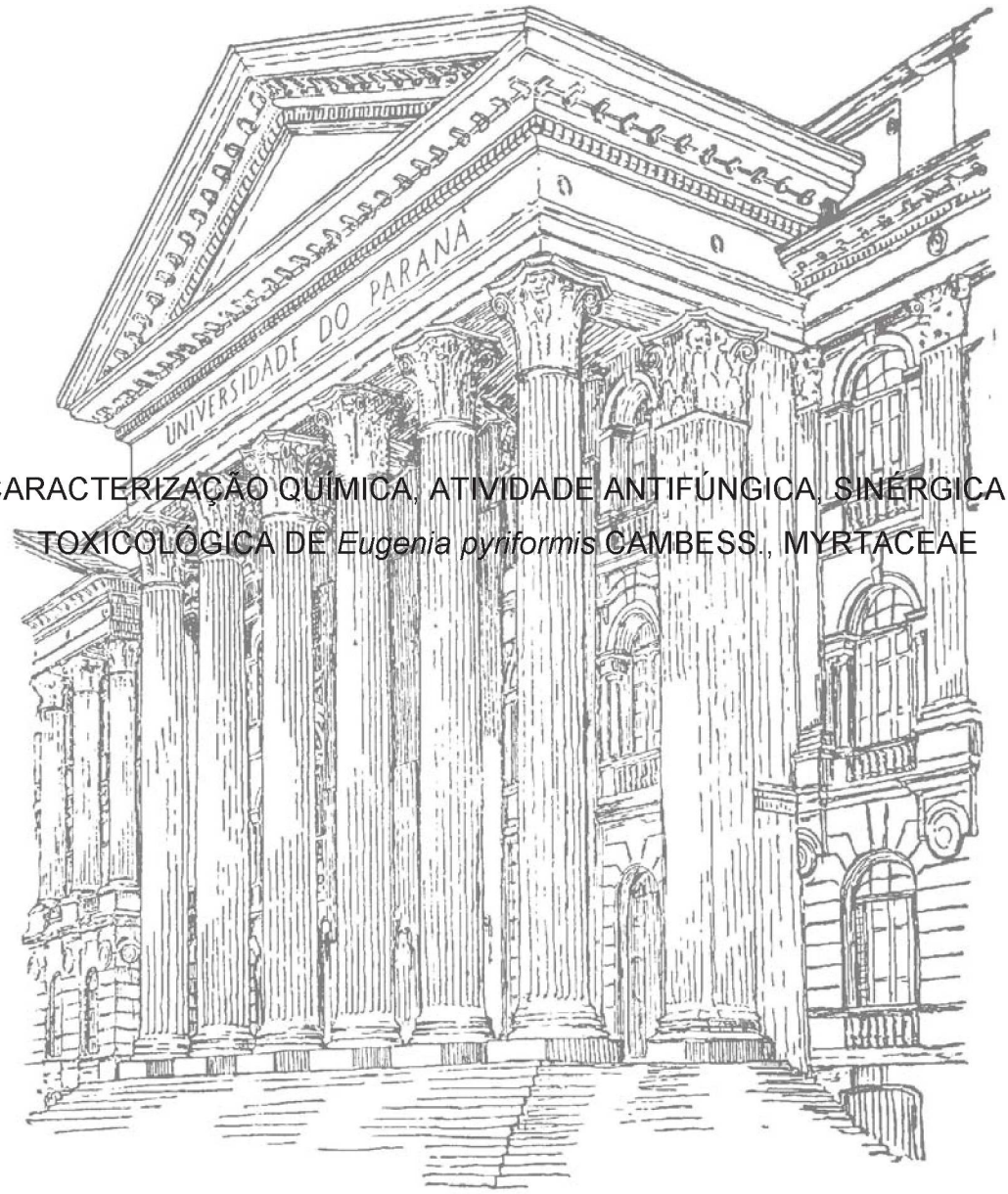
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA MARIA DE SOUZA



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, SINÉRGICA E TOXICOLÓGICA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

CURITIBA

2018

ANGELA MARIA DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, SINÉRGICA E TOXICOLÓGICA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profª. Drª. Marilis Dallarmi Miguel
Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2018

Souza, Angela Maria de

Caracterização química, atividade antifúngica, sinérgica e toxicológica de Eugenia pyriformis Cambess., Myrtaceae / Angela Maria de Souza. - Curitiba, 2018.

176 f.: il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Eugenia pyriformisCambess. 2. Composição química. 3. Atividade antifúngica. 4.Interações de sinergismo. 5. Toxicidade. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321

Natasha Pacheco de Mello Oliveira – CRB9/1889

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANGELA MARIA DE SOUZA** intitulada: **Caracterização Química, Atividade Antifúngica, Sinérgica e Toxicológica de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae** , após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Setembro de 2018.

MARILIS DALLARMI MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora

KEITE DA SILVA NOGUEIRA
Avaliador Externo (UFPR)

VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIANDRADE)

LAURA LUCIA COGO
Avaliador Externo (UFPR)

DEISE PREHS MONTRUCCHIO
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho a meu marido Arnaldo fonte das minhas alegrias e inspirações. Aos meus pais Hamilton e Dirce incentivadores incansáveis dos meus estudos e aperfeiçoamento, mas sobretudo, por todo o amor e atenção que sempre me dedicaram. Ao meu irmão e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por conceder-me força, serenidade e sabedoria. Que me deu coragem para iniciar este trabalho e persistência para chegar ao fim.

Aos meus pais, meu marido e familiares, alicerces da minha vida. Obrigada pela compreensão nas horas que estive ausente, pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todos os momentos que precisei. Vocês são essenciais na minha vida!

A Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de continuar meus estudos e realizar este trabalho.

Aos meus orientadores Profª. Drª. Marilis Dallarmi Miguel e Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela orientação, ensinamentos, carinho, amizade e principalmente pela confiança depositada em mim.

A Profª. Drª. Josiane de Fátima Gaspari Dias, Profª. Drª. Sandra Zanin, Pedro Zanin e Profº. Dr. Vitor Alberto Kerber, pelos ensinamentos e contribuições.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

Aos técnicos Paulo Diniz, Maria da Graça Toledo, Maurício Passos e Jair José de Lima pelo apoio técnico, amizade e disponibilidade, auxiliando em todas as necessidades.

Ao secretário do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Jean Godoi, por todo o auxílio e dedicação.

Aos Departamentos de Nutrição, Química e Bioquímica da UFPR, pela utilização de equipamentos que ajudaram na construção deste trabalho.

As funcionárias da limpeza, pela dedicação e alegria.

Ao Biólogo do Museu Botânico Municipal de Curitiba José Tadeu Motta, pelas identificações botânicas.

À minha grande amiga Drª. Laura Lúcia Cogo, pelo companheirismo, incentivo, paciência, carinho e amizade, e principalmente pelo suporte e apoio incondicional em todos os momentos.

Às minhas queridas amigas Alessandra Daur, Fabiana Nicol, Keite Nogueira e Cristina Leise Monteiro pelo apoio, disponibilidade, pelas inúmeras doações, risadas e acima de tudo pela amizade e carinho. Afinal foi em um de nossos encontros que a pós-graduação se iniciou em minha vida.

À querida Alexandra Cristina Senegaglia pelo apoio, disponibilidade, amizade e realização dos testes de citotoxicidade, além das inúmeras doações. Meu muito obrigado!!!

Aos amigos queridos e conquistados durante o Doutorado Camila Oliveira, Katlin Rech, Fernando César Betim, Paula Moura e Vínicius Bednarczuk de Oliveira, pelo apoio, pelas horas extras de trabalho, pelos espectros de RMN, pelos desenhos de estruturas químicas, pelo companheirismo, risadas, lanchinhos na padaria e todos os momentos difíceis e alegres. Vocês serão meus eternos amigos!!!

Ao grupo de pesquisa de Produtos Naturais, em especial aos amigos Beatriz Hirota, Cristiane da Silva Paula, Ellis Szabo, Francis Merino, Gislene Fujiwara, Isabel Mignoni, Maislian de Oliveira, Samantha Gollin, Leticia de Oliveira, Carolina Sette Barbosa, Cibeli Martins, Susan Webber, Fernanda OCampos, Ranieri Campos, Ligia Burci e Vanessa Bobek que, de diversas formas entre conversas, risadas e cafés, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos da seção de Bacteriologia, Micologia e Central de Soluções do Hospital de Clínicas da UFPR pelo carinho que me receberam, pela amizade, pelo apoio e pelos bons momentos que tornaram a execução deste trabalho tão especial.

Aos amigos e companheiros de trabalho da Seção de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR por entenderem a minha ausência nas tarefas de rotina e que sempre torceram por mim para a concretização deste trabalho.

À Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda., pelo fornecimento de diversos materiais necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

Aos queridos amigos que a "Uvaia" colocou em minha vida Moacir e Bernadete Backes, por serem tão gentis e atenciosos desde o primeiro telefonema, pelo carinho e disponibilidade em contribuir com este trabalho.

E a todos os amigos e pessoas especiais que não foram citadas, mas que com palavras de incentivo e carinho nestes quatro anos de caminhada contribuíram para a concretização desse sonho, sou eternamente grata.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza vai mais longe”.

Clarice Lispector

RESUMO

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae, é conhecida popularmente como uvaia, uvalha-do-campo ou uvalha. Esta espécie possui poucos estudos anteriores e têm mostrado que extratos e frações obtidos de caule e folhas apresentam habilidade de inibir o crescimento *in vitro* de bactérias e fungos. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição fitoquímica, investigar a atividade antifúngica, sinérgica e a toxicidade do óleo essencial, dos extratos, das frações e compostos isolados de *Eugenia pyriformis.* O estudo foi realizado a partir do caule, das folhas e dos frutos, onde verificou-se os parâmetros físicos-químicos, além da avaliação nutricional e da capacidade antioxidante da casca e da polpa do fruto. O material foi seco e armazenado para a preparação dos extratos brutos cetônico e etanólico em aparelho de soxhlet. Os extratos brutos foram particionados obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Foram identificados através de ressonância magnética nuclear cinco compostos, sendo eles na fração hexano o β-sitosterol e o campesterol, na fração acetato de etila o ácido gálico e no extrato cetônico primário, a α- e β-amirinas. Realizou-se também a extração do óleo essencial a partir das folhas secas, pelo método de hidrodestilação e, os compostos majoritários identificados foram β-cariofileno, biciclogermacreno, globulol e δ-cadineno. A atividade antifúngica foi avaliada pelas técnicas da microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra cepas de *Candida abicans* ATCC 40175, *Candida krusei* ATCC 40147, *Candida parapsilosis* ATCC 40038, *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Trychophyton mentagrophytes* ATCC 9533 e contra 10 isolados clínicos de *C. albicans*. A análise da atividade antifúngica contra fungos leveduriformes demonstrou um bom potencial inibitório para os extratos brutos e as frações acetato de etila e hidroalcoólica obtidos a partir da extração cetônica e etanólica do caule e das folhas com CIMs de 7,81 µg/mL e inferiores a 7,81 µg/mL para as cepas testadas. A avaliação do potencial antifúngico contra *T. mentagrophytes* mostrou bom potencial inibitório observado no extrato cetônico bruto de caule e nas frações cetônica e etanólica acetato de etila de caule e folhas com CIMs oscilando entre 7,81 e 62,5 µg/mL. O estudo contra isolados clínicos de *C. albicans* mostrou eficiente atividade da fração etanólica acetato de etila de folhas (FEAEF) sobre as cepas testadas, com valores de CIMs entre 3,9 e 62,5 µg/mL. O estudo do potencial sinérgico foi realizado pela técnica *Time Kill* onde foi possível observar que a FEAEF assim como o Fluconazol, apresentaram atividade fungistática. Pela técnica *Checkerboard* houve interação de aditividade na associação de Fluconazol com FEAEF frente a *C. albicans*, com valor de FICI de 1,49. Na avaliação da atividade citotóxica pelas metodologias de *A. salina*, atividade hemolítica e no estudo da viabilidade de células-tronco mesenquimais os resultados sugerem baixa toxicidade. Os resultados encontrados incentivam a continuação da pesquisa com *E. pyriformis*, pois estes dados podem ser considerados promissores na busca e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

Palavras-chave: *Eugenia pyriformis* Cambess. Composição Química. Atividade antifúngica. Interações de sinergismo. Toxicidade.

ABSTRACT

The species *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae, is popularly known as uvaia, uvalha-do-campo or uvalha. This species has few previous studies and has shown that extracts and fractions obtained from stem and leaves have the ability to inhibit in vitro growth of bacteria and fungi. The objective of this study was to evaluate the phytochemical composition, to investigate the antifungal and synergistic activities and, toxicity of the essential oil, extracts, fractions and isolates compounds of *Eugenia pyriformis*. The study was carried out from the stem, leaves and fruits, where the physical-chemical parameters were verified, as well as the nutritional evaluation and the antioxidant capacity of the fruit peel and pulp. The material was dried and stored for the preparation of plant extracts in soxhlet apparatus. The ketone and ethanolic extracts were partitioned to give the hexane, chloroform, ethyl acetate and residual hydroalcohol fractions. Five compounds were identified by means of nuclear magnetic resonance, hexane fraction, β-sitosterol and campesterol, in the ethyl acetate fraction, gallic acid and in the primary ketone extract, α- and β-amyrin. The essential oil was extracted from the dried leaves obtained by hydrodistillation, and the major compounds identified were β-caryophyllene, bicyclogermacrene, globulol and δ-cadinene. The antimicrobial activity was evaluated by broth microdilution techniques for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against strains of *Candida abicans* ATCC 40175, *Candida krusei* ATCC 40147, *Candida parapsilosis* ATCC 40038, *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Trychophyton mentagrophytes* ATCC 9533 and against 10 clinical isolates of *C. albicans*. The analysis of the antifungal activity against yeast fungi demonstrated a good inhibitory potential for the crude extracts and the ethyl acetate and hydroalcohol fractions obtained from the ketonic and ethanolic extraction of the stem and the leaves showed MIC of 7.81 µg/mL and less than to 7.81 µg/mL for the strains tested. The evaluation of the antifungal potential against *T. mentagrophytes* showed good inhibitory potential observed in the crude ketone extract of stem and in the ketone and ethanolic fractions of ethyl acetate of stem and leaves with MIC ranging from 7.81 to 62.5 µg/mL. The study of clinical strains of *C. albicans* showed efficient activity of ethanolic ethyl acetato fraction of leaves (EEAFL) on the strains tested, with MIC values between 3.9 and 62.5 µg/mL. The study of the synergistic potential was performed by the *Time Kill* technique, where it was possible to observe that EEAFL as well as Fluconazol had fungistatic activity. By the *Checkerboard* technique, there was interaction of additivity in the association of Fluconazole with EEAFL versus *C. albicans*, with FICI value of 1.49. In the evaluation of the cytotoxic activity by the methods of *A. salina*, hemolytic activity and in the study of the viability of mesenchymal stem cells the results suggest low toxicity. The results found encourage the continuation of the research with *E. pyriformis*, since these data can be considered promising in the search and development of new antifungal drugs.

