

Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*

Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho^a

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Brasil

* Autor correspondente (astronomoamadorgoias@gmail.com)

INFO

Keywords

Protium
protective activity
antifungal activity
antibacterial activity

ABSTRACT

Phytochemical evaluation and biological activities of the exocarp extract from the fruit of Protium spruceanum. Protium spruceanum known as “breu branco” is a medicinal plant species. The aim of this study was to evaluate the hydroethanolic extract of the exocarp of the mature fruit of *Protium spruceanum* regarding its phytochemical groups and biological activities. The fruits were collected and the extract produced by static maceration in a 70% hydroethanol solution. The analyzes carried out were for organoleptic, physicochemical, regarding the yield of the extract obtained, relative density, pH, refractive index and optical rotation, and for biological assays, the extract was tested for photoprotection activity in UV-Vis, antifungal activity on *Candida* and antibacterial on *Staphylococcus*, *Salmonella* and *Escherichia* by disk assay (mm). The extract was light brown and aromatic. Qualitative phytochemical screening revealed the presence of organic acids, reducing sugars, phenols, purines, catechins and double olefins. The yield was 16.99%, relative density 0.965 g mL⁻¹, pH 5.26, refractive index 1.3987 n_D and optical rotation -99.8°. In photoprotection activity, the extract exhibited activity at UVC wavelength. In the antifungal activity, potential inhibition was obtained for *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* and for antibacterial inhibition for strains of *S. aureus*, *E. coli* and *S. serovar* Enteritidis. The exocarp extract of the ripe fruit of *Protium spruceanum* showed a potential biological effect.

RESUMO

Protium spruceanum conhecido por “breu branco” é uma espécie vegetal medicinal. O estudo teve por objetivo, avaliar o extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* quanto aos grupos fitoquímicos e atividades biológicas. Os frutos foram coletados e o extrato produzido por maceração estática em solução hidroetanólica 70%. As análises realizadas foram para organolépticas, físico-químicas quanto ao rendimento de extrato obtido, densidade relativa, pH, índice de refração e giro óptico, e para os ensaios biológicos, o extrato foi testado para atividade de fotoproteção em UV-Vis, atividade antifúngica sobre *Candida* e antibacteriana sobre *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Escherichia* pelo ensaio em disco (mm). O extrato apresentou coloração castanho claro e aromático. A prospecção fitoquímica qualitativa revelou a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, purinas, catequinas e duplas olefinas. O rendimento foi de 16,99%, densidade relativa de 0,965 g mL⁻¹, pH 5,26, índice de refração 1,3987 n_D e giro óptico de -99,8°. Na atividade de fotoproteção, o extrato exibiu atividade no comprimento de ondas UVC. Na atividade antifúngica, foi obtido potencial inibição para *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* e para antibacteriano inibição para cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *S. sorovar* Enteritidis. O extrato do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* demonstrou potencial efeito biológico.

Palavras-chaves

Protium
atividade fotoprotetora
atividade antifúngica
atividade antibacteriana

Received 22 January 2021; Received in revised from 19 March 2021; Accepted 28 February 2022

INTRODUÇÃO

A família Burseraceae é composta por 19 gêneros e aproximadamente 700 espécies amplamente distribuídas nos trópicos (295 espécies em 8 gêneros) e subtropicais nas (Américas (Central e do Sul) e África), e em menor quantidade em áreas temperadas quentes, sendo Burseraceae uma das maiores do mundo (Lima et al., 2014; Sri Rama Murthy et al., 2016; Rosalem et al., 2017). No Brasil, os gêneros encontrados nos diversos biomas e domínio Cerrado são, *Protium* Burm. f., *Bursera* Jacq. ex L., *Tetragastris* Gaertn., *Crepidospermum* Hook. F., *Dacryodes* Vahl e *Trattinnickia* Willd conforme Vieira et al. (2010) e Lima et al. (2014).

Vários táxons do gênero *Protium* são empregados na medicina popular, onde as resinas, óleos essenciais e extratos de diversas partes do vegetal, apresentam inúmeras classes de fitocompostos com potencial comprovado para uso medicinal. Estudos reportam para *P. decandrum*, *P. altsonii*, *P. strumosum*, *P. ovatum*, e *P. spruceanum* importantes atividades biológicas (Silva et al., 2013). As diversas espécies de *Protium* apresentam exsudato branco ou preto extraído principalmente das partes aéreas e das raízes superficiais. Esse exsudato é comercializado em mercados de produtos naturais e em lojas especializadas em produtos fitoterápicos. Sabe-se que, a composição desse exsudato apresenta atividades biológicas com ação antimicrobiana, antioxidante, analgésica, antiinflamatória, antitussígena, antitumoral e edematogênica (Siani et al., 1999; Bandeira et al., 2006; Rüdiger et al., 2007; Camargo et al., 2010; Rosalem et al., 2017; Amparo et al., 2019), bem como no tratamento da pneumonia, tuberculose e gonorréia (Corrêa, 1926; Costa, 1994; Amparo et al., 2018; Aranaga et al., 2020).

Popularmente o gênero *Protium* é conhecido por “almecegueira, breu branco, breu preto, pau-de-breu e resina mesca”. Uma das espécies de com maior distribuição nos ambientes naturais, é a *P. spruceanum* encontrada com abundância nas regiões Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado

brasileiro. Em si, um indivíduo de *P. spruceanum* pode alcançar até 20 m de altura; copa densa e arredondada, formando dossel; com tronco reto cilíndrico, com casca rugosa e delgada entre 25-40 cm de diâmetro; folhas compostas, pinadas, alternas; folíolos subcoriáceos entre 3-5, descoloridos, glabros na face superior e pubescentes na face inferior; inflorescências em panículas ramosas axilares com 2-3 cm de comprimento, frutos elipsóides entre 2-3 valvas avermelhadas (Brasil et al., 2018), sendo conhecida entre a população por “breu branco, breu ou almecega-de-casca-lisa” devido a coloração natural esbranquiçada do exsudato aromático produzido nas raízes, tronco, galhos e frutos, sendo utilizado no tratamento de dores estomacais, dores de cabeça e de dente, bem como em processos gripais (Machado et al., 2003; Zoghbi et al., 2005).

