 20 µL aliquot of inoculum at McFarland concentration of 0.5 (1x10⁶ CFU.mL⁻¹) of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) was added to 130 µL of Brain Heart Infusion (BHI) medium (Himedia) supplemented with 1% glucose added to 96-well flat-bottomed microplates and

incubated at 37°C for 24 hours without shaking (irreversible fixation). Then, the medium was removed and aliquots of 150 µL at concentrations of 100 to 0.09 mg.mL⁻¹ for extracts and/or 7000 to 54.68 µg.mL⁻¹ for EO and then incubated again at 37°C for 24 hours without shaking. Untreated biofilm controls (BHI supplemented with 1% glucose and inoculum), positive control (Gentamicin) (Neo Química) and inoculum and color interference control (BHI and the concentrations of the extract and/or OE diluted in DMSO without inoculum) were used. Biomass was quantified using the crystal violet (CV) staining method and cell viability by tretazolium salt reduction (TTC).

2.9.2 Crystal violet staining test

The assay was carried out according to Christensen et al. (1982) with modifications. The 96-well flat-bottomed microplates were washed three times with 1X PBS. Then, for cell fixation, 150 µL methanol P.A. was added to the wells. (Neon) for 20 minutes, after removal of the methanol, 150 µL of 1% crystal violet (Scientific Exodus) was added for 15 minutes. Then, the wells were washed in running water to remove the unabsorbed dye. At this point, biofilms were observed as purple rings next to the well. A 150 µL aliquot of 95% ethanol was added and left in contact for 30 minutes for biofilm decolorization. After this time, the contents of the microplates were transferred to a new sterile plate and the absorbance (OD) was measured at 570nm using Epoch model microplate reader (Biotek). The data were calculated in overall mean absorbance by Microsoft Excel 2010 program, and the percentage inhibition of biofilm was determined using the following equation:

$$\% \text{ growth inhibition} = [(Ac-At)/Ac]*100$$

Where Ac: mean absorbance of the untreated control; At: mean absorbance of the test with extract/oil.

The result was classified as per Famuyide et al. (2019) where: < 50% indicate low antibiofilm activity; > 50% indicate high antibiofilm activity. Negative values indicate increase in mature biofilm biomass.

2.9.3 Testing the cell viability of the biofilms formed

The metabolic viability analysis of mature biofilms was evaluated by the reduction of triphenyltetrazolium chloride (TTC) at a concentration of 0.5%. After removal of methanol, an aliquot of 180 μ L and 20 μ L of TTC were added to each well, and the plates were incubated in the dark at 37 °C for 2:30 hours. After this period, the medium was removed and the dye (TTC) was resolubilized with 150 μ L of DMSO for 15 minutes. The reading was performed using a microplate reader model Epoch (Biotek) with a wavelength of 570 nm. Cell viability data of mature biofilms were expressed as overall mean optical density (OD) and percent cell viability (CV%) was determined by the equation: experimental OD / untreated control OD x 100 (Jia et al., 2010; Kuzma et al. 2007) and classified into: Cell viability percentage values: < 50% indicate low cellular activity; > 50% indicate high cellular activity (Famiyide et al., 2019).

The activity of the extracts and oil on mature biofilm was measured by the reduction (%) of the absorbance value when compared to the untreated control, since the tested sample is a biofilm producer. As a criterion for expressing the results of the antibiofilm potential of EE, ME and EO of *P. lambertii*, both the biofilm biomass by crystal violet assay and cell viability by TTC assay were determined from the concentrations of MIC, 2X MIC and 4X MIC of each bacterial strain tested.

2.9.4 Statistical analysis

The experimental results were expressed as mean \pm standard deviation. The experiments were performed in triplicate of samples and assays. The data obtained were evaluated by Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey 5% test ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1 Yield

The yield of EO was 0.36% based on the masses of fresh and dried leaves, for plant extracts EE and EM was 9.76% and 14.9%, respectively. The utilization

of oil in the extraction was high when compared to Song et al. (2015) who obtained an average of 0.16% yield from *Podocarpus brevifolius* leaves. There are several factors that influence the yield of both EO and plant extracts. In relation to the EO some observations and care should be taken, such as the need for the EO extraction to occur at a temperature not too high, since there is the possibility of loss of volatile compounds through the upper glass valve of the Clevenger-type apparatus used in this study. Another aspect, is to be careful with the formation of foam during the boiling of the internal contents of the flask, if it is done at too high temperature can cause significant losses of the extracted EO (Gonçalves, et al. 2019). In addition, other factors such as seasonality, extractive method, extraction time (Franzen et al., 2018; Paulus, Valmorbida and Ramos, 2018) and solvent polarity directly influence on the yield of the extracts (Cabana et al., 2013; Fernández- Agulló et al., 2013).

3.2 Phytochemical prospection of the extracts

The phytochemical screening of the EE and ME revealed the presence of four groups of compounds: flavonoids, steroids, tannins, alkaloids. The presence of saponins, coumarins, anthocyanins and anthocyanidins was not detected in any of the extracts (Table 1). The ME presented the four classes of compounds mentioned, while in the EE the class of tannins was not observed (Table 1).

Table 1. Phytochemical prospection of secondary metabolites present in methanolic and ethanolic extracts of *Podocarpus lambertii* leaves

Classes of Metabolites	ME	EE
Tannins	+	-
Alkaloids	+	+
Cumarins	-	-
Anthocyanins	-	-
Flavonoids	+	+
Triterpenoids	-	-
Steroids	+	+
Saponins	-	-
Anthocyanidins	-	-

(+) presence; (-) absence; ME= methanolic extract; EE= ethanolic extract. Source: authors

No reports were found in the literature related to the presence of phytochemicals in *P. lambertii*, but our results corroborate with studies on other species of the genus *Podocarpus* spp. which found the presence of several types

of flavonoids, such as monoflavonoids, biflavonoids and glycosides, besides a wide variety of steroidal and terpenic compounds (Abdilahi et al., 2010). Obtaining the steroid β -Sitosterol from the benzene extract of the barks and leaves of *P. lambertii* was reported by Campello (1972). These metabolites were also identified in our study with *P. lambertii*.

Differences in phytochemical composition among species were reported in the literature and biotic and abiotic changes such as: leaf age, harvesting season, water, light, temperature, soil and chemicals, influence the synthesis and accumulation of secondary metabolites (Thakur et al., 2019; Li et al., 2020). The characterization of extracts varies according to several factors, especially the extraction method and type of solvent used (Dirar et al., 2019, Kong et al., 2020).

The flavonoids present in the tested extracts exert antimicrobial properties through inhibition of nucleic acid synthesis and cytoplasmic membrane function and are also able to suppress energy metabolism (Reddy et al., 2020).

Another group of biologically active compounds in *P. lambertii* leaf extracts were alkaloids, which have pharmacological properties, biological and important ecological functions already described in the literature (Takshak and Agrawal, 2019; Guimarães et al., 2019; Reddy et al., 2020; Fakhri et al., 2020).

Steroids also found, are a group of natural compounds that have reported action as antioxidant, insecticide (Ribeiro et al., 2013), antifungal (Nadaraia et al., 2019) and immunomodulatory (Orczyk et al., 2020). Small changes in their chemical structure can result in potential biological activities, which may explain the significant results observed with *P. lambertii* extracts in this study.

3.3 Characterization of the essential oil

The results of the chemical composition of the EO of *P. lambertii* and its retention indexes are expressed in Table 2. Sixteen compounds were identified by GC-MS analysis, corresponding to 94.1% of the EO. The analysis of the components of *P. lambertii* EO showed the presence of terpenes, being diterpenes (62.64%), sesquiterpenes (23.52%), hydrocarbon (3.85%) and monoterpene (3.62%). The majority components were Manool, 13-epi- (30.30%), Rimunene (Rosa-5,15-diene) (26.02%), (diterpenes) and Caryophyllene (11.34%), Elixene (7.46%) (sesquiterpenes).

Table 2. Chemical composition of the essential oil from *P. lambertii* leaves obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-MS.

Nº	COMPOSITE	AREA (%)	TR	RI	RI*
1	α -Pinene	1.63	9.20	9.30	9.36
2	Mircene	0.56	12.9	9.89	9.89
3	D-limonene	1.99	14.31	10.28	10.30
4	Caryophyllene (E)**	11.34	39.40	14.15	14.20
5	α -Humulene	1.30	41.57	14.50	14.53
6	Germacrene D	2.76	43.17	14.77	14.81
7	Elixene	7.46	44.09	14.92	14.92
8	δ -Cadinene	0.53	45.57	15.16	15.20
9	Spathulenol	2.30	48.80	15.72	15.76
10	Caryophyllene oxide	0.77	49.04	15.76	15.81
11	Globulol	0.35	49.32	15.81	15.82
12	Rimuen (Rosa-5,15-diene)**	26.02	65.93	18.92	18.94
13	Manool, 13-epi-**	30.30	68.83	19.61	19.60
14	Manoyl oxide	1.12	69.93	19.88	19.93
15	Phyllocladene	5.20	70.83	20.13	20.17
16	NI	0.47	33.98	13.30	-

RT: Retention Time; RI: calculated retention index values; RI*: retention index values found in the literature; **Majority compounds; NI: not identified. Source: authors.

Some research was carried out with the *Podocarpus* genus and its 65 species spread around the world. So far, no study was described the chemical composition of the essential oil extracted from the leaves of the *Podocarpus lambertii* species by the steam-dragging extraction system. This is the first study using this methodology.

Compounds found in *P. lambertii* are recurrent in other species. The phytochemical screening of the essential oil of *Podocarpus totara* leaves, presents seventeen monoterpenoids, six sesquiterpenoids and nine diterpenoids, among them found α -Pinene, D-limonemo (Franich and Cambie (2011), which is also present in this study with *P. lambertii*.

The study conducted with three *Podocarpus* species (*Podocarpus macrophyllus* (Thunb.), *Podocarpus gracilior* (Pilg.) and *Podocarpus elongatus* (Aiton) L'Hér. ex Pers.) showed in its composition ten compounds among them

monoterpenes, sesquiterpenes, including two compounds also present in *P. lambertii*, myrcene and limonene (El-Hawary et al., 2015).

OE from 49 specimens of *P. spicatus* were evaluated and two diterpenes, seven sesquiterpene hydrocarbons were identified, among them Germacrene D, δ -Cadinene (Stephen and Rex (1987), present also in our study with *P. lambertii*, as well as the hydrocarbon rimunene.

The difference and/or absence of certain compounds may be related to several climatic factors (temperature, relative humidity, exposure to ultraviolet radiation and wind regime), geographic location (altitude, habitat and air pollution), soil composition, plant organ, age and stage of the vegetative cycle, genetic diversity, seasonality, circadian rhythm, water availability, nutrients, protection against pathogens, among others (Campello, 1972; Gobbo-Neto and Lopes 2007; Le Metayer et al., 2008; Toledo, 2018). Thus, research aimed at standardizing the chemical constituents of EOs should be conducted to verify the environmental influences on the metabolic production of these compounds and for their possible safe use.

3.4 Antimicrobial activity

The results regarding the antimicrobial activity of EO, ME and EE from *P. lambertii* leaves are described in Table 3. No inhibitory and bactericidal/fungicidal effect of EO on the bacteria and yeast *C. albicans* tested was found. The MIC and MBC/MFC values should be higher than the concentrations tested in this study.

As for the plant extracts, the results varied according to the extracting solvent and the microorganism tested. The EE showed antimicrobial activity against ATCCs strains, even not presenting the greatest diversity of secondary metabolites, which can be explained due to the polarity of ethanol influencing both the quantity and the interaction of the extracted compounds and the synergy or antagonism of the specific groups present in each of them (Weber et al., 2014; Gupta, et al., 2016).