Key words: *Eugenia pyriformis* Cambess. Chemical composition. Antifungal activity. Synergistic interaction. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NÚCLEO BÁSICO DOS FLAVONOIDES 33
FIGURA 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS 35
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DA PESQUISA DE *Eugenia pyriformis* DESENVOLVIDAS NO MESTRADO 57
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DA PESQUISA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS 58
FIGURA 5 - EXSICATAS DE *E. pyriformis* CAMBESS 60
FIGURA 6 - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DO FRUTO DE *E. pyriformis* CAMBESS 62
FIGURA 7 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DA TÉCNICA *CHECKERBOARD* 85
FIGURA 8 - ANÁLISE EM CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS 98
FIGURA 9 - COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS 101
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP1 109
FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP1 109
FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP1 110
FIGURA 13 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTERÓIDES IDENTIFICADOS NO ISOLADO EP1 112
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP2 113
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP2 113
FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO IDENTIFICADO NO ISOLADO EP2 114
FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP3 116
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP3 116
FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP4 117
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP4 117
FIGURA 21 - ESTRUTURA QUÍMICA DA α-AMIRINA E β-AMIRINA IDENTIFICADOS NOS ISOLADOS EP3 E EP4 119
FIGURA 22 - GRÁFICO DA TÉCNICA *TIME KILL* 128

FIGURA 23 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* COM FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans* 130
FIGURA 24 - ISOBOLOGRAMA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL CONTRA *C. albicans* 131
FIGURA 25 – LEITURA DOS RESULTADOS DA TÉCNICA DE DISCO-APROXIMAÇÃO E DOS DISCOS COMBINADOS 133
FIGURA 26 - TESTE DE HEMÓLISE POR DIFUSÃO EM PLACA DE ÁGAR SANGUE 146
FIGURA 27 - FIGURA REPRESENTATIVA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE INCUBAÇÃO COM A FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* 147
FIGURA 28 - VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS 148

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *E. pyriformis* CAMBESS 37

TABELA 2 - ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Eugenia*. 43

TABELA 3 - SOLUÇÕES COM RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES PARA A METODOLOGIA DE FOLIN-CICALTEAU 67

TABELA 4 - PESQUISA DE GRUPOS QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) 74

TABELA 5 - COLUNA CROMATOGRÁFICA GRAVIMÉTRICA DE PURIFICAÇÃO DA β-AMIRINA E α-AMIRINA 77

TABELA 6 – CARACTERÍZAÇÃO E COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS AMOSTRAS *in natura* E LIOFILIZADAS DA CASCA E DA POLPA DO FRUTO DE *E. pyriformis* CAMBESS. 91

TABELA 7 - DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS, FLAVONOIDES E DPPH DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS DO FRUTO (CASCA E POLPA) DE *E. pyrifomis* CAMBESS. 94

TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS E ÁCIDO L-ASCÓRBICO POR CLAE DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS DA CASCA E DA POLPA DO FRUTO DE *E. pyrifomis* CAMBESS 95

TABELA 9 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS. 99

TABELA 10 - TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO E REDUÇÃO DO DPPH DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS. 103

TABELA 11 -DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS DO CAULE E FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS. 104

TABELA 12 -RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇOES OBTIDAS DE *E. pyriformis* CAMBESS. 106

TABELA 13 -CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *E. pyriformis* CAMBESS 107

TABELA 14 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DOS ESTERÓIDES β-SITOSTEROL E CAMPESTEROL EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA 111
TABELA 15 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^{1}H E ^{13}C DO ÁCIDO 3,4,5-TRIIDROBENZÓICO (ÁCIDO GÁLICO)..... 114
TABELA 16 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE β-AMIRINA E α-AMIRINA EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA. 118
TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE, FOLHAS E FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS LEVEDURIFORMES..... 121
TABELA 18 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E ALGUNS COMPOSTOS ISOLADOS DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS LEVEDURIFORMES..... 122
TABELA 19 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans*..... 123
TABELA 20 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE, FOLHAS E FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS..... 125
TABELA 21 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E ALGUNS COMPOSTOS ISOLADOS DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS..... 127
TABELA 22 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FIC) E ÍNDICES FIC NA ANÁLISE DE SINERGISMO PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD*..... 129
TABELA 23 - RESULTADO DO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE *A. salina* LEACH DAS DIFERENTES AMOSTRAS OBTIDAS DE *E. pyriformis*. 134
TABELA 24 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE CAULE DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO . 138
TABELA 25 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHA DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO . 140

TABELA 26 -ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO 142
TABELA 27 -ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO. 144
TABELA 28 -VIABILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE INCUBAÇÃO COM A FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS. 147

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO DE CAULE E FRAÇÕES DE *E. pyriformis* 139
GRÁFICO 2 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULE E FRAÇÕES DE *E. pyriformis* 139
GRÁFICO 3 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO DE FOLHA E FRAÇÕES DE *E. pyriformis*. 141
GRÁFICO 4 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE FOLHA E FRAÇÕES DE *E. pyriformis*. 141
GRÁFICO 5 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO E FRAÇÕES DO FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis*..... 143
GRÁFICO 6 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DO FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis*..... 143
GRÁFICO 7 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. pyriformis*..... 144

LISTA DE SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Colection*
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CL_{50} - Concentração Letal 50%
CLAE - Cromatografia de Alta Eficiência
CLSI - *Clinical Laboratory Standarts Institute*
DL_{50} - Dose Letal 50%
DP - Desvio Padrão
ECB - Extrato Cetônico Bruto
EEB - Extrato Etanólico Bruto
EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAE - Fração Acetato de Etila
FC - Fração Clorofórmio
FH - Fração Hexano
FIC - Concentração Inibitória Fracionada
FICI - Índice de Concentração Inibitória Fracionada
FR - Fração Hidroalcoólica remanescente
IA - Índice de Atividade
INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
RNM ^{13}C - Ressonância Nuclear Magnética de Carbono 13
RNM ^{1}H - Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio
PA - Padrão Analítico
PBS - Tampão fosfato salino
Pe - Éter de Pétroleo
TTC - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	- Antes de Cristo
BM	- Banho-maria
°C	- Grau Celsius
cm	- Centímetro
g	- Gramas
GL	- Gay-Lussac Lei Volumétrica
h	- Hora
kg	- Kilograma
M	- Molar
m	- Metro
mg	- Miligrama
mL	- Mililitros
mm	- Milímetros
nm	- Nanômetro
%	- Porcentagem
pH	- Potencial Hidrogeniônico
Rpm	- Rotações por minuto
RSM	- Modelo de Resposta de Superfície
UFC	- Unidade formadora de colônias
UV	- Ultravioleta
µg	- Microgramas
µm	- Micrômetro
µL	- Microlitro
v/v	- Volume/volume

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**23**
1.1	OBJETIVO GERAL	26
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	**27**
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	27
2.2	COMPOSTOS ATIVOS NAS PLANTAS COM PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	29
2.2.1	Fenilpropanoides	30
2.2.2	Cumarinas	30
2.2.3	Lignanas	31
2.2.4	Flavonoides	32
2.2.5	Ácidos Fenólicos	33
2.2.6	Taninos	34
2.2.7	Terpenos	35
2.2.8	Alcaloides	36
2.3	ESPÉCIE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.	37
2.3.1	Família	38
2.3.2	Gênero	38
2.3.3	Sinonímia vulgar	39
2.3.4	Descrição botânica	39
2.3.5	Ocorrência de *E. pyriformis*	40
2.3.6	Atividade antimicrobiana de *E. pyriformis* Cambess.	40
2.3.7	Potencial Sinérgico de *E. pyriformis* Cambess.	41
2.4	ESPÉCIES DE *Eugenia* COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO	41
2.5	MECANISMOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	47
2.6	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	48
2.7	PATÓGENOS FÚNGICOS	51
2.8	TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS	53
2.8.1	*Artemia salina*	54
2.8.2	Atividade Hemolítica	55
2.8.3	Citotoxicidade	56

3 MATERIAL E MÉTODOS 57
3.1 MATERIAL BOTÂNICO 59
3.1.1 Coleta das Amostras 59
3.1.2 Processamento 60
3.1.3 Processo de Liofilização 61
3.2 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DO FRUTO (CASCA E POLPA) DE *E. pyriformis* CAMBESS. 63
3.2.1 Caracterização e Composição Proximal das amostras *in natura* e liofilizadas obtidas do fruto de *E. pyriformis* 63
3.2.1.1 Umidade 63
3.2.1.2 Cinzas Totais 63
3.2.1.3 Lípidios 64
3.2.1.4 Proteínas 64
3.2.1.5 Fibras Totais 65
3.2.1.6 Carboidratos 66
3.2.1.7 Valor Energético Total 66
3.2.2 Determinação da atividade antioxidante das amostras liofilizadas do fruto (casca e polpa) de *E. pyriformis* Cambess 66
3.2.2.1 Doseamento de Polifenóis Totais 66
3.2.2.2 Doseamento de Flavonoides Totais 67
3.2.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela redução do radical DPPH 68
3.2.3 Determinação do teor de Ácido L-Ascórbico por CLAE 68
3.2.4 Determinação de Antioxidantes Lipofílicos 69
3.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. pyriformis*. 70
3.3.1 Extração do Óleo Essencial 70
3.3.2 Rendimento do Óleo Essencial 70
3.3.3 Determinação da Densidade 70
3.3.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) 71
3.3.5 Determinação da atividade antioxidante do Óleo Essencial de *E. pyriformis* 71
3.3.5.1 Doseamento de Polifenóis Totais 71
3.3.5.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela redução do radical DPPH 71
3.3.5.3 Método da formação do Complexo Fosfomolibdênio 72

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES POR APARELHO DE SOXHLET 72
3.4.1 Determinação do Teor de Sólidos 72
3.4.2 Particionamento dos Extratos Brutos Cetônico e Etanólico 73
3.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) 73
3.6 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS 74
3.6.1 Fração Hexano 74
3.6.2 Fração Acetato de Etila 75
3.6.3 Obtenção da β-Amirina e α-Amirina 76
3.6.3.1 Coluna Cromatográfica Gravimétrica 76
3.6.3.2 Cristalização da β-Amirina 77
3.6.4 Identificação dos Compostos 78
3.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA 78
3.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica de Microdiluição em caldo para Fungos Leveduriformes 79
3.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Técnica de Microdiluição em caldo para Fungos Filamentosos 79
3.7.3 Interpretação dos resultados pela Técnica de Microdiluição em caldo 81
3.7.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Técnica da Macrodiluição 81
3.7.5 Interpretação dos resultados pela Técnica de Macrodiluição 82
3.7.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) 82
3.7.7 Técnica para Determinação do Limite de Detecção 83
3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO 83
3.8.1 Ensaio de *Time Kill* 83
3.8.2 Técnica *Checkerboard* 84
3.8.3 Técnica dos Discos Combinados e Disco aproximação 86
3.9 ENSAIOS DE CITOXICIDADE 87
3.9.1 Frente à *Artemia salina* Leach 87
3.9.2 Atividade Hemolítica 88
3.9.2.1 Hemólise em tubo 88
3.9.2.2 Hemólise por difusão em placa de Ágar Sangue 89
3.9.3 Avaliação da Citotoxidade em Células-Tronco Mesenquimais 89

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 91
4.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS OBTIDAS DO FRUTO (CASCA E POLPA) DE *E. pyriformis* CAMBESS. 91
4.1.1 Caracterização e Composição Proximal das amostras obtidas do fruto de *E. pyriformis* 91
4.1.2 Doseamento de Polifenóis Totais, Flavonoides Totais e Atividade Antioxidante frente ao radical DPPH 93
4.1.3 Determinação de Antioxidantes Lipofílicos e Ácido L-Ascórbico por CLAE 95
4.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *E. pyriformis*. 97
4.2.1 Rendimento do Óleo Essencial 97
4.2.2 Determinação da Densidade do Óleo Essencial 97
4.2.3 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) ... 97
4.2.4 Determinação do Teor de Polifenóis Totais e Atividade antioxidante do óleo essencial de *E. pyriformis* Cambess. 102
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE CAULE E FOLHAS DE *E. pyriformis* 104
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *E. pyriformis*. 105
4.5 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *E. pyriformis* POR CCD 106
4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS .. 108
4.6.1 Isolados EP1 108
4.6.2 Isolado EP2 112
4.6.3 Isolados EP3 e EP4 115
4.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA 119
4.7.1 Atividade antifúngica para fungos leveduriformes 119
4.7.2 Atividade antifúngica para fungos filamentosos 124
4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO 127
4.9 ENSAIOS DE CITOXICIDADE 133
4.9.1 Frente à *Artemia salina* Leach 133
4.9.2 Atividade Hemolítica 135
4.9.2.1 Hemólise em tubo 136
4.9.2.2 Hemólise por difusão em placa de Ágar Sangue. 145
4.9.3 Citotoxicidade em Células-Tronco Mesenquimais 146

5 CONCLUSÕES 149
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 152
REFERÊNCIAS 153
ANEXO 1 – DEPÓSITO DE EXSICATAS 172
ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA 174
ANEXO 3 – CERTIFICADO PLATAFORMA BRASIL 175
ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO REVISTA PLANTA MEDICA 176

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais historicamente provaram seu valor como uma fonte de moléculas com potencial terapêutico (ATANASOV et al., 2015). Desde a antiguidade, as plantas forneceram uma fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos compostos medicamentosos, uma vez que os medicamentos derivados de plantas contribuíram para a saúde e o bem estar humano (BILAL et al., 2017). Muitas delas são utilizadas para o tratamento de doenças infecciosas comuns e são reconhecidas por serem capazes de retardar ou inibir o crescimento de bactérias, leveduras e fungos leveduriformes (TIWARI et al., 2009).