Os extratos foliares são utilizados em processos inflamatórios na presença de febre, antinociceptivo e antiedematogênico, sendo estas atividades atribuídas a presença de α - e β -amirinas (Rodrigues et al., 2013; Amparo et al., 2018; Figueiredo et al., 2019), e os frutos, servem de alimento para a fauna como: tucanos, jabutis e tartarugas e ajudam também no processo de digestão desses animais (Machado et al., 2003; Rodrigues et al., 2013).

Como observado, *P. spruceanum* apresenta diversos estudos bem diversificados quanto as atividades biológicas e constituintes fitoquímicos ativos. No entanto, essa espécie ainda apresenta várias possibilidades de estudos de caracterização, bem como, ensaios *in vitro* e *ex vitro*, principalmente para uso farmacológico.

Este estudo teve por objetivo, avaliar o extrato do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* (Figura 1), sobre os grupos fitoquímicos, características físico-químicas e atividades biológicas nos ensaios de fotoproteção, antifúngica sobre o gênero *Candida* e antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sorovar* Tiphymurium, *Salmonella sorovar* Enteritidis e *Escherichia coli*.



Figura 1 - Indivíduo de *Protium spruceanum* em período de frutificação e no canto inferior esquerdo o extrato hidroetanólico

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação do vegetal e coleta dos frutos

Frutos maduros (1 kg) foram coletados em 20 indivíduos de *P. spruceanum* adultos localizados em uma propriedade rural no município de Rio Verde, Goiás, Brasil, com a seguinte localização geográfica (17°42'59.5''S e 50°53'27.7''W), apresentando altura média de 748 m, tipo de solo distroférico, clima com duas estações bem definidas: seca (Maio a Outubro) e chuvosa (Novembro a Abril). A espécie foi identificada através de chave dicotômica para o gênero *Protium* pelo Biólogo Msc^o. Wendel Cruvinel, e uma exsicata foi herborizada e depositada no Herbário do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, localizado no laboratório de Sistemática Vegetal com o seguinte *Voucher* (HRV: 15954).

Produção do extrato

O exocarpo foi retirado do fruto utilizando uma faca inox. As sementes foram descartadas. Um total de 500 g de exocarpo teve sua massa determinada em balança analítica digital. E em seguida, o material foi transferido para um processador de alimentos contendo 1 L de uma solução hidroetanólica 70% (v/v) onde foi processado por 5 min. Após esse tempo, a solução foi transferida para um frasco de vidro âmbar onde ficou sob maceração estática por 8 dias, em sala livre de luz e calor. Após esse período, foi adicionado 100 mL de acetona (P.A – ACS) (Neon), permanecendo por mais 2 dias.

A solução foi então filtrada em papel de filtro qualitativo faixa azul (Unifil, C-42), e o sobrenadante coletado em balão de fundo redondo de 2 L. Em seguida, o balão foi transferido para rotaevaporador rotativo com pressão reduzida para concentração do extrato. Após redução, o extrato foi transferido para freezer a $-12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e logo em seguida, transferido para liofilizador até massa constante. O extrato liofilizado foi mantido em frasco de vidro âmbar mantido em freezer a $-10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análises.

Análises físico-químicas

As características organolépticas para cor, aroma, limpidez e homogeneidade foram obtidas por método qualitativo. O rendimento de extrato foi determinado conforme descrito por Rodrigues et al. (2011) através da equação $R(\%) = (Pex/Pexo) \cdot 100$. Onde: $R(\%)$ = rendimento de extrato em percentagem; Pex = massa do extrato seco; $Pexofruto$ = massa exocarpo *in natura* (g). A densidade relativa foi realizada em proveta

graduada de 10 mL a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o resultado expresso em g mL^{-1} .

A massa do extrato hidroetanólico bruto foi então obtida em balança analítica digital, e o resultado expresso em g mL^{-1} a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ conforme proposto por Menezes Filho et al. (2020). O pH foi obtido em pHmetro digital de bancada (Lucadena, Mod. Luca-210), a partir de 50 mL o extrato bruto. Para determinação do índice de refração, foi necessário 1 mL do extrato bruto adicionado em refratrômetro digital (Hanna Instruments, Mod. HI96800) com faixa de refração entre 1,3330 a 1,5080, resolução de 0,0001 a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. O giro óptico foi determinado em polarímetro (Novainstruments, Mod. WXG-4) com faixa de aferição entre -180° e $+180^{\circ}$ na escala Vernier conforme descrito por Menezes Filho et al. (2020), a partir de solução hidroetanólica conc. 10% (m/v) do extrato e transferida para uma célula de 10 mL.

Prospecção fitoquímica qualitativa

A determinação qualitativa para as classes fitoquímicas de glicosídeos cardíacos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, açúcares redutores e não redutores, ácidos orgânicos, cumarinas, saponinas espumílica e hemolítica, polissacarídeos, fenóis, flavonoides, purinas, resinas, catequinas, depsídeos e depsídonas, esteroides e triterpenoides, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, duplas olefínicas e tempo de oxidação foram realizados conforme descrito por Bessa et al. (2013).