The antimicrobial activity of EE and ME extracts was evaluated on eleven ATCC bacteria and one yeast. Both extracts showed high antimicrobial activity (12.5 mg.mL^{-1}) (Table 3). Among the tested bacteria, *Staphylococcus aureus*

was the most susceptible to the extracts, followed by *Pseudomonas aeruginosa* and *S. epidermidis*, while the most resistant bacteria were *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *S. Abaetetuba*. The yeast *C. albicans* presented susceptibility to the extracts varying the MIC and CFM from high (12.5 mg.mL⁻¹) to low (50 mg.mL⁻¹).

Table 3 Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of plant extracts of *Podocarpus lambertii* leaves against the pathogenic microorganisms tested.

Microorganisms	MIC/MBC (mg.mL ⁻¹)	
	EM	EE
Gram-negative		
<i>Escherichia coli</i>	50/50	6.25/12.5
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	25/12.5	6.25/6.25
<i>Salmonella entérica</i> Typhimurium	50/50	6.25/6.25
<i>Salmonella entérica</i> Abaetetuba	50/25	50/25
<i>Proteus mirabilis</i>	25/6.25	0.78/100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5/12.5	6.25/6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.5/1.56	1.56/3.12
Gram-positive		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78/1,56	0.78/3.12
<i>Enterococcus faecalis</i>	6.25/12.5	25/25
<i>Bacillus subtilis</i>	12.5/25	1.56/100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12.5/6.25	6.25/12.5
Yeast	MIC/MFC	
<i>Candida albicans</i>	50/25	50/12.5

EE= ethanolic extract; ME= methanolic extract. Activity High (≤ 12.5 mg.mL⁻¹); Moderate (25 mg.mL⁻¹); Low (50 mg.mL⁻¹); Very low (100 to 200 mg.mL⁻¹); (-) = no activity. Source: authors

The EE from leaves showed high antimicrobial activity (12.5 mg.mL⁻¹) on *B. subtilis* and *S. aureus* (Gram positive). This action is related to the structure of its cell wall, which is thicker and simpler in constitution compared to *E. coli* and *K. pneumoniae* (Gram negative). These bacteria shown a thin cell wall and are more resistant to extracts and antimicrobials in general (Abdillahi, et al., 2008). These authors observed that EE from the leaves of four *Podocarpus* species exerted better antimicrobial activity on *E. coli* and *K. pneuminia* when compared to ME. This result corroborates with our study, in which the species *P. lambertii* also showed better results with EE compared to ME. It is known that an influential factor in the antimicrobial activity of the species is the variation in the chemical

composition of the EO and extracts, which can be changed by several factors that condition their bioactive properties: species, plant part, harvest time, geographical location, and the extraction method (Teixeira et al., 2013; Monteiro, 2015).

Thus for lack of studies that prove the activity of the EO of the species *P. lambertii*, it was verified in the literature the activity of the compounds present in *P. lambertii* the α -pinene and limonene when present in large quantities, presents high antimicrobial activity (Fachini-Queiroz et al, 2012; Johnson et al., 2013; Pereira et al., 2014; Kumar et al., 2012), which is not was not observed by Monteiro (2015), the EOs of black pepper and tangerine despite presenting both compounds, do not show antimicrobial activity, as well as in this study with *P. lambertii*. This may have occurred because they were not present in sufficient quantities and/or due to the extraction method and insolubility of the compounds (Morais, 2009; Tan and Lim, 2015).

No antifungal and/or antimicrobial action was observed by the EO, which may be related to factors such as volatility, insolubility, chemical complexity, synergistic, antagonistic or additive interaction between EO compounds should be taken into consideration. The hydrophobic nature and high viscosity of the EO may reduce its dilution capacity and cause uneven distribution of the oil throughout the medium, thus suggesting studies with isolated compounds to verify if there is influence of compounds present in smaller amounts on the antimicrobial potential of this essential oil (Mann and Markham, 1998; Kalemba and Kunicka, 2003; Burt, 2004; Ferreira, 2014; Tan and Lim, 2015; Guimarães et al., 2019; Santos et al., 2020).

3.5 Antioxidant activity

The antioxidant capacity of the EO and *P. lambertii* extracts was determined by decreasing absorbance at 515 nm using the DPPH free radical scavenging assay (Table 4). The extracts showed higher DPPH radical scavenging when compared to the EO, with the ME showing an antioxidant percentage of 84% and CI_{50} value of 2.48, followed by the EE with 83% of free radical scavenging and CI_{50} value of 2.49. On the other hand, the EO showed low antioxidant activity (3.5%) and CI_{50} value of 42.98 when compared with the BHT

control (98%), indicating the need of higher concentrations to sequester the same amount of DPPH radicals. The results showed significant differences when compared with the BHT control. The EM and EE extracts did not differ ($p < 0.05$) (Table 4).

Table 4. Percentage of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) sequestration and CI_{50} of the essential oil and leaf extracts of *P. lambertii*

Test solution	% reduction DPPH [1 mg.mL ⁻¹]	Mean \pm standard deviation of % reduction of DPPH	CI_{50}
BHT (control)	98	0.01 \pm 0.003 a	1.31
ME	84	2.71 \pm 0.003 b	2.48
EE	83	1.15 \pm 0.007 b	2.49
OE	3.5	4.64 \pm 0.011 c	42.98

EO= essential oil; ME= methanolic extract; EE= ethanolic extract; mean \pm standard deviation. Values followed by the same letter do not differ by Tukey test 5%. Source: authors.

It is noteworthy that the CI_{50} values are inversely proportional to the percentage of DPPH sequestration, and the higher the percentage of sequestration, the lower the CI_{50} value. Thus, the EO requires a very high concentration to reach the maximum antioxidant potential (80%), thus making its use unfeasible. The other extracts tested, EE and ME showed IC_{50} values close to the control commercial antioxidant ($p < 0.05$).

The antioxidant activity of the ME should be associated with the presence of phenolic compounds, especially flavonoids and tannins that were identified in this study and present recognized antioxidant activity, as well as their possible effect in preventing several cardiovascular, cancer and neurological diseases (Harborne and Williams, 2000; Sánchez-Moreno, 2002; Ali et al, 2011) The antioxidant capacity of plant bioactives (extracts and oils) is related to their composition of phenolic compounds and their ability to interrupt the free radical chain in the initiation step of the oxidative process (Lai et al., 1991; Sharma et al. 2021). The beneficial action of phenolic compounds in human health has been related to their anti-inflammatory activity, and prevents the action of free radicals in the body (Harborne & Williams, 2000; Sánchez-Moreno, 2002, Ali et al., 2011). The efficiency of the compounds is linked to hydrogen transference that neutralizes the action of free radicals (Brewer, 2011).

Tannins are able to capture active oxygen forming stable radicals (Mello and Santos, 2007). Flavonoids act as chelators of metals, deactivators of single oxygen and consequently reduce free radicals (Mello and Filho, 2002; Canterle, 2005). The quantities of phenolic compounds vary due to different variables that affect the plants, such as climate, type of soil, species, cultivar, temperature, pathogen attack, besides the type of storage of the leaves and plant extracts (Melo et al., 2008).

The terpenes or their derivatives constitute an extensive group of organic molecules also produced as secondary metabolites in plants and their presence is normally related to the ability to prevent injuries caused by external agents (UV rays, insects, fungi, viruses, bacteria, herbivores) (Correia et al., 2008; Viegas-Júnior, 2003).

The low antioxidant activity presented by the EO of *P. lambertii*, can be attributed mainly by the absence of one of the main bioactive components present in the *Podocarpus* family, the terpenoid totarol that already has recognized antioxidant activities (Barrero, Quilez-Del-Moral, Mar-Herrador, 2003; Abdillahi et al., 2008; 2010). Generally, the potential of EOs corresponds to the phenolic content present. However, some EOs show antioxidant behavior according to the chemical structure of their components, as is the case of some terpenes (Amorati et al. 2013; Panigrahy et al. 2017).

Finally, it is suggested that further studies be conducted related to the method of collection, seasonal period and drying of the plant, as well as the extraction method since these factors directly influence the active principles that compose the EO and plant extracts (Gobbo-Neto and Lopes, 2007; Ciarlini et al., 2017).

Thus, the important role of solvents in the evaluation of the biological activities of these plants, such as antioxidant and antimicrobial activity, was verified, besides their determining characteristics in the extraction of bioactive compounds. It was observed that extracts of hydroalcoholic compositions, such as methanol and ethanol are effective for the extraction of antioxidant compounds, due to the high polarity and good solubility of the solvents, especially for the extraction of phenolic compounds (Durling et al., 2007; Fernández-Agulló et al., 2013).

3.6 Evaluation of the activity of plant extracts on preformed bacterial biofilm (irreversible fixation)

Only the extracts (EE and ME) were evaluated for *P. lambertii* activity in preformed biofilms (24 hours - irreversible fixation) against standard strains. The EO showed no inhibitory or bactericidal activity (MIC/MBC). EE and ME were tested at concentrations of MIC, 2X MIC and 4X MIC on each bacterial strain evaluated. The data from the colorimetric assays were calculated in general averages of the optical density (OD) of the biofilm biomass quantified by crystal violet staining and the evaluation of biofilm cell viability was assessed by reducing tetrazolium salts (with TTC) (Table 5 and 6). Statistical tests demonstrated no significant difference between MIC, 2X MIC and 4X MIC, therefore the results expressed refer to MIC.

The ME results (Table 5) showed greater inhibition of the biomass of the preformed biofilm for *Escherichia coli* (185.91%) and high antibiofilm activity (>50%) in all strains tested. These results can be explained by the fact that the secondary compounds present in ME, present influence on bacterial interaction, not allowing the attachment of microorganisms on an abiotic surface (Merritt et al., 2005; Abdallah et al., 2014).

Table 5 - Antifibiofilm activity of *Podocarpus lambertii* methanolic extract on cell viability of preformed biofilms of standard bacteria by the crystal violet technique and triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction.

ME	Crystal violet			Assay with TTC		
	Control	MIC	%I	Control	MIC	% VC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0.16±0,055	0.10±0.137	185.91	0.05±0.003	0.06±0.004*	1.36
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1.87±0,054	0.62±0.056*	66.64	0.06±0.003	0.05±0.002*	-0.87
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (ATCC 25923)	0.24±0,070	0.09±0.022*	122.93	0.07±0.011Aa	0.05±0.002*	-2.68

Mean OD ± standard deviation; CV= Crystal Violet; ME = methanolic extract; %I = percentage of inhibition; %VC= percentage of cell viability; * = differ by Tukey test (p>0.05). Values of inhibition percentages (CV): < 50% indicate low antibiofilm activity; > 50% indicate high antibiofilm activity. Negative values indicate increase in biomass of biofilm formed. Values of percentages of cell viability (TTC): < 50% indicate low cell activity; > 50% indicate high cell activity.

The high antibiofilm activity exhibited by ME is due to the presence of tannins, which are water-soluble polyphenols and, can be hydrolyzable or condensed (Sharma, Misba, and Khan 2019). They cause enzyme inhibition by depriving bacteria of protein substrates and polysaccharides. The either activate or block chemical reactions or hinder cell-cell communication (quorum sensing), thus reducing biofilm formation (Juhas, Eberl, Tummler, 2005; Dong, Wang, Zhang, 2007; Paul et al., 2009; Reis-Teixeira, 2014; Reddy et al., 2020).

On the other hand, EE showed low antibiofilm activity (Table 6) for the *S. aureus* strain (47.90%) and in the *E. coli* and *P. aeruginosa* strains the percentages were below 0%. This behavior occurred because planktonic bacteria are more susceptible to antimicrobial agents than cells in a biofilm system, and bioactives cannot pass through the extracellular matrix of the biofilm as easily (Lewis, 2001; Sandasi, Leonard and Viljoen, 2008).

Table 6 - Antifibiofilm activity of the ethanolic extract of *Podocarpus lambertii* on biomass of pre-formed biofilms of standard bacteria by the crystal violet technique and reduction of triphenyltetrazolium chloride (TTC).