Plantas e outras fontes naturais podem fornecer uma enorme variedade de compostos complexos, estruturalmente diversos e potencialmente terapêuticos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Estes compostos são metabólitos secundários, como alcaloides, esteróides, taninos e compostos fenólicos, e são produzidos como resultado de mecanismos intrínsecos e interações recíprocas entre plantas, micróbios e animais (UPADHYAY et al., 2014). Assim, pesquisadores do mundo todo estão explorando o reino vegetal como fonte alternativa de moléculas, para a descoberta e desenvolvimento de compostos com potencial antimicrobiano. Outro aspecto, que despertou o interesse pelas pesquisas de produtos naturais foi o crescente aumento na incidência de microrganismos resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado, que tornou-se um dos problemas de saúde pública mais ameaçadores (TAYLOR, 2013; BORGES et al., 2016).

Uma estratégia utilizada para o desenvolvimento de muitos fármacos é a busca por novos fármacos que agem em vários alvos, com a finalidade de potencializar o efeito terapêutico. Assim, o princípio da sinergia torna-se o grande desafio contemporâneo na descoberta de novos agentes terapêuticos (MA et al., 2009). As interações sinérgicas são de vital importância na fitomedicina para explicar a eficácia de doses aparentemente baixas de constituintes ativos em um produto fitoterápico. A sinergia pode ocorrer quando antibióticos são combinados a um agente que antagoniza os mecanismos de resistência bacteriana. O uso de compostos derivados de plantas como potenciadores de antibióticos e atenuadores de virulência tem sido intensamente estudados (BORGES et al., 2016).

Em farmacologia, a medicina clínica tem conhecimento dos benefícios da combinação de drogas. Substâncias medicinais isoladas com ação em apenas um alvo molecular são, em geral, menos eficazes para tratar uma doença do que uma terapia com substâncias combinadas que agem em vários alvos simultaneamente (multi-alvo), potencializando o efeito terapêutico (MA et al., 2009).

O Brasil possui uma extensa biodiversidade vegetal, possuindo seis domínios ecológicos, sendo eles, a floresta Amazônica, Caatinga, Pampa, Cerrado, Mata Atlântica e o Pantanal. Esta biodiversidade vêm representando um grande potencial na obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos para o tratamento de doenças humanas e de animais. A flora brasileira é a mais diversa do mundo com cerca de 55 mil espécies de plantas (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009; BIESKI et al., 2012).

Myrtaceae é a nona maior família de plantas com flores, inclui árvores e arbustos com centros de diversidade nos trópicos úmidos, particularmente na América do Sul, Austrália e Ásia Tropical, distribuídos em 132 gêneros e 5671 espécies. Também representa uma das maiores famílias da flora brasileira, onde 23 gêneros e cerca de 1000 espécies ocorrem distribuídos em todas as regiões e formações vegetais do país. As espécies de Myrtaceae também são usadas na medicina popular para tratar várias doenças, especialmente distúrbios gastrintestinais, doenças hemorrágicas e infecciosas, com uma ação que provavelmente está relacionada às suas propriedades adstringentes (CASCAES et al., 2015).

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess., também conhecida como uvaia, uvalha, uvalha-do-mato e uvalheira, é uma espécie arbórea da família Myrtaceae, cultivada em pomares, que produz frutos comestíveis de sabor agradável (SOUZA; LORENZI, 2005). Sua distribuição geográfica abrange desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul e, provavelmente, estende-se até o Paraguai e Argentina (DONADIO; MÔRO; SERVIDONE, 2004). Esta espécie é uma planta que pode ser utilizada em programas de reflorestamento, apresentando fácil cultivo e crescimento em jardins. As frutas com rico valor nutritivo são utilizadas na indústria alimentícia em diversos produtos (SOUZA; LORENZI, 2005) e suas folhas atuam no tratamento da gota (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987). Estudos anteriores têm mostrado

que extratos e frações obtidos da espécie *E. pyriformis* apresenta habilidade de inibir o crescimento *in vitro* de bactérias e fungos (CHAVASCO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

Diante da importância da família Myrtaceae e devido aos escassos estudos realizados até o presente, a espécie *E. pyriformis* representa um grande potencial para exploração e, um campo promissor no desenvolvimento de agentes antimicrobianos ou em associação com determinados fármacos antimicrobianos. Os resultados promissores de atividade antifúngica obtidos nos estudos realizados no mestrado, incentivaram a continuação deste estudo com intuito de isolar novos compostos e utilizar diferentes técnicas de combinação.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características químicas da espécie *Eugenia pyriformis* Cambess. através de métodos analíticos, investigar sua atividade antifúngica, toxicidade e potencial para provocar sinergismo com agente antifúngico de uso clínico.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises físico-químicas, nutricionais e avaliar a atividade antioxidante da casca e da polpa do fruto;
- Realizar análise físico-químicas das amostras de caule, folhas e casca do fruto;
- Realizar a extração, análise e caracterização do óleo essencial das folhas;
- Realizar análise fitoquímica preliminar por cromatografia de camada delgada identificando as principais classes de constituintes presentes nos extratos brutos e frações obtidos a partir do caule, das folhas e da casca do fruto;
- Isolar e identificar as substâncias químicas das frações através de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio;
- Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial, dos extratos, das frações, e dos compostos isolados obtidos a partir do caule, das folhas e da casca do fruto;
- Investigar presença de sinergismo através da associação da fração etanólica acetato de etila de folhas com antifúngico de uso clínico;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial, dos extratos, das frações e dos compostos isolados obtidos a partir do caule, das folhas e da casca do fruto de *E. pyriformis* Cambess.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A medicina tradicional há milhares de anos tem sido usada para o tratamento de doenças humanas, uma das primeiras maneiras de uso de produtos naturais (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; PIO et al., 2018). Desde o passado, em busca de tratamento para as doenças, as pessoas procuravam drogas na natureza. No início o uso das plantas medicinais foi instintivo, pois na época não havia informação suficiente sobre as causas das doenças ou sobre qual planta poderia ser utilizada como cura, tudo era baseado na experiência. Com o tempo, o uso de plantas medicinais específicas para o tratamento de certas doenças foi gradualmente se fundamentando e se propagando entre os povos (PETROVSKA, 2012).

Os primeiros registros escritos sobre aplicações medicinais de plantas datam de volta a 2600 a.C e relatam a existência de um medicamento sofisticado na Mesopotâmia, compreendendo cerca de 1000 plantas. A medicina egípcia remonta a cerca de 2900 a.C, mas o seu registro mais preservado é o "Papiro Ebers" de cerca de 1550 a.C, contendo mais de 700 drogas, principalmente de origem vegetal (CRAGG; NEWMAN, 2013; ATANASOV et al., 2015). No início do século XIX, o farmacêutico alemão Friedrich Sertürner conseguiu isolar um agente analgésico e indutor do sono a partir do ópio, o qual recebeu o nome de morfina, em referência ao deus grego dos sonhos, Morfeu. Isso desencadeou as pesquisas de outras ervas medicinais e, durante as décadas seguintes, muitos produtos naturais bioativos, principalmente alcaloides (quinino, cafeína, nicotina, codeína, atropina, colchicina, cocaína, capsaicina) foram isolados de suas fontes naturais (ATANASOV et al., 2015).

As plantas são reservatórios de compostos biológicos ativos, contêm classes específicas de compostos, como os alcaloides, fenólicos e terpenoides, com inúmeras propriedades terapêuticas. Estas propriedades decorrem de compostos antimicrobianos e antioxidantes, cada vez mais aproveitados em benefício humano (OYEDEMI et al., 2012; WILLIS, 2017). Desta maneira, os produtos naturais têm

servido como uma importante fonte de drogas, de modo que contribuem para aproximadamente metade do arsenal de medicamentos atualmente em uso (RAMALINGUM; MAHOMOODALLY, 2014). Alguns compostos são usados como ingredientes ativos isolados diretamente de extratos de plantas, outros são sintetizados para imitar um composto vegetal natural. Muitas vezes os produtos naturais exercem pouca ou mesmo nenhuma atividade, mas por modificação e uso de métodos químicos ou biológicos, drogas potentes podem ser produzidas. Portanto, os compostos naturais podem ser modelos para o desenvolvimento de novas moléculas de drogas pela indústria farmacêutica (ORHAN, 2014).

Atualmente, em muitas regiões do mundo, as pessoas ainda dependem de medicamentos tradicionais à base de plantas para a atenção primária à saúde. Isto ocorre em muitas comunidades rurais na África, partes da Ásia e América Central e do Sul, onde as plantas e o conhecimento de seu uso tradicional são acessíveis (WILLIS, 2017). Nos países em desenvolvimento, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 65-80% da população depende de medicamentos fitoterápicos como fonte primária de tratamento (MAZZARI; PRIETO, 2014).

O consumo de medicamentos fitoterápicos vem aumentando em todo o mundo ao longo dos últimos anos. Mais pessoas estão apontando para o conceito de autocuidado e acreditam que os produtos naturais estão associados a menos efeitos colaterais e, consequentemente, uma maior segurança. Os fitoterápicos resistiram ao tempo e são considerados relativamente mais baratos em comparação com as drogas sintéticas (RAMALINGUM; MAHOMOODALLY, 2014).

No Brasil, o uso de plantas para o tratamento de enfermidades é uma prática comum, fortalecida pela influência cultural trazida pela colonização européia e africana, além do conhecimento tradicional indígena (PIO et al., 2018).

Compostos fitoquímicos têm se tornado importantes para a terapêutica de muitas doenças humanas. É importante salientar o uso do produto total obtido de plantas, como extratos, principalmente pelos efeitos sinérgicos que a mistura de metabólitos de uma planta pode apresentar e os múltiplos pontos de intervenção em que estes podem ter efeito (NEERGHEEN et al., 2010).

Devido a esse cenário, associado a limitações das farmacoterapias atuais, a indústria farmacêutica tem considerado os recursos da natureza como uma

importante fonte de material para novos medicamentos (KARAR; KUHNERT, 2017; PIO et al., 2018).

2.2 COMPOSTOS ATIVOS NAS PLANTAS COM PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

As plantas produzem uma grande quantidade de compostos bioativos especializados, chamados de metabólitos secundários, que apresentam uma enorme diversidade estrutural. Estima-se que exista aproximadamente 200.000 metabólitos secundários. A presença destes compostos nas plantas pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles distribuição geográfica, condições de crescimento e época de colheita. Estes possuem diversas propriedades biológicas, entre elas antialérgica, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antimicrobiana, antiviral, anticarcinogênica, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora (LEONOV et al., 2015; LUO et al., 2016; SELLAMI et al., 2018).

Muitos metabólitos secundários são amplamente utilizados como substâncias ativas de fármacos na medicina curativa. Muitos antibióticos, agentes antitumorais e antivirais são derivados de metabólitos secundários, assim como os antipiréticos (aspirina), alucinógenos (LSD) e drogas que promovem a redução do colesterol (levastatina). Também são empregados como herbicidas ou fitotoxinas na agricultura, como aditivos alimentares (cor, sabor e edulcorantes), fragrâncias e até como precursores para a síntese de plásticos (BREITLING et al., 2013).

A origem dos metabólitos secundários é o metabolismo da glicose, através de dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Os flavonoides e taninos condensados derivam de ambos os intermediários. A partir da via do acetato derivam os alcaloides, terpenos, esteroides e ácidos graxos. Os metabólios secundários podem ser encontrados na forma livre, agliconas ou ligados a uma ou mais unidades de açúcar, formando os heterosídeos (SIMÕES et al., 2010).

Baseado na origem biossíntetica os metabólitos secundários podem ser classificados em vários grupos, destacam-se os descritos a seguir.

2.2.1 Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são um grande grupo de compostos orgânicos produzidos pelas plantas para proteção contra infecções, irradiação ultravioleta, ferimentos e herbívoros. Esses compostos são constituídos por um anel aromático unido a uma cadeia lateral de três átomos de carbono. Estes formam-se a partir do ácido chiquímico, constituindo as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Os ácidos cinâmico e *p*-cumárico por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos e, através de oxidações com degradação das cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos (SILVA et al., 2014b; SIMÕES et al., 2010). A redução da cadeia lateral dos ácidos cinâmicos conduz a formação de compostos importantes presentes em óleos voláteis, como por exemplo eugenol, cinamaldeído, anetol e safrol (SILVA et al., 2014b).

Os compostos fenilpropanoides possuem importante atividade antibacteriana e antifúngica (IVANAUSKAS et al., 2008). Alguns fenilpropanoides, entre eles, anisil álcool, salicilaldeído, guaiacol, eugenol, cinamaldeído, vanilina, ácido cinâmico e farnesol possuem habilidade de inibir o crescimento de *Candida albicans.* O principal mecanismo de atividade dos fenilpropanoides contra o crescimento de fungos leveduriformes é pela ruptura da membrana fúngica (RAUT et al., 2014).