Atividade fotoprotetora pelo método de varredura no comprimento de ondas crítico UV-Vis

Uma varredura foi realizada no comprimento de ondas crítico entre 400-240 nm, utilizando espectrofotômetro UV-Vis (Belphotonics, Mod. M-51) e cubeta de quartzo de campo único de 1 cm. O resultado foi analisado onde gerou-se uma imagem (Figura 3) da varredura através do programa UV Professional 2.

Ensaio antifúngico sobre *Candida*

O ensaio antifúngico avaliando o extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto de *P. spruceanum*, foi realizado através do método de difusão em disco de papel, conforme descrito por Menezes et al. (2009) adaptado. As cepas fúngicas utilizadas foram: *Candida tropicalis* (ATCC 4563), *Candida guilliermondii* (ATCC 56822), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida krusei* (ATCC 34135) mantidas em meio sólido batata dextrose e ágar (BDA) (Kasvi). As cepas foram então

repicadas em solução caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Sigma Aldrich), e em seguida, incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 horas em estufa bacteriológica.

Inicialmente, foi preparado um inóculo com 100 μL a partir de uma suspensão fúngica em diluição a 10^6 mL^{-1} de células, padronizado conforme a escala de McFarland com turbidez de 0,5 sendo realizado em espectrofotômetro UV-Vis (Belphotonics, Mod. M-51) e densidade óptica em 530 nm, utilizando cubeta de vidro de 5 mL. A solução fúngica foi dispersa homogeneamente pela técnica de esgotamento em placa de *Petri* de 10 cm, contendo meio BDA.

Diferentes concentrações do extrato nas conc. 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 mg mL^{-1} (m/v) foram previamente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (P.A – ACS) (Vetec). Discos de papel de filtro qualitativo com diâmetro de 6 mm foram embebidos com 25 μL de cada concentração de extrato. Logo após, os discos foram adicionados sobre o ágar contendo a solução fúngica e o sistema foi mantido em incubadora bacteriológica a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. O acompanhamento do ensaio fúngico foi realizado diariamente, conforme descrito por Gonzalez Hernandez et al. (2020) adaptado.

Foi considerado o halo de inibição igual ou superior à 8 mm de diâmetro. Como controle negativo foi utilizado DMSO, e como controle positivo solução aquosa esterilizada 10 mL contendo o princípio ativo Cetoconazol (Crovell, P.A – ACS, 99%) na conc. de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (v/m).

Ensaio antibacteriano sobre Staphylococcus aureus, Salmonella sorovar Typhimurium, Salmonella sorovar Enteritidis e Escherichia coli

O ensaio antibacteriano foi realizado conforme descrito por Fernández et al. (2017) adaptado. Foram utilizadas culturas de bactérias dos gêneros *Staphylococcus aureus* (ATCC 9891), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). As bactérias foram doadas pelo banco genético de microorganismos da Universidade Federal de Goiás – UFG, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil. Inicialmente, as colônias foram suspensas em 50 mL de uma solução aquosa de caldo peptona bacteriológico (PB) (Kasvi) em frasco *Erlenmeyer* de 125 mL esterilizado. Em seguida, os frascos contendo o suspenso bacteriano foi mantido na temperatura de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 h em incubadora bacteriológica (SolidSteel, Mod. SSD). Após a fase crescimento, alíquotas de 5 mL foram coletadas e distribuídas em placas de *Petri* contendo meio sólido Ágar Contagem de Placas (ACP) (Kasvi)

esterilizado. Após esse procedimento, as placas foram homogeneizadas com auxílio de uma alça de *Drigalski* e incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

Após esse tempo, foram selecionadas e transferidas cinco colônias com auxílio de uma alça de platina para *Erlenmeyers* de 125 mL contendo 50 mL de caldo PB. Após esse procedimento, os frascos foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por ~36 horas com agitação orbital a 100 rpm, até obtenção de turbidez adequada conforme escala 0.5 de McFarland. Após determinação da turbidez ideal, entre $1\text{-}2 \times 10^8\text{ UFC mL}^{-1}$, uma alíquota de 5 mL foi coletada e transferida para placas de *Petri* contendo meio ACP. Em seguida, a solução foi homogeneizada com auxílio de uma alça de *Drigalski*.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em poços. Na placa de *Petri* foram realizados pequenos poços com 9 mm de diâmetro na superfície do meio. Em cada placa, foram realizados 4 poços onde foi aplicado 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o 1º poço: Ciprofloxacina 500 mg mL^{-1} (La Santé), como controle positivo, no 2º poço: Azitromicina 500 mg mL^{-1} (Eurofarma), como controle positivo, no 3º poço: solução hidroetanólica como controle negativo, e no 4º poço: extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *P. spruceanum* nas concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 mg mL^{-1} (m/v). Os controles positivos foram diluídos em 100 mL de água destilada estéril conc. 500 mg mL^{-1} .

Após a aplicação, as placas foram mantidas por 30 minutos em câmara de fluxo laminar a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida, incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas. Após este período, a mensuração foi realizada utilizando paquímetro digital (Digimess, Mod. 100.174NL), com resolução de 0,01 mm/.0005” e erro de 0,001 mm. Foi considerado o halo de inibição igual ou superior à 8 mm de diâmetro.

Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata seguido de \pm desvio padrão. Para determinação da diferença estatística entre o antifúngico e os agentes antibacterianos de referências, e as concentrações do extrato hidroetanólico 70%, foi utilizado teste de Duncan com significância ($p < 5\%$). O programa estatístico utilizado foi o IBM SPSS (Statistic 26).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato apresentou coloração castanho claro, aromático, límpido e homogêneo, com rendimento de $16,99\% \pm 1,54$, densidade relativa foi de 0,96569

$\pm 0,01 \text{ g mL}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,26 \pm 0,02$, índice de refração = $1,3987 \pm 0,04 \text{ n}_D$ $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e giro óptico de $-99,8^\circ$.

