

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

LARISSA VALÉRIA LASKOSKI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
EXTRATOS VEGETAIS E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrsine*
umbellata Mart. (PRIMULACEAE).

CASCAVEL-PR
AGOSTO/2021

LARISSA VALÉRIA LASKOSKI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
EXTRATOS VEGETAIS E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrsine
umbellata* Mart. (PRIMULACEAE).

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
Orientador: Dra. Fabiana Gisele da Silva
Pinto.

Co-orientador: Dra. Juliana Moço Correa

CASCAVEL-PR

AGOSTO/2021

Ficha Catalográfica

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

Laskoski, Larissa Valéria
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS VEGETAIS E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrsine umbellata* Mart. (PRIMULACEAE). / Larissa Valéria Laskoski; orientadora Fabiana Gisele da Silva Pinto ; coorientadora Juliana Moço Correa. -- Cascavel, 2021.
110 p.

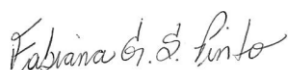
Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2021.

1. Ciências Ambientais. 2. Microbiologia. 3. Compostos Bioativos Vegetais. 4. Potencial Biológico. I. da Silva Pinto, Fabiana Gisele, orient. II. Moço Correa, Juliana, coorient. III. Título.

LARISSA VALÉRIA LASKOSKI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS VEGETAIS E DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Myrsine umbellata* Mart. (PRIMULACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia aplicada e indicadores de qualidade no ambiente terrestre, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Lilian Cristiane Baeza

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Jane Martha Graton Mikcha

Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Cascavel, 20 de agosto de 2021

Aprovada em: 20 de Agosto de 2021

Local da defesa: remota síncrona, por meio de chamada de videoconferência.

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz.”
(Steve Jobs).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida, por sempre estar iluminando meu caminho e por ter me dado força para superar todos os obstáculos que me permitiram concluir essa etapa tão importante da minha vida.

Agradeço a minha família que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou em todas as minhas conquistas, em especial aos meus pais, Sebastião Antônio Laskoski e Alice Zaleski Laskoski, aos meus irmãos Laura Beatriz Laskoski e Lucas Gabriel Laskoski por todo amor, carinho, confiança, orações, os quais acreditaram no meu sonho, me apoiaram e sempre torceram por mim.

Ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, pela oportunidade de realizar esse trabalho. Também agradeço a CAPES pela concessão da bolsa para pesquisa.

A minha orientadora, professora Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto pelo suporte, paciência, confiança e ensinamentos no pouco tempo que lhe coube e principalmente pela contribuição para a realização desta dissertação. Agradeço também a minha co-orientadora Dra. Juliana Moço Correa e as professoras Dra. Lilian Cristiane Baeza e Dra. Jane Martha Graton Mikcha e ao professor Dr. José Luis da Conceição Silva pelas contribuições valiosas para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia que me acompanharam ao longo desses dois anos pelo compartilhamento do laboratório e conhecimentos que contribuíram com a realização deste trabalho. Em especial a Joelma Marques Batista e Vanessa Nicolau pela amizade verdadeira, força e companheirismo, por todos os momentos inesquecíveis, por tornar essa etapa mais iluminada e leve, pelos choros, sorrisos, alegrias e conquistas compartilhadas, vocês são meu presente do mestrado e farão sempre parte da minha vida.

Meu eterno agradecimento a todas as (os) minhas (meus) amigas (os) por torcerem e vibrarem comigo ao longo dessa caminhada, por todo carinho e apoio, sem dúvidas vocês foram essenciais. Enfim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente participaram de alguma forma na construção e realização desse sonho, serei sempre grata, muito o

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1 Biodiversidade brasileira e produtos naturais | 5 |
| 2.2 Resistência bacteriana e antimicrobianos alternativos: extratos vegetais, óleo essencial aplicados para atividade antimicrobiana | 6 |
| 2.3 Perspectivas e potencial antioxidante de extratos vegetais e óleo essencial..... | 8 |
| 2.4 Capacidade de inibição do biofilme microbiano utilizando extratos vegetais e óleo essencial..... | 9 |
| 2.5 Triagem fitoquímica e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) | 10 |
| 2.6 Descrição da planta | 11 |
| 2.6.1 Família Primulaceae..... | 11 |
| 2.6.2 Gênero <i>Myrsine</i> | 12 |
| 2.6.3 Espécie <i>Myrsine umbellata</i> Mart. | 13 |
| CAPÍTULO 1: Bioscience Journal | 15 |
| COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE <i>Myrsine umbellata</i> MART. (PRIMULACEAE) | 15 |
| CAPÍTULO 2: Brazilian Journal of Biology | 44 |
| PHYTOCHEMICAL PROSPECTION AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF EXTRACTS AND ESSENTIAL OIL FROM LEAVES OF <i>Myrsine umbellata</i> Mart. (PRIMULACEAE)..... | 44 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| ANEXO 1: Normas da revista capítulo 1 | 89 |
| Bioscience Journal..... | 89 |
| ANEXO 2: Normas da revista capítulo 2 | 99 |
| Brazilian Journal of Biology..... | 99 |

RESUMO

LASKOSKI, L. V. Composição química e avaliação das atividades biológicas dos extratos vegetais e do óleo essencial das folhas de *Myrsine umbellata* Mart. (Primulaceae). 2021. 110 p. Dissertação (Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2021.

O interesse por compostos ativos com potencial biológico de plantas nativas brasileiras vêm crescendo ano após ano. A espécie arbórea *Myrsine umbellata* Mart. (Primulaceae), conhecida como capororoca, têm suas cascas empregadas no tratamento de doenças do fígado, do sistema urinário e da pele (hanseníase ou lepra). Assim, o objetivo do estudo foi realizar a prospecção fitoquímica através de testes colorimétricos para determinar os grupos de metabólitos secundários presentes nos diferentes extratos vegetais testados e no óleo essencial das folhas de *M. umbellata* através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), bem como investigar a atividade antimicrobiana frente às doze cepas padrões ATCCs pela técnica de microdiluição em caldo; o potencial antioxidante pelo método de DPPH e o potencial antibiofilme sobre a biomassa dos biofilmes de bactérias padrões pela técnica do cristal violeta e ensaio de redução do sal tetrazólio (MTT). A prospecção fitoquímica dos extratos detectou a presença de esteroides livres, alcaloides, antocianinas, antocianidinas, flavonoides (flavonas, flavononóis, flavonóis e xantonas), taninos e saponinas. Na análise do óleo essencial os compostos majoritários identificados foram elixeno, cariofileno (E), espatulenol, d-Cadineno e aromadendreno. Os extratos que apresentaram os melhores resultados foram: metanólico com atividade antimicrobiana frente à cepa Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (CIM 3,12 e CBM 6,25), percentual antioxidante de 92,58% e ação antibiofilme contra o biofilme da cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* com inibição da biomassa em 92,58% e viabilidade celular de 17,88%. O acetônico com atividade antimicrobiana com valores de CIM e CBM/CFM que variaram de 3,12 a 100 mg.mL⁻¹, destacando sua eficiência sobre a cepa Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*, seu potencial antioxidante de 89,55%. O potencial antibiofilme também foi observado no etanólico que reduziu a biomassa do biofilme de todas as bactérias testadas com elevada atividade (63,41% a 83,65%) e no óleo essencial com potencial antibiofilme de 84,96% frente ao biofilme da cepa *Salmonella enterica* Enteritidis. Esses resultados indicam o potencial dos extratos e do óleo essencial de *M. umbellata* como fonte de bioativos vegetais para o desenvolvimento de novas estratégias alternativas para o controle de microrganismos resistentes.

PALAVRAS-CHAVES: Ciências Ambientais. Microbiologia. Compostos Bioativos vegetais. Potencial biológico.

ABSTRACT

LASKOSKI, L. V. Chemical composition and evaluation of the biological activities of the plant extracts and essential oil of the leaves of *Myrsine umbellata* Mart. (Primulaceae). 2021. 110 p. Dissertation (Stricto Sensu Graduate Program in Conservation and Management of Natural Resources - Master Level) - Center for Biological and Health Sciences, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2021.

The interest in active compounds with biological potential of native Brazilian plants has been growing year after year. The arboreal species *Myrsine umbellata* Mart. (Primulaceae) Known as capororoca, they have their shells used in the treatment of diseases of the liver, urinary system and skin (leprosy). Thus, the objective of the study was to carry out phytochemical prospecting through colorimetric tests to determine the groups of secondary metabolites present in the different plant extracts tested and in the essential oil of the leaves of *M. umbellata* through gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM), as well as investigating antimicrobial activity against the twelve standard ATCC strains by the broth microdilution technique; the antioxidant potential by the DPPH method and the antibiofilm potential on the biomass of biofilms of standard bacteria by the crystal violet technique and tetrazolium salt reduction assay (MTT). Phytochemical prospecting of the extracts detected the presence of free steroids, alkaloids, anthocyanins, anthocyanidins, flavonoids (flavones, flavonols, flavonols and xanthons), tannins and saponins. In the analysis of the essential oil the identified majority compounds were eucalyptol, caryophyllene (E), eucalyptol, d-Cadinene and aromadendrene. The extracts that presented the best results were: methanol with antimicrobial activity against the Gram-positive strain *Staphylococcus epidermidis* (CIM 3.12 and CBM 6.25), antioxidant percentage of 92.58% and antibiofilm action against the biofilm of the Gram-strainpositive *Staphylococcus aureus* with inhibition of biomass in 92.58% and cell viability of 17.88%. The acetonic with antimicrobial activity with CIM and CBM/CFM values ranging from 3.12 to 100 mg.mL⁻¹, highlighting its efficiency over the Gram-positive strain *Staphylococcus epidermidis*, its antioxidant potential of 89.55%. The antibiofilm potential was also observed in the ethanolic that reduced the biofilm biomass of all bacteria tested with high activity (63.41% to 83.65%) and in the essential oil with antibiofilm potential of 84.96% compared to the biofilm of the *Salmonella enterica* Enteritidis strain. These results indicate the potential of extracts and essential oil of *M. umbellata* as a source of plant bioactive for the development of new alternative strategies for the control of resistant microorganisms.

KEYWORDS: Environmental Sciences. Microbiology. Plant Bioactive Compounds. Biological potential.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com a maior biodiversidade de espécies vegetais, detentor de inúmeras espécies nativas com propriedades medicinais. O emprego terapêutico com plantas vem promovendo o interesse científico no controle de várias patologias presentes no ambiente (SILVA et al., 2016; SOUZA et al. 2017; MENEZES et al., 2019).

Dessa forma, a busca por antimicrobianos naturais intensifica os estudos a fim de validar as ações e o potencial dos compostos naturais. Dentre os conhecimentos já elucidados, os óleos essenciais e os extratos vegetais vêm ganhando destaque no meio científico e aplicações na indústria (MIRANDA, 2016). Estudos demonstram a eficiência dos produtos de origem vegetal no controle de microrganismos resistentes. Certamente por serem produtos naturais apresentam menor toxicidade. Além do mais, representam uma forma menos danosa a saúde do consumidor, que estará livre das super dosagens de antibióticos (FASCINA, 2011; SILVA et al., 2016).

Na investigação por plantas nativas brasileiras com potencial terapêuticos, à família Primulaceae, representada pelo gênero *Myrsine* (sinônimo *Rapanea*), com cerca de 300 espécies com distribuição pantropical. No Brasil são registradas 26 espécies, distribuídas principalmente nas regiões sul e sudeste (RICKETSON, PIPOLY, 1997; FREITAS, CARRIJO, 2014).

As espécies desse gênero tem sua madeira utilizada como combustível (carvão e lenha), construção civil, as folhas são utilizadas como tintureiros e frutos são fonte de alimentos para pássaros (PINESCHI, 1990; LORENZI, 2009). Ademais, as espécies: *R. melanophoeos* (L.) Mez (OHTANI; HOSTETTMANN; 1992), *M. umbellata* Mart. e *M. coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem & Schult. (MIRANDA et al., 2015) apresentam potencial antifúngico. *R. parviflora* (A.Dc.) Mez (SUFFREDINI et al., 2007) e *Rapanea* sp. (MONTOVANI et al., 2009) têm ação antibacteriana. *M. guianensis* (Aubl.) Kuntze possui efeito anti-inflamatório (OSPINA et al., 2001). *M. guianensis* (OSPINA et al., 2001) e *M. coriacea* (MIRANDA et al., 2015) mostraram atividade antioxidante. *M. umbellata* e *M. coriacea* (MIRANDA et al., 2015) atuam como inseticidas. Por fim, *M. africana* L. e *R. melanophoeos* (L.) agem no tratamento dos helmintos (GITHIORI et al., 2002).

A espécie *Myrsine umbellata* Mart. é uma planta arbórea nativa brasileira, popularmente conhecida por capororoca. Sua distribuição ocorre do Rio Grande do Sul até Pernambuco. Suas cascas são empregadas na medicina popular no tratamento da hanseníase (lepra), diurético, urinário e hepáticos. (FARIAS et al., 1993; VILELA et al., 1993; LORENZI, 2009; NAPPO et al., 2004). Na literatura há relatos sobre seu potencial antifúngico e inseticida (MIRANDA et al., 2015).

Tendo em consideração que não há investigações na literatura em relação à composição química e as atividades biológicas da espécie nativa brasileira *M. umbellata*, o presente estudo tem como objetivo realizar a caracterização química e avaliar os potenciais antimicrobiano, antioxidante e antibiofilme, através de extratos vegetais e óleo essencial das folhas dessa espécie nativa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiversidade brasileira e produtos naturais

O Brasil é um dos países com a maior diversidade biológica, tanto na variedade e complexidade de biomas quanto no número de espécies, com aproximadamente 350 mil espécies catalogadas, o que representa cerca de 20% do total mundial. Portanto, apresenta cerca de um terço da flora mundial, e, é dono de uma rica biodiversidade de espécies vegetais com propriedades medicinais, e que podem ser utilizadas para fins terapêuticos (PEIXOTO, MORIM, 2003; BRANDÃO et al., 2006, CORADIN, SIMINSKI, REIS, 2011; CARNEIRO et al., 2014; SOUSA et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as plantas são a melhor fonte para obtenção de uma variedade de moléculas biologicamente ativas contribuindo para o fornecimento de substâncias orgânicas, por apresentarem inúmeros componentes químicos que possuem atividades biológicas. Aproximadamente 40% dos novos medicamentos, disponíveis atualmente, são direta ou indiretamente provenientes de fontes naturais vegetais (LEANDRO et al., 2013; CARVALHO et al., 2014; GUILARDUCCI et al., 2016).

O interesse por produtos naturais vêm sendo exaltado nos últimos anos, visto que aumentou a preocupação em utilizar produtos menos agressivos a natureza e ao homem. Dentre os produtos naturais podemos citar os extratos vegetais e óleos essenciais produzidos pelas plantas, estes apresentam propriedades bioativas comprovadas, que são capazes de atuar no controle de crescimento de diversos microrganismos (PACKER, LUZ, 2007; LIMA, GOMES, 2014).

Portanto, nos últimos anos aumentou o número de pesquisas com espécies vegetais, para buscar novas substâncias com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, inseticidas e acaricidas. Espécies como *Myrcia oblongata* (SANTANA, 2017), *Eugenia involucrata* (TOLEDO, 2018), *Myrcia sylvatica* (SILVA et al., 2018), *Ilex breviscuspis* (MALLMANN, 2019), *Myrcia*

palustris (SANTOS, 2019), além de espécies do gênero *Myrsine* como *Myrsine coriacea* (MIRANDA, 2015), foram estudadas. Logo, estudar as atividades biológicas de *Myrsine umbellata* é de extrema importância, visto que está podendo vir a ser uma fonte de novas substâncias com propriedades terapêuticas.

2.2 Resistência bacteriana e antimicrobianos alternativos: extratos vegetais, óleo essencial aplicados para atividade antimicrobiana

Os antimicrobianos são essenciais para o combate de inúmeras doenças, tanto na medicina como também na produção de alimentos de origem animal. Entretanto, o uso indiscriminado dos antimicrobianos sintéticos contribuiu para a seleção de cepas resistentes. Outro fator predominante de resistência é a transferência de microbiotas que são normais dos frangos, porém tornam-se patogênicas para o homem, diante disso, existe um grande debate em relação aos aditivos utilizados nas rações de aves, os quais podem contribuir para resistência cruzada (MEIRELES, 2008; KANASHIRO, STOPPA, 2010; BEZERRA et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a resistência bacteriana é a capacidade do organismo de interromper um determinado agente antimicrobiano de atuar sobre ele, resultando em tratamentos ineficazes e infecções persistentes. Essa resistência é causada por mutações espontâneas cromossômicas, onde os microrganismos se adaptam e conseguem crescer mesmo na presença dos antimicrobianos (WHO, 2012; SCUR et al., 2014; BEZERRA et al., 2017).

Portanto, diante da problemática, têm-se buscado utilizar antimicrobianos alternativos, entre os quais, destacam-se as plantas, as quais têm demonstrado potencial antimicrobiano e fins terapêuticos, por apresentarem substâncias capazes de modular a ação de antibióticos. Diante disso, as plantas medicinais estão sendo cada vez mais estudadas, a fim de comprovar suas atividades biológicas. (BRENES, ROURA, 2010; FASCINA, 2011).

Tendo em vista o comprovado potencial promissor de substâncias antimicrobianas derivadas de plantas, pesquisadores passaram a estudar os benefícios dos “produtos naturais”, tais como os extratos vegetais e óleos essenciais. Estudos recentes evidenciam que os metabólitos secundários

presentes nas plantas, são substâncias com a capacidade de inibir atividade de bactérias e outros microrganismos (BONA et al., 2010; SAMY; GOPALAKRISNAKONE, 2010; SAVOIA, 2012).

Os extratos vegetais são preparações concentradas, constituídas por compostos como terpenóides, alcaloides, cumarinas, taninos e substâncias fenólicas. Esses extratos são preparações concentradas obtidas a partir de matéria-prima vegetal seca ou fresca, e preparadas a partir de processos como infusão e maceração que envolvem solventes, com objetivo de extrair diferentes compostos das plantas. Assim sendo, o método de extração pode influenciar na composição química e, portanto, na atividade biológica do extrato (HANDA, 2008; SILVEIRA, 2012; SANTOS et al., 2013; WEBER et al., 2014; PANDINI, 2014; ATANASOV et al., 2015).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas que são denominadas aromáticas. Possuem composição química complexa e constituem os elementos voláteis presentes em muitos órgãos vegetais que estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência das plantas, como o papel fundamental na defesa contra microrganismos (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003). Os componentes que são encontrados nos óleos essenciais incluem aldeídos, ésteres, álcoois simples, cetonas, fenóis, hidrocarbonetos terpênicos e ácidos orgânicos, são encontrados em diferentes concentrações (DORMAN, DEANS, 2000; SIMÕES, SPITZER, 2007). Estudos comprovam que os óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e antibacterianas (BHAVANANI, BALLOW, 1992).

Esses extratos vegetais e óleos essenciais não apresentam risco de resistência a patógenos, são normalmente menos tóxicos quando comparados a produtos sintéticos, além de serem degradados rapidamente pelo ambiente e derivados de recursos naturais (BONA et al., 2010; SANTOS et al., 2013)

Em vista disso, a utilização de produtos de origem vegetal, tem sido amplamente estudados para fins antimicrobianos. Portanto, extratos vegetais e óleos essenciais são fortes candidatos a estudos referentes a atividades biológicas, sendo observadas na literatura diversas plantas com compostos antimicrobianos: *Prunus myrtifolia* (WEBER et al., 2014), *Guarea kunthiana* (PANDINI et al., 2015), *Psidium cattleianum* (SCUR et al., 2016), *Zanthoxylum*

caribaeum (SOUZA et al., 2017), *Eugenia involucrata* (TOLEDO, 2018), *Ilex brevicuspis* (MALLMANN, 2019) e *Myrcia palustris* (SANTOS, 2019). Dentro do gênero *Myrsine* foram descritas quanto ao seu potencial antimicrobiano: *Rapanea ferruginea* (sinônimo de *Myrsine coriacea*) (SILVA, 2013) e *Myrsine coriacea* (BURGER et al., 2015).

Deste modo, é de extrema importância à pesquisa com extratos vegetais e óleos essenciais de plantas, a fim de expandir o conhecimento das suas atividades biológicas.

2.3 Perspectivas e potencial antioxidante de extratos vegetais e óleo essencial

Os antioxidantes são compostos que protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva. Essas substâncias antioxidantes retardam a velocidade da oxidação, através da inibição de radicais livres (composto químico instável e reativo que é capaz de se ligar a várias moléculas) e complexação de metais. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, devem ser seguros para a saúde. Os antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT), porém estes são questionados devido ao seu risco, que está associado com efeitos deletérios e tóxicos nos organismos, e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (KRINSKY, 1994; RICE-EVANS et al., 1996; PIETTA, 2000; GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2010; ARAKAKI, 2015).

O metabolismo do oxigênio nas células vivas produz radicais livres, que quando produzidos em excesso podem acarretar em doenças e danos profundos em tecidos. Portanto, os antioxidantes reagem diretamente com os radicais livres, levando a formação de produtos menos reativos. (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; FONSECA, 2007; ROESLER et al., 2007; ALVES et al., 2010).

Baseado nisso, nos últimos anos tem crescido o número de pesquisas por antioxidantes naturais, e as plantas são fortes candidatas, pois são capazes de sintetizar compostos antioxidantes que controlam o excesso de radicais livres nas células, em especial os compostos fenólicos que agem como

terminais para radicais livres, os flavonoides, taninos e compostos terpênicos agem como sequestradores de radicais livres. Portanto, são observados na literatura diversos estudos com extratos vegetais e óleos essenciais referentes a esta atividade biológica (ROESLER et al., 2007; TOMEI, SALVADOR, 2007; DING et al., 2011).

Por exemplo, algumas espécies foram reportadas quanto ao seu elevado potencial antioxidante quando testados seus extratos vegetais e óleos essenciais: *Guarea kunthiana* (Figo-do-mato) (PANDINI, 2014), *Baccharis trimera* (Carqueja-amarga) e *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim-do-campo) (PAROUL et al., 2016), *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) (EVERTON et al., 2019). Dentro do gênero *Myrsine*, algumas espécies demonstraram seu potencial antioxidante investigado quanto aos extratos vegetais à base de hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol de *M. coriacea* (Capororoquinha) e *M. umbellata* (Capororocão) (MIRANDA, 2015).

2.4 Capacidade de inibição do biofilme microbiano utilizando extratos vegetais e óleo essencial

Biofilmes bacterianos são comunidades estruturadas de células agregadas em matrizes poliméricas que se aderem a superfícies imóveis ou móveis (PASTERNAK, 2009; FROZI, ESPER, FRANCO, 2017). A sobrevivência dos biofilmes resulta de táticas de adaptação desenvolvidas ao longo do tempo. Dentre os mecanismos de proteção presente nos biofilmes, podemos destacar a heterogeneidade das bactérias e a secreção extracelular de substância polimérica (AAWC, 2008).

Na natureza as bactérias que se estão organizadas em biofilme podem ser mais resistentes às defesas do hospedeiro e apresentam maior tolerância ao uso de drogas sintéticas tais como antibióticos. As bactérias de importância clínica que apresentam capacidade de formar biofilme são *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Typhimurium e *Salmonella enterica* Enteritidis (GREENBERG, 2003).

Os óleos essenciais e extratos vegetais de plantas são capazes de agir sobre o biofilme microbiano através de mecanismos como: degradando as

moléculas sinalizadoras ou se ligando aos receptores de enzima ou interrompendo o sinal de moléculas produzidas por essa enzima. Também os metabólitos secundários das plantas podem afetar a integridade dos biofilmes e torná-los mais suscetível à ação dos mesmos (KOH *et al.*, 2013).

Pesquisas por extratos vegetais e óleos essenciais de espécies nativas brasileiras vêm sendo reportadas quanto ao seu potencial antibiofilme. Bazargani e Rohloff (2015) testaram a atividade antibiofilme do OE e de extratos das folhas de *Mentha piperita* e sementes de *Coriandrum sativum* e *Pimpinella anisum* contra os biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, identificaram que o óleo de *C. sativum* apresentou a maior atividade antibiofilme sobre ambas as bactérias testadas. Famuyide *et al.* (2019) avaliaram o potencial antibiofilme de EA de folhas de *Eugenia* da África do Sul e espécies de *Syzygium* e apresentaram potencial de bom a fraco para destruir biofilmes formados. Silva (2019) testou a atividade antibiofilme do extrato metanólico da flor e do caule de *Calliandra dysantha* Benth. (Fabaceae) contra o biofilme de *Staphylococcus aureus* e observou atividade antibiofilme com baixa viabilidade celular.

2.5 Triagem fitoquímica e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As atividades biológicas de espécies vegetais como as atividades antimicrobiana, antioxidante, acaricida e inseticida, se dão através de constituintes que são resultantes do metabolismo secundário, os quais se encontram presentes tanto no óleo essencial quanto nos extratos vegetais. Existem vários métodos utilizados para a identificação, separação e purificação desses compostos, como por exemplo, a triagem fitoquímica e a cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (RODRIGUES, SOUZA FILHO, FERREIRA, 2009; SANTANA, 2017).

A triagem fitoquímica é a área responsável pelo estudo dos princípios ativos de drogas vegetais, ou seja, é o estudo químico sobre a planta. Estes princípios ativos são obtidos através dos metabólitos secundários, os quais fazem parte do metabolismo dos vegetais, conferindo proteção para as plantas contra doenças, radiação ultravioleta e ataque de insetos e herbívoros. Além

disso, os metabólitos secundários possuem atividade biológica comprovada para microrganismos. Ademais, a triagem fitoquímica é uma metodologia simples e geral, que permite a identificação da presença ou ausência das classes dos metabólitos secundários presente nos extratos vegetais (MATOS, 1997; PERES, 2002).

Já a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é uma técnica com alto poder de resolução, a qual possibilita a análise de vários compostos de uma única amostra, determinando a estrutura química destes compostos presentes nos óleos essenciais. Além disso, a CG-EM apresentar vantagens como, a rapidez, a obtenção da informação estrutural, alta seletividade e eficiência de separação dos compostos (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008).