2.2.2 Cumarinas

As cumarinas são também conhecidas por α-benzopirona, e cuja estrutura química consiste num anel benzênico fundido com uma lactona, 2H-1-benzopirano-2-ona. Os compostos cumarínicos são metabólitos secundários de várias plantas, bactérias e fungos, desempenhando funções diretas nos mecanismos de regulação e manutenção da planta. Seus metabólitos secundários são produzidos pela rota do ácido chiquímico derivada do metabolismo da fenilalanina e normalmente são lactonas do ácido orto-hidróxi-cinâmico e que na sua maioria são substituídas na posição 7 oxidada (SOUZA; OLIVEIRA; SALES, 2014).

O seu odor doce e aromático semelhante ao da baunilha despertou interesse por parte da indústria alimentar, que a utiliza como aromatizante em vários tipos de produtos alimentares e bebidas alcoólicas (SPROLL et al., 2008).

As cumarinas possuem diversas atividades farmacológicas, entre elas antibacteriana, antifúngica, antiviral, antimutagênica, antioxidante, anti-inflamatória, antitrombótica, antitumoral e muitas outras. Podem ser encontradas em vegetais, frutas, sementes, nozes, café, chás e vinho (STEFANACHI et al., 2018).

A fraxetina, uma cumarina *o*-metilada, foi capaz de inibir o crescimento de culturas bacterianas de *Staphylococcus aureus*. Os mecanismos associados à ação antimicrobiana da fraxetina indicaram uma maior inibição da topoisomerase 1 e topoisomerase 2 e notável aumento na permeabilidade da membrana (SARFRAZ et al., 2017).

2.2.3 Lignanas

As lignanas são fenóis que ocorrem naturalmente nas plantas, e são biossinteticamente derivados a partir de fenilpropanoides. Elas são caracterizadas estruturalmente pelo acoplamento oxidativo nas posições 8 e 8' de duas unidades fenilpropanoidicas (ZHANG et al., 2014).

As lignanas possuem uma ampla gama de propriedades biológicas que estão intrinsecamente relacionadas à sua estereoquímica. Essa variedade está relacionada à diversidade de esqueletos de carbono que essas classes de produtos naturais apresentam nas plantas. Existem oito subclasses de lignanas, incluindo dibenzilbutano, dibenzilbutirolactol, dibenzilbutirolactona, furano, furofurano, ariltetralina, arilnaftaleno e dibenzociclooctadieno (LIMA; BARROS; LAURENTIZ, 2018).

Lignanas estão presentes principalmente em plantas, sementes de linho, frutas e vegetais, mas também podem ser encontradas em mamíferos, além de serem produzidas pela ação de bactérias intestinais (LIMA; BARROS; LAURENTIZ, 2018). As lignanas têm atraído muito interesse dos pesquisadores, devido a sua ampla ocorrência na natureza e por sua extensa gama de atividades biológicas. Entre elas estão incluídas atividades citotóxica, anti-inflamatória, antiparasitária,

antitumoral, antifúngica e antibacteriana (SIMÕES et al., 2010; LIMA; BARROS; LAURENTIZ, 2018).

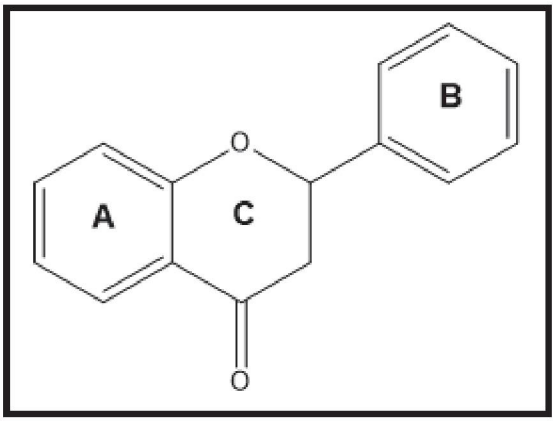
2.2.4 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma classe altamente diversificada de metabólitos, compostos por mais de 10.000 estruturas conhecidas. Eles são agentes fisiologicamente ativos nas plantas, e se tornam de alto interesse científico pela característica de seus benefícios a saúde (YANG et al., 2016).

Estes são derivados de 2-fenil-benzil-γ-pirona, presentes em todo o reino vegetal. A biossíntese começa com a condensação de uma molécula de *p*-coumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA para produzir chalcona (4',2',4',6'-tetra-hidroxichalcona), catalisada por chalcona sintase. O próximo passo é a isomerização de chalcona a flavanona pela chalcona isomerase. A partir desta etapa, o mecanismo se divide em vários braços dando origem a várias classes de flavonoides, incluindo auronas, diidrochalconas, flavanonóis (di-hidroflavonóis), isoflavonas, flavonas, flavonóis, leucoantocianidinas, antocianinas (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014).

Os flavonoides ocorrem como agliconas, glicosídeos e derivados metilados. Nas plantas, os flavonoides agliconas ocorrem numa variedade de formas estruturais. Todos contêm quinze átomos de carbono em seu núcleo básico (Figura 1), constituído de dois anéis de seis membros ligados a uma unidade de três carbonos, que pode ou não ser parte de um terceiro anel. Os anéis são classificados como A, B e C e os átomos de carbono individuais são identificados através de numerais ordinários. As diferentes maneiras de fechar este anel associadas aos diferentes graus de oxidação do anel A fornecem as várias classes de flavonoides (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008).

FIGURA 1 - NÚCLEO BÁSICO DOS FLAVONOIDES



FONTE: O autor (2018).

Os flavonoides desempenham uma variedade de atividades biológicas em plantas, animais e bactérias. Nas plantas, os flavonoides são responsáveis pela cor e aroma das flores e, nas frutas para atrair polinizadores e consequentemente na germinação de sementes, crescimento e desenvolvimento de mudas. Flavonoides protegem plantas e agem como filtros UV, são moléculas sinalizadoras, fitoalexinas, agentes desintoxicantes e compostos antimicrobianos defensivos. Os flavonoides são importantes na aclimatização das plantas, promovendo resistência à geada e à seca (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Os flavonoides apresentam várias propriedades farmacológicas, com potencial na prevenção de várias doenças associadas ao stress oxidativo, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Além do seu potencial antioxidante, os flavonoides demonstram uma boa atividade antibacteriana sobre isolados Gram-positivos e Gram-negativos, com habilidade em inibir a DNAgirase, funções da membrana celular e metabolismo de energia bacteriana (BARBIERI et al., 2017).

2.2.5 Ácidos Fenólicos

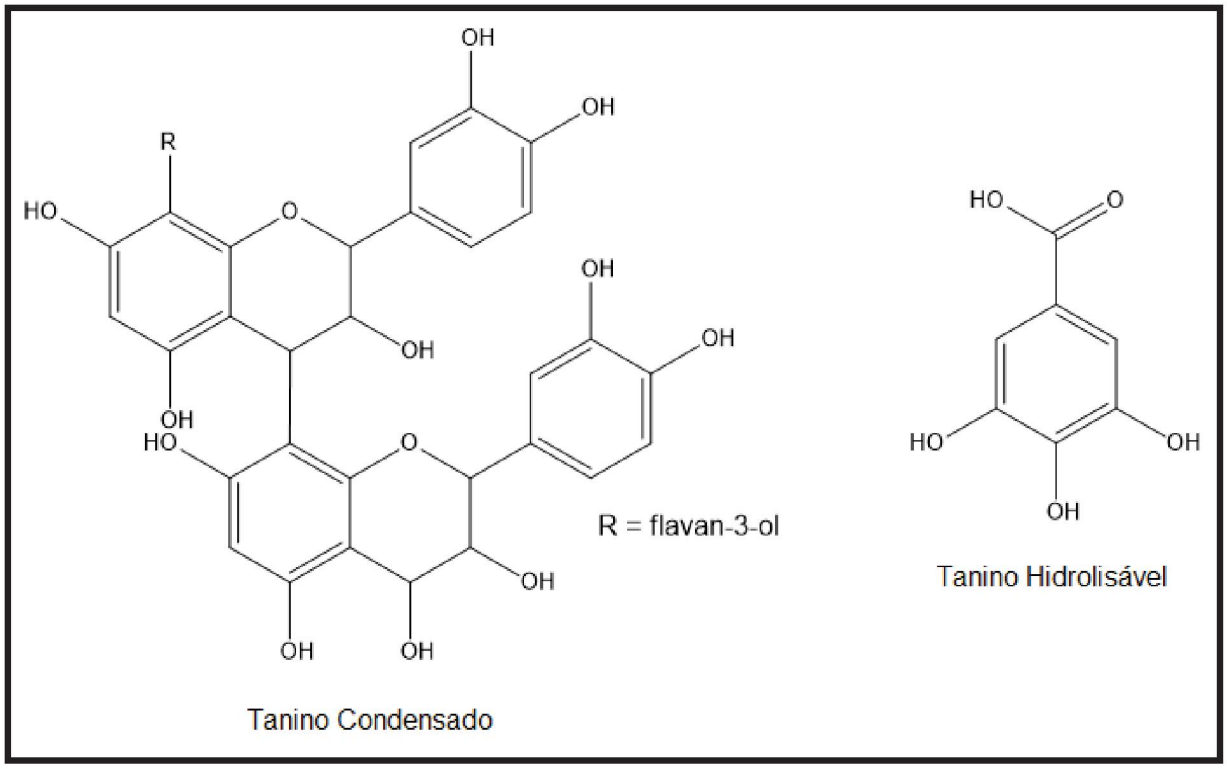
Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários que possuem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Os ácidos fenólicos são classificados em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos

hidroxibenzóicos incluem o ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatécuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C6–C1; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), como os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sináptico, sendo os mais comuns (ANGELO; JORGE, 2007). O anel fenólico destes ácidos pode estabilizar e deslocar os elétrons não pareados, fornecendo uma propriedade antioxidante aos ácidos fenólicos. Sua propriedade antioxidante depende, do número e a posição dos grupos hidroxila no anel fenólico (GOUFO; TRINDADE, 2014). Além desta característica, cada classe pode conter até centenas de compostos individuais que, por diversos estudos, demonstram capacidade de regular várias vias moleculares celulares, levando a efeitos antioxidativos, antiproliferativos e anti-inflamatórios (RUSSO et al., 2017).

2.2.6 Taninos

Os taninos são um grupo heterogêneo de compostos fenólicos presentes nas plantas. Estes possuem entre 12-16 grupos fenólicos e 5-7 anéis aromáticos por 1000 unidades de massa molecular relativa (LAMY et al., 2011). Os taninos podem ser classificados em taninos condensados e hidrolisáveis (Figura 2). Os taninos hidrolisáveis representam estéres de ácidos fenólicos (geralmente ácido gálico com galotaninos ou outros ácidos fenólicos derivados da oxidação de resíduos de galoil com elagitaninos) e um poliol, geralmente a glicose. Os taninos condensados, também denominados de proantocianidinas, estão entre os polifenóis mais abundantes do reino vegetal e, são derivados de monômeros de flavonoides. Os membros mais comuns deste grupo são as procianidinas, compostas de flavan-3-ol monomérico, catequina e/ou epicatequina (LAMY et al., 2011; REDONDO et al., 2014).

FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS



FONTE: O autor (2018).

Os taninos possuem múltiplas atividades biológicas, incluindo cardioprotetoras, propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antivirais, antidiarréicos, antissépticas, hemostáticas, antifúngicas e antibacterianas atribuídas principalmente à sua atividade antioxidante e antirradical livre (REDONDO et al., 2014). Muitas espécies de plantas produtoras de taninos são usadas na medicina popular para diferentes propósitos. Suas aplicações estão relacionadas principalmente às suas propriedades adstringentes. Alguns estudos mostram que muitos taninos atuam interceptando radicais livres ativos. Várias doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, aterosclerose e o próprio processo de envelhecimento estão associados a altas concentrações de radicais livres intercelulares (JESUS et al., 2012).

2.2.7 Terpenos

Os terpenos representam a maior classe de compostos orgânicos de ocorrência natural, com mais de 40.000 estruturas relatadas até o momento. Sua

estrutura química básica consiste de uma unidade de isopreno (C5H8). Eles são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno em monoterpenos (C10H16), sesquiterpenos (C15H24), diterpenos (C20H32) e triterpenos (C30H40). Os terpenos possuem uma enorme diversidade estrutural química que é gerada por várias vias metabólicas terpenóides, bem como pelos tipos celulares especializados que participam de sua biossíntese (CHO et al., 2017). Após a formação do esqueletos básicos de carbono, modificações subsequentes, como oxidação, redução, isomerização e conjugação, levam a um enorme número de estruturas, que representam a maior classe de metabólitos especializados em plantas (YANG et al., 2016).

Os monoterpenos e sesquiterpenos são amplamente distribuídos em plantas. Os monoterpenos são o principal componente, cerca de 90% dos compostos voláteis bioativos em flores, frutos, caules e folhas, desempenhando importante papel nas interações planta-ambiente (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016; YANG et al., 2016). Alguns dos principais terpenos dos óleos essenciais incluem compostos hidrocarbonetos monoterpenos (*p*-cimeno, limoneno, α-pineno e α-terpineno), monoterpenos oxigenados (cânfora, carvacrol, eugenol e timol), diterpenos (cembrene C, caurene e canforeno), sesquiterpenos hidrocarbonetos (β-cariofileno, germacreno D e humuleno), sesquiterpenos oxigenados (espatulenol, óxido de cariofileno), álcoois monoterpênicos (geraniol, linalol e nerol), álcool sesquiterpênico (patchoulol) (SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016). Durante décadas a atividade antimicrobiana destes compostos vem sendo estudada, e são habéis em inibir o crescimento de inúmeras bactérias (BARBIERI et al., 2017).