Os métodos qualitativos para fitoquímica é uma importante ferramenta preliminar onde possibilita *screening* inicial de baixo custo, especialmente quando se desconhece o perfil químico de um vegetal. O extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto de *P. spruceanum* apresentou resultados positivos para um grande número de fitomoléculas (Tabela 1).

Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Protium* reportam a presença de esteróides, terpenos (mono e triterpenos), cumarinas, ligninas, fenilpropanóides e flavonóides (Magalhães et al., 2006; Adfa et al., 2013) corroborando com esse estudo. Ainda são escassos os estudos com extratos do fruto de *P. spruceanum* na literatura, embora observa-se um grande número de trabalhos com folhas, galhos e resina como relatado por Figueiredo et al. (2019) em que avaliaram os extratos etanólico e aceto-etílico foliar quanto aos fitocompostos, moléculas de glicerol, ácido hexadecanóico, galactopiranosose, inositol, ácido oléico, catequina que foram observados em ambos os extratos. Fitomoléculas não compartilhadas foram ácido piroglutâmico, ácido 2-aminoeptanodióico, ácido ribônico, talose, A- β -glucopiranosídeo para o extrato etanólico, e β -Amirina para o extrato aceto-etílico foliar. Amparo et al. (2019) também encontraram um grande número de moléculas nos grupos dos taninos (procianidina B) e seis flavonóides (catequina, isoquercetina, quercetina-3-*O*-glucuronídeo, rutina, quercitrina e kaempferol-3-*O*-ramnosídeo) nos extratos hidrometanólicos das folhas e galhos finos de *P. spruceanum*.

Alguns desses constituintes presentes no extrato de *P. spruceanum* podem responder

majoritariamente por inúmeras atividades biológicas, embora sua ação seja normalmente através de conjugações em determinada bioatividade. Por exemplo: ácidos orgânicos, apresentam ação antibacteriana principalmente para o grupo de bactérias gram-negativas e ação fungistática devido ao baixo pH (Duarte et al., 2014); açúcares redutores atuam no sistema nervoso central (SNC) e musculoesquelético suprindo de energia e agindo também como gastoprotetor (Menezes Filho e Castro, 2019).

Fenóis apresentam capacidade redutora em radicalis livres que são gerados continuamente no organismo ou mesmo adquiridos na forma exógena, sendo esses, estando intimamente ligados a diversas patologias principalmente aos inúmeros tipos de cânceres, envelhecimento precoce e distúrbios genéticos (Rocha et al., 2011; Bessa et al., 2013); taninos, caracterizados como compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, antifécciosa, antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiprotozoária além de auxiliar no reparo e regeneração tecidual (Robbers et al., 1997; Bessa et al., 2013); compostos purínicos apresentam atividade antialucínógena e inseticida (Vizzotto et al., 2010; Menezes Filho e Castro, 2020).

As catequinas são polifenóis, que apresentam atividade antioxidante, quimioprotetora, termogênica, antiinflamatória, antitumoral e com ação reguladora de gordura atuando diretamente no metabolismo dos lipídios (Schmitz et al., 2005; Bessa et al., 2013; Menezes Filho e Castro, 2019), duplas olefinas são capazes de formarem compostos estruturais resinosos e oleosos apresentando também aromas adocicados (Menezes Filho e Castro, 2019), como observado no próprio extrato desse estudo.

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*

Grupos	Resultados
Glicosídeos cardíacos	-
Glicosídeos cianogênicos	-
Alcaloides	+
Ácidos orgânicos	+++
Açúcares redutores	+++
Açúcares não redutores	++
Cumarinas	-
Saponinas espumídica	-
Saponinas hemolítica	+
Polissacarídeos	-
Fenóis	+++
Taninos	Verde
Flavonóides	++
Purinas	+++

(continua..)

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum* (continuação)

Grupos	Resultados
Resinas	++
Catequinas	+++
Depsídeos e depsidonas	++
Esteroides e triterpenóides	-
Sesquiterpenolactonas	+
Dupla olefínicas	+++
Tempo de oxidação	2 seg.

Nota: (-) negativo. (+) fraco positivo. (++) moderado positivo. (+++) forte positivo. Taninos: Verde condensado o catéquicos. Azul (Az) hidrolisável ou gálicos

O extrato do exocarpo do fruto maduro de *P. spruceanum* apresentou uma banda entre 256-288 nm. Essa banda apresenta as características larga amplitude com média intensidade e máxima absorção energética entre 270-280 nm, nesta faixa de comprimento de ondas, prevalece fontes energéticas pertencentes a UVC, que compreende entre a faixa espectral de 100-280 nm (Figura 2).

Fontes energéticas do espectro do ultravioleta causam sérios danos nos vegetais, animais e no próprio homem. Com isso, a evolução dos vegetais proporcionou que grupos de moléculas apresentassem característica de repelir essas fontes impedindo assim, os efeitos deletérios nos tecidos superficiais. A partir disso, os pesquisadores desenvolveram emulsões capazes de agirem como meio bloqueador e filtrando essas fontes de energia. O fator de proteção solar (FPS) por estimativa em espectrofotometria, baseia-se em um número que avalia o filtro solar ou uma ou várias fitomoléculas em conjunto em estudo, de acordo com a altura, largura e localização da banda de absorção dentro do espectro do UV (Mansur et al., 1986; Violante et al., 2009).

Conforme Violante et al. (2009), extratos

vegetais também podem apresentar diferentes comportamentos de absorção de fontes energéticas no UV, como ocorre entre as soluções emulsificantes fotoprotetoras alopáticas. Isso se deve, a presença de diferentes classes fitoquímicas, que são capazes de absorver diferentes fontes UV (UVA, UVB e UVC).