Utilizando esses métodos já foram identificados e isolados compostos como triterpenóides, flavonoides, saponinas, taninos, hidroquinonas, glicosídeos, terpenos e benzoquinonas do gênero *Myrsine*. Essas substâncias apresentam atividades fitotóxica, antibacteriana, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-helmínticas e moluscicida e já foram relatadas e identificadas em extratos vegetais e óleos essenciais de *Rapanea lancifolia* (JANUÁRIO et al., 1992), *Rapanea melanophloeos* (OHTANI, MAVI, HOSTETTMANN, 1993; GITHIORI et al., 2002), *Myrsine africana* (MANGURO, MIDIWO, KRAUS, 1997; GITHIORI et al., 2002), *Myrsine seguinii* (ZHONG et al., 1997), *Myrsine guianensis* (OSPINA et al., 2001; PEREIRA, 2013). Quanto a *Myrsine umbellata*, planta interesse deste estudo, foi encontrado na literatura compostos como glicosídeos e triterpenóides (JANUÁRIO et al., 1992; FRANCISCO, PINOTTI, 2000).

2.6 Descrição da planta

2.6.1 Família Primulaceae

Primulaceae é uma família de angiospermas, também conhecida como família de primulas, da ordem de Ericales, são plantas dicotiledôneas, com distribuição cosmopolita, ocupa os mais variados ambientes. Composta por aproximadamente 53 gêneros e 2790 espécies, sendo representada na flora do

Brasil por 11 gêneros e 140 espécies, com ampla distribuição. Atualmente compreende as famílias Maesaceae, Myrsinaceae, Theophrastaceae, por serem estreitamente relacionadas, designadas como o “grupo primulóide”. Esse grupo é caracterizado pelas flores gamopétalas, estames opositipétalos, ovário com poucos a muitos óvulos, com placentação central livre (KALLERSJO, BERGQVIST, ANDERBERG, 2000; STEVENS, 2001; BFG, 2015; APG IV, 2016; XU, CHANG, 2017).

As plantas dessa família são ervas, arbustos ou árvores, caracterizadas por apresentar folhas simples, alternadas, opostas ou verticuladas, geralmente com estruturas secretoras abundantes. A fruta é uma capsula com apenas uma semente protegida por pericarpo carnoso e endocarpo pétreo (STEVENS, 2001, STAHL, ANDERBERG, 2004; FREITAS, 2003; SOUZA, LORENSI, 2012; XU, CHANG, 2017).

Algumas plantas da família Primulaceae são amplamente utilizadas na medicina tradicional como anti-helmínticos e antibactericidas. A casca é importante fonte de tanino e o seu decocto é considerado remédio contra a lepra, enquanto raízes e frutos são usados na farmacologia. Ademais, são também utilizadas na construção civil, produção de lenha, carvão, cultivos ornamentais e arborização urbana (STAHL, 1991; MIDWO et al., 2002; BACKES, IRGANG, 2002).

2.6.2 Gênero *Myrsine*

Foi descrito por Linnaeus em 1753, tem como sinônimo *Rapanea* e apresenta cerca de 300 espécies com distribuição pantropical. As espécies caracterizam-se por serem arbustos ou pequenas árvores dotadas de estruturas secretoras, que se apresentam sob forma de tricomas e cavidades secretoras internas em todo o corpo vegetal, principalmente nas folhas, flores e frutos. Apresentam ainda, folhas alternas, pecioladas ou sésseis. Possuem uma inflorescência umbeliforme e são férteis durante o ano todo. Os frutos são do tipo drupa, globosos ou elípticos com semente globosa única protegida por um pericarpo carnoso e endocarpo pétreo (RICKETSON, PIPOLY, 1997; STAHL, ANDERBERG, 2004).

No Brasil até o presente momento são registradas 23 espécies de *Myrsine* para as regiões sudeste e sul e 26 espécies para a Flora Brasileira como um todo (FREITAS, CARRIJO, 2014). As espécies desse gênero são conhecidas como “capororoca”, “pororoca”, “caapororoca”, estes nomes são direcionados ao seu uso mais comum, que é o da madeira, utilizada como combustível, para extração de taninos e estacas na construção civil, lenha, carvão e na fabricação de brinquedos, miolo de portas e painéis (SMITH, DOWNS, 1957; LORENZI, 2009). Além disso, as folhas são utilizadas como tintoriais, e os frutos são fonte alimentícia para várias espécies de pássaros (SIQUEIRA, 1993; PINESCHI, 1990). Por fim, algumas espécies de *Myrsine* são recomendadas para restauração de ambientes antropizados (PEREIRA, JACOBI, 2014).

Vários metabólitos secundários presentes em diversas espécies do gênero *Myrsine* já foram isolados, podemos citar: triterpenóides, flavonoides, hidroquinonas, glicosídeos e benzoquinonas, este último, responsável pela ação fitotóxica e antibacteriana dessas espécies (JANUÁRIO et al., 1992; ZHONG et al., 1997, 1999).

Nas espécies brasileiras de *Myrsine* são identificadas substâncias chamadas de terpenos, e essas se destacam pelas suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-helmíticas e moluscicida. Além das ações antissépticas, os terpenos podem atuar na atração de polinizadores, além do que substâncias como glicosídeos cianogênicos atuam nos mecanismos de proteção das plantas a herbívora (FAHN, 1988; JANUÁRIO et al., 1992; OHTANO, MAVI, HOSTETTMANN, 1993; MANGURO, MIDIWO, KRAUS, 1997; FRANCISCO; PINOTTI, 2000; OSPINA et al., 2001; GITHIORI et al., 2002).

2.6.3 Espécie *Myrsine umbellata* Mart.

A espécie *Myrsine umbellata* Mart. é uma planta nativa brasileira, popularmente conhecida como: capororoca, capororoca-branca, jacaré-domato e copororocão. É uma das espécies de distribuição mais ampla, com ocorrência desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul. Pertencente aos Domínios Fitogeográficos Mata Atlântica e Cerrado, é caracterizada por ser

uma espécie arbórea, perenifólia, polimorfa e heliofága, apresentando de 1,5 a 8 metros de altura, suas inflorescências umbeliformes, com longos pedicelos e densamente dispostas nos ramos terminais (FREITAS, 2003; JUNG-MENDAÇOLLI, BERNACCI, 2005). As folhas são simples, alternadas, coriáceas, verdes escuras, sendo brilhantes e visivelmente nervadas na face adaxial e opacas com glândulas esparsas na face abaxial. As sementes germinam facilmente em qualquer tipo de solo, após os frutos passarem pelo sistema digestório dos animais que o consomem (BACKES, IRGANG, 2002).

A madeira da espécie *M. umbellata* é utilizada na construção civil, produção de lenha e carvão. Além disso, a espécie é recomendada na recuperação de áreas degradadas para a recuperação de ambientes voçorocas, ripários e reabilitação de áreas mineradas, além de possuir qualidades ornamentais para o paisagismo e arborização de ruas, praças, parque, entre outros. Por fim, na medicina popular, são utilizados chás das folhas ou decocção das cascas para tratamento diurético, no combate de infecções das vias urinárias, diminuem pruridos, erupções, urticárias, eczemas, reumatismo e é utilizado no combate de problemas do fígado, sendo até as suas cascas consideradas remédio para lepra (FARIAS et al., 1993; VILELA et al., 1993; BACKES, IRGANG, 2002; LORENZI, 2002; NAPPO et al., 2004).

Em relação às atividades biológicas das folhas de *M. umbellata*, foi comprovado na literatura que o extrato de acetato de etila apresenta potencial antifúngico, o extrato diclorometânico apresenta atividade inseticida contra as larvas de *Spodoptera frugiperda* (MIRANDA, 2015).



Figura 1. Morfologia de *Myrsine umbellata*: A) flor; B) folhas; C) Folhas e fruto.

Fonte: Flora Digital. Fotografos: João A. Bagatini.

http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php

1 **CAPÍTULO 1: Bioscience Journal**
2

3 **COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES**
4 **BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE *Myrsine***
5 ***umbellata* MART. (PRIMULACEAE)**
6

7 Larissa Valéria Laskoski¹; Fabiana Gisele da Silva Pinto^{1*}
8

9 ¹Programa de Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Laboratório de
10 Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI), Universidade Estadual do Oeste do
11 Paraná – UNIOESTE. Cascavel – PR, Brasil. Cep: 85819-110.
12

13 *Autor para correspondência: fabiana.pinto@unioeste.br.
14

15 **RESUMO:** *Myrsine umbellata* pertence à família Primulaceae, é uma planta
16 nativa brasileira, encontrada nas regiões Nordeste e Sul e devido aos seus
17 efeitos terapêuticos é amplamente utilizada na medicina popular em fitoterapia,
18 usa-se a casca no tratamento das afecções do fígado, combate às doenças
19 da pele e hanseníase ou lepra. Assim, o objetivo do estudo foi realizar a
20 prospecção fitoquímica através de testes colorimétricos para determinar os
21 grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais solúveis
22 em metanol (EM), acetato de etila (EAE), hexano (EH) e diclorometano (ED)
23 das folhas de *M. umbellata*, bem como investigar a atividade antimicrobiana
24 frente às doze cepas padrões ATCCs pela técnica de microdiluição em caldo; o
25 potencial antioxidante pelo método de DPPH e o potencial antibiofilme sobre a
26 biomassa dos biofilmes de bactérias padrões pela técnica do cristal violeta e
27 ensaio de redução do sal tetrazólio (MTT). A prospecção fitoquímica detectou a
28 presença de saponinas, esteroides, alcaloides, antocianinas, antocianidinas,
29 flavonoides e taninos. O EM apresentou as melhores atividades biológicas
30 quando comparado aos demais extratos testados. Apresentou atividade
31 antimicrobiana frente à cepa Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (CIM
32 3,12 e CBM 6,25), o seu percentual antioxidante de 92,58% e ação antibiofilme
33 contra o biofilme da cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* com inibição

34 da biomassa em 92,58% e viabilidade celular de 17,88%. Os resultados
35 sugerem que o EM de *M. umbellata* representa uma fonte alternativa de
36 bioativos vegetais para desenvolvimento de produtos naturais.

37

38 **PALAVRAS-CHAVES:** Antimicrobianos. Biofilme Bacteriano. Capororoca.
39 Fitoquímico. Plantas medicinais. Radicais livres.

40

41 **PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF BIOLOGICAL**
42 **ACTIVITIES OF PLANT EXTRACTS FROM LEAVES OF *Myrsine umbellata***
43 **MART. (PRIMULACEAE)**

44

45 **ABSTRACT:** *Myrsine umbellata* belongs to the family Primulaceae, is a native
46 Brazilian plant, found in the Northeast and South regions and due to its
47 therapeutic effects is widely used in folk medicine in herbal medicine, the bark is
48 used in the treatment of liver disorders, combating skin diseases and leprosy or
49 leprosy. Thus, the objective of the study was to carry out phytochemical
50 prospecting through colorimetric tests to determine the groups of secondary
51 metabolites present in methanol-soluble plant extracts (EM), ethyl acetate
52 (EAE), hexane (EH) and dichloromethane (ED) of the leaves of *M. umbellata*,
53 as well as to investigate the antimicrobial activity in front of the twelve ATCCs
54 standard strains by the broth microdilution technique; the antioxidant potential
55 by the DPPH method and the antibiofilm potential on the biomass of biofilms of
56 standard bacteria by the crystal violet technique and tetrazolium salt reduction
57 assay (MTT). Phytochemical prospecting detected the presence of saponins,
58 steroids, alkaloids, anthocyanins, anthocyanidins, flavonoids and tannins. The
59 EM presented the best biological activities when compared to the other extracts
60 tested. Presented antimicrobial activity against the Gram-positive strain
61 *Staphylococcus epidermidis* (MIC 3,12 and MBC 6,25), its antioxidant
62 percentage of 92,58% and antibiofilm action against the biofilm of the Gram-
63 positive strain *Staphylococcus aureus* with biomass inhibition in 92,58% and
64 cell viability of 17.88%. The results suggest that the EM of *M. umbellata*
65 represents an alternative source of plant bioactive for the development of
66 natural products.

67

68 **KEYWORDS:** Antimicrobials. Bacterial biofilm. Capororoca. Free radicals.
69 Medicinal plants. Phytochemical.

70

71 **INTRODUÇÃO**

72

73 O Brasil é um dos países com a maior diversidade de espécies vegetais
74 do planeta, sendo assim, as plantas vêm sendo pesquisadas como alternativa
75 para os problemas sanitários, devido especialmente a seus princípios ativos.
76 Dessa forma, a indústria brasileira tem buscado por opções mais seguras para
77 o controle de patógenos, apontando como promissores, os antimicrobianos
78 naturais, tais como os extratos vegetais. Estudos já demonstram sua eficiência
79 no controle de microrganismos resistentes, por serem produtos naturais
80 provavelmente apresentam menor toxicidade. Além de representarem uma
81 forma menos danosa ao consumidor que estará livre das super dosagens de
82 antibióticos e possíveis danos à saúde (BONA et al., 2010; SILVA et al., 2016).

83 A aplicação indevida de antimicrobianos sintéticos atinge as áreas da
84 medicina humana e veterinária, pois são utilizadas altas dosagens de
85 antimicrobianos/antifúngicos. Isso acarreta na seleção de patógenos
86 resistentes ao tentar combater infecções causadas por microrganismos. Essa
87 resistência provoca alterações genéticas, as quais modificam os distintos
88 mecanismos bioquímicos impedindo a ação das drogas (ARANTES et al.,
89 2016). Portanto, é importante a busca por novas substâncias antimicrobianas,
90 objetivando uma opção mais eficiente, econômica e menos danosa ao
91 ambiente.

92 Devido a esses problemas e com o aumento da preocupação da
93 população em relação ao uso de produtos sintéticos, há uma demanda nos
94 estudos em relação a atividades biológicas. Além disso, a utilização de
95 produtos de origem vegetal tem sido amplamente estudada para fins
96 antioxidantes, visto que podem apresentar compostos que controlam o excesso
97 de radicais livres na célula. Portanto, extratos vegetais tornam-se fortes
98 candidatos a estudos referentes a esta atividade biológica (PUPO, GALLO,
99 2007).

100 Além disso, os extratos vegetais vêm sendo estudados e utilizados para
101 controle de biofilmes. Determinadas células bacterianas são capazes de formar

102 uma matriz de polímero extracelular constituída por ácidos nucleicos, proteínas
103 e polissacarídeos, denominadas como biofilmes. Os biofilmes manifestam
104 propriedades de desenvolvimento e traços fenotípicos únicos que lhes
105 favorecem proteção contra o meio externo e proporcionam melhor adesão às
106 superfícies. Dessa forma, reduzem a suscetibilidade aos antimicrobianos
107 comercializados tornando-se mais resistentes em ambientes com condições
108 adversas (FLACH; KARNEPP; CORÇÃO, 2005; PASTERNAK, 2009; SILVA,
109 2019). A presença dos biofilmes causa deterioração da superfície e/ou
110 proliferação de microorganismos patogênicos. Gerando prejuízo na indústria
111 quando presentes em equipamentos, e na saúde aumentando a taxa de
112 mortalidade decorrente das doenças causadas pela resistência das bactérias
113 aos antimicrobianos e desinfetantes. Por tanto, os extratos vegetais podem ser
114 uma fonte promissora ao combate de microorganismos multiresistentes
115 (XAVIER et al., 2003; PASTERNAK, 2009; FROZI, ESPER, FRANCO, 2017).

116 Na investigação por extratos vegetais oriundos de plantas nativas
117 brasileiras, o gênero *Myrsine* (tem como sinônimo *Rapanea*), pertencente à
118 família Primulaceae, compreende cerca de 300 espécies com distribuição
119 pantropical, no Brasil são registradas 26 espécies, distribuídas principalmente
120 nas regiões sul e sudeste (RICKETSON, PIPOLY, 1997; FREITAS, CARRIJO,
121 2014). As espécies desse gênero apresentam potencial antifúngico: *R.*
122 *melanophloeos* (L.) Mez (OHTANI; HOSTETTMANN; 1992), *M. umbellata* Mart.
123 e *M. coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem & Schult. (MIRANDA et al., 2015),
124 antibacteriano: *R. parviflora* (A.Dc.) Mez (SUFFREDINI et al., 2007) e *Rapanea*
125 sp. (MONTOVANI et al., 2009), anti-inflamatório: *M. guianensis* (Aubl.) Kuntze
126 (OSPINA et al., 2001), antioxidantes: *M. guianensis* (OSPINA et al., 2001) e *M.*
127 *coriacea* (MIRANDA et al., 2015), inseticida: *M. umbellata*; *M. coriacea*
128 (MIRANDA et al., 2015) e anti-helmítico *M. africana* L. e *R. melanophloeos* (L.)
129 (GITHIORI et al., 2002).

130 A espécie escolhida nesta pesquisa, *Myrsine umbellata* Mart. é uma
131 planta arbórea nativa brasileira, popularmente conhecida por capororoca. Tem
132 distribuição ampla com ocorrência desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul.
133 Na medicina popular suas cascas são usadas para tratamento diurético,
134 infecções das vias urinárias, de problemas no fígado e também como remédio
135 para tratamento de hanseníase (lepra) (FARIAS et al., 1993; VILELA et al.,

136 1993; LORENZI, 2009; NAPPO et al., 2004). Existem poucos estudos sobre as
137 atividades biológicas de suas folhas. Na literatura foi relatado que o extrato de
138 acetato de etila apresenta potencial antifúngico e o extrato diclorometano
139 apresenta atividade inseticida contra as larvas de *Spodoptera frugiperda*
140 (MIRANDA et al., 2015).

141 Diante do exposto é de grande valia estudos com bioativos vegetais
142 como alternativa aos problemas de sanidade decorrentes da resistência
143 bacteriana e a utilização de produtos sintéticos, tornando importante a pesquisa
144 com extratos vegetais, bem como estudos com espécies de plantas nativas
145 para fins terapêuticos para validação científica e para a valorização da flora
146 regional e ressaltando a importância de sua conservação.

147 O presente estudo tem por objetivo realizar a caracterização fitoquímica,
148 avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e antibiofilme dos extratos
149 vegetais das folhas da espécie *Myrsine umbellata* frente às cepas padrões
150 ATCCs de importância médica.

151

152 **MATERIAL E MÉTODOS**

153

154 *Coleta e identificação das folhas de Myrsine umbellata Mart.*

155 A coleta das folhas de *Myrsine umbellata* foi realizada no Parque
156 Ecológico Paulo Gorski, localizado em Cascavel, Paraná, Brasil (24°57'51.61"S
157 e 53°26'14.80"O) entre os meses de agosto de 2019 a março de 2020, no
158 período da manhã, nas primeiras horas do dia ensolarado e com temperatura
159 em torno dos 20°C, clima subtropical úmido, entre as estações fim de inverno e
160 início do outono, estado fenológico da planta vegetativo e tempo de coleta em
161 torno de uma hora. Uma exsicata da planta foi depositada ao Herbário da
162 Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) sob número de
163 *voucher* UNOP 10731.

164

165 *Obtenção dos extratos vegetais*

166 As folhas de *M. umbellata* foram secas em estufa de ar a 40° C por 48 a
167 72 horas, e posteriormente moídas em moinho de facas do tipo Willey até
168 granulometria de 0,42 mm. Foram preparados os extratos vegetais segundo a
169 metodologia proposta por Pandini et al. (2015), com modificações. O material

170 vegetal seco (10 g) foi submetido à extração com diferentes solventes (100
171 mL): metanol P. A. (EM), acetato de etila P. A. (EAE), hexano P. A. (EH) e
172 diclorometano P. A. (ED). Essas preparações líquidas foram mantidas em
173 agitador rotativo a 220 rpm durante 24 horas. Após este período, as soluções
174 foram filtradas utilizando papel filtro Whatman nº 1 e, posteriormente
175 centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi
176 coletado e submetido à rotoevaporação em evaporador rotativo, para total
177 eliminação dos solventes, obtendo os extratos brutos orgânicos ao final do
178 processo. Os extratos foram armazenados ao abrigo da luz em freezer a 4º C.
179 O rendimento dos extratos vegetais foi calculado pela expressão: Porcentagem
180 (%) = (massa do extrato (g) / massa vegetal seca e moída (g)) x 100.

181

182 *Prospecção Fitoquímica*

183 Os testes fitoquímicos dos diferentes extratos vegetais de *M. umbellata*
184 foram realizados segundo a metodologia descrita por Matos (1997), com
185 modificações. Esses testes se basearam na visualização colorimétrica e/ou na
186 formação de precipitado após a adição dos reagentes específicos. As classes
187 de metabólitos secundários identificados foram: alcaloides empregando o
188 reagente de Dragendorff; saponinas a partir da reação com água destilada e
189 ácido clorídrico P. A.; esteroides e triterpenoides por meio da reação de
190 Liebermann-Burchard; antocianinas, antocianidinas, auronas, chalconas,
191 flavanonóis, flavonas, flavonóis e xantonas (flavonoides) a partir de mudanças
192 de pH no meio; taninos por meio da reação com cloreto férrico e cumarinas por
193 meio de reação de fluorescência com hidróxido de potássio.

194

195 *Atividade Antimicrobiana – CIM/CBM*

196 *Microrganismos utilizados*

197 Os ensaios experimentais com os extratos vegetais foram realizados no
198 Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade
199 Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus de Cascavel. Para o
200 ensaio foram utilizadas diferentes cepas da coleção *American Type Culture*
201 *Collection* (ATCC) e da coleção de Culturas Cefar Diagnóstica (CCCD), sendo
202 sete cepas Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella*
203 *enterica* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC

204 14028), *Salmonella enterica* Abaetetuba (ATCC 35640), *Pseudomonas*
205 *aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klebsiella*
206 *pneumoniae* (ATCC 13883); quatro Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*
207 (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus*
208 *epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus subtilis* (CCD-04); uma levedura *Candida*
209 *albicans* (ATCC 10231) (SCUR et al., 2014; PANDINI et al., 2018).

210 Para os testes, os microrganismos foram recuperados em caldo de
211 enriquecimento *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados por 24 horas a $36\pm 1^\circ$ C.
212 Após este período, as cepas foram repicadas em placas contendo meio Ágar
213 Muller Hinton (MH), incubadas a $36\pm 1^\circ$ C por 24 horas. Logo após este
214 período, foram feitos os inóculos e padronizados em solução salina (0,85%)
215 resultando na concentração final de 1×10^5 UFC/mL⁻¹ para bactérias e 1×10^6
216 UFC. mL⁻¹ para levedura *C. albicans*.

217

218 *Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

219 Os ensaios foram realizados segundo a metodologia de microdiluição em
220 caldo descrita por Weber et al. (2014) e CLSI (2015), com modificações. Todos
221 os extratos vegetais de *M. umbellata* foram solubilizados em metanol P. A.,
222 obtendo uma solução estoque (400 mg.mL^{-1}). Em placas de microdiluição de 96
223 poços foram distribuídos a partir da segunda coluna 150 μL do caldo MH por
224 poço para as cepas bacterianas e para a levedura *C. albicans*. Na primeira
225 coluna foram adicionados em cada poço 300 μL da solução extrato
226 vegetal/metanol/MH, e em seguida foram realizadas as diluições seriadas
227 obtendo concentrações que variaram de 200 a $0,09 \text{ mg.mL}^{-1}$. Ao final, foram
228 adicionados 10 μL de inóculo em cada poço e as placas foram incubadas a
229 $36\pm 1^\circ$ C entre 18-24 horas. Para o controle positivo foi utilizado antibiótico
230 comercial Gentamicina (200 mg.mL^{-1}) e o antifúngico comercial Nistatina (200
231 mg.mL^{-1}). Como controle negativo foi adicionado o inóculo ao caldo MH, sem
232 presença do extrato para verificar a viabilidade do microrganismo testado.
233 Também foi realizado o controle de esterilidade dos extratos solubilizados em
234 metanol P.A. e um controle do diluente metanol P.A para verificar se houve
235 interferência no ensaio. Foi utilizado 20 μL cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a
236 0,5% como revelador colorimétrico. Foram realizados três experimentos de CIM

237 em triplicata, sendo possível determinar a menor concentração dos extratos
238 capaz de inibir o crescimento microbiano.

239

240 *Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima* 241 *(CFM)*

242 Para o ensaio foi realizada a metodologia de Weber et al. (2014), com
243 modificações. Antes da adição do TTC a 0,5% para determinar o CIM, foi
244 retirada uma alíquota de 2 µL de cada poço da placa de microdiuicção e semeada
245 na superfície do ágar MH. As placas foram incubadas a 36±1° C entre 18-24
246 horas. O ensaio foi realizado em triplicata, e para determinar a CBM/CFM foi
247 observado se houve crescimento microbiano em ágar MH, permitindo verificar a
248 menor concentração dos extratos vegetais capaz de causar a morte da
249 bactéria/fungo testado.

250

251 *Atividade Antioxidante*

252 A atividade antioxidante dos extratos vegetais foi realizada conforme o
253 método da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), proposto
254 por Rufino et al. (2007) e Pandini et al. (2015), com modificações. Inicialmente,
255 foi feita uma curva de calibração (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µM DPPH) para se
256 obter a concentração de DPPH no meio após a reação com os extratos vegetais,
257 onde foi determinada a equação $y = 0,114x - 0,0973$ ($R^2 = 0,99$), onde y é a
258 concentração de DPPH e x é absorbância. Em seguida, os extratos vegetais
259 foram solubilizados em metanol P. A., obtendo concentrações que variaram de
260 0,1 a 15 mg.mL⁻¹. Uma alíquota de 0,1 mL desses extratos vegetais foi
261 adicionada a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (60 µM) e
262 homogeneizadas em agitador de tubos. Como controle negativo foi utilizado 1
263 mL de metanol P. A. adicionado a 3,9 mL de DPPH, e como controle positivo foi
264 utilizado o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxi-tolueno) em diferentes
265 concentrações (0,10 a 1,0 mg.mL⁻¹).