2.2.8 Alcaloides

Os alcaloides são uma classe de compostos orgânicos farmacologicamente ativos que se distinguem pela presença de anéis de nitrogênio e aromáticos na estrutura química. Os alcaloides são produzidos por uma grande variedade de organismos, tais como plantas, fungos, bactérias e animais (ALI SHAH et al., 2017). A biossíntese dos alcaloides geralmente começa com a modificação de aminoácidos, principalmente descarboxilação ou desaminação, e passa por etapas

adicionais, como metilação, hidroxilação e oxidação, e/ou acoplados com outros compostos. Existem mais de 12.000 alcaloides que foram identificados a partir de plantas (YANG et al., 2016). No século XIX, o primeiro alcaloide foi isolado a partir do ópio, chamado de morfina, subsequentemente, após esta descoberta, dois pesquisadores franceses isolaram outros alcaloides chamados de estricnina, emetina, piperina, cafeína, quinina, colchicina e conina (BARBIERI et al., 2017). Muitos alcaloides têm sido utilizados ao longo da história no campo da medicina apresentando muitos efeitos fisiológicos, como a quinina (antimalária), efedrina (antiasmático), vincamina (vasodilatador), reserpina (anti-hipertensivo), vinblastina e vincristina (antitumoral) e quinidina (antiarrítmico). Alguns alcaloides possuem atividades psicotrópicas e estimulantes (cocaína, cafeína e nicotina) e alguns com efeitos analgésicos (morfina) (ALI SHAH et al., 2017; BARBIERI et al., 2017; TAYLOR; JABBARZADEH, 2017).

2.3 ESPÉCIE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.

De acordo com Cronquist (1981), *Eugenia pyriformis* Cambess. possui enquadramento taxonômico demonstrado na Tabela 1.

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *E. pyriformis* CAMBESS.

Classificação taxonômica	
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledonea)
Ordem	Myrtales
Família	Myrtaceae
Gênero	*Eugenia*
Espécie	*Eugenia pyriformis* Cambess.

FONTE: CRONQUIST (1981).

2.3.1 Família

A família Myrtaceae é composta de no mínimo 133 gêneros e mais de 3800 espécies. Ela representa centros de distribuição na Austrália, sudeste da Ásia e sul da América, com pouca representação na África. No Brasil é representada por 23 gêneros e mil espécies distribuídas por todo o país principalmente pela Floresta Atlântica e restinga, sendo que, cerca de um terço destas espécies pertence ao gênero *Eugenia* (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

Os representantes da família prosperam em solos contendo baixa quantidade de magnésio e fósforo, com pouca drenagem e baixa quantidade de nutrientes e são empregados de diversas formas, tais como medicinal, alimentícia, aromática e industrial (FARIAS et al., 2009). As plantas da família Myrtaceae são fontes de uma grande quantidade de compostos biologicamente ativos (HESKES et al., 2012).

2.3.2 Gênero

O gênero *Eugenia* é um dos mais numerosos da família Myrtaceae, compreendendo cerca de 350 espécies nativas (MAGINA et al., 2009a), encontra-se representado nas diversas formações vegetais do Brasil, tanto pela sua riqueza específica, como pela abundância e frequência de suas espécies (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

Os frutos comestíveis de muitas de suas espécies são apreciados pelos homens e animais silvestres, como a pitanga (*Eugenia uniflora* Lam.), cereja do mato (*Eugenia involucrata* DC), uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.), jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) e cambucá (*Eugenia edulis* Vell.) (OLIVEIRA et al., 2006). Estudos químicos com espécies de *Eugenia* revelaram a presença de flavonoides, taninos, terpenóides e óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2006; MAGINA et al., 2009a).

2.3.3 Sinonímia vulgar

A espécie *E. pyriformis* Cambess. é conhecida pelo nome popular de uvaia, uvaieira, uvaia-do-campo, uvalha ou uvalha-do-campo (RASEIRA et al., 2004; STEFANELLO et al., 2008; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

2.3.4 Descrição botânica

A árvore possui de 5 a 15 m de altura com copa alongada, com ramificação ascendente, folhagem verde-clara e ramos finos, achatados, providos de pubescência serícea até velutínea. Apresenta casca pardo-clara-acinzentada, descamante e com fissuras pouco profundas, as quais deixam cicatrizes mais claras. As folhas são opostas, coriáceas e oblongo-lanceoladas, medindo de 3 a 7 cm de comprimento por 0,8 a 1,8 cm de largura. Ligeiramente pubescentes na face inferior do limbo e pecíolo, com ápice atenuado obtuso, base aguda e nervura principal muito saliente na face inferior (RASEIRA et al., 2004; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

As flores são brancas e produzidas em dicásios trifloros longamente pedunculados, com 2 a 2,5 cm de comprimento, algumas vezes solitários (MARCHIORI; SOBRAL, 1997). Florescem em novembro, dezembro e janeiro. O fruto é do tipo baga-piriforme, com comprimento variando entre 2 e 2,5 cm, amarelo, polpa carnosa, sucoso, ácido e pubescente (MATTOS, 1978). Contém de uma a três sementes que apresentam tegumento de coloração castanha, cotilédones carnosos e justapostos. Amadurecem em janeiro e fevereiro, tornando-se amarelos. Os frutos são comestíveis e muito apreciados na forma de sucos, e por várias espécies de pássaros, o que torna recomendável para reflorestamento e recomposição da vegetação em áreas de preservação permanente (OLIVEIRA et al., 2010; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

A planta é heliófita, seletiva higrófita e semidecídua, cultivada em pomares e empregada na medicina popular, seus frutos apresentam altos níveis de atividade antioxidante e compostos fenólicos (ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

Os óleos essenciais das flores e frutos de *E. pyriformis* apresentam em sua composição química sesquiterpenos em maior quantidade e monoterpenos em menor quantidade. Os constituintes principais são α-cadinol, δ-cadineno e β-cariofileno (STEFANELLO et al., 2009; STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009).

2.3.5 Ocorrência de *E. pyriformis*

A espécie é nativa das bacias do rio Paraná e Uruguai, no Brasil é encontrada nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (RASEIRA et al., 2004; STEFANELLO et al., 2008; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

2.3.6 Atividade antimicrobiana de *E. pyriformis* Cambess.

Em estudo realizado por Souza (2013) determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo para extratos, frações e compostos isolados de caule e folhas de *E. pyriformis*.

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e ausência de atividade antimicrobiana (maiores que 1000 µg/mL) (AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

Na avaliação da atividade antibacteriana das amostras testadas foi observado que o extrato cetônico do caule e da folha, as frações etanólicas acetato de etila e hidroalcoólica das folhas mostraram um bom potencial inibitório, com CIMs abaixo de 100 µg/mL contra os microrganismos Gram-positivos *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Na análise da atividade antifúngica os resultados sugerem uma eficiência da atividade de *E. pyriformis* sobre fungos leveduriformes. Os extratos brutos etanólicos e cetônicos e a fração etanólica acetato de etila de caule e de folhas de *E. pyriformis* mostraram boa atividade antimicrobiana frente aos fungos leveduriformes (*Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*) com valores de CIMs oscilando entre 7,81 e 62,5 µg/mL (SOUZA, 2013).

2.3.7 Potencial Sinérgico de *E. pyriformis* Cambess.

Em estudo realizado por Souza (2013) avaliou-se o potencial sinérgico de extratos e frações de *E. pyriformis* pela técnica *Checkerboard*. Neste estudo foi avaliada a influência dos extratos e frações de *E. pyriformis* em associação com a Vancomicina contra *E. faecalis* e *S. aureus,* e a associação com o Fluconazol frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis.* A avaliação foi realizada com amostras de *E. pyriformis* que apresentaram valores de CIM abaixo de 100 µg/mL frente aos microrganismos testados. A análise das associações de *E. pyriformis* com os antimicrobianos foi obtida através do cálculo da concentração inibitória mínima fracionada (FICI). Para a interpretação dos resultados, foram considerados como sinergismo (FICI ≤ 0,5); aditividade (FICI entre 0,5 e 4,0) ou antagonismo (FICI >4,0) (PALANIAPPAN, HOLLEY, 2010; CHUNG, NAVARATNAM, CHUNG, 2011).

A fração etanólica hidroalcoólica de folha potencializou a atividade da Vancomicina sobre *E. faecalis* com um valor de FICI de 0,3749 e sua atividade mostrou uma redução da CIM da Vancomicina em 8 vezes. Na associação dos extratos e frações de *E. pyriformis* e Vancomicina frente a *S. aureus,* observou-se que *E. pyriformis* não interferiu na ação da Vancomicina, com valores de FICI entre 1,25 e 2,1249 (SOUZA, 2013).

A análise da associação de *E. pyriformis* com o antifúngico Fluconazol demonstrou interações entre o extrato etanólico e a fração etanólica acetato de etila de folhas para os microrganismos *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, com interação de sinergismo e capaz de reduzir o crescimento microbiano de forma mais eficiente que quando o fármaco foi testado isoladamente (SOUZA, 2013).

2.4 ESPÉCIES DE *Eugenia* COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Várias espécies de *Eugenia* tem apresentado potencial antimicrobiano, entre elas, *E. axillaris* (SW.) Willd., *E. beaurepaireana* (Kiaersk.) D.Legrand, *E. brasiliensis* Lam, *E. calycina* Cambess, *E. chlorophyla* O.Berg, *E. dysenterica* DC, *E. mansoni* O.Berg, *E. monteverdensis* Barrie, *E. pyriformis* Cambess, *E. repanda* O.Berg, *E. umbelliflora* O.Berg, *E. uniflora* L e *E. uruguaiensis* Cambess (Tabela 2).

Preparações de óleos essenciais, extratos de folhas, caules e sementes de espécies de *Eugenia* têm sido pesquisados para avaliar seu potencial contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes comparadas ao potencial antimicrobiano de drogas padrão (SOUZA et al., 2018).

TABELA 2 - ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Eugenia*.

(continua)

Espécies *Eugenia*	**Material / Procedimento de Extração**	**Método / Controle**	**Microrganismos e Resultados**	**Referências**
E. axillaris (SW.) Willd.	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Microdiluição / Gentamicina e Anfotericina B.	*Bacillus cereus* ATCC 14579 = 625 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC29213 = 625 µg/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = 625 µg/mL *Escherichia coli* ATCC 25922 = 625 µg/mL *Candida albicans* ATCC 10231 = 625 µg/mL *Aspergillus niger* ATCC 16401 = 625 µg/mL	SCHMIDT et al., 2006.
E. beaurepaireana (Kiaersk.) D.Legrand	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Microdiluição / Gentamicina	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = 1110 µg/mL *Escherichia coli* ATCC 25922 = 556,6 µg/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = 278,3 µg/mL	MAGINA et al., 2009b.
E. brasiliensis Lam.	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Microdiluição / Gentamicina	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = 156,2 µg/mL *Escherichia coli* ATCC 25922 = 624,9 µg/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = 624,9 µg/mL	MAGINA et al., 2009a.
E. calycina Cambess.	Extrato etanólico Cascas e folhas Maceração Fração hexano, diclorometano e acetato de etila.	Microdiluição / Vancomicina, gentamicina e itraconazol	*Bacillus cereus* ATCC 14579 = 250 - 2000 µg/mL *Micrococcus luteus* ATCC 9341 = 1000 - 2000 µg/mL *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12229 = 1000 - 2000 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = 1000 - 2000 µg/mL *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 = 1000 - 2000 µg/mL *Escherichia coli* ATCC 11229 = 1000 - 2000 µg/mL *Cryptococcus sp.* D (isolado clínico) = 15,62 - 2000 µg/mL *Cryptococcus gatti* (isolado clínico) = 31,2 - 2000 µg/mL *Cryptococcus neoformans* (isolado clínico) = 31,2 - 2000 µg/mL	FERREIRA et al., 2014.

TABELA 2 - ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Eugenia*.

(continuação)

Espécies *Eugenia*	Material / Procedimento de Extração	Método / Controle	Microrganismos e Resultados	Referências
E. chlorophyla O.Berg	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Microdiluição / Bacitracina e Cetoconazol	*Streptococcus mutans* ATCC 15175 = 50 - 500 µg/mL *Streptococcus sobrinus* (isolado clínico) = 50 - 500 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 = 500 µg/mL *Kocuria ryzophila* ATCC 9341 = 100 – 500 µg/mL *Staphylococcus* aureus ATCC 6538 = 500 µg/mL *Candida albicans* ATCC 1023 = 500 µg/mL	STEFANELLO et al., 2008.
E. dysenterica DC.	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Microdiluição / Fluconazol, anfotecina B e itraconazol	*Criptococcus neoformans* = ≤ 250 µg/mL *Criptococcus gatii* (isolado clínico) = ≤ 250 µg/mL	COSTA et al., 2000.
E. mansoni O.Berg	Extrato etanólico, cetônico e clorofórmio Folhas Maceração	Agar difusão / Microdiluição Nistatina e gentamicina	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = Resistente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p = Sensível (+) *Listeria inocua* (isolado clínico) = Sensível (+) *Aspergillus niger* ATCC 2601 = Sensível (+) *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*ATCC 27294= Sensível (+) / 200 µg/mL.	BERTUCCI et al., 2009.
E. monteverdensis Barrie	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Microdiluição / Gentamicina	*Bacillus cereus* ATCC 14579 = 1250 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 = 1250 µg/mL *Escherichia coli* ATCC 25922 = 1250 µg/mL	VILLANUEVA; HARBER; SETZER et al., 2009.

TABELA 2 - ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Eugenia*.