EE	Crystal Violet Test			TTC test		
	Control	MIC	%I	Control	MIC	% VC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0.16±0.055	0.96±0.087*	-489.02	0.05±0.003	0.07±0.006*	1.58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1.87±0.754	3.33±0.033*	-78.10	0.06±0.003	0.05±0.001*	-1.55
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0.24±0.070	0.39±0.053	47.90	0.07±0.011	0.47±0.000*	-1.75

Mean OD ± standard deviation; CV= Crystal Violet; EE = ethanolic extract; %I = percentage of inhibition; %VC= percentage of cell viability; * = differ by Tukey test (p>0.05). Values of inhibition percentages (CV): < 50% indicate low antibiofilm activity; > 50% indicate high antibiofilm activity. Negative values indicate increase in biomass of biofilm formed. Values of percentages of cell viability (TTC): < 50% indicate low cell activity; > 50% indicate high cell activity

The inability of EE to inhibit biomass growth may be related several factors such as the mode of biofilm growth, the required concentration of an antimicrobial, which can be 1000 times higher to eliminate biofilm producing cells than to eliminate bacteria in planktonic state (Frank, Patel, 2007; Hoiby et al. 2010; Pereira, 2014; Chen et al., 2018, Macedo, 2019).

The increased biomass of the biofilm formed in EE, (mainly in *E. coli* strain) may have occurred due to the synergistic effect between the compounds present in this extract. Enzyme-mediated resistance, genetic adaptation, by the concentration of secondary metabolites and/or activation of the glycocalyx matrix, which helps the biofilm in defense and survival to stress situations from the external environment, may also cause an increase in biomass (Naves et al., 2008; Caixeta, 2008; Sharma et al., 2013).

Adhesion is a condition for biomass formation that is based on the microbial capacity that, when faced with imposed conditions, forms biofilm or not; some conditions that can influence such formation are: nutritional supply, carbon source, nitrogen and presence of inhibitor components (Gandhi et al., 2017; Zamuza et al., 2021). In both extracts (ME and EE) there is the presence of flavonoids, which present an aggregating effect on bacterial cells when in low amounts. The EE presents lower amount of flavonoids inducing biomass growth, while the flavonoids present in ME show greater amounts. This may have facilitated the penetration of these compounds through the cell wall, acting directly on the disruption of the biofilm architecture, promoting disruption of bonds and cell detachment and biomass reduction (Qin et al., 2000; Anderson et al. 2005; Zeng et al., 2008; Vandeputte et al., 2010; Rasko and Sperandio, 2010; Bocelli, 2016).

The results of ME and EE extracts on the cell viability of biofilms formed indicated a reduction in cellular activity and/or high antibiofilm activity on all strains tested, demonstrating a percentage of inhibition < 50% (Table 5 and 6).

There are no records in the literature regarding the ability of plant extracts of species of the genus *Podocarpus* to reduce and/or destroy pre-formed biofilm. Making this study of EE and ME from *P. lambertii* leaves the first scientific report on this biological activity. Nevertheless, research with plant extracts and essential oil of other species on antibiofilm activity has been studied. The action of the hydroalcoholic extract *Lippia grata* on biofilm formation in 25 isolates of *P. aeruginosa* was evaluated and antibiofilm activity was observed at the concentration of 50 mg.mL⁻¹, but the essential oil was shown no antimicrobial activity Macedo (2019), similar to our study.

In summary, the results of the antibiofilm potential tests by crystal violet assay indicate that the ME was effective in reducing biomass and as for TTC test,

both EE and ME were effective in reducing the metabolic viability of biofilms formed, causing damage to their cellular activity.

4. Conclusions

The manuscript is the first study that describes the bioactive compounds present in the essential oil and plant extracts of the leaves of *P. lambertii* and their biological activities. In the characterization of the EO, 16 groups of compounds were identified: diterpenes, sesquiterpenes, hydrocarbon and monoterpene. The phytochemical prospection of ME and EE of *P. lambertii* revealed the presence of flavonoids, steroids, tannins and alkaloids, suggesting the relationship of these classes of metabolites with antimicrobial and antioxidant activities found in the extracts. These finding demonstrated a high antimicrobial activity of the extracts, which varied according to the extracting solvent and the microorganisms tested. High antioxidant and antibiofilm activity was observed for ME. There was no significant antimicrobial activity or antioxidant activity of EO when compared to the BHT control. The ME showed high biological potential in terms of antimicrobial and antioxidant potential and can be exploited as a natural source of antimicrobial and antioxidant compounds.

Financing

This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Funding Code 001.

Declaration of conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' contributions

Designed and conducted all of the experiment (Bandeira, D. M.; Correa, J. M; Pinto, F.G.S.), Collected data, data analysis (Bandeira, D. M; Rosset, J.),

laboratory analysis (Bandeira, D. M; Laskoski, L.V.; Batista, J.M.), Statistical analysis of the data (Bandeira, D. M) and wrote the manuscript (Bandeira, D. M.; Pinto, F.G.S; Kuo, L.H.). All authors have read and approved the final manuscript.

References

Abdillahi, H. S., Stafford, G. I., Finnie, J. F. & Staden, J., 2010. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Podocarpus sensu latissimo* (s.l.). South African Journal of Botany 76, 1-24.

Abdillahi, H. S., Stafford, G. I., Finnie, J. F. & Staden, J., 2008. Antimicrobial activity of South African *Podocarpus* species. Journal of Ethnopharmacology 119, 191-194.

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N. E., 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. Archives of microbiology 196, 453-472.

Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream.

Ali, L., Svensson, B., Alsanius, B. W., Olsson, M. E., 2011. Late season harvest and storage of Rubus berries - major antioxidant and sugar levels. Scientia Horticulturae 129, 376-381. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.047>

Amorati R., Foti, M. C. & Valgimigli, L., 2013. Antioxidant activity of essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 10835-10847. <https://doi.org/10.1021/jf403496k>.

Anderson J. C., Headley C., Stapleton P. D., Taylor P. W., 2005. Synthesis and antibacterial activity of hydrolytically stable epicatechin gallate analogues for the modulation of lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters 15, 2633–2635.

Araújo, N. R. R., 2010. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, Pará, Brasil.

Babushok, V. I., Linstrom, P. J. & Zenkevich, I. G., 2011. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. Journal of Physical Chemistry Reference Data 40, 1-48.

Barrero, A. F., Quilez-Del-Moral, J. F. & Mar-Herrador, M., 2003. Podolactones: a group of biologically active norditerpenoids. Studies in Natural Products Chemistry 28, 453-516.

Bezerra, J. W. A., Costa, A. R., da Silva, M. A. P., Rocha, M., Boligon, A. A., da Rocha, J. B. T. & Kamdem, J. P., 2017. Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. South African Journal of Botany 113, 437-442.

Bocelli, M. D. 2016. Estudo da Atividade de chalconas no controle de biofilmes bacterianos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Carlos, São Paulo, Brasil.

Bouzidi, A., Benzarti, A., Amira, E. A., Mahfoudhi, A., Hammami, S., Gorcii, M., Mastouri, M., Hellal, A. N., Mighri, Z., 2016. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial effects of *Tunisian Limoniastrum guyonianum*, Durieu ex Boiss extracts, Pak. Journal of Pharmaceutical Sciences 29, 1299–1305.

Brewer, M. S., 2011. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 10, 221-247.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology 94, 223-253. <https://doi.org/361.10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.

Cabana, R., Silva, L. R., Valentão, P., Viturro, C., Andrade, P., 2013. Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). Industrial Crops and Products 48, 49-56.

Caixeta, D. S. 2008. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de pseudomonas em superfície de aço inoxidável. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Campello, J. P. 1972. Isolamento e identificação de alguns constituintes da casca e das folhas do *Podocarpus lambertii* Klotszch. Tese de Livre Docência. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

Carvalho, A., Paiva, J., Louzada, J., Lima-Brito, J., 2013. The transcriptomics of secondary growth and wood formation in Conifers. Molecular Biology International 8, 01-13.

Ciarlini, J. J. S., Marangoni, A., & Bolzan, A., 2017. Selectivity of supercritical CO₂ extraction and atmospheric pressure techniques for the major volatile compounds of *Eugenia involucreta* leaves from Southern Brazil. Food and Bioproducts Processing 106, 29-34. <https://doi.org/37210.1016/j.fbp.2017.08.008>.

CLSI. 2018. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 11th Edition, CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Chen, H., Wubbolts, R. W., Haagsman, H. P., Veldhuizen, E. J. A., 2018. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. *Scientific reports* 8, 10446. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28842-8>.
- Christensen, G. D., Simpson, A. W., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, L. M., Melton, D. M., Beachey, E. H., 1985. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococcus* to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22, 996-1006. <https://doi.org/10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985>
- Correia, S. J., David, J. M., Da-Silva, E. P., David, J. P., Lopes, L. M. X. & Guedes, L. M. S., 2008. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de *Tapirira guianensis*. *Química Nova* 31, 2056-2059.
- Dirar, A. I., Alsaadi, D. H. M., Wada, M., Mohamed, M. A., Watanabe, T. & Devkota, H. P., 2019. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany* 120, 261–267.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Zhang, L. H., 2007. Quorum-quenching microbial infection: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 326, 1201-1211. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2045>
- Durling, N. E., Catchpole, O., Grey, B. J., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., Perry, N. B., 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry* 50, 5294-5299.
- El-Hawary, S., Taha, K., Kirolos F., Dahad, A., Saleh, N., El-Mahis, A., 2015. Molecular Identification, GC/MS and antimicrobial activity of the essential oils and extracts of three *Podocarpos* species. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 30, 360.
- Fachini-Queiroz, F., Kummer, R., Estevão-Silva, C. F., Carvalho, M. D. B., Cunha, M. J., Grespan, R., Bersani-Amado, C. A., Cuman, R. K. N., 2012. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/657026>.
- Famuyide, I. M., Aro, A. Q., Fasina, F. O., Eloff, J. N., McGaw, L. J., 2019. Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19, 141. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>
- Fakhri, S., Moradi, S. Z., Farzaei, M. H. & Bishayee, A., 2020. Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A Mechanistic Review 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.007>

Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentão, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., Pereira, J. A., 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products* 42,126–132.

Ferreira, J. M. C. N., 2014. Genes enterotoxigénicos e resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva de origem alimentar. Dissertação de mestrado. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco. Castelo Branco, Portugal.

Frank, K. L., Patel, R., 2007. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infection and Immunity* 75, 4728-4742. <https://doi.org/10.1128/iai.00640-07>.

Franich, R. A., Cambie, R. C., 2011. Constituintes de Óleo Essencial de Folhas *Podocarpus totara* Leaves. *Journal of Essential Oil Research* 11, 507-510. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701197>.

Frazen, F. L., Fries, L. L. M., Oliveira, M. S. R., Lidório, H. F., Menegaes, J. F., Lopes, S. J., 2018. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. *Acta Iguazu* 7, 9-21.

Gandhi, A. D., Vizhi, D. K., Lavanya, K., Kalpana, V. N., Rajeswari, V. D., Babujanathanam, R., 2017. In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry and Biophysics Reports* 12, 193-197. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.004>

Gobbo-Neto, L & Lopes, N. P., 2007. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova* 30, 374-381.

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

Gonçalves, C. H. S., Almas, L. R. M., Pinc, M. M.; Antonio, N. C., Carneiro, V. P. P., Lourenço, E. L. B., Ceranto, D. C. F. B., Alberton, O., 2019. Rendimento, caracterização e fitoquímica do óleo essencial de *Tetradenia riparia*. *Brazilian Journal of Development* 5, 20207-20217.

Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M. & Scherer, R., 2019. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* 24, 1-12.