266 Os testes foram realizados em espectrofotômetro a 515 nm em intervalos
267 de leitura de 1 minuto até a estabilização da absorbância. Todas as
268 concentrações foram definidas a partir de pré-teste para determinar a atividade
269 antioxidante no intervalo aproximado de 7% a 97% de sequestro de radicais
270 livres DPPH. Como branco, foi utilizado metanol para a calibração do

271 espectrofotômetro. A porcentagem de sequestro do radical livre (AA%) foi
272 expressa pela equação: $AA\% = \frac{(A_0 - A_1)}{A_1} \times 100$, onde A_0 é a absorbância do
273 controle negativo e A_1 é a absorbância da amostra. Para o cálculo de IC_{50}
274 (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a
275 concentração inicial de DPPH), foram utilizadas as concentrações dos extratos
276 vegetais e do BHT para obter a equação da reta com R^2 maior que 0,80, e
277 assim, encontrado o valor de IC_{50} , a partir de regressão linear. Os testes foram
278 realizados em triplicata e expressos com média \pm desvio padrão. Os resultados
279 de IC_{50} foram analisados usando ANOVA com teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando
280 o programa estatístico SISVAR 2011. Em seguida, os extratos foram calculados
281 pela equação $IAA = AA\% / IC_{50}$ onde AA% é a porcentagem de sequestro do
282 radical livre e IC_{50} (quantidade de substância antioxidante necessária para
283 reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) e classificados de acordo com
284 o AAI em fraco (AAI $< 0,5$), moderado (AAI entre 0,5 e 1,0), forte (AAI entre 1,0 e
285 2,0) e muito forte (AAI $> 2,0$), conforme metodologia proposta em Scherer e
286 Godoy, (2009).

287

288 *Atividade Antibiofilme*

289

290 *Microrganismos*

291 Para o ensaio foram utilizadas diferentes cepas da coleção *American*
292 *Type Culture Collection* (ATCC) que na literatura são referenciadas como
293 excelentes produtoras de biofilme sendo uma cepa Gram-positiva
294 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e duas cepas Gram-negativas
295 *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).
296 Como controle positivo foi utilizado meio BHI suplementado com glicose 1% e
297 inóculo das cepas testadas; e como controle de interferência da cor de EM e BHI
298 nas diferentes concentrações destes diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e BHI.
299 E como controle do diluente DMSO para verificar se houve interferência do
300 mesmo no ensaio.

301

302 *Ensaio da atividade sobre biofilme bacteriano*

303 O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços (fundo chato) com
304 superfície de poliestireno. Inicialmente, foram distribuídos 180 µL de meio BHI
305 suplementado com 1% de glicose e 20 µL do inóculo bacteriano para a formação
306 de biofilme ($0,5 \times 10^6$ UFC/mL em solução BHI suplementada com 1% de
307 glicose), em cada poço das placas e estas foram incubadas por 24 horas a
308 $37 \pm 1^\circ$ C para permitir a fixação celular e a formação do biofilme. Após o período
309 de incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados uma vez com
310 solução salina tamponada fosfato (PBS 1X), e em seguida adicionado 150 µL de
311 um novo meio BHI contendo EM nas concentrações que variaram de 200 a 1,56
312 mg/mL⁻¹. O material foi incubado novamente a $37 \pm 1^\circ$ C por 24 horas
313 (STEPANOVIĆ et al., 2007) com modificações.

314

315 *Quantificação da biomassa do biofilme por cristal violeta*

316 Após a incubação, o meio foi aspirado suavemente, e os poços foram
317 lavados três vezes com PBS 1X. Em seguida, os poços receberam 150 µL de
318 metanol P.A. durante 20 minutos para a fixação da amostra, após a retirada do
319 metanol foram adicionados 150 µL de cristal violeta 2% por 15 minutos. Em
320 seguida, os poços foram lavados em PBS 1X até a saída total do corante. Após
321 a secagem foram adicionados 150 µL de etanol a 95% e deixado em contato
322 por 30 minutos, em seguida foi transferido o conteúdo dos poços para uma
323 nova placa e realizada a leitura da densidade óptica (DO) em 570 nm utilizando
324 leitor de microplacas do tipo Biotek, modelo Epoch. Os dados foram calculados
325 em média geral da densidade óptica (DO) da biomassa do biofilme quantificada
326 pela coloração usando cristal violeta. O percentual de inibição do biofilme foi
327 determinado pela equação: Porcentagem de inibição (%): $((DO \text{ controle}$
328 $\text{positivo} - DO \text{ experimental}) / DO \text{ controle positivo}) \times 100$ no programa Microsoft
329 Excel 2010 (CHRISTENSEN et al., 1985). Os valores de porcentagens de
330 inibição foram classificados da seguinte forma: (<50%) indicam baixa atividade
331 antibiofilme e (>50%) indicam alta atividade antibiofilme (SANDASI, LEONARD
332 E VILJOEN, 2018).

333

334 *Ensaio da viabilidade celular dos biofilmes*

335 A viabilidade celular dos biofilmes maduros foi avaliada pela redução do
336 3- (4,5-dimetiltiazol-2-Il) -2,5- difeniltetrazólio (MTT). Após a retirada do metanol

337 uma alíquota de 180 µL de BHI e 20 µL de MTT foram adicionadas em cada
338 poço, e as placas foram incubadas no escuro a 37° C por 2 horas. Após, o
339 meio foi retirado e acrescentado 150 µL de DMSO por 15 minutos. Em seguida,
340 os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa e a densidade óptica
341 foi mensurada a 570 nm em leitor de microplacas do tipo Biotek, modelo
342 Epoch. Os dados da viabilidade celular dos biofilmes maduros foram expressos
343 em média geral da densidade óptica (DO) e o percentual da viabilidade celular
344 (CV%) foi determinado pela equação: (DO controle positivo/ DO experimental)
345 x 100 (Jia et al., 2011; Kuzma et al. 2007). Os valores da porcentagem de
346 viabilidade celular foram classificados como: (< 50%) indicam baixa atividade
347 celular e (> 50%) indicam alta atividade celular (SANDASI, LEONARD E
348 VILJOEN, 2018).

349 A atividade do extrato sobre o biofilme foi mensurada pela redução (%) do
350 valor de absorvância quando comparada com o controle positivo, uma vez que a
351 amostra testada é produtora de biofilme. Como critério para expressar os
352 resultados do potencial antibiofilme de EM de *M. umbellata*, tanto o teste da
353 biomassa do biofilme pelo ensaio do cristal violeta quanto da viabilidade celular
354 pelo ensaio do MTT, foram determinados a partir das concentrações de CIM, 2X
355 CIM e 4X CIM de cada cepa bacteriana testada.

356

357 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

358

359 *Rendimento e prospecção fitoquímica dos extratos vegetais*

360 A partir da obtenção dos extratos vegetais de *M. umbellata* com diferentes
361 solventes, obteve-se os seguintes rendimentos: EM (24,75%), EAE (9,50%), ED
362 (7,97%) e EH (5,97%).

363 Vários razões podem influenciar no rendimento dos diferentes extratos
364 vegetais, tais como a temperatura, tempo de extração, relação sólido-solvente,
365 entre outros. Porém, a variável mais importante é a escolha do solvente extrator,
366 graças as suas complexas características químicas, como solubilidade e
367 polaridade diferentes influenciam sobre o rendimento dos mesmos (CABANA et
368 al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013).

369 A prospecção fitoquímica dos extratos vegetais de *M. umbellata* revelou a
370 presença de compostos pertencentes às classes das saponinas, esteroides,

371 alcaloides, antocianinas, antocianidinas, flavonoides (flavonas, flavánois,
372 xantonas e flavanonóis), e taninos. Não foi detectada a presença de
373 triterpenoides e cumarinas em nenhum dos extratos testados (Tabela 1). Os
374 metabólitos secundários como alcaloides e flavonoides foram identificados em
375 todos os extratos. A maior diversidade de classes de compostos foi observada
376 nos extratos EH com 9 diferentes classes de compostos, seguidos dos EM com
377 8 classes, EAE e ED com 6 classes. Segundo relatos da literatura, extratos
378 vegetais que utilizam como solventes extratores metanol, etanol, hexano e
379 acetato de etila são comumente ricos em metabólitos secundários, essa
380 informação corrobora com os dados encontrados em nosso trabalho (CABANA
381 et al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ et al., 2013).

382

383 Apesar de nenhum relato na literatura referente à prospecção fitoquímica
384 dos extratos vegetais das folhas de *M. umbellata*, vários metabólitos secundários
385 de diversas espécies do gênero *Myrsine* já foram identificados e isolados, como
386 os triterpenoides em *M. africana* e *R. Melanophloes* (MANGURO et al. 1997;
387 OTHANI E HOSTETTMANN, 1992), flavonoides em *M. seguinii* e *M. coriácea*
388 (ZHONG et al., 1997; ALVES et al., 2012) , terpenos em *R. Lancifolia* e *R.*
389 *Guyanensis* (JANUÁRIO et al., 1992), saponinas em *R. Melanophloeos* (OTHANI
390 e HOSTETTMANN, 1992) e taninos em *M. coriacea* (ALVES et al., 2012). Ainda
391 na literatura foi referenciado o estudo sobre a prospecção fitoquímica de extratos
392 orgânicos das folhas de *Myrsine coriacea* onde foi identificada a presença dos
393 seguintes compostos: flavonas, flavonóis, xantonas, taninos, saponinas e
394 compostos fenólicos (ALVES et al., 2012), corroborando os resultados obtidos
395 no nosso estudo, visto que estes compostos também foram identificados nos
396 extratos de *M. umbellata*.

397 Vale ressaltar que pode ser encontradas diferenças nos compostos entre
398 espécies da mesma família, gênero e até espécie, devido à localização em que a
399 planta se encontra e a fatores ambientais da região como temperatura,
400 sazonalidade, fatores climáticos, disponibilidade hídrica, pH, solo, época da
401 coleta, método de extração, escolha do solvente e as características de
402 polaridade do mesmo, entre outros, que podem interferir na via metabólica das
403 plantas, sendo fundamentais na extração de compostos bioativos com potencial
404 biológico (MORAIS, 2009; FERNÁNDEZ- AGULLÓ et al. 2013).

405

406 *Atividade antimicrobiana*

407 Em relação à atividade antimicrobiana, no ensaio de microdiluição em
408 caldo, todos os extratos vegetais das folhas de *M. umbellata* foram testados
409 quanto à sua capacidade de inibir o crescimento (Concentração Inibitória
410 Mínima- CIM) ou causar a morte (Concentração Bactericida Mínima- CBM/
411 Concentração Fungicida Mínima- CFM) dos microrganismos (Tabela 2). A CIM e
412 a CBM/CFM dos extratos vegetais foram classificadas de acordo com Araújo
413 (2010) e Pandini et al. (2015), sendo a atividade enquadrada em uma das quatro
414 diferentes classes: elevada (<12,5 mg.mL⁻¹), moderada (12,5 a 25 mg.mL⁻¹),
415 baixa (50 a 100 mg.mL⁻¹) e muito baixa (>100 mg.mL⁻¹).

416 Todos os extratos vegetais testados de *M. umbellata* apresentaram
417 potencial antimicrobiano quando testados frente às dozes cepas padrões
418 patogênicas (ATCCs).

419 Observou-se que o EM apresentou a melhor atividade antimicrobiana
420 quando comparados com os demais extratos, com valores de CIM/CBM que
421 variaram de 3,12 a 25 mg.mL⁻¹, classificadas tanto a CIM como a CBM de
422 elevada a moderada, destacando sua eficiência sobre a cepa Gram-positiva
423 *Staphylococcus epidermidis* (CIM/CBM de 3,12/6,25 mg.mL⁻¹). Este extrato
424 apresentou melhor desempenho e a sua atividade pode ser explicada pela
425 presença de saponinas e taninos, quando comparado aos outros extratos que
426 não apresentaram essas classes de compostos.

427 Em seguida o EH demonstrou a segunda melhor atividade antimicrobiana,
428 sendo classificado com CIM de elevada, moderada e baixa e CBM de moderada,
429 baixa e muito baixa. Este assim como o EM, também mostrou eficiência frente à
430 cepa Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*, com valores de CIM e CBM de
431 6,25 e 12,5 mg.mL⁻¹, respectivamente.

432 Por fim, o EAE e o ED, foram classificados com potencial antimicrobiano
433 de CIM de elevada, moderada e baixa e CBM de moderada, baixa e muito baixa.
434 A cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (CIM e CBM de 3,12 e 25 mg.mL⁻¹
435 ¹, respectivamente) foi a mais suscetível ao EAE. Já o ED apresentou as
436 melhores atividades tanto inibitórias quanto bactericidas/fungicidas com CIM de
437 6,25 mg.mL⁻¹ e CBM/CFM de 25 mg.mL⁻¹ para as cepas Gram-negativa
438 *Pseudomonas aeruginosa* e levedura *Candida albicans*.

439 Apesar de o EH ser o único a apresentar os compostos antocianinas e
440 antocianidinas, e estes serem relatados na literatura por apresentarem atividade
441 antimicrobiana pela sua capacidade de danificar as células através da alteração
442 da permeabilidade seletiva da membrana plasmática e atividade antioxidante
443 podendo atenuar o estresse oxidativo provocado pelos radicais livres
444 (CARDOSO et al. 2011), porém, este extrato não apresentou os melhores
445 resultados quanto ao potencial antimicrobiano e antioxidante quando comparado
446 aos demais extratos testados, isto pode ser explicado através da prospecção
447 fitoquímica, por se tratar de um método qualitativo, não permite quantificar esses
448 grupos, e a presença desses em baixas quantidades provavelmente não foram
449 suficientes para inibir significativamente os microrganismos testados e reduzir os
450 radicais livres, além do mais, estes compostos podem ter efeitos aditivos ou
451 sinérgicos quando utilizados em combinação (PENTEADO et al., 2016).

452 Contudo, não foi verificado na literatura dados sobre o potencial
453 antimicrobiano de extratos vegetais de *M. umbellata* frente as cepas padrões
454 ATCCs, considerando este o primeiro relato do potencial antimicrobiano dessa
455 espécie. Apenas foi encontrado na literatura trabalhos sobre o potencial
456 antimicrobiano de extratos vegetais de plantas do gênero *Myrsine*. Montovani et
457 al. (2009) reportaram a atividade antimicrobiana dos extratos hexano, acetato
458 de etila e metanol de espécies de *Rapanea* sp. (sinônimo de *Myrsine* sp.) frente
459 a cepa *Staphylococcus aureus*, e dentre os extratos testados somente o extrato
460 hexânico não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

461 Todos os extratos testados apresentaram atividade
462 bacteriostática/fungistática ou bactericida/fungicida sobre as cepas ATCCs,
463 sugerindo que o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais de *M. umbellata*
464 esteja relacionado ao seu perfil fitoquímico, principalmente pela presença das
465 classes dos flavonoides, alcaloides e taninos. Os flavonoides (flavonas,
466 flavonóis, xantonas e flavovonóis) presentes em todos os extratos testados são
467 substâncias fenólicas hidroxiladas possuem comprovada atividade
468 antimicrobiana na literatura. Seu modo de ação antimicrobiana se dá por
469 formação de complexos com proteínas extracelulares e solúveis, que ao se
470 ligarem na parede bacteriana causam danos irreversíveis a células. Além disso,
471 podem causar a perfuração e a redução da fluidez da membrana plasmática,
472 inibição da topoisomerase, acarretando na inibição da síntese de ácidos

473 nucleicos e/ou inibindo o metabolismo energético (SAMY;
474 GOPALAKRISHNAKONE, 2010; CUSHNIE; LAMB, 2011).

475 Os esteroides, presentes em todos os extratos testados, são compostos
476 terpenos formados por descarboxilações de precursores de origem triterpenos.
477 São ativos contra diversos microrganismos, seus mecanismos de ação não
478 estão completamente esclarecidos, porém acredita-se que envolvem a ruptura
479 da membrana celular por compostos lipofílicos (SILVA; DUARTE; VIERA FILHO,
480 2014;).

481 Já os taninos foram identificados em EM e EH, são compostos fenólicos
482 solúveis em água e em solventes polares, que ao precipitarem proteínas
483 propiciam um efeito antifúngico e antimicrobiano. O seu modo de ação pode
484 estar relacionado à sua capacidade de inibir as adesinas microbianas e
485 enzimas bacterianas, podendo ou não complexar com os substratos dessas
486 enzimas e proteínas envolvidas no transporte celular. Além disso, podem
487 também atuar sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando
488 seu metabolismo, e por fim, se complexam com íons metálicos, diminuindo a
489 disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano
490 (LOGUERCIO *et al.*, 2005).

491 Todos os extratos testados apresentaram os compostos fitoquímicos
492 alcaloides, são substâncias nitrogenadas, estes inibem a ação de bactérias
493 gram-negativas causando a lise celular e mudanças morfológicas nos
494 microrganismos (FUMAGALI *et al.*, 2008). Enfim, as saponinas foram
495 identificadas no EM, elas agem aumentando a permeabilidade das membranas
496 celulares das bactérias (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

497

498 *Atividade antioxidante*

499 A capacidade antioxidante dos extratos vegetais de *M. umbellata* foi
500 determinada pelo ensaio de sequestro de radicais livres de DPPH. Como
501 controle foi utilizado o antioxidante comercial *hidroxitolueno butilado* (BHT) nas
502 concentrações de 0,1 a 1,0 mg.mL⁻¹. Neste estudo foram testadas diferentes
503 concentrações dos extratos que variaram de 0,1 a 15 mg.mL⁻¹. Os dados
504 expostos na Tabela 3 são referentes à concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, que
505 apresentou os resultados mais relevantes.

506 O EM foi o extrato capaz de sequestrar mais radicais DPPH quando
507 comparado aos demais extratos testados, com atividade antioxidante de
508 92,54% e valor de IC₅₀ de 0,50 mg.mL⁻¹, necessário para reduzir em 50% o
509 valor de DPPH.

510 Enquanto, o EAE, EH e ED apresentaram as menores porcentagens de
511 sequestro de radicais livres com percentual antioxidante de 18,78%, 11,64% e
512 9,16%, respectivamente, e valores de IC₅₀ de 5,76 mg.mL⁻¹, 10,88 mg.mL⁻¹ e
513 11,65 mg.mL⁻¹ respectivamente. Estes resultados afirmam a necessidade de
514 concentrações maiores desses extratos para sequestrar a mesma quantidade de
515 radicais DPPH quando comparado ao BHT e ao EM. Sendo assim, foi possível
516 observar que atividade antioxidante depende do solvente extrator e da
517 concentração testada.

518 Segundo a classificação proposta por Scherer e Godoy, (2009) os
519 extratos vegetais de *M. umbellata* demonstraram índice de atividade antioxidante
520 (IAA) forte para o EM (IAA 1,85) e índice fraco para os demais EH (IAA 0,13),
521 EAE (IAA 0,05) e ED (IAA 0,05).

522 Não foram encontrados dados na literatura referentes à atividade
523 antioxidante dos extratos vegetais de *M. umbellata*. Na literatura há registro da
524 atividade antioxidante dos extratos vegetais EH, ED, EAE, EM das folhas de *M.*
525 *coriacea*, sendo que EM apresentou índice de atividade antioxidante (IAA) muito
526 forte (AAI >2) com valor de AAI de 5,95 (MIRANDA et al., 2015). O que torna os
527 nossos resultados promissores, tendo em vista que o EM de *M. umbellata*
528 apresentou maior percentual de sequestro de radicais livres DPPH, o que
529 resultou em índice de atividade antioxidante forte.

530 A excelente atividade antioxidante destes extratos está relacionada com
531 o teor de compostos fenólicos (flavonoides) presentes. Os flavonoides são
532 produzidos em grandes quantidades pelas plantas e são ótimos antioxidantes, é
533 o maior grupo encontrado também em alimentos e possuem estrutura ideal para
534 o sequestro de radicais e redução do potencial redox do meio. (JING et al.,
535 2012).

536

537 *Avaliação da atividade dos extratos vegetais sobre biofilme bacteriano*

538 Como o extrato EM foi o melhor antimicrobiano e antioxidante escolheu-se
539 ele para avaliar a atividade sobre os biofilmes de bactérias padrões. Foi

540 realizada a análise estatística dos dados da biomassa e da viabilidade celular,
541 quando os dados encontravam-se em normalidade foram executados os testes
542 estatísticos ANOVA e Tukey e quando os dados não estavam em distribuição
543 normal foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

544 Constatou-se que não houve diferenças significativas entre as diferentes
545 concentrações testadas (CIM, 2X CIM e 4X CIM), em vista disso, os dados
546 expressos nas tabelas 4 e 5 são referentes à ação da CIM sobre o biofilme.

547 O potencial antibiofilme de EM foi verificado somente frente ao biofilme da
548 cepa Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, onde foi capaz de reduzir a
549 biomassa em 92,53% e foi observada viabilidade celular baixa de 17,88% (tabela
550 4 e 5). Portanto, pode-se observar que este extrato apresentou melhor potencial
551 antimicrobiano e antibiofilme frente às cepas Gram-positivas testadas.

552 Em relação aos biofilmes das cepas Gram-negativas, o EM apresentou
553 baixa atividade antibiofilme, além disso, promoveu aumento da biomassa do
554 biofilme da cepa *Escherichia coli* em -8,05% (Tabela 4) e quando feito o ensaio
555 sobre a viabilidade celular do mesmo constatou-se que 64,52% das células
556 estavam ativadas (Tabela 5). Supostamente, esse aumento de biomassa pode
557 ser explicado pela ação dos compostos fitoquímicos em menores concentrações,
558 ou baixa penetração dos mesmos, ou aumento das bombas de efluxo da
559 membrana celular ou ainda o efeito sinérgico entre eles. Estes fatores favorecem
560 o aumento da biomassa do biofilme formado de *Escherichia coli*, através da
561 ativação de genes que proporcionam excesso de matriz celular (JAMAL et al.,
562 2018).

563 Na literatura não foi constatados dados sobre o potencial antibiofilme de
564 extratos vegetais de espécies do gênero *Myrsine*, este estudo é a primeira
565 descrição tanto do gênero, quanto da espécie *M. umbellata*.

566 Porém, já se tem estudos com espécies pertencentes a outros gêneros e
567 famílias, como o realizado por Silva (2019) que testou a atividade antibiofilme do
568 extrato metanólico da flor e do caule de *Calliandra dysantha* Benth. (Fabaceae)
569 contra o biofilme de *Staphylococcus aureus* e observou atividade antibiofilme
570 com baixa viabilidade celular.

571

572 **CONCLUSÃO**

573 O rendimento dos extratos vegetais testados variou de acordo com os
574 solventes utilizados. O EM apresentou o maior rendimento (24,75%) quando
575 comparado aos demais extratos testados.

576 Em relação à prospecção fitoquímica, o EH apresentou 9 classes de
577 compostos fitoquímicos revelando a presença de saponinas, esteroides,
578 alcaloides, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavanóis, flavanonóis,
579 xantonas (flavonoides) e taninos.

580 O EM apresentou as melhores atividades biológicas (antimicrobiana,
581 antioxidante e antibiofilme) quando comparado aos demais extratos testados.
582 Sua atividade antimicrobiana foi classificada entre elevada a baixa para a cepa
583 Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (CIM 3,12 mg.mL⁻¹ e CBM 6,25
584 mg.mL⁻¹). Já o seu percentual antioxidante foi de 92,58% e ainda apresentou
585 atividade antibiofilme contra o biofilme da cepa Gram-positiva *Staphylococcus*
586 *aureus* com alta inibição (92,53%) e viabilidade celular baixa de 17,88%.

587 Os resultados sugerem que o EM de *M. umbellata* pode ser usado como
588 nova alternativa na produção de produtos com bioativos vegetais, evidenciando
589 um novo ponto de vista para possíveis usos em diferentes setores industriais.

590 Portanto, ficam claras as influências dos compostos fenólicos
591 (flavonoides e taninos) na elevada atividade antimicrobiana, antioxidante e
592 antibiofilme. Esses resultados indicam o potencial biológico de *M. umbellata*,
593 portanto, são uma contribuição valiosa para futuros bioensaios a fim de
594 identificar e isolar os bioativos vegetais responsáveis pelo elevado potencial
595 antimicrobiano, antioxidante e antibiofilme.

596

597 **AGRADECIMENTOS:** Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento
598 Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa
599 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela
600 concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Manejo e
601 Conservação de Recursos Naturais (PPRN).

602

603 REFERÊNCIAS

604

605 ALVES, E. D. et al. Estudo Fitoquímico de folhas de *Myrsine coriacea* (Sw.) R.
606 Br. (Primulaceae). *Revista XVI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica*
607 *e XII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação- Universidade do Vale do*

608 *Paraíba*. 2012. Disponível em:
609 http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2012/anais/arquivos/1089_0954_01.pdf
610
611 ANSARI, F. et al. Association between poultry density and *Salmonella* infection in
612 commercial laying flocks in Iran using a kernel density. *Revista Pakistan*
613 *Veterinary Journal*. 2017, **3**, (37), 299-304.
614 <http://dSPACE.tbzmed.ac.ir:8080/xmlui/handle/123456789/46126>
615
616 ARANTES, V. P. et al. Estudo comparativo da atividade antibacteriana de
617 extratos vegetais de *Senna spectabilis*, *Rosmarinus officinalis* e *Eugenia*
618 *uniflora* frente à cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,
619 *Staphylococcus aureus* ATCC 6528 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
620 *Revista Arquivo Ciência Saúde UNIPAR*. 2016, **20**, (3), 151-158.
621 <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v20i3.2016.5715>
622
623 ARAÚJO, N.R.R., 2010. *In vitro evaluation of antimicrobial activity of plant*
624 *extracts on microorganisms related to oral mucositis injury*. Pará: Universidade
625 Federal do Pará. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
626
627 BONA, E. A. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de erva-mate (*Ilex*
628 *paraguariensis*) sobre sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. *Revista*
629 *UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde*. 2010, **12**, 45-48.
630 <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2010v12n3p%25p>
631
632 BURGER, M. C. M. et al. Atividade antimicrobiana do ácido mirsinóico A de
633 *Myrsine coriácea* e seus derivados semi-sintéticos. *Revista Brasileira de*
634 *Farmacognosia*. 2015, **25**, (5). <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.023>
635
636 CABANA, R. et al. Effect of different extraction methodologies on the recovery of
637 bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Revista*
638 *Industrial Crops and Products*. 2013. **48**, 49-56.
639 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.003>
640
641 CARDOSO, L. M. et al. Efeitos biológicos das antocianinas no processo
642 aterosclerótico. *Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas*. 2011,
643 **40**, (1). ISSN: 1909-6356.
644
645 CHRISTENSEN, G. D. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococcus to
646 Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of
647 Staphylococci to Medical Devices. *Revista Journal of Clinical Microbiology*. 1985,
648 **22**, (6). <https://doi.org/10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985>
649
650 CLSI. M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for
651 Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. *Revista*
652 *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*. 2015, **35**, (2).
653 <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3>.
654
655 COSTA, G. M. et al. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of
656 *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Revista International Journal of*

657 *Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015, **4**, (6), 908-917. ISSN: 2319-
658 7706.