Entre estas classes fitoquímicas estão os flavonoides, taninos, antraquinonas, alcalóides e polifenóis que além de agirem como fotoprotetores, agem também como antioxidantes (Henriques et al., 2000; Violante et al., 2009). Corroborando com os estudos de Bobin et al. (1994), e Violante et al. (2009) ainda observando a (Figura 2), a banda observada é característica dos flavonóides que em solução hidroetanólica absorvem com duas bandas características, a primeira entre 240-280 nm e a segunda entre 300-550 nm. Além disso, o resultado qualitativo para flavonoides (Tabela 1) corrobora com a análise espectrofotométrica em UV-Vis. No entanto, novos estudos deverão ser realizados na determinação quantitativa do flavonoide por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o extrato do fruto de *P. spruceanum*.

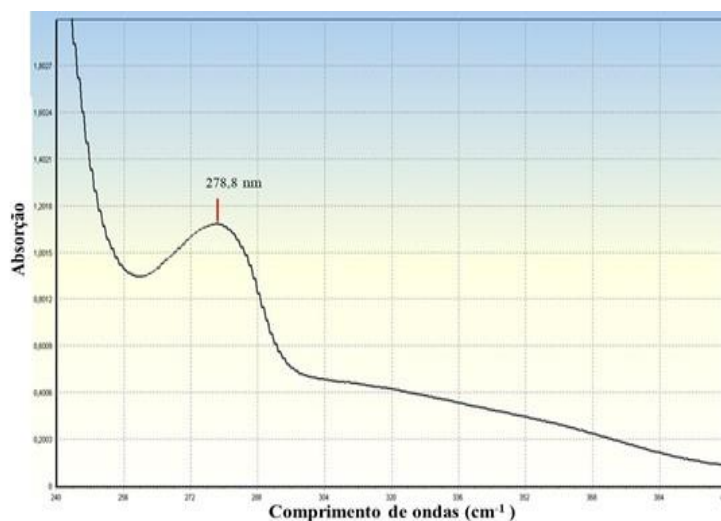


Figura 2 - Varredura em espectrofotometria UV-Vis no comprimento de ondas crítico entre 400 a 240 nm sobre o extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum*

O ensaio antifúngico a partir do extrato do exocarpo do fruto de *P. spruceanum* sobre cepas de *Candida*, demonstrou que a eficiência alta sensibilidade é maior em maiores conc. sobre *C. guilliermondii* (Figura 3), para *C. tropicalis* fica claro que a ação antifúngica é dose dependente. Para *C. krusei* foi observada discreta sensibilidade apenas nas maiores concentrações entre 500 e 250 mg mL⁻¹. O teste antifúngico com *C. albicans* demonstrou que essa levedura apresentou resistência em todas as concentrações não sendo possível a verificação de inibição. *Candida albicans* é a espécie de *Candida* oportunista em indivíduos humanos imunossuprimidos e em infecções hospitalares (Vieira e Santos, 2017). Todos os resultados apresentaram diferença significativa entre o antifúngico de referência e as dosagens do extrato conforme teste de Duncan $p < 5\%$. Quando comparado ao antifúngico de referência, as cepas de *Candida* ainda apresentam alta sensibilidade.

De acordo com Vieira e Santos (2017) e López-Ávila et al. (2016), as principais espécies de interesse clínico e epidemiológico são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Os pesquisadores ainda complementam que, nos surtos de candidíase são observadas diferentes manifestações clínicas desde cutânea a quadros mais severos e altamente perigosos observados na forma de candidíase invasiva e sistêmica. Embora

os agentes antifúngicos apresentem boa eficácia na inibição desses fungos patológicos, o uso concomitante e contínuo de drogas antifúngicas, vem promovendo o aparecimento de cepas resistentes principalmente para Anfotericina B, Fluconazol, Caspofungina e Azóis (Quintero, 2010; López-Ávila et al., 2016; Vieira e Santos, 2017).

De acordo com Rodrigues e Wrangham (1993), os frutos de *Protium* sp., são utilizados entre os macacos para curarem infecções oportunistas causadas por fungos. Vários estudos com extratos vegetais apresentam resultados promissores na inibição de diferentes cepas de *Candida*. Além da atividade antifúngica em fungos promotores de patologias em animais e humanos, os extratos, óleos essenciais e óleos-resinas de *Protium* proporcionam atividade antifúngica em espécies fitopatológicas como descrito no estudo de Carvajal, Alvarez e Sorio (2016) a partir do óleo essencial de *P. colombianum* com potencial atividade antifúngica sobre isolados de *Fusarium* (*F. oxysporum* e *F. solani*). No estudo de Silva et al. (2013) foi observado inibição na concentração mínima inibitória (CMI) de 1,25 mg mL⁻¹ para o óleo essencial de breu preto (*Protium* spp.) sobre isolado de *C. albicans*. Bandeira et al. (2006) também observaram que o óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum* apresentou atividade fungistática sobre *C. albicans*.