(continuação)

Espécies *Eugenia*	**Material / Procedimento de Extração**	**Método / Controle**	**Microrganismos e Resultados**	**Referências**
E. pyriformis Cambess	Extrato etanólico Frações Hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica Extrato cetônico Soxhlet	Microdiluição / Vancomicina e fluconazol	*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 = 62,5 - 1000 µg/mL *Stapylococcus aureus* ATCC 25923 = 62,5 - 250 µg/mL *Escherichia coli* ATCC 25922 = 250 - 1000 µg/mL *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 = 250 - 1000 µg/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = 250 - 1000 µg/mL *Candida albicans* ATCC 40175 = 7,81 - 62,5 µg/mL *Candida krusei* ATCC 40147 = 7,81 - 31,25 µg/mL *Candida parapsilosis* ATCC 40038 = 7,81 - 62,5 µg/mL	SOUZA et al., 2014.
E. repanda O.Berg	Extrato etanólico maceração	Agar dfusão, Microdiluição / Nistatina e gentamicina	*Psudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = Resistente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p = Resistente *Listeria inocua* (isolado clínico) = Sensível (+) *Aspergillus niger* ATCC 2601 = Sensível (+) *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* ATCC 27294 = Sensível (+) / 200 µg/mL.	BERTUCCI et al., 2009.
E. umbelliflora O.Berg	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Microdiluição / Gentamicina	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = 119,2 µg/mL *Escherichia coli* ATCC 25922 = 477 µg/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = 477 µg/mL	MAGINA et al., 2009a.

TABELA 2 - ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES DE *Eugenia*.

(conclusão)

Espécies *Eugenia*	**Material / Procedimento de Extração**	**Método / Controle**	**Microrganismos e Resultados**	**Referências**
E. uniflora L.	Óleo Essencial Folhas Hidrodestilação	Ágar difusão Microdiluição / Sulfatiazina e cefalotina	*Candida albicans* (isolado clínico) = 208,3 µg/mL *Candida parapsilosis* (isolado clínico) = 208,3 µg/mL *Candida guilhermondii* (isolado clínico) = 109,4 µg/mL *Candida globosa* (isolado clínico) = 187,5 µg/mL *Candida lipolytica* (isolado clínico) = 93,7 µg/mL *Candida laurentii* (isolado clínico) = 208,3 µg/mL *Trichosporon asahii* (isolado clínico) = 312,5 µg/mL	VICTORIA et al., 2012.
	Extrato hidroalcoólico de folhas Maceração com etanol-água (90-10%)	Microdiluição Bioautografia / Tetraciclina, vancomicina, penicilina e nistatina	*Escherichia coli* ATCC 25922 = 500 µg/mL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 = >1000 µg/mL *Bacillus subtilis* ATCC 6623 = >1000 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = 250 µg/mL *Candida albicans* (isolado clínico) = >1000 µg/mL *Candida krusei* (isolado clínico) = 31,2 µg/mL *Candida parapsilosis* (isolado clínico) = 125 µg/mL *Candida tropicalis* (isolado clínico) = 31,2 µg/mL	HOLETZ et al., 2002.
E. uruguayensis Cambess.	Extratos / maceração com EtOH/H_2O 70:30, Acetona e $CHCl_3$	Microdiluição / sem dados	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538p MSSA = 31,3 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 MRSA = 31,3 µg/mL *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 MRSA = 31,3 µg/mL *Staphylococcus aureus* USA 100 MRSA = 31,3 µg/mL	BARNECHE et al., 2011.

2.5 MECANISMOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários das plantas podem afetar a célula bacteriana ou fúngica de várias maneiras diferentes. Os mecanismos de ação destes agentes podem incluir o rompimento da função e estrutura da membrana microbiana, interromper a síntese ou função do DNA/RNA, interferir no metabolismo intermediário, induzir a coagulação dos constituintes citoplasmáticos e interromper a comunicação celular. Estas ações antimicrobianas geralmente incluem uma sequência de eventos, entre elas a interação dos metabólitos secundários com a membrana celular, a difusão através da membrana e a interação destes agentes com os constituintes e processos intracelulares (RADULOVIĆ et al., 2013).

Os diversos compostos químicos agem de maneira específica e, muitos ainda, possuem mecanismos de ação desconhecidos. A propriedade antimicrobiana dos flavonoides contra patógenos bacterianos e fúngicos é mediada por sua ação na membrana das células microbianas. Devido à sua hidrofobicidade, são capazes de penetrar na membrana fosfolipídica, interagindo com as proteínas de membrana presentes na parede celular bacteriana, levando ao aumento da permeabilidade e a interrupção da membrana (DAGLIA, 2012). Os flavonoides podem interferir no empilhamento de bases de ácidos nucléicos, causando uma ação inibitória sobre a síntese de ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico das bactérias (SIMÕES; BENNETT; ROSA, 2009).

O efeito antimicrobiano dos taninos é devido à inativação da membrana microbiana e das proteínas transportadoras da parede celular (UPADHYAY et al., 2014). As catequinas complexam-se irreversivelmente com aminoácidos nucleofílicos, levando frequentemente à sua inativação e perda de função. Os alvos principais na célula microbiana incluem adesinas proteicas expostas à superfície, polipeptídeos da parede celular e enzimas ligadas à membrana (RADULOVIĆ et al., 2013).

A ação antimicrobiana dos alcaloides é atribuível à capacidade de se intercalar com o DNA, resultando na depressão e deterioração da divisão celular (UPADHYAY et al., 2014). Os compostos terpenóides ainda não possuem seu

mecanismo de ação claramente definido, mas é atribuído à ruptura da membrana em microrganismos. Os compostos terpênicos apresentam propriedades lipofílicas sobre a membrana bacteriana, sendo seu local de ação a bicamada fosfolípidica da célula. Esta propriedade está diretamente relacionada à sua hidrofobicidade, que permite o rompimento dos lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando suas estruturas e aumentando sua permeabilidade a prótons, íons e outros constituintes celulares (DORMAN; DEANS, 2000; GUINOISEAU et al., 2010).

O mecanismo de ação antimicrobiano dos óleos essenciais não é totalmente elucidado. Estes apresentam diferentes grupos de compostos químicos, sendo desta forma, sua atividade antibacteriana não atribuível a um único mecanismo de ação, mas em vários alvos celulares (BURT, 2004). Por exemplo, o timol, um fenol monoterpênico do tipo p-mentano aromático e um dos metabólitos secundários mais ativos das plantas em geral. Este composto interage com a membrana das células citoplasmáticas externa e interna, integrando-se na região do grupo de cabeça polar da bicamada lipídica. Esta interação com a membrana celular, provoca um aumento da permeabilidade e posterior desintegração. No entanto, o timol também pode participar na regulação ascendente ou descendente de genes envolvidos na síntese de proteínas da membrana externa, inibição de enzimas envolvidas na proteção contra o estresse térmico, síntese de ATP, vias metabólicas cítricas, entre outros mecanismos (RADULOVIĆ et al., 2013).

2.6 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os métodos mais comuns para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas são o de difusão e diluição.

O método de difusão em ágar é um método físico, que em meio de cultura sólido um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa. Neste procedimento as placas de ágar são inoculadas com o inóculo padronizado do microrganismo teste. Discos de papel com cerca de 6 mm de diâmetro contendo a substância teste em concentrações conhecidas, são colocados na superfície do ágar, e estas placas são incubadas sob condições adequadas. O agente antimicrobiano se difunde no ágar e inibe o crescimento do microrganismo,

ocorrendo o aparecimento de um halo, denominado halo de inibição (BAKER et al., 1991; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

O teste de difusão é uma das abordagens mais antigas para teste de susceptibilidade a antimicrobianos e continua sendo um dos métodos mais utilizados (MATUSCHEK; BROWN; KAHLMETER, 2014). Ele é empregado para microrganismos de crescimento rápido e algumas bactérias fastidiosas. O método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, dos cilindros de aço inoxidável ou vidro e da perfuração em ágar (OSTROSKY et al., 2008). Este método não é apropriado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) por ser impossível quantificar a concentração do agente antimicrobiano que se difunde no ágar. O ensaio de difusão oferece muitas vantagens em relação a outros métodos, como simplicidade, baixo custo, capacidade de testar um grande número de microrganismos e agentes antimicrobianos, e a facilidade para interpretar os resultados fornecidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Porém, por este método, vários fatores podem se tornar fontes de erros, tais como a composição e preparação incorreta do meio de cultura, espessura do meio, densidade incorreta do inóculo, temperatura e tempo de incubação inadequados, leitura prematura e erro na medição dos halos de inibição. Para resultados confiáveis é necessário trabalhar com uma metodologia padronizada (ALVES et al., 2008).

O método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Este método é uma ferramenta para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano ou fúngico. Podem ser usados pelas técnicas de diluição em caldo ou em ágar. Os agentes antimicrobianos são testados em diluições seriadas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a CIM (ALVES et al., 2008). O método de diluição em caldo pode ser feito de duas maneiras, a primeira é a macrodiluição, que utiliza vários tubos de ensaio, com volumes de meio de cultura variando entre 1 a 10 mL. É um método trabalhoso, que consome muito tempo e requer muito espaço. A segunda, é a microdiluição que utiliza microplacas estéreis de cavidades. Apresenta várias vantagens como baixo custo e pode ser usado para testar numerosas amostras. A maior dificuldade do método está na visualização do

resultado, pois alguns microrganismos se aderem à base da cavidade, enquanto outros permanecem em suspensão (OSTROSKY et al., 2008).

Existem muitas diretrizes aprovadas para teste de susceptibilidade antimicrobiana para bactérias e fungos. Os padrões mais reconhecidos são fornecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Estas diretrizes fornecem um procedimento uniforme para prática desta metodologia e permite que o bioensaio seja realizado de forma padronizada (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Algumas metodologias *in vitro* são utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana de combinações de agentes antimicrobianos. Entre elas a técnica *Time kill*, *Checkerboard,* disco combinado e disco aproximação.

O método *Time kill* ou curva de morte é usado para o estudo de novos antibióticos e para determinar a sinergia ou antagonismo de duas ou mais substâncias administradas concomitantemente. A curva de morte é uma ferramenta para a determinação dos efeitos antimicrobianos em bactérias e fungos, fornecendo informações sobre a dinâmica da atividade bactericida ou fungicida e a relação entre a concentração de sua atividade microbicida (MUKHERJEE et al., 2005; RAMIREZ; CASTAÑO, 2009).

O método *Checkerboard* refere-se a múltiplas diluições com dois antimicrobianos testados em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das concentrações inibitórias mínimas para os microrganismos testados. As concentrações testadas para cada antimicrobiano são de quatro ou cinco diluições abaixo da CIM, usando dois quarto de diluições de cada antimicrobiano. O *Checkerboard* consiste de colunas contendo alguma quantidade da droga A, diluídas ao longo do eixo-x, e linhas contendo a droga B diluídas ao longo do eixo-y (LORIAN, 1991).

As metodologias do disco combinado e disco aproximação são empregadas para avaliar interações entre duas drogas, onde discos contendo droga A e B são distribuídas na placa com o microrganismo teste. Na técnica do disco combinado, discos contendo a droga A, B e a associação das drogas AB são distribuídas na placa de meio de cultura contendo o microrganismo teste. Os halos de inibição

formados são medidos e avaliados. Nesta metodologia interações sinérgicas são observadas pelo aumento do halo de inibição do disco contendo a associação da droga AB em relação ao halos formados pelo disco A e B isolados e, nas interações antagônicas ocorre uma diminuição do halo de inibição do disco contendo a associação da droga AB em relação ao halos formados pelo disco A e B isolados. Na técnica do disco aproximação, discos contendo a droga A e B são colocados na placa de meio de cultura com o microrganismo teste a uma distância entre eles igual ou ligeiramente maior que o raio de inibição quando estes são avaliados isoladamente. Nesta metodologia o fenômeno de aditividade mostra a formação de dois halos independentes e, nas combinações sinérgicas os halos de inibição se unem formando alongamentos ou pontes. Nas combinações de antagonismo ocorre a formação de um corte ou bloqueio nos halos de inibição formado pelas duas substâncias teste. A vantagem destas técnicas é a simplicidade, fornecendo informações qualitativas sobre interações antimicrobianas (LORIAN, 1991).

2.7 PATÓGENOS FÚNGICOS

Durante as últimas décadas, os fungos tem sido considerados uma preocupação crescente devido ao aumento no número de casos de infecção e pelas altas taxas de morbidade e mortalidade (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013).

O surgimento de doenças causadas por fungos está principalmente relacionado a prevalência de infecções causadas por imunocomprometimento e uso de imunossupressores em intervenções, como transplante de órgãos e tratamentos hemoterapêuticos (ROLLIN-PINHEIRO et al., 2016). Além disso, cepas resistentes a drogas estão surgindo, e o número de infecções por espécies intrinsecamente resistentes aumentou consideravelmente. Esta realidade promoveu um estímulo as pesquisas para o desenvolvimento de drogas sintéticas, e paralelamente uma atenção tem se concentrado na busca de espécies de plantas com propriedades antifúngicas (NEGRI et al., 2014).

O gênero *Candida* spp. corresponde a cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas em hospitais terciários (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013). Na prática clínica, a maioria dos casos de candidíase foi atribuída a *Candida albicans*.

C. albicans é um patógeno fúngico oportunista comum em humanos, que coloniza de forma assintomática a pele e as superfícies mucosas da maioria dos indivíduos saudáveis. No entanto, alterações na imunidade, fisiologia e microbiota do hospedeiro podem levar à incapacidade de controlar a colonização de *C. albicans* em superfícies mucosas e ocorrer o desenvolvimento de doenças. A candidíase invasiva disseminada tem uma taxa de mortalidade estimada em 40%, mesmo com o uso de drogas antifúngicas (LU; SU; LIU, 2014).

No entanto, mais recentemente, outras espécies foram identificadas como patógenos comuns, e a prevalência dessas espécies em infecções humanas vem mudando nos últimos anos. Nos países europeus, uma análise mostrou aumento nas taxas de incidência para a *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (ALVES et al., 2014).

Os fungos filamentosos que causam as micoses cutâneas estão entre as infecções fúngicas mais comuns. Os dermatófitos são fungos filamentosos causadores da infecção cutânea chamada dermatofitose. Os dermatófitos são classificados em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (OUF et al., 2016). Esses fungos utilizam a queratina como principal substrato e, por essa razão, a doença afeta principalmente os tecidos queratinizados. Em humanos, isso resulta em lesões na pele, couro cabeludo e unhas. Cerca de 90% das onicomicoses são causadas principalmente por dermatófitos, especialmente *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (ZIMMERMAM-FRANCO et al., 2013).