Gupta, D., Dubey, J. & Kumar, M., 2016. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6, 15-20. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60978-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60978-1)

- Harborne, J. B., Williams, C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 52, 481- 504.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Hutchings, A., Scott, A. H., Lewis, G. & Cunningham, A. B. 1996. *Zulu Medicinal Plants: An Inventory*. Scottsville: University of Natal Press.
- Iganci, J. R. V. & Dorneles, M. P., 2019. Podocarpaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20526> (Accessed at 29.08.2020).
- Jesus, G. S., Micheletti, A. C., Takahashi, K. M., Matayoshi, T., Pott, A. e Yoshida, N. C., 2020. Antimicrobial potencial of *Pectis subtriata* essential Oil (Asteraceae) Against drug-resistant *Staphylococcus* strains. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 92, 1-10. <https://doi.org/10.1590/0001-37652020200456>
- Jia, P., Xue, Y. J., Duan, X. J. & Shao, S. H., 2011. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression. By methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 53, 409-416. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03122.x>
- Johnson, O. O., Ayoola, G. A. & Adenipekun, T., 2013. Antimicrobial Activity and the Chemical Composition of the Volatile Oil Blend from *Allium sativum* (Garlic Clove) and *Citrus reticulata* (Tangerine Fruit). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 5, 187-193.
- Juhas, M., Eberl, L. & Tummeler, B. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* 7, 459-471.
- Kalemba, D. & Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10, 813-82. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Kong, K. W., Junit, S. M., Aminudin, N. & Aziz, A. A., 2020. Phytochemicals in *Barringtonia* species: Linking their traditional uses as food and medicine with current research. *Journal of Herbal Medicine* 19, 1-14.
- Korbes, V. C. 1995. *Manual de plantas medicinais*. Francisco Beltrão: Associação de Estudos, Orientação e Assistência Rural, 1-188.
- Kumar, P.; Mishra, S., Malik, A., Satya, S., 2012. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*, 122, 212-218.

Kuźma, L., Rózalski, M., Walencka, E., Rózalska, B., Wysokińska, H., 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine* 14, 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.10.008>

Lai S. M., Gray J. I., Smith D. M., Booren A. M., Crakel R. L., Buckley D. J., 1991. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *Journal of Food Science*, 56, 616-20.

Lazari, D. M., Skaltsa, H. D. & Constantinidis, T., 2000. Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakiensis* (Freyn & Sint.) Georg. and *C. zuccariniana* DC. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 7-11. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(200001/02\)15:13.3.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(200001/02)15:13.3.CO;2-V)

Le Metayer, P., Schaeffer, P., Adam, P., Albrecht, P., Rousse, S. & Düringer, P., 2008. A novel pathway leading to the formation of unreported C40 bis-diterpenoids of Podocarpaceae origin in sediments. *Organic Geochemistry*. 39, 658-675.

Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 999-1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R. & Wu, H., 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 148, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>

Macedo, C. A., 2019. Atividade antibacteriana e antibiofilme da *Lippa grata* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal- Rio Grande do Norte, Brasil.

Mann, C. M. & Markham. J. L., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied of Microbiology*, 84, 538–544. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x>

Matos, F.J. A. (1997). Introdução à fitoquímica experimental. 2ª ed. UFC, Fortaleza.

Mazzari, A. & Prieto J. M. 2014. Monitoramento de interações farmacocinéticas entre plantas medicinais e fitoterápicos e os medicamentos convencionais pelo sistema de farmacovigilância brasileiro. *Infarma*, 26, 193-198.

Mello, J. C. P. & Santos, S. D. 2007. Taninos. In: Simões C. M. O. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6ª ed. Editora UFRGS, Porto Alegre; Editora UFSC, Florianópolis.

Mello, M. O. & Filho, S. M. C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 14, 71-81.

Melo, E. De A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G. De, Nascimento, R. J., 2008. Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 193-201. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000200005>

Merritt, J. H., Kadouri, D. E., O'Toole, G. A, 2005. Growing and analyzing static biofilms. Jul;Chapter 1:Unit 1B.1. *Current Protocols in Microbiology* <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>.

Monteiro, A. R. P., 2015. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Dissertação de mestrado. Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

Morais, S. M., Cavalcanti, E. S. B., Costa, OS. M. O., Aguiar, C. L. A. 2009. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia* 19, 315-320. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200023>.

Nadaraia, N. S., Amiranashvili, L. S., Merlani, M., Kakhbrishvili, M. L., Barbakadze, N. N., Geronikaki, A., Petrou, A., Poroikov, V., Ciric, A., Glamoclija, J. & Sokovic, M. 2019. Novel antimicrobial agents' discovery among the steroid derivatives. *Steroids* 144, 52-65.

Naves, P., Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, M., Onte, C. M., Soriano, F., 2008. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis* 45, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.03.003>.

Oliveira, E. A., Martins, E. G. A., Soares, M. G., Chagas-Paula, D. A., Passero, L. F. D., Sartorelli, P., Baldim, J. L. & Lago, J. H. G., 2019. A Comparative Study on Chemical Composition, Antileishmanial and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from Leaves of *Guarea macrophylla* (Meliaceae) from Two Different Regions of São Paulo State, Brazil, Using Multivariate Statistical Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30, 1395-1405.

Orczyk, M., Wojciechowski, K. & Brezesinski, G., 2020. The influence of steroidal and triterpenoid saponins on monolayer models of the outer leaflets of human erythrocytes, *E. coli* and *S. cerevisiae* cell membranes. *Journal of Colloid and Interface Science* 563, 207-217.

Pandini, J. A., Pinto, F. G. S., Scur, M., Alves, L. F. A., Martins, C. C. 2015. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9, 48-55.

Panigrahy, S. K.; Kumar, A. & Bhatt, R., 2017. Antioxidant potentials of successive solvent extracts from the unexplored *Hedychium coronarium*

rhizome. *Journal of Food Science and Technology* 54, 3297-3306. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2777-3>.

Paul, D., Kim, Y. S., Ponnusamy, K. & Kwean, J. H., 2009. Application of quorum quenching to inhibit biofilm formation. *Environmental Engineering Science* 26, 1319-1323. <https://doi.org/10.1089/ees.2009.0392>.

Paulus, D., Valmorbida, R. & Ramos, C. E. P. 2019. Productivity and Chemical composition of the essential oil of *Ocimum x citriodorum* Vis. According to ontogenetic and diurnal variation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 12, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.12.004>

Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, C., Rosa, E., & Saavedra, M. J., 2014. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics Against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, 52, 1-7.

Qin, Y., Luo Z-Q., Smyth, A.J., Gao, P., von Bodman, S. B. & Farrand, S. K., 2000. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *The EMBO Journal* 19, 5212–21. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5212>.

Rasko, D. A. & Sperandio V., 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteriamediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 117-128. <https://doi.org/10.1038/nrd3013>

Reddy, P. R. K., Elghandour, M. M. M. Y., Salem, A. Z. M., Yasaswini, D. Reddy, P. P. R. Reddy, A. N. & Hyder, I., 2020. Plant secondary metabolites as feed additives in calves for antimicrobial stewardship. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114469>.

Reis-Teixeira, F. B. R., 2014. Avaliação do papel de óxido nítrico, de óleos essenciais e de sanitizantes na dispersão de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Ribeiro, B. D., Alviano, D. S., Barreto, D. W. & Coelho, M. A. Z., 2013. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 436, 736-743. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2013.08.007>.

Rosa, P. V. S., Everton, G. O., Pereira, A. P. M., Fonseca, D., Cunha, J. C. R., Mendonça, I. P., Lima, E. S., Souza, L. S., Souza, L. S., Dias, A. A. S., Mouchrek-Filho, V. E. & Arruda, M. O. 2020. Bactericidal activity of essential oil and hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* leaves. *Research, Society and Development*, 9, 1-22.

- Sandasi, M., Leonard C. & Viljoen A. 2008. The effect of five common essential oil components on *Listeria Monocytogenes* biofilms. *Food Microbiology* 19, 1070–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.11.006>.
- Santos, J. R. N., Teles, A. M.; Ferreira, C. G. & Mouchrek, A. N., 2020. Avaliação da atividade bactericida e antioxidante do óleo essencial e do extrato hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgare*). *Research, Society and Development* 9, 1-17. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8410>.
- Scur, M. C., Pinto, F. G. S., De Bona, E. A. M., Weber, M. C., Alves, L. F. A. & Moura, A. C., 2014. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, 9, 823-830. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8202>.
- Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S. & Gabrani, R. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets, *Biologicals* 42, 1-17. <http://dx.doi.org/10.1016/biologicals.2013.11.001>
- Sharma, D., Misba, L. & Khan, A. U. 2019. Antibiotics versus biofilm: na emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 8, 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- Sharma, S., Kumari, A., Dhatwalia, J., Guleira, I., Lal, S., Upadhyay, N. & Kumar. 2021. Effect of solvents extraction on phytochemical profile and biological activities of two *Ocimum* species: A comparative study. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 25, 100348. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100348>.
- Song, X. M., Yu, J., Canção, X. P., Zhong, Q. X., Chen, G. Y., Wu, L. Y. & Chao, J., 2015. Chemical Composition of Essential Oils from *Podocarpus brevifolius* Leaves, Stems, and Roots. *Chemistry of Natural Compounds*, 51, 987–988. <https://doi.org/10.1007/s10600-015-1472-8>
- Souza, J. G. L., Pinto, F. G. S., Toledo, A. G., Alves, L. F. A., Alves, D. S. 2020. Biological activities and phytochemical screening of leaf extractes from *Zanthoxylum caribaeum* L. (*Rutaceae*). *Bioscience Journal*, 36, 223-234. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-48051>
- Stephen D. L. & Rex T. W. (1987). Foliage sesquiterpenes and diterpenes of *Podocarpus spicatus*. *Phytochemistry*, 26, 3207-3215. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82471-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82471-1).
- Takshak, S. & Agrawal, S. B., 2019. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 193, 51-88. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>.
- Tan, J. B. L. & Lim, Y. Y., 2015. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Journal Food Chemistry*, 172, 814-822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.141>.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J., Saraiva, J. M. A. & Nunes, M. L., 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595.

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K. & Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 12, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>.

Toledo, A. G., Souza, J. G. L., Silva, J. P. B., Favreto, W. A. J., Costa, W. F., Pinto, F. G. S. 2020. Chemical composition antimicrobial and antioxidante activity of the essential oil of leaves of *Eugenia involucrata* DC. *Bioscience Journal*, 36, 568-577. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-48096>

Toledo, A. G. (2018). Composição química e atividades biológicas das folhas de *Eugenia involucrata*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

Yu, J. Q., Liao, Z. X., Cai, X. Q. & Zou, G. L., 2007. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.08.004>.

Vandeputte, O. M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., El Jaziri, M., Baucher, M., 2010. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 243–53. <https://doi.org/10.1128/AEM.01059-09>

Viegas-Júnior, C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26, 390-400. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300017>.

Weber, L. D., Pinto, F. G. S., Scur, M. C., Souza, J. G. L., Costa, W. F., Leite, C. W., 2014. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. *African Journal of Agricultural Research*, 9, 846-853. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8269>.

World Health Organization - WHO. (2011). Combat Antimicrobial Resistance. In: World Health Day 2011. World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/world-health-day/2011/WHD201_FS_EN.pdf?ua=1. (Acesso em: 08.01.2021).

Zamuza, S., Munekeataa, P. E. S., Dzuvoorb, C. K. O., Anderson, W. Z., José, S. S. & Lorenzo, M., 2021. The role of phenolic compounds against *Listeria*

monocytogenes in food. A review. *Trends in Food Science & Technology* 110, 385-392.

Zeng, Z.; Qian, L.; Cao, L.; Tan, H.; Huang, Y.; Xue, X.; Shen, Y. & Zhou, S., 2008. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 119–126. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1406-5>.

CAPITULO 2: Prospecção fitoquímica, antioxidante, microbiológica e biofilmes dos extratos de *Podocarpus lambertii* Klotzch ex Endl.

Debora Marina Bandeira^a, Juliana Moço Corrêa^a, Larissa Valéria Laskoski^a, Jéssica Rosset^b, Lázaro Henrique Soares de Moraes Conceição^c Fabiana Gisele da Silva Pinto^{a*}

^aPrograma de Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Cascavel – PR, Brasil. Cep: 85819-110.