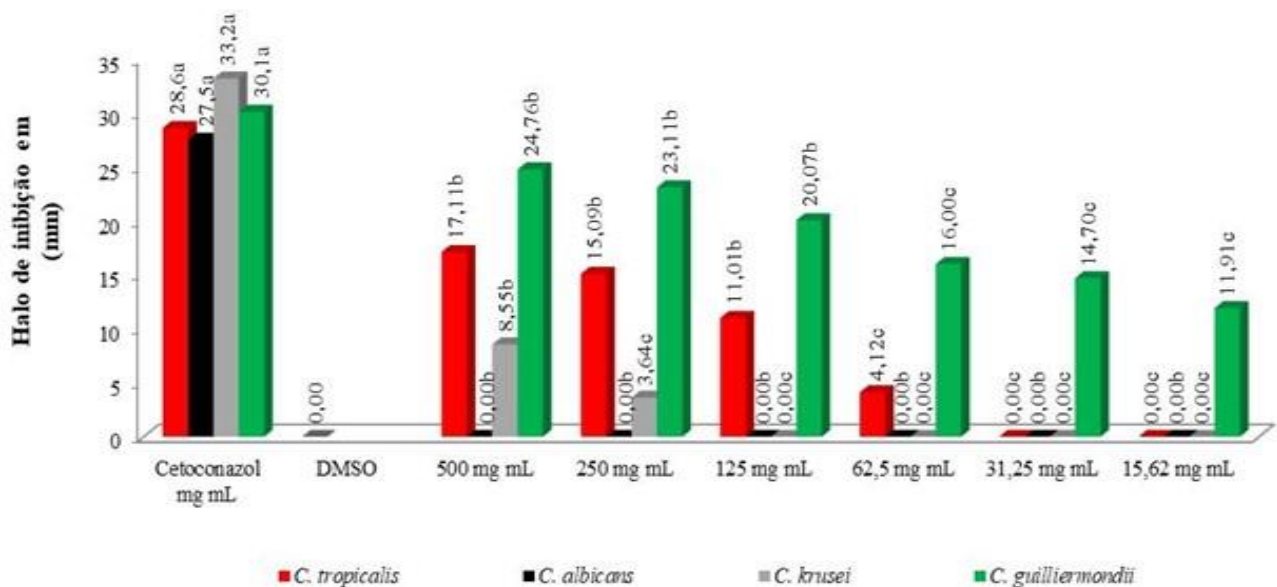


Figura 3 - Atividade antifúngica do extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum* sobre *Candida*. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre o antifúngico de referência e as dosagens do extrato pelo teste de Duncan ($p < 5\%$)

O extrato hidroetanólico apresentou alto potencial de inibição bacteriana sobre *S. aureus* entre as

concentrações 500-31,5 mg mL⁻¹ e para *E. coli* entre as concentrações 500-15,62 mg mL⁻¹ (Figura

4). Estatisticamente, ambas as cepas demonstraram ser sensíveis ao extrato bruto do exocarpo do fruto. Ainda quando comparado aos antibacterianos de referência Ciprofloxacina e Azitromicina (500 mg mL⁻¹) antibióticos de amplo espectro, o extrato nas maiores concentrações entre 500-125 mg mL⁻¹ não diferiram entre si pelo teste de Duncan.

Discreta inibição foi observada em *S. serovar* Enteritidis que diferiu entre os antibióticos de referência mesmo na maior concentração de extrato. No entanto, demonstrou eficácia podendo ser administrado em conjunto com antibióticos avaliados proporcionando o sinergismo entre as moléculas, embora seja necessário novos estudos sobre essa administração de doses *in vitro*. Para *S. serovar* Typhimurium não foi possível verificar inibição antibacteriana em nenhuma das doses, demonstrando ser ineficaz. Entretanto, ambos os antibióticos de referência, ainda apresentam alta eficácia de inibição para essa cepa.

Outros estudos demonstram o importante efeito biológico de *P. spruceanum* como no estudo de

Amparo et al. (2017) com o extrato etanólico dos galhos de *P. spruceanum* com boa eficácia sobre zonas de inibição superiores a 10 mm em 19 bactérias patogênicas sendo este, um extrato com alto potencial bacteriostático. Silva et al. (2013) observaram sensibilidade embora discreta, sobre *Mycobacterium tuberculosis* na concentração de 100 µg mL⁻¹ a partir do óleo essencial da resina do breu preto (*Protium* spp.). Os pesquisadores ainda observaram baixa atividade de inibição sobre *S. aureus* e *E. coli* avaliando tanto o óleo essencial do breu preto quanto do breu branco de *Protium*. Bandeira et al. (2006) também observaram atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli* utilizando o óleo essencial da resina de *P. heptahyllum*. Algumas espécies de *Protium* sp., produtoras de óleo essencial também apresentam interessantes valores de inibição de crescimento sobre *S. aureus* Rosenbach., *Mycobacterium smegmatis* Trevisan. e para *Bacillus subtilis* Ehrenberg. (Carvajal et al., 2016).