Dentre os fungos filamentosos envolvidos com infecções invasivas em ambiente hospitalar destaca-se o gênero *Aspergillus* spp. *Aspergillus* é um fungo filamentoso que pode levar a uma variedade de doenças infecciosas, alérgicas dependendo do estado imunológico do hospedeiro (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011). Os seres humanos constantemente inalam numerosos conídeos destes fungos, os quais são eliminados pelo muco ciliar e por mecanismos imunológicos. O desenvolvimento de aspergilose pulmonar requer a predisposição de alguns fatores tais como, alergias (asma), doenças das vias aéreas e doenças crônicas da cavidade pulmonar ou deficiência imune (CHABI et al., 2015). A pneumonia causada por fungos oportunistas, sendo a espécie *Aspergillus* a mais comum, é a manifestação mais frequente e potencialmente fatal de infecções por fungos

invasivos em pacientes crônicos imunossuprimidos, com malignidades hematológicas e receptores em transplantes de células tronco hematopoiéticas (CUNHA et al., 2013).

Os medicamentos comumente prescritos para o tratamento de candidíases incluem uma variedade de drogas imidazólicas (cetoconazol, miconazol e clotrimazol) e triazólicas (fluconazol, itraconazol e voriconazol) que interrompem a biossíntese do ergosterol, um componente específico de membranas celulares. Além disso incluem-se os medicamentos polienos, nomeadamente a anfotericina B e nistatina, os quais formam um complexo com os esteróis presentes na membrana fúngica resultando em vazamento celular, e as equinocandinas que inibem a síntese da parede celular β-(1,3)-glucans (FARIA et al., 2011). Para o tratamento das dermatofitoses são prescritos antifúngicos sistêmicos tais como, cetoconazol, fluconazol e derivados de itraconazol (OUF et al., 2016). As aspergiloses são tratadas com Anfotericina B ou Voriconazol, como tratamento de primeira escolha. Os derivados de equinocardina tais como, caspofungina, micafungina e anidulafungina são agentes efetivos no tratamento de aspergiloses refratárias, após tratamento padrão ou quando os pacientes não toleram os agentes de primeira escolha (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011).

2.8 TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais possuem grande importância na prevenção e tratamento de doenças. Efeitos benéficos comprovados dessas plantas, baixo custo e compatibilidade com o meio ambiente são as razões mais importantes do uso de plantas medicinais. Porém, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias agressivas e, portanto devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (AZAM et al., 2018). Algumas vezes, uma mesma planta pode apresentar tanto ação terapêutica quanto ação tóxica. Os fatores que influenciam de maneira importante são a forma de preparo e dosagem. A variação de dosagem pode fazer um medicamento fitoterápico se transformar em algo prejudicial à saúde (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

Considerando seus vários efeitos tóxicos, é de grande importância a avaliação do potencial tóxico dos compostos ativos presentes nas espécies vegetais, garantindo a segurança no uso das mesmas. O uso de bioensaios para monitorar a bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado à pesquisa fitoquímica (ROGERO et al., 2003).

Existe a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de compostos bioativos para uso em seres humanos. Estes podem promover alguns tipos de resultados preliminares relacionados à interação entre os compostos e o agente biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais (DAGUANO; SANTOS; ROGERO, 2007). Um dos debates éticos em ampla discussão está relacionado ao uso de animais em experimentos laboratoriais. Diversas leis e projetos foram elaborados para garantir aos animais cobaias, uma boa qualidade de vida antes e durante os experimentos laboratoriais (BEDNARCZUK et al., 2010). Além da questão ética, existe o fator financeiro envolvido nos estudos de toxicidade *in vivo*. Assim, uma das soluções para esta problemática sugere a implementação de ensaios de toxicidade *in vitro*, como testes preliminares, com o intuito de predizer o potencial tóxico de uma substância, realizando-se posteriormente os ensaios necessários com animais de laboratório (ROGERO et al., 2003). Entre os testes de atividade *in vitro* destacam-se as metodologias de *Artemia salina*, atividade hemolítica e citotoxicidade.

2.8.1 *Artemia salina*

O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi desenvolvido para o monitoramento de compostos bioativos e rastreamento de substâncias tóxicas em extratos de plantas (MEYER et al., 1982). Os laboratórios de produtos naturais utilizam este ensaio nas suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural como técnica inicial de triagem biológica e direcionamento do estudo fitoquímico (ARCANJO et al., 2012).

O ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *A. salina*, microcrustáceos de água salgada empregados como alimento vivo para peixes, é um método de fácil obtenção, rápido e de baixo custo (MEYER et al., 1982). É um dos testes mais

valiosos para testes de ecotoxicidade (RAJABI et al., 2015). Por esse método, é possível determinar a concentração letal 50% (CL_{50}) dos componentes ativos capaz de matar 50% de náuplios em um meio salino (ARAÚJO; CUNHA; VENEZIANI, 2010). A toxicidade para esse microcrustáceo tem boa correlação com estudos de atividade antiviral, antitumoral e anti-*Trypanosoma cruzi* (MCLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998; MEYER et al., 1982; SIQUEIRA et al., 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que existe uma correlação muito boa entre a CL_{50} de extratos de plantas para os microcrustáceos de água salgada e as doses letais medianas (DL_{50}) dos mesmos extratos, administrados por via oral em camundongos (COSTA et al., 2010).

2.8.2 Atividade Hemolítica

O teste para verificação da ação hemolítica *in vitro* tem sido utilizado como uma das metodologias de triagem para diversos agentes tóxicos. O teste de hemólise *in vitro* já foi empregado por diversos autores para a avaliação toxicológica de diferentes plantas (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

Este ensaio utiliza glóbulos vermelhos (RBC) de mamíferos *in vitro* para avaliação rápida dos efeitos prejudiciais à membrana plasmática. A ação hemolítica dos produtos naturais pode ocorrer por vários mecanismos, dissolvendo ou aumentando a permeabilidade da membrana celular até sua completa ruptura (SOBRINHO et al., 2016). Permite quantificar a liberação da hemoglobina (hemólise) e ainda, o índice de desnaturação da hemoglobina, avaliado através de sua forma oxidada, ambos quantificados por espectrofotometria. O sistema usa a hemoglobina liberada durante o dano de hemácias como um indicador para determinar quantitativamente a concentração na qual os agentes tensoativos afetam e rompem a membrana plasmática. A relação entre a hemólise e a oxidação da hemoglobina fornece um parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vitro* (PAPE; HOPPE, 1990; ANVISA, 2012). Uma alternativa para o método é a observação de formação de halos de hemólise em placas de ágar sangue de carneiro (BEDNARCZUK et al., 2010). Independente da metodologia escolhida faz-

se necessário a avaliação dessa atividade, indicando possíveis danos da espécie estudada sobre os eritrócitos.

2.8.3 Citotoxicidade

A caracterização da citotoxicidade *in vitro* é uma prática comum na avaliação de produtos naturais e fundamental para análise inicial da toxicidade dos mesmos. É possível caracterizar reações de toxicidade pela exposição de culturas celulares a amostras de compostos bioativos. Os sistemas de cultura de células *in vitro* não só podem imitar o estado fisiopatológico de várias doenças, como também podem fornecer informações úteis sobre a boa previsibilidade de compostos bioativos *in vivo*, e informações de perfis de toxicidade (RAUSCH, 2006).

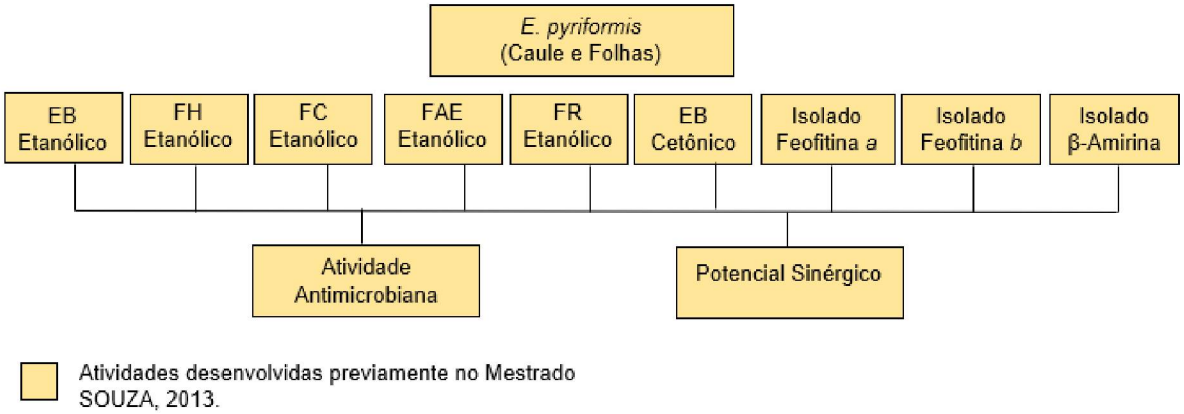
A atividade citotóxica de produtos naturais pode ser estabelecida em cultura de células tumorais de várias linhagens através de diferentes métodos, verificando-se a integridade da membrana, alterações morfológicas celulares, proliferação celular e conteúdo de proteínas da população celular. Estas alterações podem ser causadas por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (GLOECKNER; JONULEIT; LEMKE, 2001; ROGERO et al., 2003; RAUSCH, 2006).

Os danos ocorridos à morfologia celular em cultura são avaliados através de microscopia sem coloração específica por um determinado tempo. A viabilidade celular é avaliada através do uso de corantes vitais, como o azul de tripan, eosina e formazan. Além desses, são utilizados também corantes para proteínas que se ligam eletrostaticamente aos íons das macromoléculas contendo cargas opostas ou medindo o teor de ATP. Esses ensaios baseiam-se na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante vital (MACIEL et al., 2002; MIOSO et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Durante o mestrado foram realizados estudos de atividade antimicrobiana e de avaliação do potencial sinérgico de amostras obtidas de caule e folhas de *E. pyriformis* Cambess. As amostras analisadas foram os extratos bruto cetônico e etanólico, as frações obtidas a partir do extrato etanólico (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente) e os isolados feofitina *a*, feofitina *b* e β-amirina. Estas amostras foram preparadas, analisadas e cedidas para o estudo microbiológico pela pesquisadora de mestrado Lorene Armstrong (2011), em um projeto de parceria desenvolvido pelo laboratório de fitoquímica e farmacotécnica, da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR. As atividades desenvolvidas no mestrado estão representadas no fluxograma da Figura 3.

FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DA PESQUISA DE *Eugenia pyriformis* DESENVOLVIDAS NO MESTRADO



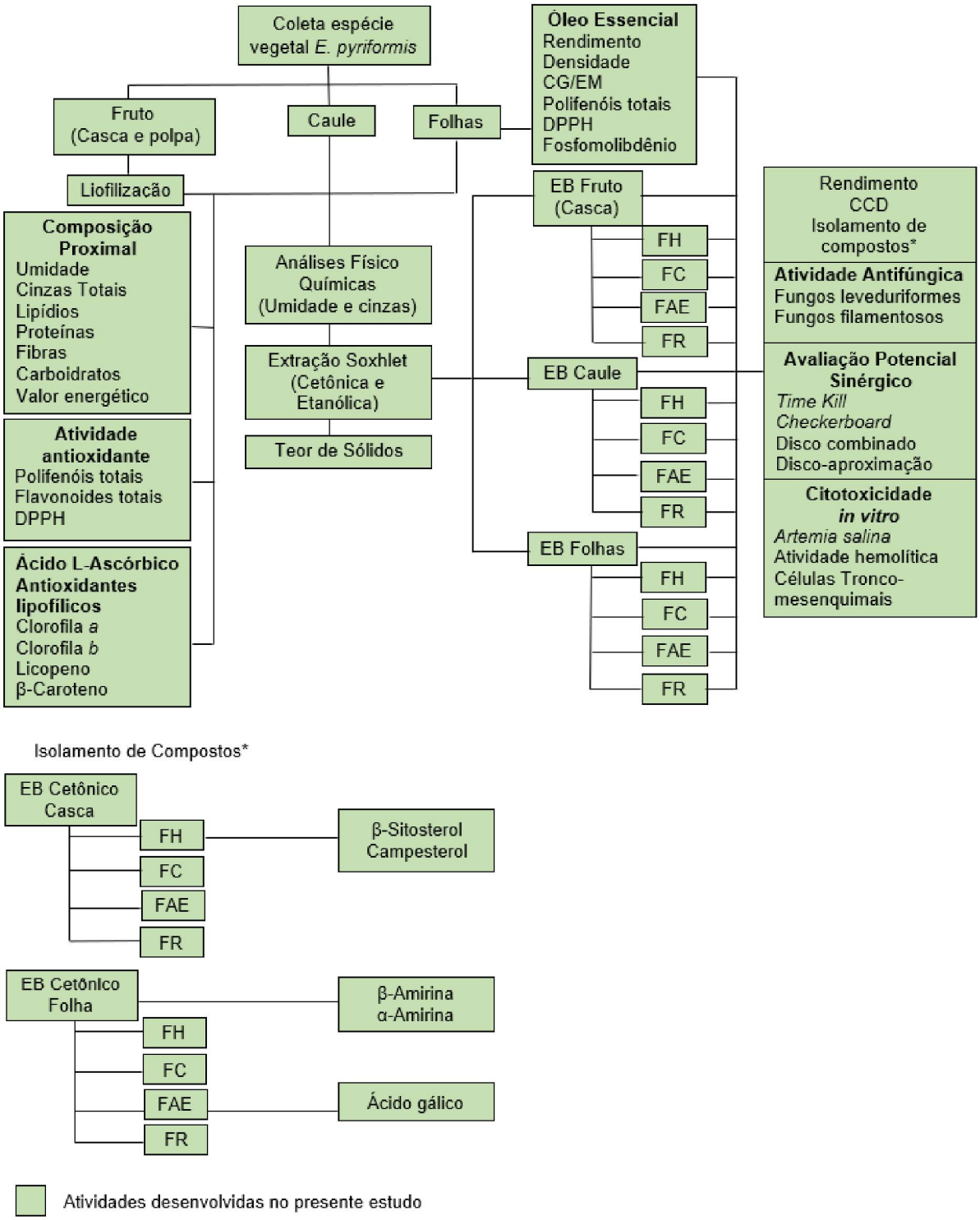
FONTE: O autor (2015).