^bCurso de Ciências Biológicas, Licenciatura, Universidade Estadual do Oeste do Paraná UNIOESTE. Cascavel – PR, Brasil. Cep: 85819-110.

^c Programa de Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Herbário HUOP, Universidade Estadual do Oeste do Oeste do Paraná UNIOESTE. Cascavel – PR, Brasil. Cep: 85819-110.

RESUMO

Alguns ensaios deste estudo com a espécie *Podocarpus lambertii* são inéditos pelo fato de ser uma planta nativa brasileira usada tradicionalmente em reflorestamento, estudos em relação ao seu potencial biológico, é quase que nulo, quando comparado com outras espécies do gênero. O objetivo deste estudo foi realizar a prospecção fitoquímica através de reações colorimétricas, para determinar os metabólitos secundários presente nos extratos vegetais solúveis em acetona (EA), acetato de etila (EAE) e hexano (EHx) das folhas; avaliar o potencial antimicrobiano pela técnica de microdiluição em caldo; potencial antioxidante pelo método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), bem como avaliar a capacidade de inibição do biofilme pelos métodos cristal violeta e redução de 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazol)-2,5- Diphenyl-2H Tetrazolium bromide (MTT). Na prospecção fitoquímica foi detectado a presença de flavonoides, triterpenoides, esteroides, taninos, alcaloides e saponinas. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Salmonella enterica* Abaetetuba, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*). Foi observado elevado potencial de sequestro de radical livre apenas no extrato acetônico. O potencial antibiofilme foi observado em todos os extratos testado reduzindo a viabilidade celular em todas as cepas testadas. Os resultados contribuem para o conhecimento da espécie e indicam o potencial dos extratos de *P. lambertii* como fonte de bioativos vegetais para o desenvolvimento de novas estratégias alternativas para o controle de micro-organismos resistentes.

Palavras-chaves: Atividade antioxidante. Plantas Nativas. Biofilme. Atividades Biológicas. Metabólitos secundários.

1 Introdução

A capacidade de consciência e experiência capacitou o ser humano a utilizar diversos recursos naturais, inclusive o uso de plantas medicinais para o tratamento das mais diversas condições clínicas. Em muitas regiões, especialmente em países em desenvolvimento, as tradições culturais e crenças nesses métodos alternativos ainda são um dos principais suportes para cuidado e manutenção da saúde (Santos et al., 2020; Brasil, 2006). Um grande número de estudos e pesquisas estão em andamento com o objetivo de verificar cientificamente o conhecimento popular sobre os efeitos das plantas medicinais principalmente para encontrar uma nova base para terapias alternativas, ingredientes eficazes para medicamentos, controle de pragas, minimizando os efeitos colaterais e toxicológicos, e buscando uso mais seguro e confiável (Firmo et al., 2011; Carneiro et al. 2014).

O Brasil é detentor da maior diversidade genética do mundo, no qual estima-se que exista entorno de 350 a 550 mil espécies e destas 55 mil espécies de plantas já foram reconhecidas e catalogadas, no qual apenas 1% da flora foi investigada devido a este conhecimento popular. (Duarte, 2006; Silva Filho, 2009; Carneiro et al. 2014). Setores como industrial, farmacêutico, ambiental, por exemplo, já destacam os compostos bioativos (metabólitos secundários) dos extratos vegetais como: agentes antimicrobianos, antioxidantes, pesticidas, inseticidas, herbicidas, sedativos, aromas, dentre outros (Sartoratto et al., 2004, Baser; Buchbauer, 2015).

A resistência dos micro-organismos devido ao aumento do excessivo do uso indevido de antimicrobianos sintéticos, fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2017, cataloga-se 12 famílias de bactérias que representam ameaça à saúde humana, e em 2019 lançaram uma campanha para combater a resistência antimicrobiana alertando sobre a alta capacidade adaptativa dos micro-organismos, o que torna a pesquisa sobre os metabólitos secundários das plantas nativas essencial para o combate a resistência (Duarte, 2006).

A família Podocarpaceae compreende 18 gêneros e aproximadamente 173 espécies espalhadas pelo mundo (Klock et al.,2005). Entre as espécies, destaca-se o *Podocarpus lambertii*, conhecido como Pinheiro Bravo, espécie nativa da região Sul do Brasil (Embrapa, 2004; Iganci e Dorneles, 2019). O estudo desta espécie ainda é incipiente e em decorrência disto, pouco se sabe do ponto de vista científico do potencial farmacológico e químico desta planta, justificando sua exploração acadêmica.

Levando em consideração as características da família Podocarpaceae, com o relato de atividades biológicas já descritas em espécies desta família, torna-se interessante maiores estudos com a espécie *Podocarpus lambertii*, para descoberta de novos bioativos naturais que possam ser empregados em saúde pública, indústria e inúmeras outras possibilidades de aplicação, tornando estes estudos cada vez mais pertinentes, permitindo a validação do conhecimento etnobotânico e valorização da flora nativa.

Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar os principais grupos de metabólitos secundários, a partir da prospecção fitoquímica dos extratos vegetais das folhas de *P. lambertii*, investigar o potencial antimicrobiano e antioxidante e antibiofilme frente a micro-organismos patogênicos.

2. Metodologia

2.1 Coleta e identificação das folhas de *Podocarpus lambertii*

A coleta das folhas foi realizada no parque ecológico Paulo Gorski, localizado no município de Cascavel, região oeste do estado do Paraná, (24°57'51.61"S e 53°26'14.80"O). As coletas aconteceram em dias aleatórios, no período da manhã, entre as 08:00 am (manhã), 12h (meio-dia), tanto em períodos chuvosos como secos, entre os meses de agosto de 2019 e março de 2020. Uma exsicata da planta foi entregue ao Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) para a identificação botânica e registro UNOP10730.

2.2 Obtenção dos extratos vegetais

A preparação dos extratos foi realizada segundo a metodologia proposta por Pandini et al. (2015). O material vegetal seco foi adicionado na proporção de 10 gramas (g) para cada 100 mL de Acetona P.A (EAc), Acetato de Etila P.A. (EAe) e/ou Hexano P. A. (EHx) (marca Dinâmica) e mantidos em agitador rotativo à 220 rpm durante 24 horas. Após esse período, a solução foi filtrada utilizando papel filtro Whatman nº1 e centrifugado em tubos cônicos a 3800 rpm durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante dos extratos foi submetido à rotaevaporação para total eliminação dos solventes. Os extratos brutos foram armazenados ao abrigo de luz em freezer a 4°C. O rendimento foi calculado em função da massa de extrato e a massa de matéria prima, em gramas de material utilizado.

2.3 Triagem fitoquímica dos extratos

A prospecção fitoquímica qualitativa para metabólitos secundários presentes nos extratos foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Matos (1997) com modificações. Esses testes se basearam na visualização colorimétrica e/ou na formação de precipitado após a adição dos reagentes específicos. As classes de metabólitos secundários identificados foram: saponinas a partir da reação com água destilada e ácido clorídrico P. A.; esteroides e triterpenoides por meio da reação de Liebermann-Burchard; taninos por meio da reação com cloreto férrico e cumarinas por meio de reação de fluorescência com hidróxido de potássio; antocianinas, antocianidinas, auronas, chalconas, flavanonóis, flavonas, flavonóis e xantonas (flavonoides) a partir de mudanças de pH no meio; alcaloides empregando o reagente de Dragendorff.

2.4 Micro-organismos utilizados

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel/PR. O OE e os extratos foram testados frente a diferentes micro-organismos da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) sendo três cepas Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* Enteritidis (ATCC 13076), *Pseudomonas*

aeruginosa (ATCC 27853), quatro Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) *Listeria monocytogenes* (ATCC 1911) e uma levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

2.5 Atividade antimicrobiana

Para o teste de atividade antimicrobiana, os micro-organismos foram recuperados em caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi) e incubados por 24 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após este período, as cepas foram repicadas em meio Ágar Muller Hinton (AMH) (Kasvi), e padronizadas em solução salina (0,85%) resultando na concentração final de 1×10^5 UFC.mL⁻¹ para as bactérias e 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para levedura de acordo com a escala Mac Farland.

2.5.1 Concentração inibitória mínima (CIM) / Concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A atividade antimicrobiana do OE e dos extratos de *P. lambertii* foi avaliada seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) e Scur et al., (2014) com modificações e a concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. A EAc, EAe e EHx foram solubilizados em metanol (P.A), filtrado e diluído em caldo Muller Hinton (MHB). Na placa de microdiluição de 96 poços (Olen) foram dispensados 150 µL de MHB em todos os poços, 150 µL dos extratos vegetais foi acrescentado no primeiro poço, com diluições seriadas nas concentrações de 200 – 0.09 mg.mL⁻¹. Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 20 µL com micro-organismos a 1×10^5 UFC.mL⁻¹ em cada poço e as placas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico comercial gentamicina (bactérias) e o antifúngico nistatina (*C. albicans*) nas mesmas concentrações testadas nos experimentos. Como controle negativo foi adicionado o inóculo ao caldo MH, sem presença do óleo/extrato para verificação da viabilidade do microrganismo testado. Como revelador colorimétrico foram utilizados 20 µL da solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (Vetec) a 0,5 % em cada poço da placa. A presença da coloração vermelha foi interpretada como prova negativa

do efeito inibitório. O ensaio de CIM foi realizado em triplicata, sendo possível determinar a menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento microbiano. Depois da incubação foi observada a turbidez e cada poço recebeu uma alíquota de 20 µl de cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) para a revelação da inibição ou não das bactérias. Após a realização do ensaio da CIM, antes de realizar a adição de TTC, foi retirada uma alíquota de 2 µl e inoculada em MHA, para a determinação da CBM/CFM e as placas foram incubadas durante 24 horas a temperatura de 36°C, observando o crescimento ou não bacteriano.

A CIM e a CBM/CFM foram classificadas de acordo com a Araújo (2010) e Pandini et al. (2015), sendo a atividade enquadrada em uma das 4 classes: elevada (<12.5 mg.mL⁻¹), moderada (12.5 a 25 mg.mL⁻¹), baixa (50 a 100 mg.mL⁻¹) e muito baixa (>100 mg.mL⁻¹) e para o óleo essencial a classificação segue os critérios propostos por Sartoratto et al. (2004), sendo a atividade considerada baixa (7000 a 3500 µg.mL⁻¹), moderada (1700 a 875 µg.mL⁻¹), alta (437.5 a 218.75 µg.mL⁻¹) ou muito alta (<109.375 µg.mL⁻¹).

2.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi analisada de acordo com as metodologias propostas por Rufino et al. (2007) e Weber (2014) com modificações, pelo método da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Para a determinação da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) a amostra foi preparada com 1 mg de extrato e 1 mL de metanol P.A. em tubo cônico de 1.5 mL, homogeneizado em agitador de tubos por 30 segundos. Uma alíquota de 0.1 mL foi transferida para 3.9 mL de solução metanólica de DPPH 0.2 mM e homogeneizada. As leituras foram mensuradas em espectrofotômetro (Femto, 600plus) com absorvância de 515 nm e monitoradas a cada minuto a redução até completa estabilização, perfazendo o ensaio pré-teste. A leitura da absorvância final para o cálculo foi expressa por: $I\% = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$, onde Abs₀ é a absorvância do controle e Abs₁ é a absorvância da amostra.