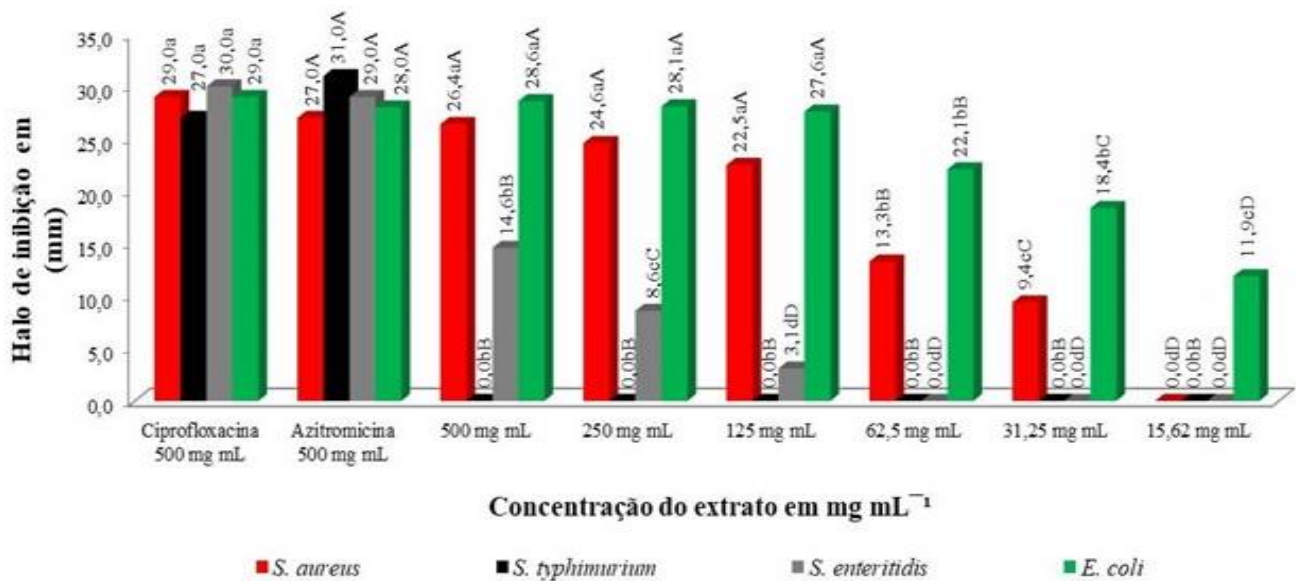


Figure 4 - Atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre o antifúngico de referência e as dosagens do extrato pelo teste de Duncan ($p < 5\%$)

CONCLUSÃO

O extrato hidroetanólico de *Protium spruceanum* exibiu grande número de grupos de fitomoléculas no ensaio de prospecção qualitativa, além disso, importante rendimento de extrato bruto, bem como atividade fotoprotetora sobre a fonte energética UVC e excepcional atividade antifúngica

sobre *Candida guilliermondii* e antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Estudos futuros deverão ser realizados avaliando quantitativamente os grupos de fitomoléculas no extrato do exocarpo do fruto de *P. spruceanum* por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como, avaliar novos grupos de agentes fúngicos e bacterianos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Goiano; ao Departamento de Agroquímica; aos laboratórios de Química Tecnológica, Química Orgânica, Química Geral e Inorgânica, Fitotécnica; órgãos de fomento em pesquisa CAPES, CNPq, FINEP e FAPEG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adfa M, Hattori Y, Ninomiya M, Funahashi Y, Yoshimura T, Koketsu M. Chemical constituents of Indonesian plant *Protium javanicum* Burm. f. and their antifeedant activities against *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Natural Product Research*, v.27, p.270-273, 2013. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.665917>
- Amparo TR, Seibert JB, Mathias FAZ, Vieira JFP, Soares RDOA, Freitas KM, Cabral VAR, Brandão GC, Santos ODH, Souza GHB, Vieira PMA. Anti-inflammatory activity of *Protium spruceanum* (Benth.) Engler is associated to immunomodulation and enzymes inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, v.241, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112024>
- Amparo TR, Rodrigues IV, Seibert JB, Souza RHZ, Oliveira AR, Cabral VAR, Vieira PMA, Brandão GC, Okuma AA, Vieira Filho AS, Teixeira LFM, Souza GHB. Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. *Natural Product Research*, v.32, n.16, p.1951-1954, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1354182>
- Aranaga CA, Fraile S, Torres A, Falco A, Michelangeli F, Takiff H. Antimycobacterial and PKnB inhibitory activities of Venezuelan medicinal plants. *International Journal of Microbiology*, v.2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8823764>
- Bandeira PN, Fonseca AM, Costa SMO, Lins MUDS, Pessoa OD, Monte FJQ, Nogueira NAP, Lemos TLG. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of resin *Protium heptaphyllum*. *Natural Product Communication*, v.1, n.2, p.117-120, 2006. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X0600100207>
- Bessa NGF, Borges JCM, Besarra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, Campos SL, Ribeiro LU, Quirino MS, Chargas Junior AF, Alves A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.15, n.4, p.692-707, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>
- Brasil COM, Lacerda GA, Arrudas SR, Veloso MDM. Essential oil content and composition of almescla resin (*Protium spruceanum* (Benth.) Engl., Burseraceae). *Journal of Agricultural Science*, v.10, n.11, p.442-450, 2018. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n11p442>
- Camargo JER, Afonso ANT, Rojas-Rozo RA, Castro C, Murcia TR. Efeitos citotóxicos *in vitro* de extratos y frações de *Bursera tomentosa* (Jacq.) Triana and Planch., Burseraceae, frente a linhas celulares tumorais humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.4, p.588-593, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2010000400019>
- Carvajal D, Alvarez R, Osorio E. Chemical variability of essential oils of *Protium colombianum* from two tropical life zones and their *in vitro* activity against isolates of *Fusarium*. *Journal Pest Science*, v.89, n.1, p.241-248, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0667-x>
- Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1926.
- Costa A. Fármacos resinosos. In: *Farmacognosia*. Ed., Costa A, p.773-842. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1994.
- Duarte JL, Mota LJT, Almeida SSMS. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson (Ipê Amarelo). *Revista Estação Científica*, v.4, n.1, p.33-43, 2014.
- Figueiredo JCG, Nunes YRF, Vasconcelos VO, Arruda SR, Morais-Costa F, Santos GSC, Alvez FS, Duarte ER. Effects of leaf extracts of *Protium spruceanum* against adult and larval *Rhipicephalus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, v.79, p.447-458, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00447-4>
- Gonzalez Hernandez, RM, Martínez VR, Delgado MM, Abreu YM, Hernández LJG. Actividad antibacteriana del extracto de *Mentha arvensis* L. (menta japonesa), frente a cepas productoras de piodermis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v.25, n.4, p.e1164, 2020.
- Henriques AT, Kerber VA, Moreno PRH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, p.641-642, 2000.
- Lima TAAC, Rocha KRA, Melo MFF, Marques MOM, Facanali R, Lima MP. Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*: Uma contribuição ao conhecimento de espécies aromáticas do Bosque da Ciência do INPA. *Scientia Amazonia*, v.3, n.2, p.6-10, 2014.
- López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León J, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Uma revisión. *Revista Biomédica*, v.27, p.127-136, 2016.
- Machado LB, Zoghbi MGB, Helena E, Andrade EHA. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and Fragrance Journal*, v.18, n.4, p.338-341, 2003. <https://doi.org/10.1002/ffj.1238>
- Magalhães A, Zoghbi MDGB, Siani AC. 5-Methoxypropacin, a novel coumarinolignoid from *Protium unifoliolatum*. *Natural Product Research*, v.20, n.1 p.43-46, 2006. <https://doi.org/10.1080/14786410500055555>
- Mansur JS, Breder MVR, Mansur MCA, Azulay RD. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.61, n.4, p.167-172, 1986.
- Melo MFF, Macedo ST, Daly DC. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de nove espécies de *Protium* Burm. f. (Burseraceae) da Amazônia Central, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.21, n.3, p.503-520, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062007000300001>
- Menezes Filho ACP, Castro CFS. Classes fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do Cerrado brasileiro. *Revista Saúde & Ciência*