659

660 CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the
661 antibacterial properties of flavonoids. *Revista International Journal of*
662 *Antimicrobial Agents*. 2011, **38**, 99-107. [hppts://doi.org/10.1016 /](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014)
663 [j.ijantimicag.2011.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014)

664

665 FARIAS, C. A. et al. Dinâmica da revegetação natural de voçorocas na região de
666 Cachoeira do Campo, Município de Ouro Preto- MG. *Revista Árvore*. 1993, **17**,
667 (3), 314-326.

668

669 FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A. et al. Influence of solvent on the antioxidant and
670 antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Revista*
671 *Industrial Crops and Products*. 2013, **42**, 126–132. [https://doi.org/10.1016](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021)
672 [/j.indcrop.2012.05.021](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021)

673

674 FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima
675 em contato com leite: fatres de virulência envolvidos. *Revista Acta Scientiae*
676 *Veterinariae*. 2005, **33**, (3), 291-296. ISSN: 1679-9216.

677

678 FREITAS, M. F.; CARRIJO, T. T. *Primulaceae. Lista de Espécies da Flora do*
679 *Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2014*. Disponível em:
680 <http://forariojaneiro.jbrj.gov.br>. Acesso em: 26 abr. 2021

681

682 FROZI, J. B.; ESPER, L. M. R.; FRANCO, R. M. Formação de Biofilmes Mono e
683 Multi-espécies de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Salmonella* spp.
684 Isoladas de Pescado Cru e Indústria de Pescado. *Revista Ciência Rural*. 2017,
685 **47**, (7). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170011>

686

687 FUMAGALI, E. et al. Production of plant secondary metabolites in plant cell and
688 tissue culture: the example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma* genera.
689 *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008, **18**, (4).
690 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400022>

691

692 GANDHI, A. D. et al. In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania*
693 *grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. *Revista Biochemistry and*
694 *Biophysics Reports*. 2017, **12**, 193-197.
695 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.004>

696

697 GITHIORI, J. B. et al. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine*
698 *africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite,
699 *Haemonchus contortus*, of sheep. *Revista Journal of Ethnopharmacology*. 2002,
700 **80**, (2), 187-191. [https://doi.org/10.1016 /s0378-8741\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00030-2)

701

702 GYAWALI, R., IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. *Revista*
703 *Journal Food Control*. 2014, **46**, 412–429.

704

705 JANUÁRIO, A. H. et al. Dammarane and cycloartane triterpenoids from 3
706 *Rapanea* species. *Revista Phytochemistry*. 1992, **31**, (4), 1251-1253.

707
708 JING, P. et al. Quantitative studies on structure- DPPH scavenging activity
709 relationships of food phenolic acids. *Revista Molecules*. 2012, **17**, (11), 12910-
710 12924. <https://doi.org/10.3390/molecules171112910>
711
712 LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de
713 folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Revista Ciência Rural*. 2005,
714 **35**, (2), 371-376. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000200019>
715
716 MATOS, F. J. ABREU. *À fitoquímica experimental*. 3^o ed. Fortaleza: UFC, 1997.
717
718 MIRANDA, A. F. M. et al. Fitotoxinas de *Tithonia diversifolia*. *Revista Journal of*
719 *Natural Products*. 2015, **78**, (5), 1083-1092.
720 <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00040>
721
722 MONTOVANI, P. A. B. et al. Atividade Antimicrobiana do extrato de Capororoca
723 (*Rapanea* sp.). *Revista Brasileira de Agroecologia*. 2009, **4**, 2, 3764-3767.
724
725 MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande
726 consumo no Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 2009, **19**, 315-320.
727 <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200023>.
728
729 NADER, T. T. et al. Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana*
730 em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. *Revista Pesquisa*
731 *Veterinária Brasileira*. 2018, **38**, (9), 1713-1719. [https://doi.org/10.1590/1678-](https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5034)
732 [5150-PVB-5034](https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5034)
733
734 NAPPO, M. E. et al. Dinâmica da estrutura fitossociológica da regeneração
735 natural em sub-bosque de *Mimosa scabrella* Bentham em área minerada em
736 Poços de Caldas, MG. *Revista Árvore*. 2004. **28**, (6), 811-829.
737 <http://doi.org/10.1590/S0100-67622004000600006>
738
739 NIRMALA, T. V. et al. Salmonellosis in Poultry: a case report.
740 *Revista International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.
741 2018, **7**, (2), 2347-2349. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.285>
742
743 NUÑO, G. et al. Effect of *Zuccagnia punctate* Cav. (Fabaceae) extract on pro-
744 inflammatory enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus*
745 *aureus*. Toxicity studies. *Revista Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018, **25**,
746 (8), 1713-1719. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.014>
747
748 OSPINA, L. F. et al. Inhibition of acute and chronic inflammatory responses by
749 hydroxybenzoquinonic derivative repanone. *Revista Planta Medica*. 2001, **67**, (9),
750 791-795. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18839>
751
752 OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. *Revista Microbiol Spectr*. 2018, **6**, (4).
753 <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>
754
755 PANDINI, J.A., PINTO, F.G.S., SCUR, M.C., ALVES, L.F.A. and MARTINS,
756 C.C., 2015. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil

757 and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plants*
758 *Research*, vol 9, no. 3, pp. 48-55. 10.5897/JMPR2014.5551.
759
760 PENTEADO, J. O. et al. Atividade antimicrobiana de extratos de *Ilex*
761 *paraguariensis*. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*. 2016, **6**.
762 <http://dx.doi.org/10.17058/reci.v1i1.8335>
763
764 PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. *Revista Sociedade Brasileira*
765 *de Controle de Contaminação*. 2009, **1**, (1), 36-38.
766
767 PUPO, M.T.; GALLO, M.C.B. Biologia química: uma estratégia para a pesquisa
768 em produtos naturais. *Revista Química Nova*. 2007, **30**, 1446-1455.
769 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000600014>
770
771 RICKETSON, J. M.; PIPOLY, J. J. Nomenclatural notes and synopsis of the
772 genus *Myrsine* (Myrsinaceae) in Mesoamerica. *Revista Sida, contribuições para*
773 *a Botânica*. 1997, **17**, (3), 579-589.
774
775 RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade
776 antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Revista*
777 *Comunicado Técnico on line Embrapa*. 2007, 1-4. ISSN 1679-6535.
778
779 RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in
780 virulence and possibilities for its control. *Revista Cold Spring Harbor*
781 *Perspectives in Medicine*. 2012, **2**, (11). [https://doi.org/](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427)
782 [10.1101/cshperspect.a012427](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427)
783
784 SAMY, R.P., GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as
785 antimicrobials for drug discovery. *Revista Evidence-Based Complementary*
786 *Alternative Medicine*. 2010, **7**, 283–294. [https://doi.org. 10.1093/ecam/nen036](https://doi.org/10.1093/ecam/nen036)
787
788 SANTOS, J. R. G.; TURNES, C. G. Probióticos em avicultura. *Revista Ciência*
789 *Rural*. 2005, **35**, (3), 741-747. [https://doi.org/10.1590/S0103-](https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300042)
790 [84782005000300042](https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300042)
791
792 SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2
793 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Revista Food Chemistry*. 2009, **112**, (3), 654-
794 658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
795
796 SILVA, B.G.B. Efeito de Extratos Metanólicos de *Calliandra dyasantha* Benth.
797 (Fabacea) sobre o biofilme de *Staphylococcus aureus*. Monografia apresentada
798 ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como
799 requisito final para a obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia. Pato de
800 Minas, MG, 2019.
801
802 SCUR, M. C. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella*
803 serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *Revista*
804 *Academic Journals*. 2014, **9**, 823-830. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8202>
805

806 SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIERA FILHO, S. A. Celastraceae Family: Source
807 of Pentacyclic Triterpenes with Potential Biological Activity. *Revista Virtual de*
808 *Química*. 2014, **6**, (5), 1205-1220. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140079>
809

810 SILVA, J. P. L. et al. A atividade antibacteriana da nisina, óleo de orégano
811 essencial, EDTA, e sua combinação contra *Salmonella* Enteritidis para aplicação
812 na maionese. *Revista Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência e*
813 *Tecnologia*. 2016, **16**, (1), 83-91. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00308>
814

815 STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of
816 testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm
817 production by staphylococci. *Revista Journal of Pathology, Microbiology and*
818 *Immunology*. 2007. **115**, 891-899. [https://doi.org/10.1111/j.1600-](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
819 [0463.2007.apm_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
820

821 TRENTIN, D. S. et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair
822 *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *Revista Plos one*.
823 2013, **8**, (6), e66257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066257>
824

825 VILELA, E. A. et al. Espécies de matas fluviais com potencial para estudos de
826 revegetação no alto rio Grande, sul de Minas, *Revista Árvore*. 1993. **17**, (2), 117-
827 128.
828

829 WEBER, L. D. et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant
830 activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb.
831 *Revista African Journal of Agricultural Research*. 2014, **9**, (9), 846-853.
832 <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8260>
833

834 XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes.
835 *Revista Boletim de Biotecnologia*. 2003, **76**, (1), 2-13.
836

837 ZHENG, Z.; STEWART, P. S. Penetration of Rifampin through *Staphylococcus*
838 *epidermidis* Biofilms. *Revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002, **46**,
839 (3), 900-903. [https://doi.org/10.1128 / AAC.46.3.900-903.2002](https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.900-903.2002)
840

841 ZHONG, X. N. et al. Three flavonoid glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*.
842 *Revista Phytochemistry*. 1997, **46**, (5), 943-946. [https://doi.org/10.1016/S0031-](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00366-X)
843 [9422\(97\)00366-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00366-X)
844

845 ZHONG, X. N. et al. Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*.
846 *Revista Phytochemistry*. 1999, **52**, 923-927. [https://doi.org/10.1016/S0031-](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00384-7)
847 [9422\(98\)00384-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00384-7)

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

| Metabólitos secundários | EM | EAE | EH | ED |
|-------------------------|----|-----|----|----|
| Saponinas | + | - | - | - |
| Esteroides livres | + | + | + | + |
| Triterpenoides | - | - | - | - |
| Alcaloides | + | + | + | + |
| Antocianinas | - | - | + | - |
| Antocianidinas | - | - | + | - |
| Flavonas | + | + | + | + |
| Flavanóis | + | + | + | + |
| Xantonas | + | + | + | + |
| Chalconas | - | - | - | - |
| Auronas | - | - | - | - |
| Flavanonóis | + | + | + | + |
| Taninos condensados | + | - | + | - |
| Cumarinas | - | - | - | - |

(+) presença; (-) ausência. EM: extrato metanólico; EAE: extrato acetato de etila; EH: extrato hexânico; ED: extrato diclorometano.

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos diferentes extratos das folhas de *M. umbellata* frente diferentes cepas patogênicas.

| Cepas | CIM/CBM (mg.mL ⁻¹) | | | |
|---|--------------------------------|-----------|-----------|---------|
| | EM | EAE | EH | ED |
| Gram-positivas | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 25/25 | 3,12/25 | 6,25/25 | 50/200 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) | 3,12/6,25 | 6,25/12,5 | 6,25/12,5 | 12,5/25 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433) | 6,25/12,5 | 50/200 | 50/200 | 50/200 |
| <i>Bacillus subtilis</i> (CCC B005) | 6,25/25 | 25/200 | 50/100 | 100/100 |
| Gram-negativas | | | | |
| <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 6,25/12,5 | 25/200 | 25/100 | 50/200 |
| <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 6,25/12,5 | 50/200 | 50/200 | 25/200 |
| <i>Salmonella enterica</i> Abaetetuba (ATCC 35640) | 12,5/25 | 25/100 | 25/100 | 50/200 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 3,12/12,5 | 25/50 | 50/100 | 25/100 |
| <i>Klebsiella</i> | 12,5/25 | 25/200 | 25/100 | 25/50 |

| | | | | |
|--------------------|-----------|----------|---------|---------|
| <i>pneumoniae</i> | | | | |
| (ATCC 13883) | | | | |
| <i>Proteus</i> | 3,12/12,5 | 50/200 | 100/200 | 50/100 |
| <i>mirabilis</i> | | | | |
| (ATCC 25933) | | | | |
| <i>Pseudomonas</i> | 3,12/12,5 | 12,5/200 | 50/200 | 6,25/25 |
| <i>aeruginosa</i> | | | | |
| (ATCC 27853) | | | | |
| Levedura | CIM/CFM | | | |
| <i>Candida</i> | 6,25/12,5 | 50/200 | 50/200 | 6,25/25 |
| <i>albicans</i> | | | | |
| (ATCC 10231) | | | | |

EM: extrato metanólico; EAE: extrato acetato de etila; EH: extrato hexânico; ED: extrato diclorometano.

Tabela 3- Porcentagem de sequestro de radicais DPPH e valor de IC50 pelo ensaio do DPPH dos extratos vegetais das folhas de *M. umbellata*.

| Concentração (mg.mL ⁻¹) | BHT | EM | EAE | EH | ED |
|--|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| 1,0 | 97,20±0,30 | 92,54±0,86 | 18,78±1,08* | 11,64±0,88* | 9,16±0,17* |
| IC ₅₀ | 0,46±0,00 | 0,50±0,00 | 5,76±0,05 | 10,88±0,04 | 11,65±0,08 |
| AAI | 2,11 | 1,85 | 0,13 | 0,05 | 0,05 |

Média da absorbância (%) ± desvio padrão. * Expressa diferença significativa entre os extratos quando comparados ao BHT (Teste de Tukey (p<0,05)). IC₅₀: Concentração inibindo 50% do DPPH; IAA: Índice de Atividade Antioxidante. EM: extrato metanólico; EAE: extrato acetato de etila; EH: extrato hexânico; ED: extrato diclorometano.

Tabela 4- Atividade antibiofilme do extrato metanólico de *M. umbellata* sobre biomassa dos biofilmes de bactérias padrões pela técnica do cristal violeta.

| EM | | | |
|---|-----------|------------|-----------|
| CV | | | |
| Microorganismos | CONTROLE | CIM | %INIBIÇÃO |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 3,88±0,08 | 0,29±0,12* | 92,53 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 3,49±0,17 | 1,93±0,09* | 44,70 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 1,74±0,11 | 1,88±0,02* | -8,05 |

Média da Densidade óptica ± desvio padrão. CV= Cristal Violeta. EM= extrato metanólico. * Valores diferem entre si pelo Teste t ($p>0.05$). % inibição = os dados estão expressos como porcentagem de inibição da biomassa dos biofilmes na concentração de CIM (%).

Tabela 5- Atividade antibiofilme do extrato metanólico de *M. umbellata* sobre a biomassa dos biofilmes de bactérias padrões pelo ensaio de redução do sal tetrazólio (MTT).

| EM | | | |
|---|-----------|------------|--------------|
| MTT | | | |
| Microorganismos | CONTROLE | CIM | %VIABILIDADE |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 0,32±0,06 | 1,79±0,01* | 17,88 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 0,28±0,04 | 0,50±0,04 | 56,00 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 0,20±0,06 | 0,31±0,01* | 64,52 |

Média da Densidade óptica ± desvio padrão. MTT= 3-(4,5-dimetiltiazol-2-Il)- 2,5-difeniltetrazólio. EM= extrato metanólico. * Valores diferem entre si pelo Teste t ($p>0.05$). % inibição= os dados estão expressos como porcentagem de viabilidade celular dos biofilmes na concentração de CIM (%).

1 **CAPÍTULO 2: Brazilian Journal of Biology**

2
3 **PHYTOCHEMICAL PROSPECTION AND EVALUATION OF**
4 **ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF**
5 **EXTRACTS AND ESSENTIAL OIL FROM LEAVES OF *Myrsine umbellata***
6 **Mart. (PRIMULACEAE)**

7
8 Larissa Valéria Laskoski¹, Fabiana Gisele da Silva Pinto^{1*}

9
10 ¹Laboratory of Microbiology and Biotechnology, Program in Conservation and
11 Management of Natural Resources, Center for Biological and Health Sciences,
12 State University of Western Paraná, Rua Universitária, 1619, Universitário, 85819-
13 110, Cascavel, Paraná, Brasil.

14
15 * Corresponding author: fabiana.pinto@unioeste.br

16
17 **Resumo:**

18
19 A espécie *Myrsine umbellata* é uma planta nativa do Brasil, tradicionalmente
20 suas cascas são empregadas em fitoterapia no tratamento de afecções do
21 fígado e combate a hanseníase. Portanto, o objetivo do estudo foi realizar a
22 prospecção fitoquímica dos extratos etanólico (EE) e acetônico (EA) por meio
23 de testes colorimétricos e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria
24 de massas (CG-EM) do óleo essencial (OE) das folhas de *M. umbellata*; avaliar
25 a atividade antimicrobiana frente a dozes cepas padrões ATCCs pela técnica
26 de microdiluição em caldo; o potencial antioxidante pelo método de redução de
27 DPPH e ação antibiofilme pela técnica do cristal violeta e a viabilidade celular
28 foi determinada usando 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) com
29 base na densidade óptica. A prospecção fitoquímica dos EE e EA detectou a
30 presença de esteroides livres, alcaloides, flavonoides (flavonas, flavononóis,
31 flavonóis e xantonas) e taninos em ambos os extratos (EE e EA) e de
32 saponinas somente no EE. No OE os compostos majoritários identificados

33 foram elixeno, cariofileno (E), espatulenol, d-Cadineno e aromadendreno. O EA
34 apresentou atividade antimicrobiana com valores de CIM e CBM/CFM que
35 variaram de 3,12 a 100 mg.mL⁻¹, destacando sua eficiência sobre a cepa
36 Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*. Já EE apresentou potencial
37 antimicrobiano na faixa que variou de 3,12 a 200 mg.mL⁻¹, e a cepa Gram-
38 negativa *Escherichia coli* foi a mais suscetível. Entretanto, OE apresentou
39 potencial bacteriostático frente às cepas *Salmonella enterica* Typhimurium,
40 *Salmonella enterica* Abaetetuba, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus*
41 *epidermidis*. A capacidade de sequestrar radicais livres foi evidenciada no
42 extrato EA com atividade antioxidante de 89,55% e no EE com 63,05%. O
43 potencial antibiofilme foi observado no extrato EE que reduziu a biomassa do
44 biofilme maduro de todas as bactérias testadas com elevada atividade (63,41%
45 a 83,65%) e OE também apresentou efeito antibiofilme sobre o biofilme maduro
46 das cepas *Escherichia coli* enteroagreativa T3, *Staphylococcus aureus* e
47 *Salmonella* Enteritidis com percentual de redução de biomassa de 63,39%,
48 66,21% e 84,96%, respectivamente. Esses resultados indicam o potencial dos
49 extratos e do OE de *M. umbellata* como fonte de bioativos vegetais para o
50 desenvolvimento de novas estratégias alternativas para o controle de
51 microrganismos resistentes de forma planctônica ou de biofilmes.

52 **Palavras-chaves:** Atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, biofilme,
53 DPPH, *Myrsine umbellata*

54
55 **Abstract:**

56
57 The species *Myrsine umbellata* is a plant native to Brazil, traditionally its barks
58 are used in herbal medicine to treat liver disorders and combat leprosy.
59 Therefore, the objective of the study was to identify the phytochemical
60 prospection of ethanolic (EE) and acetonic (EA) extracts by means of
61 colorimetric tests and by gas chromatography coupled to mass spectrometry
62 (GC-MS) of the essential oil (OE) of *M. umbellata* leaves; evaluate the
63 antimicrobial activity in front of the standard strains ATCCs by the broth
64 microdilution technique; the antioxidant potential by the DPPH reduction method
65 and antibiofilm action by the violet crystal technique and the cell viability was
66 determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole (MTT) based

67 on optical density. Phytochemical prospecting of EE and EA detected the
68 presence of free steroids, alkaloids, flavonoids (flavones, flavononoids,
69 flavonols and xanthons) and tannins in both extracts (EE and EA) and saponins
70 only in EE. In OE, the identified majority compounds were elixene,
71 caryophyllene (E), espatulenol, d-Cadineno and aromadendrene. The EA
72 showed antimicrobial activity with values of MIC and MBC/MFC ranging from
73 3.12 to 100 mg.mL⁻¹, highlighting its efficiency over the Gram-positive strain
74 *Staphylococcus epidermidis*. EE presented antimicrobial potential in the range
75 ranging from 3.12 to 200 mg.mL⁻¹, and the Gram-negative *Escherichia coli*
76 strain was the most susceptible. However, OE presented bacteriostatic potential
77 against the strains *Salmonella enterica* Typhimurium, *Salmonella enterica*
78 *Abaetetuba*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. The
79 ability to sequester free radicals was evidenced in EA extract with antioxidant
80 activity of 89.55% and in EE with 63.05%. The antibiofilm potential was
81 observed in the extract EE that reduced the biofilm biomass of all bacteria
82 tested with high activity (63.41% to 83.65%) and OE also presented antibiofilm
83 effect on the biofilm of the enteroagregativa T3 *Escherichia coli* strains,
84 *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis with percentage of biomass
85 reduction of 63.39%, 66.21% and 84.96%, respectively. These results indicate
86 the potential of *M. umbellata* extracts and OE as a source of plant bioactive for
87 the development of new alternative strategies for the control of planktonic or
88 biofilm resistant microorganisms.

89

90 **Keywords:** Antimicrobial activity, antioxidant activity, biofilm, DPPH, *Myrsine*
91 *umbellata*

92

93 **1. Introduction**

94

95 In recent years there was a significant increase in infections from
96 bacteria and fungi in both humans and animals, due to the selection of
97 microorganisms with high resistance to antimicrobials already commercialized,
98 such as antibiotics and antifungals. In addition to antimicrobial resistance, some
99 bacterial cells are also able to produce extracellular polymer matrices called
100 biofilms, which provide protection against the external environment and enable

101 better adhesion to surfaces. Therefore, reducing susceptibility to synthetic
102 antimicrobials, making them more resistant in environments of extreme
103 conditions. In industries, when biofilms are present on equipment, they cause
104 surface deterioration and/or proliferation of pathogenic microorganisms,
105 generating losses. In the hospital environment, biofilms increase the mortality
106 rate due to diseases caused by the resistance of bacteria to antimicrobials and
107 disinfectants (Bezerra et al., 2017; Frozi, Esper, Franco, 2017).

108 Therefore, the biological potential of plants is increasingly being studied,
109 through the use of plant extracts and essential oils, which have already shown
110 valuable results, due to the presence of secondary metabolites that are
111 substances with numerous therapeutic properties. In this context, products of
112 vegetable origin can be a possible solution to the current problem related to
113 synthetic compounds and pathogen resistance. Furthermore, these natural
114 products can also be an alternative to replace, or reduce the amount of
115 synthetic preservatives used in the food and cosmetic industries. Thus, the
116 active plant principles are being widely studied and patented regarding their
117 antimicrobial, antioxidant and antibiofilm properties (Gyawali and Ibrahim,
118 2014; Gonçalves et al., 2015).

119 Among the native Brazilian plants, the family Primulaceae, has as its
120 largest representative the genus *Myrsine* L. (synonym *Rapanea* Aubl.), which
121 comprises about 300 species with pantropical distribution, being in Brazil
122 registered 25 species, distribution between the all regions of Brazil (Ricketson
123 and Pipoly, 1997; Freitas, 2020), the species of this genus present antibacterial
124 properties: *R. parviflora* (A.Dc.) Mez (Suffredini et al., 2007) and *Rapanea* sp.
125 (Montovani et al., 2009), antifungals: *R. melanophloeos* (L.) Mez (Ohtani and
126 Hostettmann, 1992), *M. umbellata* Mart. and *M. coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem.
127 & Schult. (Miranda et al., 2015), anti-inflammatory: *M. guianensis* (Aubl.) Kuntze
128 (Ospina et al., 2001), antioxidants: *M. guianensis* (Ospina et al., 2001) and *M.*
129 *coriacea* (Miranda et al., 2015), insecticide: *M. umbellata* and *M. coriacea*
130 (Miranda et al., 2015) and anti-helmitic *M. africana* L. and *R. melanophloeos* (L.)
131 (Githiori et al., 2002).

132 The species *Myrsine umbellata* Mart. is a native Brazilian arboreal plant,
133 popularly known as capororoca, its distribution is wide with occurrence form has
134 wide distribution in all regions of Brazil, its barks have medicinal applications in

135 diuretic treatment, urinary tract infections, problems in the liver and also as a
136 remedy for the treatment of leprosy (Farias et al., 1993; Lorenzi, 2009; Freitas,
137 2020). The biological activities of the leaves of this species are still scarce, so
138 far there are only reports of its antifungal and insecticidal potential (Miranda et
139 al., 2015).

140 Considering the above, it is of great value studies with plant bioactives as
141 an alternative to the use of synthetic products in pharmaceutical and food
142 industries and also to the problems faced with biofilm-forming and antimicrobial-
143 resistant pathogens. Therefore, research with plant extracts and essential oil
144 from native Brazilian plant species is relevant for the scientific validation and
145 enhancement of regional flora.

146 This study aims to determine the chemical composition, evaluate the
147 antimicrobial, antioxidant and antibiofilm potential of plant extracts and essential
148 oil from *Myrsine umbellata* leaves against standard strains of clinical
149 importance.

150

151 **2. Materials and Methods**

152 *2.1. Collection and identification of the leaves of Myrsine umbellata*

153 The collection of leaves of *Myrsine umbellata* was carried out in the
154 Paulo Gorski Ecological Park, located in Cascavel, Paraná, Brazil
155 (24°57'51.61"S and 53°26'14.80"W) between the months of August 2019 to
156 March 2020, in the morning, in the early hours of the sunny day and with
157 temperature around 20°C, humid subtropical climate, between the late winter
158 and early autumn seasons, phenological state of the vegetative plant and time
159 of collection around one hour. An exsiccate of the plant was deposited in the
160 UNOP Herbarium (Thiers, 2021) under voucher number UNOP 10731.