Após a obtenção da %AA do OE e extratos, foram definidas as concentrações utilizadas para a obtenção do IC₅₀ (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir 50% a concentração inicial de DPPH). Para definição

das concentrações baseou-se nos valores obtidos de %AA no ensaio pré-teste, quando este foi maior que 80% utilizou-se as seguintes concentrações 0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1 mg.mL⁻¹, abaixo de 80% as concentrações 1; 2.5; 5.0; 7.5 e 10 mg.mL⁻¹. As leituras de todas as reações seguiram utilizando como branco o metanol, como controle negativo o reagente com o radical livre (DPPH) e metanol e como controle positivo o antioxidante butil-hidroxi-tolueno (BHT) (Synth) nas concentrações de (0.05; 0.025; 0.01; 0.005; 0.0025 mg.mL⁻¹). A calibração do espectrofotômetro foi realizada com álcool metílico. Os testes foram realizados em triplicata. Os dados obtidos por cálculos da capacidade do sequestro radical DPPH e do IC₅₀ foram avaliados utilizando-se o teste Tukey 5% (p<0.05), utilizando o software Sisvar. Os experimentos foram realizados em triplicata de amostras e ensaios.

2.7 Atividade dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento dos biofilmes pré-formados

O potencial dos extratos EAc, EAe e EHx foi avaliado sobre o desenvolvimento do biofilme (24 horas – fixação irreversível). Resumidamente, uma alíquota de 20 µL de inóculo na concentração de 0.5 de McFarland (1x10⁸ UFC.mL⁻¹) de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foi adicionado em 130 µL de meio Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia) suplementado com glicose a 1% adicionado em microplacas de 96 poços de fundo chato e incubadas a 37°C por 24 horas sem agitação (fixação irreversível). Em seguida, o meio foi removido e alíquotas de 150 µL nas concentrações de 100 a 0.09 mg.mL⁻¹ para extratos e, em seguida, incubadas novamente a 37°C por 24 horas sem agitação. Foram utilizados os controles biofilme não tratado (BHI suplementado com glicose a 1% e inóculo), controle positivo (Gentamicina) (Neo Química) e inóculo e controle de interferência de cor (BHI e as concentrações dos extratos diluídas em DMSO sem inóculo). A biomassa foi quantificada usando o método de coloração com cristal violeta (CV) e a viabilidade celular por meio de redução do sal 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazol)-2,5- Diphenyl-2H Tetrazolium bromide (MTT).

2.7.1 Ensaio de coloração de violeta de cristal

O ensaio foi realizado segundo Christensen et al. (1982) com modificações. As microplacas de 96 poços foram lavadas três vezes com PBS 1X. Em seguida, para a fixação das células foram adicionados aos poços 150 µL metanol P.A. (Neon) por 20 minutos, após a retirada do metanol, foi adicionado 150 µL de cristal violeta (Êxodo Científica) 1% por 15 minutos. Em seguida, os poços foram lavados em água corrente para remoção do corante não absorvido. Neste ponto, biofilmes foram observados como anéis roxos ao lado do poço. Uma alíquota de 150 µL de etanol a 95% foi adicionado e deixado em contato por 30 minutos, para a descoloração do biofilme. Após esse tempo, o conteúdo das microplacas foi transferido para uma nova placa estéril e a absorbância (DO) foi medida a 570nm utilizando leitor de microplacas modelo Epoch (Biotek). Os dados foram calculados em média geral de absorbância pelo programa Microsoft Excel 2010, e a inibição percentual do biofilme foi determinada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição de crescimento} = [(Ac-At)/Ac]*100$$

Onde Ac: média da absorbância do controle não tratado; At: média da absorbância do teste com extrato/óleo.

O resultado foi classificado conforme Famuyide et al., (2019) onde: < 50% indicam baixa atividade antibiofilme; > 50% indicam alta atividade antibiofilme. Valores negativos indicam aumento na biomassa do biofilme maduro.

2.7.2 Ensaio da viabilidade celular dos biofilmes formados

A análise de viabilidade metabólica dos biofilmes maduros foi avaliada pela redução do 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazol)-2,5- Diphenyl-2H Tetrazolium bromide (MTT) na concentração de 0.05%. Após a retirada do metanol uma alíquota de 180 µL e 20 µL de TTC foram adicionados em cada poço, e as placas foram incubadas no escuro a 37 °C por 2:30 horas. Após este período, retirou-se o meio e resolubilizou o corante (MTT) com 150 µL de DMSO por 15 minutos. Realizou-se a leitura através de um leitor de microplacas modelo Epoch (Biotek) com comprimento de onda de 570 nm. Os dados da viabilidade celular dos biofilmes maduros foram expressados em média geral da densidade óptica (DO) e o percentual da viabilidade celular (VC%) foi determinado pela equação: DO experimental / DO controle não tratado x 100 (Jia et al., 2010; Kuzma et al. 2007)

e classificada em: Valores de porcentagens de viabilidade celular: < 50% indicam baixa atividade celular; > 50% indicam alta atividade celular (Famuyide et al., 2019).

A atividade dos extratos e do óleo sobre o biofilme maduro foi mensurada pela redução (%) do valor de absorbância quando comparada com o controle não tratado, uma vez que a amostra testada é produtora de biofilme. Como critério para expressar os resultados do potencial antibiofilme de EE, EM e EO de *P. lambertii*, tanto o teste da biomassa do biofilme pelo ensaio do cristal violeta quanto da viabilidade celular pelo ensaio do MTT, foram determinados a partir das concentrações de CIM, 2X CIM e 4X CIM de cada cepa bacteriana testada.

2.8 Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos com média \pm desvio padrão. Os experimentos foram realizados em triplicata de amostras e ensaios. Os dados obtidos foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1 Rendimento

A partir da confecção dos extratos vegetais de *Podocarpus lambertii* com diferentes solventes, obteve-se os seguintes rendimentos: EAc (6.76%), EAE (7.60%) e EHx (4.51%). Muitas variáveis influenciam no rendimento dos metabólitos em extratos vegetais, desde temperatura, tempo de extração, relação sólido-solvente, entre outras. No entanto, o fator mais importante é a seleção do solvente, que devido as suas complexas características químicas, como a polaridade e solubilidade, influenciam diretamente no rendimento dos extratos (Cabana et al., 2013; Fernández-Agulló et al., 2013; Dirar et al., 2019, Kong et al., 2020).

3.2 Prospecção fitoquímica dos extratos

Após a obtenção dos extratos EAc, EHx e EAE das folhas de *Podocarpus lambertii* foi realizada a triagem fitoquímica, a qual revelou a presença de cinco grupos de compostos taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides e saponinas. Não foram detectadas nos extratos as classes das cumarinas, antocianinas, antocianidinas e triterpenoides (Tabela 1).

O EAc apresentou a maior diversidade de metabólitos secundários, com a presença de cinco diferentes classes, seguido pelos os extratos EHx e EAE que apresentaram quatro classes. Os alcaloides, flavonoides, esteroides e saponinas são comuns em todos os extratos testados, sendo a classe dos taninos que difere o EAc dos demais extratos. A literatura relata que os extratos vegetais comumente ricos em metabólitos, utilizam como solventes extratores principalmente metanol, etanol, acetona e acetato de etila (Cabana et al., 2013; Fernández-Agulló et al., 2013).

Tabela 1 - Prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos vegetais das folhas de *Podocarpus lambertii*.

Classes de Metabólitos	Hexano (EHx)	Acetona (EAc)	Acetato de etila (EAE)
Taninos	-	+	-
Alcaloides	+	+	+
Cumarinas	-	-	-
Antocianinas	-	-	-
Flavonoides	+	+	+
Triterpenoides	-	-	-
Esteroides	+	+	+
Saponinas	+	+	+
Antocianidinas	-	-	-

(+) presença; (-) ausência;

As diferenças observadas na composição do extrato podem ser explicadas pela abundância de metabólitos presentes, o rendimento durante o processo de extração e as características de polaridade do solvente utilizado, que são os determinantes do extrato. Compostos biologicamente ativos com potencial biológico (Fernández-Agulló et al., 2013; Pimentel et al., 2013).

Na literatura não foi encontrado estudos relacionados à presença de fitoquímicos em *Podocarpus lambertii*, porém nossos resultados corroboram com os estudos de Abdillahi et al. (2010) em espécies do gênero *Podocarpus* spp., que constatou a presença de vários tipos de flavonoides, tais como monoflavonoides, biflavonoides e glicosídeos flavonoides.

Os flavonoides, alcaloides, esteroides e as saponinas são classes de composto biologicamente ativos encontrados em todos os extratos das folhas de *P. lambertii* exercem propriedades antimicrobianas e apresentam propriedades farmacológicas, biológicas e importantes funções ecológicas (Takshak e Agrawal, 2019; Guimarães et al., 2019; Reddy et al., 2020; Fakhri et al., 2020), assim como, capacidade surfactante, anticâncer e imunomoduladora (Ribeiro et al., 2013; Nadaraia et al., 2019; Orczyk et al., 2020).

Os taninos presentes apenas EAc são polifenóis solúveis em água e, também apresenta um mecanismo de ação antimicrobiana que constitui na privação de substrato e inibição enzimática (Sharma, 2019; Reddy et al., 2020). A eficácia destes compostos secundários já está comprovada na literatura, em várias outras espécies de plantas, confirmando assim o potencial da espécie *P. lambertii* como matéria-prima para a extração de compostos bioativos (Nicácio et al., 2017; Sharma, 2019; Reddy et al., 2020).

3.3 Atividade antimicrobiana dos extratos

No ensaio de microdiluição em caldo, todos os extratos vegetais das folhas de *P. lambertii* foram testados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento (CIM) ou causar a morte (CBM/CFM) dos micro-organismos (Tabela 2). CIM e a CBM/CFM dos extratos vegetais foram classificadas de acordo com Pandini et al. (2015), sendo a atividade enquadrada em uma das 4 classes: elevada (<12.5 mg.mL⁻¹), moderada (12.5 a 25 mg.mL⁻¹), baixa (50 a 100 mg.mL⁻¹) e muito baixa (>100 mg.mL⁻¹).

Observou-se que a atividade dos extratos variou de acordo com o solvente extrator e o micro-organismo testado. Assim sendo, os extratos EAc, EHx e EAE apresentaram potencial antimicrobiano frente as 12 cepas padrões testadas, o EAc apresentou atividade antimicrobiana elevada (12.5 mg.mL⁻¹), sendo as gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus*

epidermidis as mais suscetíveis seguida das gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos vegetais das folhas de *Podocarpus lambertii* frente aos microrganismos patogênicos testados.

Micro-organismo	Extratos CIM/CBM		
	Hexâno (EHx)	Acetona (EAc)	Acetato de etila (EAE)
Gram negativos			
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	25/100	12.5/25	25/50
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	25/25	12.5/25	25/50
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	25/50	3.12/3,12	25/50
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25/25	6.25/6,25	12,5/100
<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	25/50	6.25/200	25/100
<i>K. pneumoniae</i> ATCC13883	25/50	6.25/12,5	12,5/100
<i>S. Abaetetuba</i> ATCC 35640	25/25	12.5/50	25/50
Gram positivas			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6.25/25	1.56/6.25	12.5/25
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	25/50	1.56/6.25	25/100
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	25/50	1.56/6.25	25/100
<i>B. subtilis</i> CCCD B005	25/50	3.12/6.25	12.5/100
Levedura			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	25/50	12.5/25	25/100

Elevada (12.5 mg.mL⁻¹); Moderada (25 mg.mL⁻¹); Baixa (50 mg.mL⁻¹); Muito baixa (100 a 200 mg.mL⁻¹).

Os extratos EHX e EAE apresentaram atividade antimicrobiana que variam de 12.5 a 100 mg.mL⁻¹, sendo classificado com atividade entre elevada a muito baixa. Estes extratos apresentam propriedades antimicrobianas muito similares e compostos fitoquímicos iguais. Os extratos EHX e EAE apresentaram alcaloides, flavonoides, esteroides e saponinas, enquanto o EAc apresenta taninos, o que pode justificar o melhor desempenho na ação antimicrobiana (atividade elevada).

Um estudo feito por Abdillahi *et al.* (2008), os extratos acetônicos das folhas das quatro espécies de *Podocarpus* exerceram melhor atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans* do que os demais extratos testados (etanólico, diclorometano, éter de petróleo), por meio do teste de microdiluição. Esse resultado corrobora ao nosso estudo, no qual a espécie *P. lambertii* também apresentou melhor resultado com o extrato acetônico em comparação aos demais extratos testados.