- Online, v.8, n.1, p.45-61, 2019.
<https://doi.org/10.35572/rsc.v8i1.60>
- Menezes Filho ACP, Castro CFS. Identificação das classes fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do Cerrado goiano/GO, Brasil. *Revista Eixo*, v.9, n.2, p.41-52, 2020.
<https://doi.org/10.19123/eixo.v9i2.653>
- Menezes Filho ACP, Sousa WC, Castro CFS. Caracterização química e atividades antioxidante e antifúngica do óleo essencial das flores de [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank.) Pilger] (Bixaceae). *Revista Princípios*, v.52, p.80-91, 2020. <http://dx.doi.org/10.18265/1517-0306a2020v1n52p80-91>
- Moreno J, Aparicio R, Velasco J, Rojas LB, Usubillaga A, Lue-Merú M. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from fruits of *Bursera tomentosa*. *Natural Product Communications*, v.5, n.2, p.311-313, 2010. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1000500229>
- Quintero CHG. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio*, v.14, p.172-180, 2010.
[https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70134-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70134-X)
- Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. *Farmacognosia e Farmacobiocologia*, 1.ed. São Paulo: Editorial premier. 372 p. 1997.
- Rocha WS, Lopes RM, Silva DB, Vieira RF, Silva JP, Agostini-Costa TS. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, n.4, p.1215-1221, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000400021>
- Rodrigues IV, Souza JNP, Silva ACG, Chibli LA, Cabral VAR, Vieira Filho AS, Perazzo FF, Guimarães AG, Souza GHB. Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler). *Pharmacognosy Journal*, v.5, p.6-13, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2012.08.001>
- Rodrigues TS, Guimarães SF, Rodrigues-das-Dôres RG, Gabriel JV. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, p.587-590, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000500014>
- Rodriguez E, Wrangham R. Chapter 4, 1993. Zoopharmacognosy: the use of medicinal plants by animals in: Downum KR, Stafford HA. (Eds.), *Phytochemical Potential of Tropical Plants. Recent Advances in Phytochemistry (Proceedings of the Phytochemical Society of North America)*, 27. Springer, Boston, MA, p.89-105.
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1783-6_4
- Rosalem PF, Picão TB, Rodrigues-Lisoni FC, Martins AR. Leaf anatomy of *Protium ovatum* and its antiproliferative potential in cervical cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.27, p.673-678, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.09.001>
- Rüdiger AL, Siani AC, Veiga-Júnior VF. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Nurm. F. (Burseraceae). *Pharmacognosy Review*, v.1, n.1, p.93-104, 2007.
- Schimitz W, Saito AY, Estevão D, Saridakis HO. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v.26, n.2, p.119-130, 2005.
<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2005v26n2p119>
- Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima O, Ribeiro-dos-Santos R, Fernandez-Ferreira E, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Henriques MGMO. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.66, n.1, p.57-69, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00148-2)
- Silva ER, Oliveira DR, Leitão SG, Assis IM, Veiga-Júnior VF, Lourenço MC, Alviano DS, Alviano CS, Bizzo HR. Essential oils of *Protium* spp. samples from Amazonian popular markets: chemical composition, phytochemical parameters and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, v.25, n.3, p.171-178, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2012.751055>
- Sri Rama Murthy K, Chandrasekhara Reddy M, Sandhya Rani S, Pullaiah T. Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v.5, n.2, p.247-258, 2016.
- Vieira FA, Appolinário V, Fajardo CG, Carvalho D. Reproductive biology of *Protium spruceanum* (Burseraceae), a dominant dioecious tree in vegetation corridors in Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.33, n.4, p.711-715, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000400018>
- Vieira AJH, Santos JI. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e Caspofungina. *RBAC*, v.49, n.3, p.235-239, 2017.
<https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600407>
- Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.2a, p.452-457, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300020>
- Vizzotto M, Krolow AC, Weber GEB. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. *Pelotas: Embrapa*, 2010. 16p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).
- Zoghbi MGB, Andrade EHA, Lima MP, Silva TMD, Daly DC. The essential oils of five species of *Protium* growing in the North of Brazil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v.8, n.3, p.312-317, 2005.
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2005.10643458>
- Zoghbi MGB, Andrade EH, Maia JG. Composition of the essential oils from leaves, wood, fruits and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Journal of Essential Oil Research*, v.14, n.3, p.169-171, 2002.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699813>