161

162 *2.2. Obtaining of plant extracts*

163 The leaves of *M. umbellata* were dried in an air oven at 40°C for 72
164 hours, and subsequently ground in a Willey-type knife mill to a particle size of
165 0.42 mm. Plant extracts were prepared according to the methodology proposed
166 by Pandini et al. (2015), with modifications. Dried plant material (10 g) was
167 extracted with different solvents (100 mL): ethanol P. A. (EE) and acetone P. A.
168 (EA). These liquid preparations were kept in a rotary shaker at 220 rpm for 24

169 hours. After this period, the solutions were filtered using Whatman n^o1 filter
170 paper and then centrifuged at 5000 rpm for 15 minutes. Then, the supernatant
171 was collected and submitted to rotoevaporation in a rotary evaporator, for total
172 elimination of solvents, obtaining the organic raw extracts at the end of the
173 process. The acetonic (EA) and ethanolic (EE) extracts were stored away from
174 the light in a freezer at 4°C. The yield of the plant extracts was calculated by the
175 expression: Percentage (%) = (extract mass (g) / dried and ground vegetable
176 mass (g)) x 100.

177

178 2.3. *Extraction of essential oil*

179 The essential oil of *M. umbellata* (OE) was obtained by the
180 hydrodistillation method using the Clevenger type equipment, according to the
181 methodology proposed by Weber et al. (2014), with modifications. Distilled
182 water 1:10 (w/v) was added from the dried and ground sample and the solution
183 was hydrodistilled for 5 hours. After extraction, the essential oil was stored in
184 conical bottom tubes surrounded by aluminum foil, shielded from light and at an
185 average temperature of 4°C until the experiment was carried out. The
186 percentage yield of the essential oil (%) was calculated by the equation: %=
187 (Total extracted essential oil (grams) / dried and ground vegetable mass
188 (grams)) x 100.

189

190 2.4. *Chemical Analysis of Essential Oil- Gas Chromatography coupled to Mass* 191 *Spectrometry (GC-MS)*

192 The analysis of Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
193 (GC-MS) was performed by the Laboratory of Gas Chromatography coupled to
194 Mass Spectrometry - COMCAP, of the Universidade Estadual de Maringá
195 (UEM), Paraná, Brazil. For the analysis of the OE constituents of *M. umbellata*
196 was performed from the CG-EM Thermo-Finnigan system, composed of a gas
197 chromatograph GC FOCUS (Thermo Electron), coupled to a mass spectrometer
198 DSQ II (Thermo Electron) and an automatic injector Triplus AS (Thermo
199 Electron). Chromatographic separation was performed with an HP-5ms fused
200 silica capillary column (30 m long, 0.25 and 0.25 a film ID; 5% phenyl-95%
201 dimethyl polysiloxane composition). The temperature of the injector was
202 degrees 250°C. Samples and alkali patterns were injected with a split rate of

203 1:25. The temperature programming used was 50°C maintained for 2 minutes,
204 increasing the temperature to 180°C at a ratio of 2°C.min⁻¹ and followed by an
205 increase to 290°C at a ratio of 5°C. min⁻¹. The interface between GC and MS
206 was maintained at 270°C and the ionization source temperature of the mass
207 spectrometer was 250°C. The identification of the components was made by
208 comparing the retention times with those obtained in the literature for the same
209 compounds analyzed using the retention index (RI) (Adams, 2007; Babushok et
210 al., 2011; Yu et al., 2007).

211

212 2.5. *Phytochemical prospecting of extracts*

213 The phytochemical tests of the EA and EE plant extracts of *M. umbellata*
214 were performed according to the methodology described by Matos
215 (1997). These tests were based on colorimetric visualization and/or precipitate
216 formation after the addition of specific reagents.

217

218 2.6. *Microorganisms used*

219 The experimental trials with EA, EE and OE were conducted at the
220 Laboratory of Microbiology and Biotechnology (LAMIBI) of the State University
221 of Western Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, BR. Different strains from the
222 American *Type Culture Collection* (ATCC) collection and the Cefar Diagnostic
223 Culture (CCCD) collection were used for the assay, with seven Gram-negative
224 strains: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* enteritidis (ATCC
225 13076), *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028), *Salmonella enterica*
226 Abaetetuba (ATCC 35640), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus*
227 *mirabilis* (ATCC 25933) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); four gram-
228 positive: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC
229 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) and *Bacillus subtilis* (CCD-
230 04); a yeast *Candida albicans* (ATCC 10231) (Scur et al., 2014).

231 For the assays, the microorganisms were recovered in *Brain Heart*
232 *Infusion* (BHI) enrichment broth and incubated for 24 hours at 36± 1°C. After
233 this period, the strains were repainted in plates containing Muller Hinton Agar
234 medium (MH), incubated at 36 1° C for 24 hours. Soon after this period, the
235 inoculums were made and standardized in saline solution (0.85%) resulting in

236 the final concentration of 1×10^5 CFU/mL⁻¹ for bacteria and 1×10^6 CFU/mL⁻¹ for
237 yeast *C. albicans*.

238

239 2.7. Testing of antimicrobial activity

240 2.7.1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

241 The trials were performed according to the microdilution in broth
242 methodology described by Weber et al. (2014) and CLSI (2015), with
243 modifications. The EA, EE and OE of *M. umbellata* were solubilized in methanol
244 P. A.. In microdilution plates of 96 wells were distributed in the first column 300
245 μ l of the vegetable extract solution or essential oil, and from the second column
246 150 μ l of the MH broth per well, then were performed the serial dilutions
247 obtaining concentrations ranging from 200 to 0.09 mg.mL⁻¹ for plant extracts
248 and from 7000 to 1.7 μ g/mL for essential oil. At the end, 10 μ l of inoculum was
249 added to each well and the plates were incubated at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ within 18-24
250 hours. For the positive control was used commercial antibiotic Gentamicin and
251 commercial antifungal Nystatin in the same concentrations of the tests. As a
252 negative control, inoculum was added in MH broth, without the presence of EA
253 and EE and LE to verify the viability of the microorganism tested. The sterility
254 control of extracts and essential oil solubilized in methanol P.A. was also
255 performed, which consisted of the extract solution or oil diluted in methanol and
256 MH broth without the presence of inoculum. Finally, the diluent was controlled
257 with methanol and MH broth and inoculum to verify if there was interference of
258 the diluent in the test. 20 μ l triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 0.5% was
259 used as a colorimetric indicator of microbial metabolism. Three triplicate MIC
260 experiments were performed, and it was possible to determine the lowest
261 concentration of EA, EE and OE capable of inhibiting microbial growth.

262

263 2.7.2. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal 264 Concentration (MFC)

265 For the trial the methodology of Weber et al. (2014) was performed, with
266 modifications. Before the addition of the TTC to 0.5% to determine the MIC, an
267 aliquot of 2 μ l was removed from each well of the microdilution plate and sown
268 on the surface of the MH agar. The plates were incubated at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ within 18-
269 24 hours. The trial was performed in triplicate, and to determine the MBC/MFC

270 it was observed if there was microbial growth in MH agar, allowing to verify the
271 lower concentration of plant extracts and essential oil capable of causing the
272 death of the bacterium/fungus tested.

273

274 *2.8. Antioxidant activity*

275 The antioxidant activity of EA, EE and OE were performed according to
276 the method of reduction of the free radical 2,2-diphenyl-1-picril-hydrazine
277 (DPPH), proposed by Rufino et al. (2007) and Pandini et al. (2015). Initially, a
278 calibration curve (0 to 60 μM DPPH) was performed to obtain the concentration
279 of DPPH in the medium after the reaction with plant extracts and essential oil.
280 Then, the plant extracts and the essential oil were solubilized in methanol P. A.,
281 obtaining concentrations ranging from 0.1 to 15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. An aliquot of 0.1 mL of
282 these plant extracts and essential oil was added to 3.9 mL of methanol solution
283 of DPPH (60 μM) and homogenized in tube stirrer. Methanol P. A. added to
284 DPPH was used as a negative control, and the synthetic antioxidant BHT (butyl-
285 hydroxy-toluene) (0.10 to 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was used as a positive control. The tests
286 were measured in a spectrophotometer at 515 nm at 1 minute reading intervals
287 until absorbance stabilization. All concentrations were defined from the pre-
288 test. As white, methanol was used for the calibration of the spectrophotometer.
289 The percentage of free radical sequestration (AA%) was expressed by the
290 equation: $\text{AA}\% = ((A_0 - A_1) / A_1) \times 100$, where A_0 is the absence of negative
291 control and A_1 is the absorbance of the sample. For the calculation of IC₅₀
292 (amount of antioxidant substance needed to reduce the initial DPPH
293 concentration by 50%), the concentrations of the treatments were used to
294 obtain the straight line equation with R² greater than 0.80, and thus found the
295 IC₅₀ value, from a linear regression. The tests were performed in triplicate and
296 expressed with mean standard deviation. The IC₅₀ results were analyzed using
297 ANOVA with Tukey test ($p < 0.05$) using the SISVAR 2011 statistical program.
298 Then, the extracts were related to the antioxidant activity index (AAI) calculated
299 by the equation $\text{AAI} = \text{AA}\% / \text{IC}_{50}$, and classified according to the AAI into weak
300 (AAI < 0.5), moderate (AAI between 0.5 and 1.0), strong (AAI between 1.0 and
301 2.0) and very strong (AAI > 2.0) according to the methodology proposed in
302 Scherer and Godoy (2009).

303

304

305 2.9. Antibiofilm activity

306 2.9.1. Microorganisms

307 Different strains from the *American Type Culture Collection* (ATCC)
308 collection were used for the assay: *Escherichia coli* (ATCC 25922),
309 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC
310 27853), *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028) and *Salmonella*
311 *enterica* Enteritidis (ATCC 13076). Positive control was used BHI supplemented
312 with glucose 1% and inoculum of the tested strains; and as interference control
313 of color of EA, EE, OE and BHI in the different concentrations of these diluted in
314 dimethyl sulfoxide (DMSO) and BHI. And the control of the diluent DMSO to
315 verify if there was interference of the same in the test.

316

317 2.9.2. Bacterial biofilm activity test

318 The test was performed on 96-well microplates (flat bottom) with
319 polystyrene surface. Initially, 180 μl of BHI medium supplemented with 1%
320 glucose and 20 μl of bacterial inoculum were distributed for biofilm formation
321 (0.5×10^6 CFU/mL in BHI solution supplemented with 1% glucose) in each well
322 of the plates and these were incubated for 24 hours at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ to allow cell
323 fixation and biofilm formation. After the incubation period, the culture medium
324 was removed and the wells washed once with buffered phosphate saline
325 solution (PBS 1X), and then added 150 μl of a new BHI medium containing EA,
326 EE (200 to 1.56 mg/mL^{-1}) and OE (7000 to 54.68 mg/mL^{-1}). The material was
327 incubated again at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours (Stepanović et al., 2007) with
328 modifications.

329

330 2.9.3. Quantification of biofilm biomass by violet crystal

331 After incubation, the medium was gently aspirated, and the wells were
332 washed three times with PBS 1X. Then, the wells received 150 μl of methanol
333 P.A. for 20 minutes to fix the sample, after the methanol was removed 150 μl of
334 2% violet crystal was added for 15 minutes. Then the wells were washed in 1X
335 PBS until the total dye output. After drying, 150 μl of 95% ethanol was added
336 and left in contact for 30 minutes, then the contents of the wells were
337 transferred to a new plate and the optical density reading (OD) was performed

338 at 570 nm using Biotek microplate reader, Epoch model. The data were
339 calculated in general mean optical density (OD) of biofilm biomass quantified by
340 staining using violet crystal. The percentage of inhibition of biofilm was
341 determined by the equation: Percentage of inhibition (%): ((DO positive control -
342 DO experimental) / DO positive control) x 100 in the Microsoft Excel 2010
343 program (Christensen et al., 1985). The values of inhibition percentages were
344 classified as follows: (< 50%) indicate low antibiofilm activity and (> 50%)
345 indicate high antibiofilm activity (Sandasi, Leonard and Viljoen, 2018).

346

347 2.9.4. Biofilm cell viability test

348 The cell viability of mature biofilms was evaluated by reducing the 3-(4,5-
349 dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltrichiole (MTT). After the methanol was
350 removed, a 180 µl aliquot of BHI and 20 µl of MTT were added to each well,
351 and the plates were incubated in the dark at 37°C for 2 hours. After, the medium
352 was removed and added 150 µl of DMSO for 15 minutes. The supernatants
353 were then transferred to a new plate and the optical density was measured at
354 570 nm in Epoch-type Biotek microplate reader. The cell viability data of mature
355 biofilms were expressed in general mean optical density (OD) and the
356 percentage of cell viability (CV%) was determined by the equation: (DO positive
357 control/ DO experimental) x 100 (Jia et al., 2011; Kuzma et al. 2007). The
358 values of the percentage of cell viability were classified as: (< 50%) indicate low
359 cellular activity and (> 50%) indicate high cellular activity (Sandasi, Leonard and
360 Viljoen, 2018).

361 The activity of the extracts and the oil on the biofilm was measured by
362 the reduction (%) of the absorbance value when compared with the positive
363 control, since the sample tested is a biofilm producer. As a criterion to express
364 the results of the antibiofilm potential of EA, EE and OE of *M. umbellata*, both
365 the biofilm biomass test by testing the violet crystal and the cell viability by the
366 MTT test were determined from the MIC concentrations, 2X MIC and 4X MIC of
367 each tested bacterial strain.

368

369 3. Results and Discussion

370

371 3.1. Yield, chemical composition of essential oil and phytochemical prospecting
372 of plant extracts

373 On the basis of obtaining plant extracts from *M. umbellata* leaves with
374 different solvents, the following yields were obtained: EE (13.26%) EA
375 (8.39%). From the extraction of the OE from the leaves of *M. umbellata* a total
376 yield of 18.5% was observed. The yield of different plant extracts can be
377 influenced by various factors such as temperature, extraction time, solid-solvent
378 ratio and the most importantly the choice of the solvent extractant, which due to
379 its chemical characteristics, such as different solubility and polarity, influence
380 their yield (Fernández-Agulló et al., 2013).

381 Phytochemical prospection of *M. umbellata* plants extracts revealed the
382 presence of compounds belonging to the classes of free steroids, alkaloids,
383 flavonoids (flavones, flavanols, xanthons and flavanonols) and tannins in both
384 extracts (EE, EA) and saponins only in EE (Table 1).

385 Table 1

386 Although there are no reports in the literature regarding the
387 phytochemical prospecting of plant extracts from the leaves of *M. umbellata*,
388 several secondary metabolites of different species of the genus *Myrsine* were
389 already identified and isolated, such as flavonoids (*M. seguinii* H. Lév.; *M.*
390 *coriacea*) (Zhong et al., 1997; Alves et al., 2012), terpenes (*R. lancifolia* (Mart.)
391 Mez; *R. guianensis* Aubl.) (Januário et al., 1992), saponins (*R. melanophloeos*)
392 (Othani and Hostettmann, 1992), tannins (*M. coriacea*) (Alves et al., 2012) and
393 triterpenoides (*M. africana* L.; *R. melanophloeos* L.) (Manguero et al.,
394 1997; Othani and Hostettmann, 1992).

395 In the literature it was reported the study of phytochemical prospection of
396 organic extracts of *Myrsine coriacea* leaves being identified the classes of
397 compounds such as: flavones, flavonols, xanthons, tannins, saponins and
398 phenolic compounds (Alves et al., 2012), confirming the results obtained in our
399 study, since these classes of compounds were also identified in the extracts of
400 *M. umbellata*.

401 It is worth emphasizing that there may be differences between the
402 compounds found between species of the same family, genus and even
403 species, depending on the location of the plant and regional environmental
404 factors such as seasonality, temperature, climatic factors, pH, soil, water

405 availability, collection time, extraction method, solvent choice and its polarity
406 characteristics, among others, which are fundamental in the extraction of
407 bioactive compounds with biological potential (Fernández- Agulló et al. 2013).

408 The chemical composition of the essential oil of *M. umbellata*, together
409 with its retention indices is expressed as shown in Table 2. Thirty six
410 compounds, corresponding to 93.05% of the essential oil, were identified by
411 GC-EM. The analysis of the chemical components of the essential oil of *M.*
412 *umbellata*, demonstrated the presence of the compounds: elixen (15.62%),
413 caryophyllene (E) (8.91%), espatulenol (6.95%), d-Cadineno (6.30%) and
414 aromadendrene (5.12%), all of these sesquiterpenes, were more abundant in
415 the sample (as shown in Table 2).

416 Table 2

417 In the family Primulaceae, the species of the genus *Myrsine*, present as
418 predominant the compounds of the sesquiterpenes group, and in a lesser
419 quantity, the monoterpenes are observed (Sardans et al., 2010; Luna et al.,
420 2014). Sesquiterpenes were identified as major compounds in foliar essential oil
421 and fruits of *M. coriacea*, *M. venosa* A.DC., *M. lessertiana* A.DC. and *M.*
422 *sandwicensis* A.DC. (Luna et al., 2014; Sardans et al., 2010). Corrêa (2017)
423 found eighteen substances in the essential oil of *M. parvifolia* A.DC. leaves,
424 considering as majorities: caryophyllene oxide (14.4%), β -caryophyllene
425 (12.6%), γ -muuroleno (7.9%).

426 The phytochemical profile of essential oils may differ between species of
427 the same genus in quantity, number of compounds and molecular configuration
428 according to the variation of climatic factors, geographical location, soil
429 composition, plant organ, age and stage of the vegetative cycle, genetic
430 diversity, seasonality, circadian rhythm, water availability, nutrients, protection
431 against pathogens, among others (Gobbo-Neto and Lopes, 2007).

432

433 3.2. Antimicrobial activity

434 Regarding antimicrobial activity, in the microdilution broth assay, the EA,
435 EE and OE of *M. umbellata* leaves were tested for their ability to inhibit growth
436 (Minimum Inhibitory Concentration- MIC) or cause death (Minimum Bactericide
437 Concentration- MBC/ Minimum Fungicide Concentration- MFC) of
438 microorganisms (as shown in Table 3). The MIC and MBC/MFC of the plant

439 extracts were classified according to Araújo (2010) and Pandini et al. (2015),
440 with the activity classified as: high ($<12.5 \text{ mg.mL}^{-1}$), moderate (12.5 to 25
441 mg.mL^{-1}), low (50 to 100 mg.mL^{-1}) and very low ($>100 \text{ mg.mL}^{-1}$). On the other
442 hand, the essential oil followed the classification proposed by Sartoratto et al.
443 (2004) and was considered as high ($<100 \text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$), moderate (100 to 500
444 $\mu\text{g/mL}^{-1}$), low (500 to 1000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) and very low ($>1000 \text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$). It was
445 observed that the antimicrobial activity varied according to the type of
446 extraction, solvents used and microorganisms tested.

447 Table 3

448 Both plant extracts of *M. umbellata* presented antimicrobial potential
449 when tested against the twelve pathogenic pattern strains (ATCCs). On the
450 other hand, the OE presented only bacteriostatic potential against the strains
451 *Salmonella enterica* Typhimurium, *Salmonella enterica* Abaetetuba,
452 *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*, and did not present
453 antimicrobial activity against the other strains tested (as shown in Table 3).

454 Regarding the antimicrobial activity of the plant extracts of *M. umbellata*
455 leaves against standard strains ATCCs, it was observed that EA presented
456 the best antimicrobial activity when compared to EE and OE, with MIC and
457 MBC/MFC values that varied from 3.12 to 100 mg.mL^{-1} , classified as high to
458 moderate and moderate to low, respectively, highlighting their efficiency over the
459 Gram-positive strain *Staphylococcus epidermidis* with MIC of 3.12 mg.mL^{-1} and
460 MBC of 25 mg.mL^{-1} . Following this, EE presented the second best antimicrobial
461 activity being classified with high and moderate MIC, and moderate, low and very
462 low MBC. This extract was efficient for the Gram-negative strain *Escherichia coli*
463 (MIC of 3.12 mg.mL^{-1} and MBC of 12.5 mg.mL^{-1}). The antimicrobial potential of
464 EA and EE extracts against standard ATCCs strains may be related to their
465 phytochemical profile, mainly by the presence of flavonoid, alkaloid, tannin and
466 saponin classes. The steroids present in both extracts tested are terpene
467 compounds, and although the mechanism of action is not completely elucidated,
468 it is believed that they break the cell membrane of microorganisms by interaction
469 with lipophilic compounds (Silva et al., 2014).

470 Meanwhile, the flavonoids (flavones, flavonols, xanthenes and flavonols)
471 found in EE and EA, are hydroxylated phenolic substances, their mode of
472 antimicrobial action happens by the formation of complexes with extracellular and

473 soluble proteins, that when they bind to the bacterial wall they cause irreversible
474 damage to the cells. In addition, they can cause perforation and reduction of
475 plasma membrane fluidity, and finally, inhibiting nucleic acid synthesis and/or
476 inhibiting energy metabolism (Cushnie and Lamb, 2011).

477 The alkaloids identified in EE and EA are nitrogenous substances that
478 inhibit the action of Gram-negative bacteria causing cell lysis and
479 morphological changes in microorganisms (Fumagali et al., 2008). The tannins
480 also identified in all extracts tested, are water-soluble phenolic compounds and
481 polar solvents, which when they precipitate proteins have antifungal and
482 antimicrobial effects, its mode of action may be related to its ability to inhibit
483 microbial adhesins and bacterial enzymes. They can also act on the cell
484 membranes of microorganisms, hindering the entry of ions essential for microbial
485 metabolism (Loguercio et al., 2005).

486 As for the saponins present only in the extract EE, the amphiphilic
487 behavior and the ability to form complexes with steroids, proteins and
488 phospholipids of membranes, enables its antimicrobial actions, and can change
489 the cell membranes permeability of bacteria, even leading to their destruction
490 (Gyawali and Ibrahim, 2014).

491 Finally, no data regarding the antimicrobial potential of EE, EA and OE of
492 *M. umbellata* against standard ATCCs strains was verified in the literature,
493 making this the first report. Montavani et al. (2009) demonstrated the
494 antimicrobial activity of plant extracts of *Myrsine* species with the ability to inhibit
495 bacterial growth of *Staphylococcus aureus*, which reinforces the results found in
496 the present study.

497 The antioxidant capacity of EE, EA and OE of *M. umbellata* was
498 determined by the DPPH-free radical sequestration assay. The commercial
499 antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a positive control.
500 Concentrations ranging from 0.1 to 15 mg.mL⁻¹ and for extracts and OE and BHT
501 control ranging from 0.1 to 1.0 mg.mL⁻¹ were tested. The results expressed refer
502 to the concentration of 1.0 mg.mL⁻¹, which presented the most expressive results
503 (as shown in Table 4).

504 Table 4

505 The EA at the concentration of 1.0 mg.mL⁻¹ presented the highest
506 percentage of DPPH radical sequestration when compared to the others, with an

507 antioxidant percentage of 89.55% and IC50 value of 0.47 mg.mL⁻¹. Followed by
508 EE with 63.05% antioxidant percentage, with IC50 value of 0.59 mg.mL⁻¹. While,
509 OE presented the lowest percentage of radical sequestration with an antioxidant
510 percentage of 10.46% and IC50 value of 0.03 mg.mL⁻¹. These data demonstrate
511 the need for a higher concentration of essential oil to sequester the same amount
512 of DPPH radicals when compared to BHT and other extracts.

513 According to the classification proposed by Scherer and Godoy, (2009)
514 plant extracts of *M. umbellata* showed a strong antioxidant activity index (AAI) for
515 EA (AAI 1.90), moderate for EE (AAI 0.59) and weak for *M. umbellata* OE (AAI
516 0.03). The literature reports the antioxidant activity of *M. coriacea* extracts with
517 high antioxidant activity, which corroborates the results found in this study
518 (Miranda et al., 2015).

519 Studies with the antioxidant potential of plant extracts and essential oil of
520 *M. umbellata* were not reported in the literature, this being the first report. The
521 excellent antioxidant activity of these extracts can be explained by the presence
522 of phenolic compounds, mainly flavonoids, which are great antioxidants and have
523 an ideal structure for radical sequestration and reduction of the redox potential of
524 the medium (Jing et al., 2012).

525

526 3.3. Evaluation of the activity of plant extracts and essential oil on bacterial 527 biofilm

528 The activity of EE, EA and OE extracts was evaluated on the biofilms of
529 standard bacteria. Statistical analysis of biomass and cell viability data was
530 performed through ANOVA and Tukey tests when the data were in normality and
531 Kruskal-Wallis and Dunn when the data were not in normal distribution. It was
532 observed that there was no significant difference between the different
533 concentrations tested (MIC, 2X MIC and 4X MIC); therefore, the results
534 expressed refer to the action of MIC on the biofilm.

535 The results showed that EE presented the best antibiofilm activity (Table
536 5), because it reduced the biofilm biomass of all bacteria tested. The percentages
537 of inhibition of biofilm ranged from 85.12%, 83,65% and 63.41% for *S.*
538 *Typhimurium*, *S. aureus* and *S. Enteritidis*, respectively. EE presented low
539 inhibition activity (43.51%) only for *Escherichia coli* biofilm. The phytochemical
540 compounds saponins, free steroids, alkaloids, flavonoids and tannins present in

541 EE showed potential to inhibit and reduce the biomass of the biofilms already
542 formed by the bacteria, probably disaggregating the consolidated colonies,
543 preventing nutrient replenishment and destroying already formed biofilms
544 (Cushnie and Lamb, 2011; Nuño et al., 2018).

545 In the literature there are reports that plant extracts with antibiofilm
546 potential can act by breaking the bacterial cellular communication (Trentin et al.
547 2013). In addition, the polarity of the plant extract can also influence the reduction
548 of the biomass of the already established biofilm, interfering with the penetration
549 of substance into the cell matrix, and the cell-cell communication strategies
550 (quorum detection) of the bacteria (Zheng and Stewart, 2002). Regarding cell
551 viability (Table 6), EE was able to reduce cell activity of all biofilms tested,
552 demonstrating a percentage of cell activity in the range of 14.29% for the biofilm
553 of the *Pseudomonas aeruginosa* strain to 26.67% for *Escherichia coli*. Therefore,
554 in relation to the reduction of biomass and cellular activity, this extract presented
555 the same behavior in relation to the biofilms of gram-negative and gram-positive
556 bacteria, presenting antibiofilm potential for both.