Em razão as comprovadas propriedades antimicrobianas dos metabólitos secundários em plantas, sugere-se que o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais de *P. lambertii* esteja relacionado aos seu perfil fitoquímico. Os flavonoides presentes nos três extratos testados são substâncias fenólicas hidroxiladas com atividade antimicrobiana comprovada na literatura. Estes por sua vez, atuam na formação de complexos com proteínas extracelulares e solúveis, que se ligam a parede celular bacteriana causando danos irreversíveis a célula (Samy e Gopalakrishnakone, 2010; Toledo, 2018).

OS taninos presentes no EAc, também pertence ao grupo dos compostos fenólicos, são caracterizados pelas suas propriedades de adstringência, além de inibirem bactérias Gram-positivas que causam a deterioração dos alimentos (*B. subtilis*), patógenos transmitidos via alimentos contaminados (*S. aureus*), bem como bactérias Gram-negativas (*E. coli*), além da comprovada inibição de crescimento de muitos fungos e leveduras (Samy e Gopalakrishnakone 2010; Gyawali e Ibrahim 2014). Seu modo de ação pode estar relacionado formação de complexos com enzimas e proteínas microbianas inativando suas funções, pode inibir o transporte de elétrons através de membranas ou ainda causar alterações em íons cobre e ferro relacionados a atividades de algumas enzimas essenciais a célula (Samy e Gopalakrishnakone 2010; Mendez et al., 2012;

Gyawali e Ibrahim 2014). Já as saponinas encontradas em EAc, EHx e EAE foram relatadas pelo seu potencial antimicrobiano, agindo sobre a membrana celular bacteriana e aumentando sua permeabilidade (Simões et al. 2004; Gyawali e Ibrahim 2014).

Em via de regra, todos os extratos afetaram o crescimento ou causaram a morte das cepas patogênicas, sugerindo que os compostos presentes nesses extratos, principalmente os compostos fenólicos, desempenham um importante papel antimicrobiano frente às cepas testadas.

3.4 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos de *P. lambertii* foi determinada pelo ensaio de sequestro de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) (Tabela 3). Esse ensaio trata-se de um método direto e confiável para medir a capacidade anti-radical de extratos vegetais (Cabana et al., 2013).

Tabela 3 - Porcentagem da atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Podocarpus lambertii* pelo método DPPH.

Solução teste	% redução DPPH [1 mg.mL ⁻¹]	Média ± desvio padrão da % de redução de DPPH	IC ₅₀
BHT	98	0.01 ± 0.003 a	1.31
EAE	96.35	0.25 ± 0.009 a	1.56
EAc	19.38	0.28 ± 0.015 b	3.34
EHx	2.84	0.68 ± 0.003 c	8.46

O extrato que apresentou maior sequestro de radicais DPPH foi o EAE na concentração de 1 mg.mL⁻¹, obtendo um percentual antioxidante de 96.36%, e valores de IC₅₀ considerados significativamente iguais quando comparado com o antioxidante comercial BHT (p<0.05).

Destaca-se que os valores de IC₅₀ são inversamente proporcionais à porcentagem de sequestro do DPPH, sendo que quanto maior a porcentagem de sequestro, menor o valor de IC₅₀. Sendo assim, os extratos EHx e EAc requerem concentrações relativamente altas para alcançar o máximo do

potencial antioxidante (80%), tornando assim inviável a utilização. O extrato EAE apresentam valor de IC₅₀ semelhante ao antioxidante comercial (p<0.05).

A atividade antioxidante do EAE deve estar associada à presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides que possuem reconhecida atividade antioxidante (Ali et al., 2011). A eficiência destes compostos está ligada a transferências de hidrogênio que neutraliza a ação dos radicais livres (Brewer, 2011). Os flavonoides atuam como quelante de metais, desativadores de oxigênio singleto e conseqüentemente reduzem os radicais livres (Mello e Filho., 2002; Canterle, 2005).

Os extratos EAc e EHx apesar de apresentarem os mesmos compostos fenólicos, com a exceção dos taninos presentes apenas no EAc, não demonstraram uma boa atividade antioxidante, o que pode estar relacionado com sua composição de compostos fenólicos e a ação dos mesmos de interromper a cadeia de radicais livres na etapa de iniciação do processo oxidativo (Lai et al., 1991).

Os resultados da atividade antioxidante relatada na literatura são difíceis de comparar, uma vez que é influenciado pelo método de determinação. Vários métodos foram descritos para avaliar a atividade antioxidante de produtos químicos presentes em extratos vegetais (Molyneux, 2004, Pandini et al.2015).

3.5 Avaliação da atividade dos extratos vegetais sobre biofilme bacteriano pré-formado (fixação irreversível)

Os extratos EHx, EAc e EAE foram testados nas concentrações de CIM, 2X CIM e 4X CIM sobre cada cepa bacteriana avaliada. Os dados dos ensaios colorimétricos foram calculados em médias gerais da densidade óptica (DO) da biomassa do biofilme quantificada pela coloração cristal violeta e a avaliação da viabilidade celular do biofilme foi avaliada pela redução do MTT (Tabela 5. 6 e 7).

Os testes estatísticos demonstraram não haver diferença significativa ente CIM, 2X CIM e 4X CIM, portanto os resultados expressos são referentes à CIM.

Os resultados demonstram que o EHx apresentou baixa inibição da biomassa do biofilme pré-formado (<50%) nas cepas de *Escherichia coli* (4.85%) e *Pseudomonas aeruginosa* (24.22%), e um aumento na biomassa do biofilme

da cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Os extratos EAc e EAE encontram-se com porcentagem de inibição abaixo de 0%, indicando o aumento da biomassa do biofilme formado em todas as cepas testadas.

Tabela 5 – Atividade antifbiofilme do extrato hexânico de *Podocarpus lambertii* sobre viabilidade celular dos biofilmes pré-formados de bactérias padrões pela técnica do cristal violeta e redução do 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazol)-2,5- Diphenyl-2H Tetrazolium bromide (MTT).

EHx Micro- organismos	Ensaio do Cristal Violeta			Ensaio com MTT		
	Controle	MIC	%I	Controle	MIC	% VC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0.17±0.018	0.15±0.017	4.85	0.05±0.003	0.07±0.022	-35.07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1.87±0.199	1.42±0.632*	24.22	0.05±0.002	0.10±0.026*	-93.60
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0.24±0.011	0.43±0.088*	-76.45	0.06±0.007	0.10±0.005*	-60.47

Média D.O ± desvio padrão; CV= Cristal Violeta; EHx = extrato hexânico; %I = porcentagem de inibição; %VC= porcentagem de viabilidade celular; Valores seguidos * diferem entre si pelo Teste Tukey ($p>0,05$). Valores de porcentagens de inibição (CV): < 50% indicam baixa atividade antibiofilme; > 50% indicam alta atividade antibiofilme. Valores negativos indicam aumento na biomassa do biofilme formado. Valores de porcentagens de viabilidade celular (MTT): < 50% indicam baixa atividade celular; > 50% indicam alta atividade celular.

Este aumento da biomassa pode ser justificado pelo fato de as bactérias planctônicas serem mais suscetíveis a agentes antimicrobianos do que a células em um sistema de biofilme, e os bioativos não conseguem atravessar a matriz extracelular do biofilme com a mesma facilidade (Lewis, 2001; Sandasi, Leonard e Viljoen, 2008). Ainda sobre a incapacidade dos extratos EAc e EAE em inibir o crescimento da biomassa pode estar relacionada a diversos fatores, como o padrão de crescimento do biofilme e a concentração necessária de agentes antibacterianos. Nesse estado, a concentração de células produtoras de biofilme pode ser 1000 vezes maior que a de bactérias em estado planctônico (Frank, Patel, 2007; Hoiby et al. 2010; Pereira, 2014; Chen et al., 2018, Macedo, 2019).

Tabela 6 – Atividade antibiofilme do extrato acetônico de *Podocarpus lambertii* sobre viabilidade celular dos biofilmes pré-formados de bactérias padrões pela técnica do cristal violeta e redução do 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazol)-2,5- Diphenyl-2H Tetrazolium bromide (MTT).

EAc	Ensaio do Cristal Violeta			Ensaio com MTT		
	Controle	MIC	%I	Controle	MIC	% VC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0.17±0.018	0.85±0.214*	-429.58	0.05±0.003	0.06±0.002	-15.17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1.87±0.199	2.03±0.685*	-8.53	0.05±0.002	0.07±0.002	-16.75
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0.24±0.011	0.51±0.140*	-109.32	0.06±0.007	0.16±0.169*	-151.94

Média D.O ± desvio padrão; CV= Cristal Violeta; EAc = extrato acetônico; %I = porcentagem de inibição; %VC= porcentagem de viabilidade celular; Valores seguidos * diferem entre si pelo Teste Tukey ($p>0,05$). Valores de porcentagens de inibição (CV): < 50% indicam baixa atividade antibiofilme; > 50% indicam alta atividade antibiofilme. Valores negativos indicam aumento na biomassa do biofilme formado. Valores de porcentagens de viabilidade celular (TTC): < 50% indicam baixa atividade celular; > 50% indicam alta atividade celular.

Apesar da baixa atividade antibiofilme na cepa de *Escherichia coli* (4.85%) e *Pseudomonas aeruginosa* (24.22%) do EHX e o aumento significativo da biomassa da cepa de *Staphylococcus aureus* e das cepas testadas nos extratos EAc e EAE, observou-se uma baixa viabilidade celular em todos os extratos testados. Provavelmente, os compostos fitoquímicos não foram capazes de quebrar a matriz de polimerização do biofilme e não houve a desagregação da biomassa quando corada com cristal violeta, mas, no ensaio com MTT, observou-se potencial antibiofilme.

Tabela 7 – Atividade antibiofilme do extrato acetato de etila de *Podocarpus lambertii* sobre viabilidade celular dos biofilmes pré-formados de bactérias padrões pela técnica do cristal violeta e redução do 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazol)-2,5- Diphenyl-2H Tetrazolium bromide (MTT).

EAE	Ensaio do Cristal Violeta			Ensaio com MTT		
	Controle	MIC	%I	Controle	MIC	% VC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0.17±0.018	0.11±0.012*	-429,58	0.05±0.003	0.10±0.048*	-91.94
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1.87±0.199	0.66±0.147*	-8,53	0.05±0.002	0.111±0.002*	-126.60
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0.24±0.011	0.41±0.142*	-109,32	0.06±0.007	0.16±0.001*	-63.18

Média D.O ± desvio padrão; CV= Cristal Violeta; EAE = extrato acetato de etila; %I = porcentagem de inibição; %VC= porcentagem de viabilidade celular; Valores seguidos * diferem entre si pelo Teste Tukey ($p>0,05$). Valores de porcentagens de inibição (CV): < 50% indicam baixa atividade antibiofilme; > 50% indicam alta atividade antibiofilme. Valores negativos indicam aumento na biomassa do biofilme formado. Valores de porcentagens de viabilidade celular (TTC): < 50% indicam baixa atividade celular; > 50% indicam alta atividade celular.

Os compostos secundários saponinas, alcaloides, flavonoides e esteroides livres encontrados na prospecção fitoquímica dos extratos EAE, EHx e EAc sejam similares (com exceção do EAc que também apresenta taninos) apresentarem comprovada ação antibiofilme na literatura, não foi evidenciada essa ação nos biofilmes maduros testados neste estudo (Cushnie e Lamb, 2011; Gandhi et al., 2017; Nuño et al., 2018). Provavelmente essas substâncias estejam presentes em concentrações diferentes, menores ou ainda apresentem efeito sinérgico entre elas que proporciona um aumento da biomassa do biofilme formado, ativando genes que irão produzir excesso de matriz celular e resulta em estratégia de defesa para a sobrevivência a situações de estresse do ambiente externo (Costa et al., 2015). Além disso, pode ocorrer uma baixa penetração destes compostos, ou ainda, aumento das bombas de efluxo, que expõem esses agentes antimicrobianos das células bacterianas (Jamal et al., 2018).