557 Table 5 and Table 6

558 OE presented antibiofilm potential (Table 7), reducing biomass and cell
559 viability of biofilms formed from enteroagregativa T3 *Escherichia coli*,
560 *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis strains with a high percentage
561 of inhibition ranging from 63.39% for *Escherichia coli* enteroagregativa T3 and
562 84.96% for *Salmonella* Enteritidis. The percentage of cell viability (Table 8)
563 ranged from 11.27% to 56.52%, and *Escherichia coli* (56.52%) and
564 *Pseudomonas aeruginosa* (51.16%) biofilms showed high cellular activity when
565 compared to the others.

566 Table 7 and Table 8

567 EA showed low antibiofilm activity (as shown in Table 9 and 10), with a
568 percentage of inhibition lower than 50% against all biofilms established, except
569 for the biofilm of the gram-negative strain *Salmonella* Enteritidis, with the
570 percentage of inhibition greater than 50%, reducing biomass by 64,63% and cell
571 viability in 15.49%.

572 Table 9 and Table 10

573 In addition, it was observed that EA promoted an increase in the biomass
574 of the *Escherichia coli* biofilm, but a low cell viability. Probably, the phytochemical

575 compounds were not able to break the polymeric matrix of the biofilm and there
576 was no breakdown of the biomass when stained with the violet crystal. For the
577 other biofilms tested, this extract presented moderate cellular activity and low
578 biomass inhibition. Therefore, EA performed better against mature biofilms of
579 gram-negative strains.

580 Although phytochemical compounds of EA present the presence of
581 metabolite classes with proven antibiofilm action in the literature, this action was
582 not evidenced in the biofilms tested in our study. Probably these substances are
583 present in lower concentrations, or even present a synergistic effect among
584 them, which provides an increase in the biomass of the biofilm formed, activating
585 genes that will produce an excess cell matrix. In addition, there may be a low
586 penetration of these compounds, or even an increase in the cell membrane efflux
587 pumps, which expel these antimicrobial agents from bacterial cells (Jamal et al.,
588 2018).

589 There are no reports in the literature regarding the capacity of plant
590 extracts and essential oil of *Myrsine* species to reduce and/or destroy biofilms,
591 making this study the first scientific report on this biological activity. However,
592 research on plant extracts and essential oils of other species on antibiofilm
593 activity is being conducted, as performed by Bazargani and Rohloff (2015) who
594 tested the antibiofilm activity of OE and extracts of *Mentha piperita* leaves and
595 *Coriandrum sativum* and *Pimpinella anisum* seeds against the biofilms of
596 *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. They identified that *C. sativum* oil
597 presented the highest antibiofilm activity on both bacteria tested. Famuyide et al.
598 (2019) evaluated the EA antibiofilm potential of *Eugenics* leaves from South
599 Africa and *Syzygium* species and presented good to weak potential to destroy
600 biofilms formed.

601 In summary, the results of the antibiofilm potential tests by both the violet
602 crystal assay and the MTT assay indicated that EE and OE were effective in
603 reducing and destroying biofilm biomass and causing damage to biofilm cell
604 activity.

605

606 **4. Conclusion**

607

608 The prospection of plant extracts of *M. umbellata* demonstrated the
609 presence of classes of compounds such as saponins, free steroids, alkaloids,
610 flavonoids (flavones, flavanols, flavanonols and xanthons) and tannins, and the
611 EE showed greater diversity of compounds (8 classes). In the composition of the
612 essential oil, thirty-eight compounds were identified, all of them sesquiterpenes,
613 being the major compounds: elixen (15.62%), caryophyllene (E) (8.91%),
614 espatulenol (6.95%), d-cadinenum (6.30%) and aromadendrene (5.12%).

615 EE and EA showed antimicrobial activity for all tested ATCCs strains,
616 being considered the best antimicrobials of this study. EA showed the best
617 antimicrobial activity, highlighting its efficiency over the Gram-positive
618 *Staphylococcus epidermidis* strain. EE presented antimicrobial potential and the
619 Gram-negative strain *Escherichia coli* was more susceptible. However, OE
620 presented only bacteriostatic potential against the strains *Salmonella enterica*
621 Typhimurium, *Salmonella enterica* Abaetetuba, *Pseudomonas aeruginosa* and
622 *Staphylococcus epidermidis*. The ability to sequester free radicals was evidenced
623 in EA that demonstrated antioxidant activity of 89.55% and EE 63.05%. The OE
624 presented low antioxidant potential with activity of 10.46%.

625 Regarding the antibiofime potential, it was observed that EE reduced the
626 biofilm biomass of all strains tested and presented high antibiofilm activity
627 (43.51% to 83.65%). The OE also presented antibiofilm effect on *E. coli*
628 enteroagreativa T3, *S. aureus* and *S.*

629 Enteritidis strains with biomass reduction percentage of mature biofilms of
630 63.39%, 66.21% and 84.96%, respectively.

631 Therefore, the results suggest that the leaves of *M. umbellata* can be
632 considered a source for the production of natural phytotherapy with possible uses
633 in different industrial sectors. Therefore, this study is a valuable contribution to
634 future bioassays in order to identify and isolate the plant bioactives responsible
635 for the high antimicrobial, antioxidant or antibiofilm potential of these extracts and
636 essential oil.

637

638 **Acknowledgements:** We thank the National Council for Scientific and
639 Technological Development (CNPq) and the Araucaria Foundation for the
640 funding of the research and the Coordination for the Improvement of Higher
641 Education Personnel (CAPES) for the grant of the master's scholarship and the

642 Post-graduate Program Graduation in Management and Conservation of Natural
643 Resources (PPRN).

644

645 **References**

646

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

650

651 ALVES, E.D., BUSATO, N.V., SILVEIRA, J.C., TULER, A.C., COSTA, A.V.,
652 CARRIJO, T.T., RINALDO, D., QUEIROZ, V.T., PRATISSOLI, D. And
653 PINHEIRO, P.F., 2012. Phytochemical study of leaves of *Myrsine coriacea*
654 (Sw.) R. Br. (Primulaceae). In: *XVI Latin American Meeting of Scientific Initiation*
655 *and XII Latin American Meeting of Graduate Studies- University of Vale do*
656 *Paraíba*, October 15-16, José dos Campos, São Paulo, pp. 1-6.

657

658 ARAÚJO, N.R.R., 2010. *In vitro evaluation of antimicrobial activity of plant*
659 *extracts on microorganisms related to oral mucositis injury*. Pará: Universidade
660 Federal do Pará. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

661

662 BABUSHOK, V.I., LINSTROM P.J., ZENKEVICH, I.G., 2011. Retention Indices
663 for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical*
664 *Chemistry Reference Data*, vol. 40. [https://doi.org/043101-1 - 043101-47](https://doi.org/043101-1-043101-47).

665

666 BAZARGANI, M.M. and ROHLOFF, J., 2015. Antibiofilm activity of essential oils
667 and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms.
668 *Food Control*, pp. 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>

669

670 BEZERRA, W.G.A., HORN, R.H., SILVA, I.N.G., TEIXEIRA, R.S.C., LOPES,
671 E.S., ALBUQUERQUE, Á.H. and CARDOSO, W.C., 2017. Antibiotics in the
672 poultry sector: a review on microbial resistance. *Archivos de Zootecnia*, vol. 66,
673 pp. 301-307. <https://doi.org/10.21071/az.v66i254.2335>

674

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

679

680 CLSI, CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015. M07-
681 A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That
682 Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. *CLSI (Clinical and*
683 *Laboratory Standards Institute*, vol. 35. [https://doi.org/10.1007/s00259-009-](https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3.7)
684 [1334-3.7](https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3.7)

685

686 COSTA, G.M., ENDO, E.H., CORTEZ, D.A.G., UEDA-NAKAMURA, T.,
687 NAKAMURA, C.V. and FILHO, B.P.D., 2015. Effect of plant extracts on
688 planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

689 *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 4, pp.
690 908-917. ISSN: 2319-7706.
691
692 CORREA, A.L., 2017. *Phytochemical Study and Evaluation of the Neutralizing*
693 *Capacity of Myrsine parvifolia on Biological Activities Caused by Bothrops sp.*
694 Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense. 135p. Dissertação de
695 doutorado em Ciências Aplicadas a Produtos de Saúde.
696
697 CUSHNIE, T.P.T. and LAMB, A.J., 2011. Recent advances in understanding the
698 antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial*
699 *Agents*, vol. 38, pp. 99-107. [https://doi.org/10.1016 / j.ijantimicag.2011.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014)
700
701 FAMUYIDE, I.M., ARO, A.Q., FASINA, F.O., ELOFF, J.N. and MCGAW, L.J.,
702 2019. Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under-
703 investigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and
704 their selectivity indices. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 19.
705 <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>
706
707 FARIAS, C.A., RESENDE, M., BARROS, N.F. and SILVA, A.F.,
708 1993. Dynamics of natural revegetation of gullies in the region of Cachoeira do
709 Campo, Municipality of Ouro Preto- MG. *Journal Árvore*, vol. 17, pp. 314-326.
710
711 FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A., PEREIRA, E., FREIRE, M.S., VALENTÃO, P.,
712 ANDRADE, P.B., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.A. and PEREIRA, J.A., 2003.
713 Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut
714 (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, vol. 42,
715 pp. 126–132. <https://doi.org/10.1016 /j.indcrop.2012.05.021>
716
717 FREITAS, M.F., 2020. [viewed 09 February 2020] Myrsine in Flora do Brasil
718 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro [online]. Available from:
719 <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10223>.
720
721 FROZI, J.B., ESPER, L.M.R., FRANCO, R.M., 2017. Formation of Mono and
722 Multi-species Biofilms of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and
723 *Salmonella* spp. Fish Isolates and Fish Industry. *Rural Science*, vol. 47.
724 <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170011>
725
726 FUMAGALI, E., GONÇALVES, R.A.C., MACHADO, M.F.P.S., VIDOTI, G.J. and
727 OLIVERIA, A.J.B., 2008. Production of plant secondary metabolites in plant cell
728 and tissue culture: the example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma*
729 *genera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18.
730 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400022>.
731
732 GITHIORI, J.B. HÖGLUND, J., WALLER, P.J. and BAKER, L.R.,
733 2002. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine africana* and
734 *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus*
735 *contortus*, of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 80, pp. 187-191.
736 [https://doi.org/ 10.1016 /s0378-8741\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016 /s0378-8741(02)00030-2)
737

738 GOBBO-NETO L. and LOPES, N.P., 2007. Medicinal plants: factors of influence
739 on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, vol. 30, pp. 374-381.
740 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
741

742 GONÇALVES, L.A., AZEVEDO, A., CASALI, V.W.D. and NASCIMENTO, E.A.,
743 2015. Production and composition of essential oil of alfavaquinha (*Ocimum selloi*
744 Benth.) in response to two levels of solar radiation. *Brazilian Journal of*
745 *Medicinal Plant*, vol. 6, pp. 8-14.
746

747 GYAWALI, R. and IBRAHIM, S.A., 2014. Natural products as antimicrobial
748 agents. *Journal Food Control*, vol. 46, pp.412–429.
749 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
750

751 JAMAL, M., AHMAD, W., ANDLEEB, S., JALIL, F., IMRAN, M., MA, N.,
752 HUSSAIN, T., ALI, M., RAFIQ, M. and MA, K., 2018. Bacterial biofilm and
753 associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 81,
754 pp.7–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.
755

756 JANUÁRIO, A.H., SILVA, M.F., VIEIRA, P.C. and FERNANDES, J.B., 1992.
757 Dammarane and cycloartane triterpenoids from 3 *Rapanea* species.
758 *Phytochemistry*, vol. 31, pp. 1251-1253. ISSN: 0031-9422.
759

760 JIA, P., XUE, Y.J., DUAN, X.J. and SHAO, S.H., 2011. Effect of
761 cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression. By methicillin-
762 resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 53, pp.
763 409-416. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03122.x>
764

765 JING, P., ZHAO, S.P., JIAN, W.J., QIAN, B.J., DONG, Y. and PANG, J., 2012.
766 Quantitative studies on structure- DPPH scavenging activity relationships of
767 food phenolic acids. *Journal Molecules*, vol. 17, pp. 12910-12924.
768 <https://doi.org/10.3390/molecules171112910>
769

770 KUŹMA, L., RÓZALSKI, M., WALENCKA, E., RÓZALSKA, B. and
771 WYSOKIŃSKA, H., 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots
772 of *Salvia sclarea* L.: *Salvipisone* as a potential anti-biofilm agent active against
773 antibiotic resistant *Staphylococci*. *Phytomedicine*, vol. 14, 31-35.
774 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.10.008>
775

776 LOGUERCIO, A.P., BATTISTIN, A., VARGAS, A.C., HENZEL, A. and WITT,
777 N.M., 2005. Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract of jamola leaves
778 (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Rural Science*, vol. 35, pp. 371-376.
779 <http://dx.doi.org/10.1590/S0103 84782005000200019>
780

781 LORENZI, H. 2009. *Brazilian trees: manual of identification and cultivation of*
782 *arboreal plants native to Brazil*. 3rd end. New Odessa: Plantarum.386p.
783

784 LUNA, B.N., DEFAVERI, A.C.A., SATO, A., BIZZO, H.R., FERITAS, M.F. and
785 BARROS, C.F., 2014. Leaf secretory tissues in *Myrsine coriacea* and *Myrsine*
786 *venosa* (Primulaceae): ontogeny, morphology, and chemical composition of

787 essential oils. *Botany*, vol. 92, pp. 757-766. <https://doi.org/10.1139/cjb-2014->
788 0044
789
790 MANGURO, L.O.A., MIDIWO, J.O. and KRAUS, W., 1997. Triterpenoids and
791 steroids of *Myrsine africana* leaves. *Planta Medica*, vol. 63, pp. 290.
792 <https://doi.org/10.1055/s-2006-957683>
793
794 MATOS, F.J.A., 1997. *To experimental phytochemistry*. 3rd end. Fortaleza:
795 UFC. 147 p.
796
797 MIRANDA, A.F.M., VARELA, R.M., TORRES, A., MOLINILLO, J.M.G.,
798 GUALTIERI, C.J., MACÍAS, F.A., 2015. Fitotoxinas de *Tithonia*
799 *diversifolia*. *Journal of Natural Products*, vol. 78, pp. 1083-1092.
800 <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00040>.
801
802 MONTOVANI, P.A.B., GONÇALVES, A.C.J., MORAES, A., MONDARDO, D.,
803 MEINERZ, C. and SHIKIDA, S.A.L. 2009. Antimicrobial activity of Capororoca
804 extract (*Rapanea* sp.). *Brazilian Journal of Agroecology*, vol. 4, pp. 3764-
805 3767. ISSN: 236-7934.
806
807 NUÑO, G., ALBERTO, M.R., ARENA, M.E., ZAMPINI, I.C. and ISLA, M.I. 2018.
808 Effect of *Zuccagnia punctate* Cav. (Fabaceae) extract on pro-inflammatory
809 enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus aureus*.
810 Toxicity studies. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 25, pp. 1713-1719.
811 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.014>
812
813 OHTANI, K. and HOSTETTMANN, K., 1992. Molluscicidal and Antifungal
814 Triterpenoid, Saponins from the Leaves of *Rapanea melanophloeos*. *Planta*
815 *Medica*, vol. 58.
816
817 OSPINA, L.F., CALLE, J., ARTEAGA, L., PINZÓN, R., ALCARAZ, M.J. and
818 PAYÁ, M., 2001. Inhibition of acute and chronic inflammatory responses by
819 hydroxybenzoquinonic derivative repanone. *Planta Medica Magazine*, vol. 67,
820 pp. 791-795. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18839>
821 PANDINI, J.A., PINTO, F.G.S., SCUR, M.C., ALVES, L.F.A. and MARTINS,
822 C.C., 2015. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil
823 and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plants*
824 *Research*, vol 9, no. 3, pp. 48-55. 10.5897/JMPR2014.5551.
825
826 RICKETSON, J.M. and PIPOLY, J.J., 1997. Nomenclatural notes and synopsis
827 of the genus *Myrsine* (Myrsinaceae) in Mesoamerica. *Journal Sida*,
828 *contributions to Botany*, vol. 17, no. 3, pp. 579-589.
829
830 RUFINO, M.S.M., ALES, R.E., BRITO, E.S., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G.,
831 PÉREZ- JIMÉNEZ, J. and SAURA- CALIXTO, F.D., 2007. Scientific
832 methodology: determination of total antioxidant activity in fruits by capture of the
833 free radical DPPH. *Journal Technical Communiqué on line Embrapa*, vol. 127,
834 pp. 1-4. ISSN 1679-6535.
835

836 SARDANS, J., LLUSIA, J., NIINEMETS, U., OWEN, S. and PENUELAS, J.,
837 2010. Foliar Mono- and Sesquiterpene Contents in Relation to Leaf Economic
838 Spectrum in Native and Alien Species in Oahu (Hawai'i). *Journal of Chemical*
839 *Ecology*, vol. 36, pp. 210-226. . [https://doi.org/ 10.1007/s10886-010-9744-z](https://doi.org/10.1007/s10886-010-9744-z)
840

841 SARTORATTO, A., MACHADO, A.L.M., DELARMELENA, C., FIGUEIRA, G.M.,
842 DUARTE, M.C.T. and REHDER, V.L.G., 2004. Composition and antimicrobial
843 activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of*
844 *Microbiology*, vol. 35, pp. 275-280.
845

846 SCHERER, R. and GODOY, H.T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the
847 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Journal Food Chemistry*, vol. 112, pp.
848 654-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
849

850 SCUR, M.C., PINTO, F.G.S., BONA, E.A.M., WEBER, L.D., ALVES, L.F.A. and
851 MOURA, A.C., 2014.. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella*
852 serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *Academic*
853 *Journals*, vol. 9, pp. 823-830. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8202>
854

855 SILVA, F.C., DUARTE, L.P. and VIERA FILHO, S.A., 2014. Celastraceae
856 Family: Source of Pentacyclic Triterpenes with Potential Biological Activity.
857 *Journal Virtual de Química*, vol. 6, pp. 1205-1220. [https://doi.org/10.5935/1984-](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140079)
858 [6835.20140079](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140079)
859

860 STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., HOLA, V., BONAVENTURA, G.D., DJUKIĆ,
861 S., CIRKOVIĆ, I. and RUZICKA, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter
862 plates: overview of testing conditions and practical recommendations for
863 assessment of biofilm production by *staphylococci*. *Journal of Pathology,*
864 *Microbiology and Immunology*, vol. 115, pp. 891-899.
865 https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
866

867 SUFFREDINI I.B., VARELLA A.D. and YOUNES, R.N., 2007. Minimum
868 inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of three
869 selected antibacterial plant extracts from the Brazilian Amazon Forest and
870 Atlantic Forest. *Journal of the Institute of Health Sciences* vol. 25, pp. 127-129.
871

872 THIERS, B., 2021 [viewed 15 February 2022] *Index Herbariorum: A global*
873 *directory of public herbaria and associated staff*. *New York Botanical Garden's*
874 *Virtual Herbarium* [online]. Available from: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>.
875

876 TRENTIN, D.S., SILVA, D.B., AMARAL, M.W., ZIMMER, K.R., SILVA, M.V.,
877 LOPES, N.P., GIORDANI, R.B. and MACEDO, A.J., 2013. Tannins Possessing
878 Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm
879 Formation. *Journal Plos one*, vol. 8, pp. e66257.
880 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066257>
881

882 WEBER, L. D., PINTO, F. G. S., SCUR, M. C., SOUZA, J. G. L., COSTA, W. F.,
883 LEITE and C. W., 2014. Chemical composition and antimicrobial and
884 antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus*

885 *myrtifolia* (L.) Urb. *African Journal of Agricultural Research*, vol. 9, pp. 846-853.
886 <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8260>
887
888 YU, J.Q., LIAO, Z.X., CAI, X.Q., LEI, J.C., 2007. Composition, antimicrobial
889 activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*.
890 *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 23, pp. 162-167.
891 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.08.004>
892
893 ZHENG, Z. and STEWART, P.S., 2002. Penetration of Rifampin through
894 *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Journal Antimicrobial Agents and*
895 *Chemotherapy* 46, 900-903. [https://doi.org/10.1128 / AAC.46.3.900-903.2002](https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.900-903.2002)
896
897 ZHONG, X.N., OTSUKA, H., IDE, T. HIRATA, E., TAKUSHI, A., TAKEDA, Y.,
898 1997. Three flavonoid glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*.
899 *Phytochemistry*, vol. 46, pp. 943-946. [https://doi.org/10.1016/S0031-](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00366-X)
900 [9422\(97\)00366-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00366-X).

Table 1- Phytochemical prospecting of secondary metabolites presente in ethanolic and acetonic extracts of *M. umbellata* leaves.

| Secondary metabolites | EE | EA |
|-----------------------|----|----|
| Saponins | + | - |
| Free Steroids | + | + |
| Triterpenoid | - | - |
| Alkaloids | + | + |
| Antocyanins | - | - |
| Antoyanidinins | - | - |
| Flavones | + | + |
| Flavanols | + | + |
| Xanthones | + | + |
| Chalconas | - | - |
| Auronas | - | - |
| Flavanonols | + | + |
| Condensed tannins | + | + |
| Coumarins | - | - |

(+)presence; (-)absence, EE: ethanolic extract; EA: acetonic extract

Table 2- Chemical composition of the essential oil of the leaves of *M. umbellata* obtained by hydrodistillation and analyzed by CG-EM.

| Number | Composed | Area (%) | TR | IR | IR* |
|--------|----------------------------|----------|-------|------|------|
| 1 | α -Thujeno | 0.15 | 8.87 | 924 | 928 |
| 2 | α -Pinena | 2.42 | 9.20 | 930 | 936 |
| 3 | Myrcene | 0.29 | 12.10 | 989 | 989 |
| 4 | m-Cimeno | 0.24 | 14.02 | 1023 | 1022 |
| 5 | D-Limonene | 0.17 | 14.31 | 1028 | 1030 |
| 6 | Terpineno-4-ol | 0.19 | 23.99 | 1179 | 1177 |
| 7 | δ -Elemeno | 0.97 | 34.20 | 1334 | 1337 |
| 8 | α -Cubebene | 0.62 | 34.97 | 1346 | 1351 |
| 9 | α -Ylangene | 0.20 | 36.34 | 1367 | 1370 |
| 10 | Isoledene | 0.15 | 36.45 | 1369 | 1373 |
| 11 | α -Copaeno | 1.70 | 36.74 | 1373 | 1376 |
| 12 | β -Elemeno | 1.22 | 37.66 | 1387 | 1390 |
| 13 | α -Gurjuneno | 1.29 | 38.70 | 1404 | 1408 |
| 14 | Caryophyllene, (E) ** | 8.91 | 39.40 | 1415 | 1420 |
| 15 | γ -Elemeno | 2.82 | 40.18 | 1428 | 1436 |
| 16 | Aromadendrene ** | 5.12 | 40.58 | 1434 | 1440 |
| 17 | α -Humulene | 3.14 | 41.59 | 1451 | 1453 |
| 18 | Alloaromadendrene | 0.46 | 41.88 | 1456 | 1460 |
| 19 | γ -Muuroleno | 4.07 | 42.93 | 1473 | 1476 |
| 20 | Germacrene D | 2.85 | 43.19 | 1477 | 1481 |
| 21 | β -Selineno | 2.58 | 43.64 | 1484 | 1486 |
| 22 | Viridifloren | 2.23 | 43.88 | 1488 | 1492 |
| 23 | Elixeno ² ** | 15.62 | 44.13 | 1492 | 1492 |
| 24 | α -Muuroleno | 1.18 | 44.39 | 1496 | 1498 |
| 25 | γ -Cadinene | 2.65 | 45.19 | 1510 | 1513 |
| 26 | δ -Cadinene ** | 6.30 | 45.58 | 1517 | 1520 |
| 27 | Selina-3,7(11)-diene | 0.59 | 46.80 | 1538 | 1540 |
| 28 | Germacrene B | 4.06 | 47.76 | 1554 | 1551 |
| 29 | Nerolidol, (E)- | 0.46 | 48.17 | 1561 | 1561 |
| 30 | Espatuleno ^l ** | 6.95 | 48.82 | 1572 | 1576 |
| 31 | Globulol | 3.59 | 49.34 | 1581 | 1582 |
| 32 | Globulol, epi- | 3.22 | 49.81 | 1589 | 1585 |
| 33 | α -Cadinol, epi- | 0.98 | 52.60 | 1639 | 1595 |
| 34 | α -Muurolol, epi - | 1.12 | 52.71 | 1641 | 1638 |
| 35 | α -Muurolol | 0.35 | 52.88 | 1644 | 1641 |
| 36 | α -Cadinol | 2.03 | 53.33 | 1652 | 1643 |
| | NI | 1.10 | 34.00 | 1330 | 1652 |

TR: Retention Time; IR: Values of Calculated Retention Indices; IR*: Values of Retention Indices found in the literature; ** Compound Majorities; NI: Not identified.

Table 3- Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Bactericidal Concentration (MBC) or Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of ethanolic and acetonic extracts and essential oil of *M. umbellata* leaves in front of different standard strains.

| Strains | MIC/MBC (mg.mL ⁻¹) | | |
|---|--------------------------------|-----------|----------|
| | EE | EA | OE |
| Gram-positive | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 12.5/200 | 25/100 | -/- |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) | 12.5/200 | 3.12/25 | 437.5/- |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433) | 6.25/25 | 6.25/25 | -/- |
| <i>Bacillus subtilis</i> (CCC B005) | 6.25/25 | 3.12/50 | -/- |
| Gram-negative | | | |
| <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 6.25/25 | 12.5/25 | 875/- |
| <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 12.5/100 | 6.25/12.5 | -/- |
| <i>Salmonella enterica</i> Abaetetuba (ATCC 35640) | 12.5/25 | 6.25/12.5 | 875/- |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 3.12/25 | 3.12/12.5 | -/- |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883) | 3.12/25 | 12.5/50 | -/- |
| <i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933) | 3.12/25 | 3.12/50 | -/- |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 3.12/25 | 3.12/50 | 218.75/- |
| Yeast | | | |
| <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) | CIM/CFM 6.25/25 | 12.5/50 | -/- |

(-) No activity. EE: ethanolic extract; EA: acetonic extract; OE: essential oil.

Table 4- Percentage sequestration of radical DPPH and IC₅₀ value by DPPH assay of plant extracts and essential oil of *M. umbellata* leaves.

| Concentration (mg.mL ⁻¹) | BHT | EE | EA | OE |
|--------------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 1.0 | 97.20±0.30 | 63.05±0.55* | 89.55±0.58* | 10.46±0.23* |
| IC ₅₀ | 0.46±0.00 | 1.44±0.02 | 0.47±0.00 | 15.21±2.23 |
| AAI | 2.11 | 0.59 | 1.90 | 0.03 |

Absorbance mean (%) standard deviation. * Expresses significant difference between extracts and essential oil when compared to BHT (Tukey test (p<0.05)). IC₅₀: 50% inhibition concentration of DPPH; AAI: Antioxidant Activity Index. BHT: butylated hydroxytoluene; EE: ethanolic extract; EA: acetonic extract; OE: essential oil.

Table 5- Antifibiofilm activity of the ethanolic extract of *M. umbellata* on biomass of the standard bacteria biofilms by the violet crystal technique.

| Microorganisms | EE | | % INHIBITION |
|--|-----------|------------|--------------|
| | CONTROL | MIC | |
| | CV | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 3.88±0.08 | 0.61±0.29* | 83.65 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 3.49±0.17 | 1.17±0.12* | 67.13 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 1.74±0.11 | 0.87±0.06* | 43.51 |
| <i>Escherichia coli</i> <i>enteroagreativa</i> UEL | 3.42±0.14 | 1.16±0.22* | 65.18 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 1.78±0.15 | 0.44±0.10* | 85.12 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 2.68±0.12 | 0.90±0.03* | 63.41 |

Average of optical density ± standard deviation. CV= Crystal Violet. EE= ethanolic extract. * Values differ by t test ($p>0.05$). % inhibition = data are expressed as percentage of inhibition of biofilm biomass at MIC concentration (%).

Table 6- Antifibiofilm activity of *M. umbellata* ethanolic extract on viability from standard bacteria biofilms by tetrazolium salt reduction assay (MTT).

| EE | | | |
|--|-----------|------------|-------------|
| MTT | | | |
| Microorganisms | CONTROL | MIC | % VIABILITY |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 0.32±0.06 | 0,10±0,05* | 18,75 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 0.28±0.04 | 0,20±0,07 | 14,29 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 0.20±0.06 | 0,75±0,09* | 26,67 |
| <i>Escherichia coli</i> <i>enteroagreativa</i> UEL | 0.29±0.03 | 1,34±0,04* | 21,64 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 0.37±0.02 | 2,10±0,09* | 17,70 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 0.35±0.02 | 2,16±0,07* | 16,20 |

Average of optical density ± standard deviation. MTT= 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolyl. EE= extra ethanol. * Values differ by t test (p>0.05). % Viability = data are expressed as percentage of cell viability of biofilms at MIC concentration (%).

Table 7- Antifibiofilm activity of *M. umbellata* essential oil in the biomass of standard bacterial biofilms by the violet crystal technique.

| | OE | | |
|--|-----------|------------|--------------|
| | CV | | |
| Microorganisms | CONTROL | MIC | % INHIBITION |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 3.88±0.08 | 1.24±0.05* | 66.21 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 3.49±0.17 | 3.32±0.01 | 6.74 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 1.74±0.11 | 1.02±0.12* | 33.77 |
| <i>Escherichia coli</i> <i>enteroagreativa</i> UEL | 3.42±0.14 | 1.24±0.13* | 63.39 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 1.78±0.15 | 2.14±0.09* | 26.30 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 2.68±0.12 | 0.37±0.04* | 84.96 |

Average of optical density ± standard deviation. CV= Crystal Violet. OE= essential oil. * Values differ by t test (p>0.05). % inhibition= data are expressed as percentage of inhibition of biofilm biomass at MIC concentration (%).

Table 8- Antifibiofilm activity of *M. umbellata* essential oil on viability from standard bacteria biofilms by tetrazolium salt reduction assay (MTT).

| Microorganisms | OE | | % VIABILITY |
|--|-----------|------------|-------------|
| | CONTROL | MIC | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 0.32±0.06 | 1.76±0.00* | 13.07 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 0.28±0.04 | 0.43±0.01* | 51.16 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 0.20±0.06 | 0.23±0.08 | 56.52 |
| <i>Escherichia coli</i> <i>enteroagreativa</i> UEL | 0.29±0.03 | 2.04±0.00* | 11.27 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 0.37±0.02 | 0.89±0.01* | 30.34 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 0.35±0.02 | 1.09±0.03* | 20.18 |

Average of optical density ± standard deviation. MTT= 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolyl. OE= essential oil. * Values differ by t test (p>0.05). % Viability = data are expressed as percentage of cell viability of biofilms at MIC concentration (%).

Table 9- Antifibiofilm activity of *M. umbellata* acetonic extract in the biomass of standard bacterial biofilms by the violet crystal technique.

| Microorganisms | EA | | % INHIBITION |
|--|-----------|------------|--------------|
| | CONTROL | MIC | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 3,88±0,08 | 2.07±0.26* | 43.60 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 3,49±0,17 | 3.20±0.04 | 10,39 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 1,74±0,11 | 1.79±0,21 | NI |
| <i>Escherichia coli</i> <i>enteroagreativa</i> UEL | 3,42±0,14 | 1.91±0.10* | 43.45 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 1,78±0,15 | 2.58±0.04* | 11.07 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 2,68±0,12 | 0.88±0.06* | 64.63 |

Average of optical density ± standard deviation. CV= Crystal Violet. EA= acetonic extract. * Values differ by t test ($p>0.05$). NI= not inhibition. % inhibition = data are expressed as percentage of inhibition of biofilm biomass at MIC concentration (%).

Table 10- Antifibiofilm activity of *M. umbellata* acetonic extract on viability from standard bacteria biofilms by tetrazolium salt reduction assay (MTT).

| OE | | | |
|--|-----------|------------|-------------|
| MTT | | | |
| Microorganisms | CONTROL | MIC | % VIABILITY |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 0.32±0.06 | 0.86±0.09* | 26.74 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 0.28±0.04 | 0.52±0.02* | 42.31 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 0.20±0.06 | 0.79±0.01* | 16.46 |
| <i>Escherichia coli</i> <i>enteroagreativa</i> UEL | 0.29±0.03 | 0.55±0.01* | 41.82 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028) | 0.37±0.02 | 0.62±0.10* | 43.55 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076) | 0.35±0.02 | 1.42±0.01* | 15.49 |

Average of optical density ± standard deviation. MTT= 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolyl. EA= acetonic extract. * Values differ by t test (p>0.05). % Viability = data are expressed as percentage of cell viability of biofilms at MIC concentration (%).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AAWC (Association for the Advancement of Wound Care). 2008. **Advancing**
2 **your practice: Understanding Wound Infection and the Role of Biofilms.**
3 Malvern: AAWC.
4
- 5 ALVES, C. Q. et al. Métodos para Determinação de Atividade Antioxidante IN
6 VITRO em Substratos Orgânicos. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-
7 2210, 2010.
8
- 9 APG IV- Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm
10 Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants.
11 **Revista Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 1-20, 2016.
12
- 13 ARAKAKI, D. G. **Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* da polpa do**
14 **jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.).** 2015. 63 f. Dissertação
15 (Mestrado em Nutrição e Metabolismo)- Programa de Pós-Graduação em
16 Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
17 Campo Grande, 2015.
18
- 19 ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active
20 plant-derived natural products: A review. **Revista Biotechnology Advances**, v.
21 33, p. 1582-1614, 2015.
22
- 23 BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do sul:** guia de identificação & interesse
24 ecológico. Santa Maria: Palloti, 2002. 326 p.
25
- 26 BAZARGANI, M. M., e ROHLOFF, J., 2015. Antibiofilm activity of essential oils
27 and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms.
28 **Food Control**, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.036>
29
- 30 BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agentes from Gram-positive bactéria.
31 **Revista Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 528-534, 1992.
32
- 33 BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from
34 the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,
35 v. 16, p. 408-420, 2006.
36
- 37 BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and
38 modes of action. **Revista Animal Feed Science and Technology**, v. 158, p. 1-
39 14, 2010.
40
- 41 BEZERRA, W. G. A. et al. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a
42 resistência microbiana. **Revista Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-
43 307, 2017.
44

45 BFG- The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant
46 diversity in Brazil. **Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, p.
47 1085-1113, 2015.
48
49 BONA, E. A. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de erva-mate (*Ilex*
50 *paraguariensis*) sobre sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **Revista**
51 **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, p. 45-48, 2010.
52
53 BURGER, M. C. M. et al. Atividade antimicrobiana do ácido mirsinóico A de
54 *Myrsine coriácea* e seus derivados semi-sintéticos. **Revista Brasileira de**
55 **Farmacognosia**, v. 25, n. 5, 2015.
56
57 CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no
58 Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3,
59 n. 2, p. 44-75, 2014.
60
61 CARVALHO, A. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos
62 etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria*
63 *chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n.
64 3, p. 521-526, 2014.
65
66 CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da
67 cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à
68 espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos.
69 **Revista Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
70
71 CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de**
72 **valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul.**
73 Brasília: MMA, 2011.
74
75 DING, Y. et al. Antioxidative Sesquiterpenes from *Artemisia iwayomogi*.
76 **Revista Bulletin Korean Chemistry Society**, v. 32, n. 9, p. 3493-3496, 2011.
77
78 DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agentes from plants:
79 antibacterial activity of plant volatile oils. **Revista Journal of Applied**
80 **Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
81
82 DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da Atividade Antioxidante Utilizando
83 Sistema β -Caroteno/Ácido Linoléico e Método de Seqüestro de Radicais DPPH.
84 **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 26, n. 2, p.
85 446-452, 2006.
86
87 EVERTON, G. O. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante
88 dos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre)
89 e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). **Revista virtual de Química**, v. 11, n. 1,
90 2019.
91
92 FAHN, A. Secretory tissues in plants. **Revista New Phytologist**, v. 108, 1988.
93

- 94 FAMUYIDE, I. M., et al. 2019. Antibacterial and antibiofilm activity of acetone
95 leaf extracts of nine under-investigated south African *Eugenia* and *Syzygium*
96 (*Myrtaceae*) species and their selectivity indices. **BMC Complementary and**
97 **Alternative Medicine**, v. 19. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2547-z>
98
- 99 FARIAS, C. A. et al. Dinâmica da revegetação natural de voçorocas na região
100 de Cachoeira do Campo, Município de Ouro Preto- MG. **Revista Árvore**, v. 17,
101 n. 3, p. 314-326, 1993.
102
- 103 FASCINA, V.B. **Aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos em dietas de**
104 **frangos de corte**. 2011. 175 f. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Programa de
105 Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
106
- 107 FRANCISCO, I. A.; PINOTTI, M. H. P. Cyanogenic glycosids in Plants. **Revista**
108 **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v. 43, n. 5, p. 487-492, 2000.
109
- 110 FREITAS, M. F. **Estudos taxonômicos das espécies de *Myrsine* L.**
111 **(*Myrsinaceae*) nas regiões sudeste e sul do Brasil**. 2003. 235 p. Tese
112 (Doutorado em Biologia Vegetal)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual
113 de Campinas, Campinas, SP, 2003.
114
- 115 FREITAS, M. F.; CARRIJO, T. T. **Primulaceae. Lista de Espécies da Flora do**
116 **Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2014**. Disponível em:
117 <<http://forariojaneiro.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 26 ago. 2019.
118
- 119 FROZI, J. B., ESPER, L. M. R., FRANCO, R. M., 2017. Formação de Biofilmes
120 Mono e Multi-espécies de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e
121 *Salmonella spp*. Isoladas de Pescado Cru e Indústria de Pescado. **Ciência**
122 **Rural**, v. 47. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170011>
123
- 124 FONSECA, T. R. **Efeitos do exercício físico e do extrato de soja no perfil**
125 **lipídico, no estresse oxidativo e na aterosclerose em camundongos**
126 **deficientes do gene para o receptor de LDL**. 2007. 89 f. Dissertação
127 (Mestrado em Ciências de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência
128 de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,
129 Belo Horizonte, MG, 2007.
130
- 131 GITHIORI, J. B. et al. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine*
132 *africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite,
133 *Haemonchus contortus*, of sheep. **Revista Journal of Ethnopharmacology**, v.
134 80, n. 2, p. 187-191, 2002.
135
- 136 GONÇALVES, L. A. et al. Produção e composição do óleo essencial de
137 alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação
138 solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 8-14, 2003.
139
- 140 GREENBERG, E. P. 2003 Bacterial communication: Tiny Teamwork. **Nature**,
141 Londres, v. 424, n. 6945, p. 134.
142

143 GUILARDUCCI, N. V. et al. Efeito da administração oral de extrato etanólico de
144 *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) no desenvolvimento do tumor sólido de
145 ehrlich. **Revista fitos**, v. 10, n. 1, p. 23-29, 2016.
146
147 GUTTERIDGE, J. M. C. HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines,
148 and myths. **Revista Biochemical and Biophysical Research**
149 **Communications**, v. 393, p. 561-564, 2010.
150
151 HANDA, S. S. **An overview of extraction techniques for medicinal and**
152 **aromatic plants**. Trieste: United Nations Industrial Development Organization
153 and the International Centre for Science and High Technology (ICS - UNIDO),
154 2008. 54 p.
155
156 JANUÁRIO, A. H. et al. Dammarane and cycloartane triterpenoids from 3
157 *Rapanea* species. **Revista Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1251-1253, 1992.
158
159 JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; BERNACCI, L. C. In: WANDERLEY, M. G. L. et al.
160 **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Rima, p. 432,
161 2005.
162
163
164 KALLERSJO, M.; BERGQVIST, G.; ANDERBERG, A. A. Generic realignment in
165 primuloid families of the Ericales s.l.: a phylogenetic analysis based on DNA
166 sequences from three chloroplast genes and morphology. **Revista American**
167 **Journal of Botany**, v. 87, p. 1325-1341, 2000.
168
169 KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z. **Resistência bacteriana**
170 **antimicrobiana e indústria avícola**. Instituto Biológico. 2010. (Comunicados
171 Técnicos, n. 134). Disponível em:
172 <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=134>. Acesso em: 29
173 ago. 2019.
174
175 KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Revista Pure and**
176 **Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.
177 LEANDRO, L. M. G. et al. Avaliação da Atividade Antibacteriana e Modulatória
178 de Extratos Metanólico e Hexânico da Casca de *Sideroxylon obtusifolium*.
179 **Revista e-ciência**, v. 1, n. 1, 2013.
180
181 KOH, C. et al. 2013. Plant-Derived Natural Products as Sources of Anti-
182 Quorum Sensing Compounds. **Sensors**, v. 13, n. 5, p. 6217-6228.
183
184 LIMA, R. A.; GOMES, A. D. Identificação de classes de metabólitos
185 secundários no extrato etanólico dos frutos de *Solanum acanthodes* hook e seu
186 potencial fungicida sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista eletrônica em**
187 **gestão, educação e tecnologia ambiental**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 1237-
188 1245, 2014.
189
190 LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas
191 arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2009. 384 p.
192

193 MALLMANN, A. P. **Avaliação Fitoquímica e Atividades Biológicas dos**
194 **Extratos vegetais de *Ilex breviscuspis* Reissek. (Aquifoliaceae).** 2019. 32 f.
195 Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais)-
196 Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de
197 Recursos Naturais, Universidade estadual do Oeste do Paraná, Cascavel,
198 2019.
199
200 MANGURO, L. O. A.; MIDIWO, J. O.; KRAUS, W. Triterpenoids and steroids of
201 *Myrsine africana* leaves. **Revista Planta Medica**, v. 63, n. 3, p. 290, 1997.
202
203 MATOS, F. J. ABREU. **À fitoquímica experimental.** Fortaleza: UFC, 1997.
204 141 p.
205
206 MEIRELES, M. A. O. M. **Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana:**
207 **aspectos socioecômicos e comportamentais e seu impacto clínico e**
208 **ecológico.** Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização)- Departamento
209 de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
210 Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
211
212 MENEZES FILHO et al. 2019. Estudo fitoquímico, bioativo, fotoprotetor e físico-
213 químico do extrato floral de algodãozinho do Cerrado (*Cochlospermum*
214 *regium*Schrank. (Pilg.) – Bixaceae. **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v.
215 3, n.2, p. 1-13.
216
217 MIDWO, J. O. et al. Bioactive compounds from some Kenyan ethnomedicinal
218 plants: Myrsinaceae, Polygonaceae and *Psiadia punctulata*. **Revista**
219 **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 311-323, 2002.
220
221 MIRANDA, M. A. F. M. **Atividades biológicas de duas espécies de *Myrsine***
222 **L. (Primulaceae) e de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae).**
223 2015. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Programa de Pós-graduação em
224 Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 2015.
225
226 MIRANDA, C. A. S. F. et al. 2016. Óleos essenciais de folhas de diversa
227 espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies
228 patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**. V. 47, p. 213-220.
229
230 MONTOVANI, P.A.B., GONÇALVES, A.C.J., MORAES, A., MONDARDO, D.,
231 MEINERZ, C. and SHIKIDA, S.A.L. 2009. Antimicrobial activity of Capororoca
232 extract (*Rapanea* sp.). **Brazilian Journal of Agroecology**, vol. 4, pp. 3764-
233 3767. ISSN: 236-7934.
234
235 NAPPO, M. E. et al. Dinâmica da estrutura fitossociológica da regeneração
236 natural em sub-bosque de *Mimosa scabrella* Bentham em área minerada em
237 Poços de Caldas, MG. **Revista Árvore**, v. 28, n. 6, p. 811-829, 2004.
238 OHTANI, K.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Molluscicidal and antifungal
239 triterpenoid saponin from *Rapanea melanophloeos* leaves. **Revista**
240 **Phytochemistry**, v. 33, n. 1, p. 83-86, 1993.
241

242 OSPINA, L. F. et al. Inhibition of acute and chronic inflammatory responses by
243 hydroxybenzoquinonic derivative repanone. **Revista Planta Medica**, v. 67, n. 9,
244 p. 791-795, 2001.
245
246 PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade
247 antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista brasileira de**
248 **farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.
249
250 PANDINI, J. A. **Composição química, atividade antimicrobiana, inseticida e**
251 **antioxidante do óleo essencial e extratos de *Guarea kunthiana* A. Juss.**
252 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos
253 Naturais)- Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Conservação e
254 Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
255 Cascavel, 2014.
256
257 PANDINI, J. A. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de
258 sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Revista**
259 **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 82, n. 3, p. 1-6, 2015.
260
261 PAROUL, N. et al. Composição Química e Atividade Antioxidante de *Baccharis*
262 *Trimeria* Pers e *Baccharis Dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Revista**
263 **Perspectiva**, Erechim, RS, v. 40, n. 151, p. 55-64, 2016.
264
265 PASTERNAK, J., 2009. Biofilmes: um inimigo (in)visível. **Revista Sociedade**
266 **Brasileira de Controle de Contaminação**, v. 1, p. 36-38.
267
268 PEIXOTO, A. L.; MORIM, M. P. Coleções botânicas: documentação da
269 biodiversidade brasileira. **Revista Ciência e cultura**, v. 3, n. 55, p. 21-24, 2003.
270
271 PEREIRA, P. E. E.; JACOBI, U. S. Avaliação da maturidade, superação da
272 dormência de sementes e crescimento inicial da raiz de *Myrsine parvifolia* A.
273 DC. (Primulaceae). **Revista Iheringia Série Botânica**, v. 69, n. 2, p. 293-301,
274 2014.
275
276 PEREIRA, T. G. **Triagem Fitoquímica das Partes aéreas da Espécie**
277 ***Myrsine guianensis* (Aubl.) Kuntze (Primulaceae)**. Trabalho de Conclusão
278 de Curso (Especialização)- Departamento de Farmácia, Universidade Federa
279 dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.
280
281 PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Revista Biológico**, v. 64, n. 2,
282 p. 227-229, 2002.
283
284 PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Revista Journal of Natural**
285 **Products**. V. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
286
287 PINESCHI, R. B. Aves como dispersoras de sete espécies de *Rapanea*
288 (*Myrsinaceae*) no maciço do Itatiaia estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais.
289 **Revista Brasileira de Ornitologia Ararajuba**, v. 1, p. 73-78, 1990.
290

- 291 RICE-EVANS, C. A. et al. Structure-antioxidant activity relationships of
292 flavonoids and phenolic acids. **Revista Free Radicals in Biology and**
293 **Medicine**. New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
294
- 295 RICKETSON, J. M.; PIPOLY, J. J. Nomenclatural notes and synopsis of the
296 genus *Myrsine* (Myrsinaceae) in Mesoamerica. **Revista Sida, contribuições**
297 **para a Botânica**, v. 17, n. 3, p. 579-589, 1997.
298
- 299 ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Revista**
300 **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 27, n. 1, p. 53-60,
301 2007.
302
- 303 RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo
304 fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Revista Planta Daninha**, v.
305 7, n. 3, p. 507-513, 2009.
306
- 307 SAMY, R. P.; GOPOLAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as
308 antimi-crobials for drug Discovery. **Revista Evidence-Based Complementary**
309 **and Alternative Medicine**, v. 7, p. 283-294, 2010.
310
- 311 SANTANA, C. B. **Composição Química, Atividade Antimicrobiana,**
312 **Inseticida e Antioxidante do Óleo Essencial e Extratos de *Myrcia***
313 ***oblongata* DC.** 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais)-
314 Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais,
315 Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.
316
- 317 SANTOS, P. L. et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas.
318 **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 2562-2576, 2013.
319
- 320 SANTOS, C. V. **Composição Química, Avaliação da Atividade**
321 **Antimicrobiana e Antioxidante do Óleo Essencial e Extratos Vegetais de**
322 ***Myrcia palustris* DC.** 2019. 36 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e
323 Manejo de Recursos Naturais)- Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em
324 Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste
325 do Paraná, Cascavel, 2019.
326
- 327 SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics.
328 **Revista Future Microbiology**, v. 7, p. 979-990, 2012.
329
- 330 SCUR, M. C. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella*
331 serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. **Revista**
332 **Academic Journals** v. 9, p. 823-830, 2014.
333
- 334 SILVA, A. F. et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens*
335 (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 1-7,
336 2003.
337
- 338 SILVA, B. S. **Avaliação da Composição Química e Atividade**
339 **Antimicrobiana de Diferentes Extratos e Frações de *Rapanea ferruginea*.**

340 Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização)- Universidade do Vale do
341 Itajaí, Itajaí, 2013.
342
343 SILVA, J. P. L. et al. A atividade antibacteriana da nisina, óleo de orégano
344 essencial, EDTA, e sua combinação contra *Salmonella* Enteritidis para
345 aplicação na maionese. **Revista Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade,
346 Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 83-91, 2016.
347
348 SILVA, L. A. et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica*
349 (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH,
350 FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v.12, n. 2, p.117-126, 2018.
351
352 SILVA, B.G.B. 2019. **Efeito de Extratos Metanólicos de *Calliandra dycanthera*
353 Benth. (Fabacea) sobre o biofilme de *Staphylococcus aureus***. Monografia
354 apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de
355 Uberlândia como requisito final para a obtenção de título de Bacharel em
356 Biotecnologia. Pato de Minas, MG, 2019.
357
358 SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de
359 extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de
360 louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo
361 fresco**. 2012. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)- Programa
362 de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa
363 Catarina, Florianópolis, 2012.
364
365 SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos essenciais: Farmacognosia da planta
366 ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2007. 1102 p.
367
368 SIQUEIRA, J. C. O gênero *Rapanea Aublet* (Myrsinaceae) na região serrana do
369 Estado do Rio de Janeiro: aspectos taxonômicos e ecológicos das espécies.
370 **Revista Pesquisas Botânicas**, v. 44, p. 41-52, 1993.
371
372 SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Resumo preliminar das Mirsináceas de Santa
373 Catarina. **Revista Sellowia**, v. 8, p. 237-248, 1957.
374
375 SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para
376 identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em
377 APG III**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.
378
379 SOUSA, I. J. O. et al. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de
380 recursos de saúde. **Revista Uningá Review**, v. 31, n. 7, p. 35-39, 2017.
381
382 SOUZA, J. G. L. **Composição Química, Atividade Antioxidante, Acaricida e
383 antimicrobiana de Extratos Vegetais e do óleo essencial das folhas de
384 *Zanthoxylum caribaeum* L. frente a sorotipos de *Salmonella* de origem
385 avícola**. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de
386 Recursos Naturais)- Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em
387 Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste
388 do Paraná Cascavel, 2017.
389

390 SOUZA, J. G. L et al. Composição química e atividade antibacteriana do óleo
391 essencial e extratos vegetais das folhas de *Zanthoxylum caribaeum* Lam.
392 contra sorotipos de *Salmonella*. **Revista Medicina Veterinária Preventiva**, v.
393 18, n. 3, 2017.

394
395 STAHL, B. A revision of *Clavija* (Theophrastaceae). **Revista Opera Botânica**,
396 v. 107, p. 1-77, 1991.

397
398 STAHL, B.; ANDERBERG, A. A. **The families and Genera of Vascular Plants:**
399 **Flowering Plants Dicotyledons Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales,**
400 **Ericales.** Ed. 1. Berlin: Springer, p. 266- 281, 2004.

401
402 STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website 2001.** Disponível
403 em:<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 25 ago.
404 2019.

405
406
407 SUFFREDINI I.B., VARELLA A.D. and YOUNES, R.N., 2007. Minimum
408 inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of three
409 selected antibacterial plant extracts from the Brazilian Amazon Forest and
410 Atlantic Forest. **Journal of the Institute of Health Sciences**, vol. 25, pp. 127-
411 129.

412
413 TOLEDO, A. G. **Avaliação de Compostos Bioativos e Atividades Biológicas**
414 **das Folhas de *Eugenia involucrata* DC.** 2018. 110 f. Dissertação (Mestrado
415 em Conservação e Manejo de Recursos Naturais)- Programa de Pós-
416 Graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais,
417 Universidade estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

418
419 TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação
420 da atividade antioxidante de produtos naturais. In: Encontro Latino Americano
421 de Iniciação Científica e Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 11. 7.,
422 2007,Campinas. **Anais...** Campinas:Universidade do Vale do Paraíba, 2007. p.
423 1963-1967.

424
425 VILELA, E. A. et al. Espécies de matas fluviais com potencial para estudos de
426 revegetação no alto rio Grande, sul de Minas, **Revista Árvore**, v. 17, n. 2, p.
427 117-128, 1993.