Não há relatos na literatura referente a capacidade de extratos vegetais de espécie do gênero *Podocarpus* de reduzir e/ou destruir o biofilme pré-formados. O que faz deste estudo de EAE, EAc e EHx das folhas de *Podocarpus lambertii* o primeiro relato científico sobre esta atividade biológica. Todavia, a

pesquisa com extratos vegetais de outras espécies sobre atividade antibiofilme vem sendo estudada. O extrato bruto hidroalcolico de *Stryphnodendron coriaceum* Benth, estudado realizado por Santos et al., (2020) apresentou moderada atividade antimicrobiana contra isolados de *C. ulcerans*, além de não apresentar efeito na inibição da formação de biofilme por essa espécie, o que é semelhante a este estudo.

Em resumo, os resultados dos testes do potencial antibiofilme pelo ensaio de cristal violeta, indicam que os extratos EHx, EAE e EAc não tiveram grande eficácia na inibição da formação da biomassa, e quanto o ensaio do MTT os mesmos extratos foram eficazes na redução da viabilidade metabólica dos biofilmes formados, causando prejuízo a atividade celular dos mesmos.

4 Conclusão

OS extratos das folhas EAE, EAc e EHx de *P. lambertii* revelaram na prospecção fitoquímica flavonoides, esteroides, taninos, alcaloides e saponinas, comprovando que a planta é um reservatório eficiente de compostos bioativos, que agregam valores medicinais à espécie. Além disso os extratos testados apresentam atividade antimicrobiana e fungicida sobre as cepas padrões testadas, com destaque para o extrato acetônico, eficaz em todos micro-organismos. A atividade antioxidante do EAE, com porcentagens de sequestro de radicais DPPH de 96.35%, mostra que tem potencial para prevenir e/ou controlar estresse oxidativo. A atividade de inibição da formação biomassa do biofilme foi baixa e/ou nula (<50%) para todos os extratos. Enquanto a viabilidade celular causou danos as células, reduzindo a atividade metabólica das mesmas. Portanto os resultados dos extratos obtidos das folhas de *P. lambertii* podem ser considerados uma fonte para a produção de produtos naturais com possíveis usos em diferentes setores medicinais/industriais. Entretanto, novas investigações sobre suas propriedades farmacológicas in vitro e in vivo são necessárias.

Referências

- Abdillahi, H.S., Stafford, G.I., Finnie, J.F. & Staden, J.V. 2010. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Podocarpus sensu latissimo* (s.l.). South African Journal of Botany 76, 1-24.
- Abdillahi, H.S., Stafford, G.I., Finnie, J.F. & Staden, J.V. 2008. Antimicrobial activity of South African *Podocarpus* species. Journal of Ethnopharmacology 119, 191-194.
- Ali, L.; Svensson, B.; Alsanius, B.W.; Olsson, M.E. 2011. Late season harvest and storage of Rubus berries - major antioxidant and sugar levels. Scientia Horticulturae, 129, 376-381.
- Araújo, N. R. R. (2010) Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. Dissertação de Mestrado, – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
- Baser, K. H. C.; Buchbauer, H. 2015. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. CRC Press. 2, 1112.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2006.
- Brewer, M.S. 2011. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10, 221-247.
- Cabana, R., Silva, L. R., Valentão, P., Viturro, C. I., 2013. Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja*

parvifolia (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* 48, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.003>

Canterle, L. P. 2005. Erva-mate e atividade antioxidante. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Carneiro, F.M. et al. 2014. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista sapiência: sociedade saberes e práticas educacionais*. 3, 44-75.

Chen, Hongwei et al. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 10446, 2018.

Christensen, G. D., 1985. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococcus to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology* 22. <https://doi.org/10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985>

Clsi, Clinical & Laboratory Standards Institute, 2015. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute 35. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3>.

Costa, G. M., Endo, E. H., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., Filho, B. P. D., 2015. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4, 908-917. ISSN: 2319-7706.

Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>

Dirar, A.I., Alsaadi, D.H.M., Wada, M., Mohamed, M.A., Watanabe, T. & Devkota, H.P. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid

contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. South African Journal of Botany 120, 261–267.

Duarte, M. C. T. 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Revista MultiCiências.07, 1 – 16.

EMBRAPA Florestas. Pinheiro-Bravo –*Podocarpus lambertii*. Circular técnica. Colombo 95, 2004.

Famuyide, I. M., Aro, A. Q., Fasina, F. O., Eloff, J. N., McGaw, L. J., 2019. Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices. BMC Complementary and Alternative Medicine 19. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>

Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M.S., Valentão, P., Andrade, P.B., González-Álvarez, J.A., Pereira, J.A., 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. Ind. Crops Prod. 42, 126–132.

Fakhri, S., Moradi, S.Z., Farzaei, M.H. & Bishayee, A. 2020. Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.02.007>. Acesso em 31 de agosto de 2020.

Frank, Kristi L.; PATEL, Robin. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. Infection and immunity, v. 75, n. 10, p. 4728-4742, 2007.

Gandhi, A. D., Vizhi, D. K., Lavanya, K., Kalpana, V. N., Rajeswari, V. D., Babujanathanam, R., 2017. In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. Biochemistry and Biophysics Reports 12, 193-197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.004>

Guimarães, A.C., Meireles, L.M., Lemos, M.F., Guimarães, M.C.C., Endringer, D.C., Fronza, M. & Scherer, R. 2019. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules* 24, 1-12.

Gyawali, R., Ibrahim, S. A., 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Journal Food Control* 46, 412–429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>

Hoiby, Niels et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Ma, N., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Ma, K., 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 81, 7–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.

Jia, P., Xue, Y.J., Duan, X. J., Shao, S. H., 2011. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression. By methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 53, 409-416. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03122.x>

Iganci, J.R.V.; Dorneles, M.P. 2019. Podocarpaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20526>. Acesso em 29 ago. 2019.

Klock, U. et al. *Química da madeira*. 3.ed. Curitiba: 2005. p. 86.

Kong, K. W., Junit, S. M., Aminudin, N. & Aziz, A.A. 2020. Phytochemicals in *Barringtonia* species: Linking their traditional uses as food and medicine with current research. *Journal of Herbal Medicine* 19, 1-14.

Kuźma, L., Rózalski, M., Walencka, E., Rózalska, B., Wysokińska, H., 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.:

Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine* 14, 31-35.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.10.008>

Lai SM, Gray JI, Smith DM, Booren AM, Crakel RL, Buckley DJ. 1991. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *J Food Sci.* 56, 616-20.

Lewis, K. Riddle of biofil resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* p. 999-1007, 2001. Doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001.

Macedo, C. A. Atividade antibacteriana e antibiofilme da *Lippa grata* frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2019. 91f.

Matos, F. J. A. 1997. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC.

Mello, M. O.; Filho, S. M. C. 2002. Plant-insect intections: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiol.* 14, 71-81.

Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F.D., Aguilar, C.N., 2012. Antibacterial activity of plants extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Ind. Crops Prod.* 37, 445-450.

Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.

Nadaraia, N. S., Amiranashvili, L. S., Merlani, M., Kakhbrishvili, M. L., Barbakadze, N. N., Geronikaki, A., Petrou, A., Poroikov, V., Ciric, A., Glamoclija,

J., & Sokovic, M. (2019). Novel antimicrobial agents' discovery among the steroid derivatives. *Steroids* 144, 52-65.

Nicácio, A.E., Rotta, E.M., Boeing, J.S., Barizão, E.O., Kimura, E., Visentainer, J.V., Maldaner, L., 2017. Antioxidant activity and determination of phenolic compounds from *Eugenia involucrata* DC. fruits by UHPLC-MS/MS. *Food Anal. Methods* 10:2718-2728.

Nuño, G., Alberto, M. R., Arena, M. E., Zampini, I. C., Isla, M. I., 2018. Effect of *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) extract on pro-inflammatory enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus aureus*. Toxicity studies. *Revista Saudi Journal of Biological Sciences* 25, 1713-1719. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.014>

OMS- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; OMS publica de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. 2017. http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812. Acesso em: 17 ago. 2020.

Orczyk, M., Wojciechowski, K. & Brezesinski, G. 2020. The influence of steroidal and triterpenoid saponins on monolayer models of the outer leaflets of human erythrocytes, *E. coli* and *S. cerevisiae* cell membranes. *Journal of colloid and interface science* 563, 207-217.

Pandini, J.A. et al. 2015. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of medicinal plants research*, 9, 48-55.

Pandini, J. A., Pinto, F. G. S., Muller, J. M., Weber, L. D., Moura, A. C., 2015. Ocorrência e perfil de resistencia antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Revista Arquivos Instituto Biológico* 82, 1-6. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000352013>

Pereira, V.; Dias, C.; Vasconcelos, C.; Rosa, E.; & Saavedra, M. J. (2014). Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics Against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, 52, 1-7.

Pimentel, F.A., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L., Queiroz, F., Barbosa, L.C.A., Morais, A.R., Nelson, D.L., Andrade, M.A., Zacaroni, L.M., Pimentel, S.M.N.P., 2013. Extracts from the leaves of *Piper piscatorum* (Trel. Yunc.) obtained by supercritical extraction with CO₂ employing ethanol and methanol as co-solvents. *Ind. Crops Prod.* 43, 490–495.

Reddy, P.R.K., Elghandour, M.M.M.Y., Salem, A.Z.M., Yayaswini, D., Reddy, P.P.R., Reddy, A.N. & Hyder, I. (2020). Plant secondary metabolites as feed additives in calves for antimicrobial stewardship. *Animal Feed Science and Technology* 264, 1-19.

Ribeiro, B.D., Alviano, D.S., Barreto, D.W & Coelho, M.A.Z. 2013. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 436, 736-743.

Rufino, M. S. M., Ales, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. D., 2007. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Revista Comunicado Técnico on line Embrapa* 127, 1-4. ISSN 1679-6535.

Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., 2010. Therapeutic potential of plants as antimicrobial for drug discovery. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine* 7, 283–294. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen036>

Sandasi M, Leonard C, Viljoen A. The effect of five common essential oil components on *Listeria Monocytogenes* biofilms. *Food Microbiol.* 2008;19(11):1070–5.

Santos, DCP., Gomes, PDB., Leite, D.S., Nova, BGV., Alves, MB., Viana, PRS., Rodrigues, JÁ., Mattos-Guaraldi, AL., Sabbadini, OS., Firmo, WCA. Bioprospecção das atividades antioxidante, antibacteriana e antibiofilme contra *Corynebacterium ulcerans* e toxicidade de *Stryphnodendron coriaceum* Benth. Scientia Plena 16, 104501 (2020).

Sartoratto, A. et al. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 35, 275–280.

Scur, M. C., Pinto, F. G. S., Bona, E. A. M., Weber, L. D., Ales, L. F. A., Moura, A. C., 2014. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. Revista Academic Journals, 9, 823-830. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8202>

Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A. U. antibiotics versus biofilm: na emergging battleground in microbial communities. Antimicrobial Resistance & Infection Control. V.8, p. 76, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>

Silva Filho, C. R. M. et al. 2009. Avaliação da bioatividade de extratos cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 19, 919 – 923.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento (in Portuguese), quinta ed. UFSC, Porto Alegre.

Takshak, S. & Agrawal, S.B. 2019. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 193, 51-88.

Toledo, A. G. (2018). Composição química e atividades biológicas das folhas de *Eugenia involucrata* (*Dissertação de mestrado*). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

Weber, L. D., Pinto, F. G. S., Scur, M. C., Souza, J. G. L., Costa, W. F., Leite, C. W., 2014. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. *Revista African Journal of Agricultural Research* 9, 846-853. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8260>