428
429 WEBER, L. D. et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant
430 activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb.
431 **Revista African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 9, p. 846-853,
432 2014.

433
434 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **10 Facts on Antimicrobial**
435 **resistance.** 2012. Disponível em:
436 <[http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.](http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.html)
437 [html](http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.html)>. Acesso em: 26 ago. 2019.

438

- 439 XU, Z.; CHANG, L. **Primulaceae**: Identificação e Controle de Ervas Daninhas
440 Comuns. 1. ed. Cingapura: Springer, 2017. 81 p.
441
442
443 ZHONG, X. N. et al. Three flavonoid glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*.
444 **Revista Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 943-946, 1997.
445
446 ZHONG, X. N. et al. Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*.
447 **Revista Phytochemistry**, v. 52, p. 923-927, 1999.

ANEXO 1: Normas da revista capítulo 1



Bioscience Journal
ISSN 1981-3163- Online Journal
Editor in Chief: Prof. Dr. Luiz Renato Paranhos

Focus and Scope

The Bioscience Journal is an interdisciplinary electronic journal that publishes scientific articles in the areas of Agricultural Sciences, Biological Sciences and Health Sciences. Its mission is to disseminate new knowledge while contributing to the development of science in the country and in the world. The journal is published in a continuous flow, in English. The opinions and concepts expressed in the published articles are the sole responsibility of their authors.

Peer Review Process

After receipt of the article through the electronic submission system, it will be read by the Editorial Team, who will check whether the text complies with the Journal's submission guidelines regarding format. The Bioscience Journal has adopted the CrossRef Similarity Check system for identifying plagiarism and any text that has been plagiarized, in whole or in part, will be promptly returned to the author who must justify the similarity and/or rewrite the text, or the article will be promptly rejected. Self-plagiarism will also be monitored.

When the general format of the manuscript is deemed acceptable and fully compliant with the Author Guidelines, and only then, the Editorial Team will submit the article to the Editor-in-Chief, who will firstly evaluate its scope. If the Editor finds that the topic is of interest for publication, he will assign at least two reviewers/referees with expertise in the theme, to evaluate the quality of the

study. Each manuscript will be reviewed by PhDs with recognized expertise in the study area in question. This process will be performed by the Double blind peer review, ensuring absolute confidentiality, both for the identity of the authors and the reviewers. In situations where there is any conflict of interest, the manuscript will be referred to new reviewers.

After a period varying from one to several weeks, the authors will then receive the reviewers' evaluations and will be required to provide all further information requested and the corrections that may be necessary for publication. A certificate of English review made by a company specializing in English proofreading services can be requested if there are misspelling and/or grammatical errors throughout the manuscript. The modified article must be resubmitted accompanied by a letter answering the reviewers' comments, point by point. The modified article and the response letter are presented to the Editorial Team and reviewers, who will verify whether the problems have been resolved adequately. For the article to be published, the same must receive favorable opinions from at least two ad hoc reviewers and from the Associate Editor responsible for its monitoring. The text and the reviewers' final evaluations, along with the response letter, will then be sent to the Editor-in-Chief for a decision.

Open Access Policy

This journal provides immediate open access to its content on the principle that making research freely available to the public supports a greater global exchange of knowledge.

Indexing

Web of Science, Scopus, DOAJ, EBSCO, LILACS, SCI Journal, Latindex, Diadorim, and Google Scholar.

ISSN

ISSN 1981-3163 - Online Journal

Sponsors

- EDUFU

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

- Submissions must be made through the link below, and only submissions that are strictly within the Bioscience Journal's standards will be considered for evaluation:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions>

- The text is justified, typed in Calibri font, size 12, with a 1.0 line spacing and a margin of 2.54 cm.
- Both the citation in the text and in the "References" item follow the ISO 690:2010(E) style adapted.
- Where appropriate, URL/doi for the references are provided.

- All mandatory documents were prepared in accordance with the Author Guidelines available below.
- Figures and tables must be saved and submitted as their own files separate from the main document.
- After review process, a publication fee will be charged to the amount of R\$ 50.00 (fifty reais) per published page of the approved articles to national authors and \$ 50 (fifty US dollars) for foreign authors.
- In the case of article approval, changes in the names of authors and co-authors in the original version won't be allowed under any circumstances.
- All of the items above are basic requirements for the submission of an article and the authors are encouraged to read the Author Guidelines for further instructions.
- If the article does not comply with the Journal's standards, or if the metadata are not filled out correctly, the submission will NOT be considered for review and publication.

Author Guidelines

The Bioscience Journal is an interdisciplinary and open-access electronic journal that publishes scientific articles in a continuous flow in the areas of Agricultural Sciences, Biological Sciences and Health Sciences. Before submitting an article to the Bioscience Journal, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

ARTICLE TYPES

The following types of articles will be accepted: research articles (clinical studies, laboratory studies, cohort studies, case-control studies, ecological studies, and cross-sectional studies), and systematic reviews with or without meta-analysis. Bioscience Journal does NOT accept narrative or critical reviews, case reports, case series, short communications, letters to the Editor, and opinion articles.

REPORTING GUIDELINES

For all manuscripts reporting data from health research, authors must follow the reporting guidelines specific to the type of research: CONSORT for randomized trials, STROBE for observational studies, PRISMA for systematic reviews, STARD for studies of diagnostic accuracy, SRQR for qualitative research, and ARRIVE for animal pre-clinical studies. Authors can consult the reporting guidelines and also other resources relevant to research reporting at the EQUATOR Network website (<https://www.equator-network.org>). A Reporting Guidelines Checklist should be submitted along with the manuscript as a supplementary file in the submission process.

ETHICAL PRINCIPLES

Manuscripts involving research on human beings, animals and systematic reviews are accepted for publication if they have received an identification number from one of their public registration databases and/or if research has been reviewed and approved by an appropriate institutional review board (IRB) or ethics committee. Articles describing clinical trials must provide the protocol registration number in ClinicalTrials.gov (<https://www.clinicaltrials.gov>) and/or REBEC (<https://ensaiosclinicos.gov.br>) and/or the World Health Organization

(<https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform>); the options are stated at <http://www.icmje.org/recommendations/browse/publishing-and-editorial-issues/clinical-trial-registration.html>. Articles describing animal research must provide the protocol registration number in the Animal Research Ethics Committee. Articles describing systematic reviews must provide the protocol registration number in the PROSPERO (<https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>) database. Manuscripts presenting clinical trials, animal research or systematic reviews without registration protocols will be promptly rejected without peer review. State the registry and registry number in the “Material and Methods” and “Ethics Approval” sections. In addition, a Certificate of Ethical Approval for research with human beings or animals should be sent as a supplementary file in the submission process, if applicable. If a recognizable photograph or any potential identifiable material of a patient will be used, a signed Statement of Informed Consent must be sent as a supplementary file in the submission process, for every patient. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

COPYRIGHT STATEMENT

Submitted manuscripts must represent original research not previously published nor being considered for publication elsewhere. The Editors of Bioscience Journal combat plagiarism, double publication, and scientific misconduct with the software CrossCheck (<https://www.crossref.org/services/similarity-check/>) powered by iThenticate (<https://www.ithenticate.com>). Your manuscript may be subject to an investigation and retraction if plagiarism is suspected. Upon publication of an article, all rights are held by the publishers, including the rights to reproduce all or part of any publication. The reproduction of articles or illustrations without prior consent from the publisher is prohibited.

All manuscripts must be submitted with a Copyright Form ([download here](#)) signed by all authors. The form must contain the following three essential items relating to the manuscript:

- (1) a statement of responsibility, whereby the authors declare responsibility for the content of the manuscript and agree to disclose all sources of funding and declare all potential conflicts of interest. Authors must also ensure that the article is original and is not under consideration by any other journal.
- (2) a copyright statement, whereby the authors declare that, in the case of acceptance of the manuscript, the Bioscience Journal shall be the owner of the copyrights relating to same, which will become the sole property of the Journal.
- (3) a statement of ethics, whereby the authors declare that the study protocol has received an identification number from a public registration database (in the case of articles describing clinical trials and systematic reviews) and/or was endorsed by an institutional review board (IRB) or ethics committee (in the case of research with human beings or animals).

GENERAL GUIDELINES

- Only original and unpublished articles, written in English, will be accepted.
- The article must not be under evaluation for publication by another journal.

- The article must be submitted correctly to one of the following corresponding areas: Agricultural Sciences, Biological Sciences and Health Sciences.
- Cover Letter is mandatory and should contain information about the manuscript relevance, the main findings, and also its suitability within the scope of the Bioscience Journal.
- Authors are responsible for all opinions, results and conclusions contained in articles.
- All accepted articles become the property of Bioscience Journal, and their subsequent publication in other media is NOT allowed.
- In the case of article approval, changes in the names of authors and co-authors in the original version won't be allowed under any circumstances.
- Submissions must be made through the link:
<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions>
- Consult the "SUBMISSION CHECKLIST" section of this guideline to ensure that you are ready to submit your manuscript.
- A publication fee will be charged to the amount of R\$ 50.00 (fifty reais) per published (formatted) page of the approved articles to national authors and \$ 50 (fifty US dollars) for foreign authors (form of payment will be informed later). The Bioscience Journal does NOT charge a fee for submitting articles.

MANUSCRIPT FORMAT

All documents should be created using Microsoft Word. The text should be justified, typed in Calibri font, font size 12, with a 1.0 line spacing and a margin of 2.54 cm throughout the entire document.

Title Page

- Title Page: must list the article title (up to 35 words and should mention the study design), the author's full name, ORCID identification number (as obtained from orcid.org), institutional affiliation, and the corresponding author's e-mail address. Institutional affiliation must contain the department (if professor or undergraduate student) or name of the postgraduate program (if postgraduate student) or private clinic for example (if you have no institutional affiliation), followed by full name of the institution (do not include the acronym or abbreviation of the institution's name), city, state, and country. Do not include the degree/title of the authors.
- Acknowledgments: grants and any other financial support for the study should be acknowledged, always with the funding agency name, and with the protocol number whenever possible. Donation of materials used in the research can and should be acknowledged too. This section should also be used to acknowledge any other contributions from individuals or professionals who have helped in producing or reviewing the study, and whose contributions to the publication do not constitute authorship.
- Authors' Contributions: the Bioscience Journal supports the position taken by the ICMJE (<http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>) regarding authorship. Each author must have made at least one of the following contributions to the completion of the manuscript: 1) conception and design, 2) acquisition of data, 3) analysis and interpretation of data, 4) drafting the article, 5) critical review of important intellectual content. In addition, all authors must

have made the following contribution: 6) final approval of the version to be published. A Declaration of Authorship Contributions signed by all authors must be sent as a supplementary file in the submission process.

- **Ethics Approval:** manuscripts involving research on human beings, animals and systematic reviews should state the public registration database and/or the institutional review board (IRB) or ethics committee and the registry number in this section (see the “ETHICAL PRINCIPLES” section). In addition, a Certificate of Ethical Approval for research with human beings or animals should be sent as a supplementary file in the submission process, if applicable.
- **Conflicts of Interest:** the Bioscience Journal supports the position taken by the ICMJE (<http://www.icmje.org/about-icmje/faqs/conflict-of-interest-disclosure-forms/>) regarding potential conflicts of interest. In this section, authors are required to describe any financial or non-financial conflicts of interest that may exist regarding the research or the publication of the article. A conflict of interest exists if authors or their institutions have financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their actions. Types of conflicts include: consulting, royalties, research support, institutional support, ownership, stock/options, speakers bureau, and fellowship support. Any commercial entity whose products are described, reviewed, evaluated, or compared in the manuscript, except for those disclosed in the Acknowledgments section, are potential conflicts. If there are no conflicts of interest, authors should state that. Failure to disclose any conflicts of interest is a form of misconduct. The existence and declaration of conflicts of interest is not an impediment to publication at all. Each author must download the Conflicts of Interest Form (<http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>), save it, fill it out and send it as a supplementary file in the submission process.

Main Document

- **Title:** must contain the article title with up to 35 words and should mention the study design.
- **Abstract:** must contain an unstructured text with up to 250 words including objectives, methods, results and conclusions. References and credits to suppliers and manufacturers of products or equipment must NOT be cited in this section.
- **Keywords:** must have three to six MeSH or DeCS terms that the authors think express the main article themes, in alphabetical order, separated by a period and starting with a capital letter. These keywords should be different from the words already used in the title and abstract, so that to improve the discoverability of the article by readers doing a search in PubMed or other databases. Please, check your keywords at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> and/or <https://decs.bvsalud.org>
- **Main Text:** must contain Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusions. Please, do NOT combine the topics of Results and Discussion, they must always be presented separately. Abbreviations and acronyms should be avoided and when necessary they should be defined the first time they are used in the text. Credit suppliers and manufacturers of equipment, drugs, and other brand-name material mentioned in the manuscript within parentheses, giving the company name and primary location (city and country). The authors can and should use short subheadings, especially those

concerning the reporting guideline items. As needed, use italic, superscript and subscript, but do NOT use boldface. Do NOT insert page or section breaks.

- Figures and Tables: must be sent separately from the main document, marked by their order number in Arabic numerals. A maximum of 6 figures/tables may be included in each document. Use TIFF or JPG format for figures (black-and-white or color art) with a minimum resolution of 300 dpi and maximum width of 16 cm. In the case of a figure with multiple graphs or photographs, they must be identified by capital letters in the upper left corner. Create tables using the Table function in Microsoft Word and save each one in a separate file. All the figures and tables must be cited in the text. Data given in tables should be commented on but not repeated in the text. A short descriptive title must be provided for each figure/table. All information contained inside the figures and tables must be in Calibri font, font size 12, line spacing 1.0. Figures and tables already published are NOT accepted, even if legal authorization has been obtained; they must have been prepared by the authors themselves.

- References: the Bioscience Journal uses the ISO 690:2010(E) style adapted. The authors should list up to 40 (research articles) or 60 references (systematic reviews), and at least 70% of them must be from the last five years. Bioscience Journal does NOT accept references of theses, dissertations, monographs, and conference abstracts. Authors should also avoid books and book chapters. Follow the instructions and examples below for the format and/or at <https://dominiodelasciencias.com/ojs/documentos/ISO690-2010.pdf> for further instructions.

CITATION IN TEXT

The citation must be presented in author-data format between parentheses before periods/full stops or commas in sentences. All authors must be listed if there are up to and including two authors, as in the following example: (Santos and Cunha 2015); for works with three or more authors, the first author must be cited, followed by the expression "et al.", as in the example: (Silva et al. 2012). If the authors' name occurs naturally in the text, the year follows in parentheses. In citations to particular parts of an information resource, the location of that part (e.g. page number) may be given after the year within the parentheses. If two or more information resources have the same author and year, they are distinguished by lower-case letters (a, b, c, etc.), following the year within the parentheses.

Example: The notion of an invisible college has been explored in the sciences (Crane 1972). Its absence among historians is noted by Stieg (1981b, p. 556). It may be, as Burchard (1965) points out, that they have no assistants, or are reluctant to delegate (Smith 1980; Chapman 1981).

CITATION IN LIST OF REFERENCES

All references must be ordered alphabetically and the authors must be listed if there are up to three authors; if there are four or more, the first author must be cited, followed by the expression "et al." At the end of each reference, please insert the "DOI" number if available. For this, authors must search the metadata for references on the Crossref website (<https://doi.crossref.org/simpleTextQuery>) and copy the DOI whenever available.

Citing an online journal article

Structure: AUTHORS, INITIALS. Title of the article. Journal Title. Year, Vol.(No.), series of pages. Available from: URL or doi

Example: GUNERHAN, H., HEPBASLI, A. and GIRESUNLU, U. Environmental impacts from the solar energy systems. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*. 2008, 31(2), 131-138. <https://doi.org/10.1080/15567030701512733>

Citing a printed journal article

Structure: AUTHORS, INITIALS. Title of the article. Journal Title. Year, Vol.(No.), series of pages. ISSN.

Example: AHMED, M. and BOISVERT, C.M. Using computers as visual aids to enhance communication in therapy. *Computers in Human Behavior*. 2006, 22(5), 847-855. ISSN 0747-5632.

Citing a chapter in a book

Structure: AUTHORS, INITIALS., Year. Title of the chapter. In: Editors, eds. Title of the book, Place of publication: Publisher, pp. series of pages.

Example: CARDOSO, H.L. and OLIVEIRA, R., 2005. Virtual enterprise normative framework within electronic institutions. In: M-P. GLEIZES, A. OMICINI and F. ZAMBONELLI, eds. *Engineering societies in the agents world V*, Heidelberg: Springer, pp. 14-32.

Citing a book

Structure: AUTHORS, INITIALS. Title of the book. Edition. Place of publication: Publisher, Year.

Example: SOMMERVILLE, I. *Software engineering*. 9th ed. Boston: Pearson, 2011.

Citing a chapter in an e-book

Structure: AUTHORS, INITIALS., Year. Title of the chapter. In: Editors, eds. Title of the e-book, Place of publication: Publisher, pp. series of pages. Available from: URL or doi

Example: STACHOWIAK, G.W. and BATCHELOR, A.W., 2014. Computational hydrodynamics. In: G.W. STACHOWIAK and A.W. BATCHELOR, eds. *Engineering tribology*, Amsterdam: Elsevier, pp. 211-265. Available from: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpETE00005/engineering-tribology/engineering-tribology>

Citing an e-book

Structure: AUTHORS, INITIALS. Title of the e-book. Edition. Place of publication: Publisher, Year. Available from: URL or doi

Example: WATTON, J. *Fundamentals of fluid power control*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. Available from: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFFPC0002/fundamentals-fluid-power/fundamentals-fluid-power>

DOCUMENTS CHECKLIST

- Cover Letter to the Editor signed by the corresponding author (see the "GENERAL GUIDELINES" section).
- Title Page containing the Title Page, and the items Acknowledgments, Authors' Contributions, Ethics Approval, and Conflicts of Interest (see the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- Main Document containing the article Title, Abstract, Keywords, Main Text, and References (see the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- Figures (see the "Figures and Tables" item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).

- Tables (see the “Figures and Tables” item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- Copyright Form signed by all authors (see the "COPYRIGHT STATEMENT" section).
- Declaration of Authorship Contributions (see the “Authors' Contributions” item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- Conflicts of Interest Form (see the “Conflicts of Interest” item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- Reporting Guidelines Checklist, if applicable (see the "REPORTING GUIDELINES" section).
- Certificate of Ethical Approval, if applicable (see the "ETHICAL PRINCIPLES" section and the “Ethics Approval” item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- Statement of Informed Consent, if applicable (see the "ETHICAL PRINCIPLES" section).

PEER REVIEW POLICY AND PROCEDURES

After receipt of the article through the electronic submission system, it will be read by the Editorial Team, who will check whether the text complies with the Journal's submission guidelines regarding format. The Bioscience Journal has adopted the CrossRef Similarity Check system for identifying plagiarism and any text that has been plagiarized, in whole or in part, will be promptly returned to the author who must justify the similarity and/or rewrite the text, or the article will be promptly rejected. Self-plagiarism will also be monitored.

When the general format of the manuscript is deemed acceptable and fully compliant with the submission guidelines, and only then, the Editorial Team will submit the article to the Editor-in-Chief, who will firstly evaluate its scope. If the Editor finds that the topic is of interest for publication, he will assign at least two reviewers/referees with expertise in the theme, to evaluate the quality of the study. After a period varying from one to several weeks, the authors will then receive the reviewers' evaluations and will be required to provide all further information requested and the corrections that may be necessary for publication. A certificate of English review made by a company specializing in English proofreading services can be requested if there are misspelling and/or grammatical errors throughout the manuscript.

The modified article must be resubmitted accompanied by a letter answering the reviewers' comments, point by point. The modified article and the response letter are presented to the Editorial Team and reviewers, who will verify whether the problems have been resolved adequately. The text and the reviewers' final evaluations, along with the response letter, will then be sent to the Editor-in-Chief for a decision.

PRODUCTION PROCEDURE

Manuscripts that are found to be suitable for publication through their scientific merit will be considered "provisionally accepted". At this stage, the authors will receive a Template for formatting the manuscript in the style of publication of the Bioscience Journal. Only after sending the article in the format of this Template, the manuscript will be considered "definitely accepted". The Editorial Team will then provide page proofs for the authors to review and approve. The Journal reserves the right to make changes as to rules, spelling and grammar in

the original, in order to maintain the standard patterns of the language, while respecting the style of the authors. The final proofs will be sent to the authors, together with the payment slip for publication. All authors should review and approve the proof, although the Journal asks the corresponding author to give final approval. No reprints will be provided. The articles will be available for printing in PDF format on the Journal website.

Copyright Notice

The Bioscience Journal uses the Creative Commons license (CC), thus preserving the integrity of the articles in an open access environment.

Privacy Statement

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

ANEXO 2: Normas da revista capítulo 2



Brazilian Journal of Biology

Editor in Chief: Takako Matsumura Tundisi (Brazil)

ISSN: 1519-6984

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Purpose and General Standards

The Brazilian Journal of Biology® is a scientific journal devoted to publishing original articles in all fields of the Biological Sciences, i.e., General Biology, Cell Biology, Evolution, Biological Oceanography, Taxonomy, Geographic Distribution, Limnology, Aquatic Biology, Botany, Zoology, Genetics, and Ecology. Priority is given to papers presenting results of research in the Neotropical region. Material published includes research papers, review papers (upon approval of the Editorial Board), notes, book reviews, and comments.

Editorial Policy

The Journal, which issues four numbers a year (February, May, August, and November), publishes papers only in English with an included abstract in Portuguese. Original manuscripts should be sent to the Editor-in-Chief or any of the Editorial Board members. Those submitted and authored by more than one author should present the agreement of the co-authors.

Papers should comply with the instructions listed below.

(Otherwise they will be sent back to the authors for reformulation.) After being checked for presentation and style, they will then be evaluated by the advisors, i.e., specialists analyzing for originality, scientific quality, and relevance. Approved papers are sent to outside referees. The Editorial Board decides for acceptance or rejection on the basis of critiques submitted by the referees. The Brazilian Journal of Biology® strives to publish the papers within 6-8 months after acceptance, so that prompt return of proofs by the authors and revised papers by the referees is urged.

Rejected originals will not be returned to the authors.

Articles accepted for publication become property of the journal.

Intellectual property

All content of the journal, except where identified, is licensed under a Creative Commons attribution-type CC-BY.

Preparation of Manuscripts

They should be typewritten, neat, and free of errors or with clear handwritten corrections. They should be double-spaced, source: Time New Roman, size 12 with a margin of 3 cm and 2 cm left to right, justified alignment and typed on one side of A4 paper (white and of good quality).

The contents of the manuscript should be organized in the following sequence on the front page: Title, Name(s) of author(s), Institution with address, Number of figures, and Running title. The second page must contain: Abstract with Keywords (maximum, 5) and the Resumo in Portuguese with Palavras-chave (5). The items on subsequent pages are: Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, and Acknowledgments. References should be listed, starting on a separate page, after the conclusion of the manuscript. The paper should be as free as possible of footnotes.

ATTENTION: ALL AUTHORS SHOULD REPORT THE ORCID, INCLUDE THEM IN THE ARCHIVE FILE.

The following information should accompany all species cited in the article:

for zoology, the author's name and the publication date of the original description should be given the first time the species is cited in the work;

for botany and ecology, only the name of the author who made the description should be given the first time the species is cited in the work.

Manuscripts can be submitted on-line to the following address:
www.scielo.br/bjb

Tables and Figures

Tables should be numbered by Arabic numerals; descriptive legend should appear at the top. Figures should be numbered in the preceding way. Figure captions should be grouped on a separate sheet of paper. Do not type captions on the figures themselves.

Tables and Figures must be presented individually on separate sheets of white paper.

Original figures should be submitted on good quality paper with drawings in black ink and clear lettering, designed as to remain readable after reduction, on scales and graphs. References in the text to figures and tables should be indicated as in these two examples: (see Figure 1) or (as shown in Table 2). Photo- and electron micrographs should have scales.

Color photographs will not be accepted, unless the author agrees to pay for additional cost.

Units, Symbols, and Abbreviations

Only standard international units are acceptable. Authors are urged to comply with the rules for biological nomenclature.

References:

In-text citation: Use the name and year of publication, e.g., Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar and Rocha, 2000); Zaluar and Rocha (2000). Use “et al.” for more than two authors.

Citations in the reference list shall be in compliance with the ISO 690/2010 norm.

In the text, the author-date system shall be used for citations (only what is strictly necessary), using “and” for the case of two authors. References, which should be typed on a separate sheet, must appear in alphabetical order. References to journal articles shall include the name(s) and initial(s) of the author(s), year, title in full, journal name (in full and in italics), volume, number, and first and last pages. References to books and monographs shall include the publisher and, depending on the citation, refer to the book chapter. The name(s) of the organizer(s) of the collection shall also be mentioned; for example:

Book:

LOMINADZE, D.G., 1981. Cyclotron waves in plasma. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. 206 p. International series in natural philosophy, no. 3.

Book chapter:

WRIGLEY, E.A., 1968. Parish registers and the historian. In: D. J. STEEL, ed. National index of parish registers. London: Society of Genealogists, pp. 15-167.

Journal article:

CYRINO, J.E. and MULVANEY, D.R., 1999. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells–BB line. *Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 517-525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000300017>. PMID: 10765463.

Dissertation or thesis:

LIMA, P.R.S., 2004. Dinâmica populacional da Serra Scomberomorus brasiliensis (Osteichthyes; Scombridae), no litoral ocidental do Maranhã-Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 45 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Work presented at an event:

RANDALL, D.J., HUNG, C.Y. and POON, W.L., 2004. Response of aquatic vertebrates to hypoxia. In: Proceedings of the Eighth International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality, October 12-14, Chongqing, China. Athens, Georgia, USA: EPA, 2006, pp. 1-10.

Available online reference:

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA, 2013 [viewed 4 February 2013]. Hidro Web: Sistema de Informações hidrológicas [online]. Available from: <http://hidroweb.ana.gov.br/>

Final Recommendations

Papers should not exceed 25 typewritten pages including figures, tables, and references. Figures and Tables should be kept to the minimum necessary, and have a maximum of 30 cm in height by 25 cm in width. Each table or figure should appear on a separate sheet. Before sending a manuscript to the Brazilian Journal of Biology®, proofread the final version very thoroughly and correct any remaining errors.

Notes and Comments should not exceed 4 typewritten pages including figures, tables, and references.