LEGENDA: EB: extrato bruto, FH: fração hexano, FC: fração clorofórmio, FAE: fração acetato de etila, FR: fração hidroalcoólica remanescente.

Os resultados promissores obtidos nas avaliações microbiológicas e de potencial sinérgico no mestrado com a espécie *E. pyriformis* (SOUZA et al., 2014) estimularam a continuação da pesquisa no intuito de isolar novos compostos, avaliar outros microrganismos, utilizar diferentes técnicas de combinação de fármacos e avaliar *in vitro* o potencial de toxicidade.

As etapas da pesquisa desenvolvidas durante o doutorado são demonstradas no fluxograma apresentado na Figura 4.

FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DA PESQUISA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.



FONTE: O autor (2015).

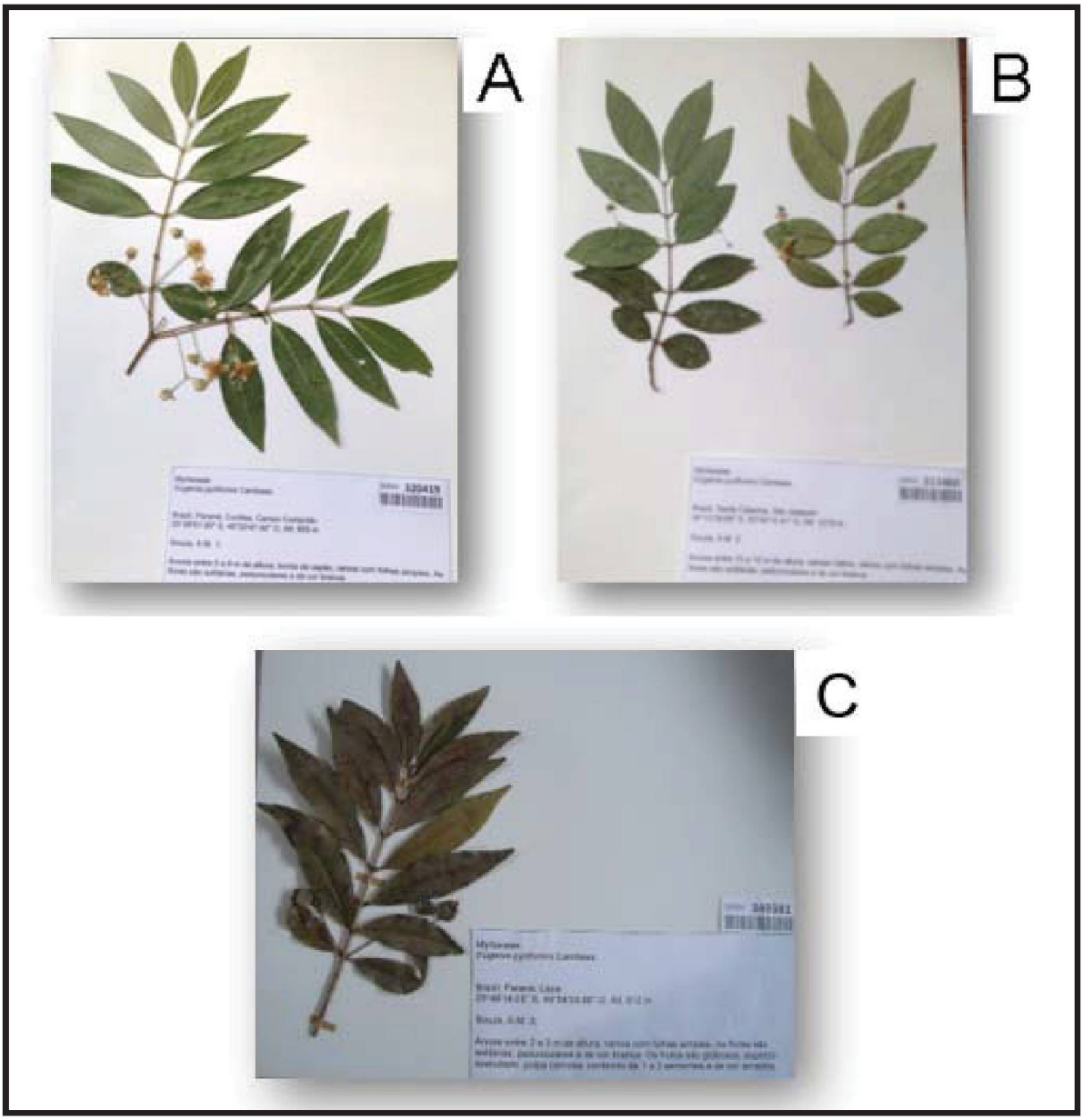
LEGENDA: EB: extrato bruto, FH: fração hexano, FC: fração clorofórmio, FAE: fração acetato de etila, FR: fração hidroalcoólica remanescente.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

3.1.1 Coleta das Amostras

Partes aéreas de *Eugenia pyriformis* Cambess. foram coletadas na cidade de Curitiba, Paraná, sob as coordenadas geográficas 25°26'51.83'' S, 49°20'47.92'' W, Alt. 955 m e na cidade de São Joaquim, Santa Catarina, sob as coordenadas geográficas 28°13'39.66'' S, 50°00'10.41'' W, Alt. 1279 m, nos meses de outubro de 2014 e abril de 2015, respectivamente. Os frutos maduros foram coletados na cidade da Lapa, Paraná, sob as coordenadas geográficas 25°49'14.05'' S, 49°54'29.86'' W, Alt. 812 m, no mês de fevereiro de 2016. A identificação do material coletado foi realizada pelo botânico José Tadeu Weidlich Motta, no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba – PR, onde as exsicatas estão depositadas com os seguintes números de registros MBM 320419, MBM 313460 e MBM 349381 (Figura 5). A pesquisa foi autorizada pelo IBAMA sob o número 02001.001165/2013-47.

FIGURA 5 - EXSICATAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.



FONTE: O autor (2015).

LEGENDA: (A) Exsicata MBM 320419
(B) Exsicata MBM 313460
(C) Exsicata MBM 349381

3.1.2 Processamento

As partes aéreas de *E. pyriformis* após coleta e transporte para local limpo, foram selecionadas, separadas em folhas e caule, secas a sombra, e trituradas em

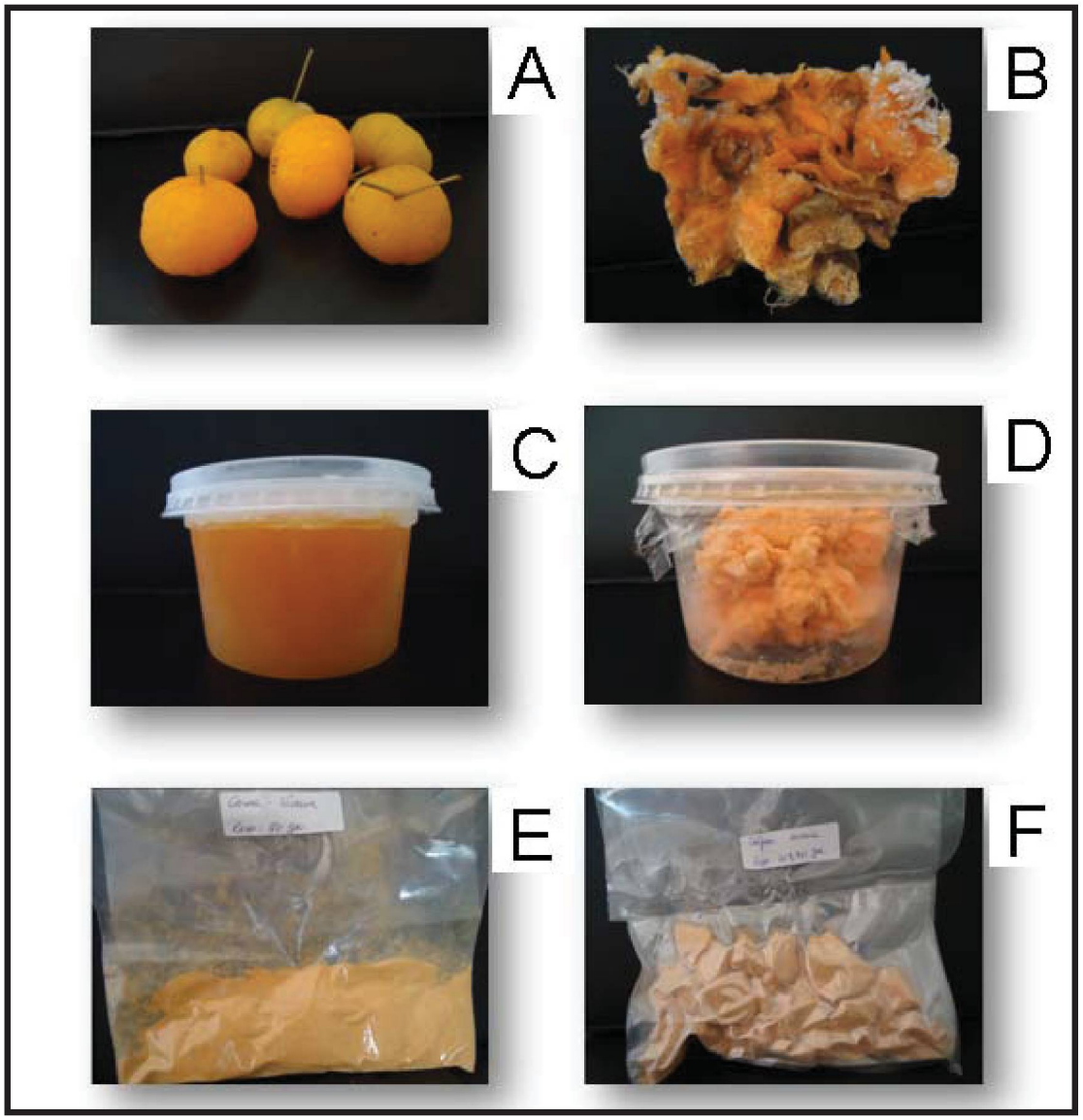
moinho de facas e martelos (TRAPP). Para a extração do óleo essencial 600 gramas de folhas secas foram armazenadas a -20°C até o início do processo de extração.

Os frutos maduros foram coletados, acondicionados em caixas térmicas com gelo e transportados para local adequado. No mesmo dia da coleta, os frutos foram lavados em água corrente, selecionados e passaram para o processo de descasque manual. Devido ao fruto apresentar uma casca fina e delicada como característica, o processamento foi realizado com auxílio de uma peneira. Assim, foram separadas a casca, a polpa e a semente. A casca e a polpa obtidas foram acondicionadas em potes de polipropileno com capacidade de 250 mL, para congelamento e armazenamento em freezer -20°C para posterior processo de liofilização.

3.1.3 Processo de Liofilização

Para o processo de liofilização as amostras do fruto (casca e polpa) congeladas em freezer -20°C foram levadas ao liofilizador da marca Bench Top Pro sp-scientific (Pennsylvania, USA) durante 14 dias à vácuo, a -78°C protegidas da luz. Após o processo de liofilização as amostras foram trituradas em moedor de café até se tornar um pó amarelo. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, lacrados em seladora a vácuo, pesados, identificados e armazenados em geladeira protegidos da luz, para posterior análise e processo de extração como ilustradro na Figura 6.

FIGURA 6 - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DO FRUTO DE *E. pyriformis* CAMBESS.



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: (A) Fruto de *E. pyriformis* Cambess.; (B) Casca do fruto pós descasque manual; (C) Polpa do fruto acondicionada em pote de polipropileno; (D) Amostra pós-processo de liofilização; (E) Casca do fruto liofilizada em saco de polipropileno lacrado em seladora a vácuo; (F) Polpa do fruto liofilizada em saco de polipropileno lacrado em seladora a vácuo.

3.2 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DO FRUTO (CASCA E POLPA) DE *E. pyriformis* CAMBESS.

3.2.1 Caracterização e Composição Proximal das amostras *in natura* e liofilizadas obtidas do fruto de *E. pyriformis*

3.2.1.1 Umidade

Para a determinação da umidade foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Em cadinho de porcelana previamente seco, pesou-se um grama do material. O material pesado foi seco em estufa a 100-105°C durante três horas e após resfriado em dessecador. As amostras foram pesadas até que o peso se mantivesse constante, não diferindo por mais de 5 mg entre duas pesagens. O teste foi realizado em triplicata.

Para os cálculos de umidade foi empregada a fórmula abaixo:

$$\frac{Pu - Ps \times 100}{Pa}$$

Onde Pa (Peso da amostra), Pu (peso da amostra + cadinho antes da dessecação) e Ps (peso do cadinho + amostra após a dessecação).

3.2.1.2 Cinzas Totais

Para a determinação de cinzas totais foi utilizada a metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (BRASIL, 2010). Um grama de material vegetal foi pesado em cadinho previamente calcinado, resfriado e pesado. O material foi levado à incineração em mufla a 450°C por 4 horas, após resfriado em dessecador e pesado. Esta análise foi realizada em quintuplicata. Realizou-se o seguinte cálculo:

$$\%\text{Cinzas Totais} = \frac{Pa - Pi}{Pa \times 100}$$

Onde Pa (Peso do cadinho + peso da amostra) e Pi (Peso do cadinho + peso da amostra incinerada).

3.2.1.3 Lípidios

O teor de lipídios foi determinado pelo método de Bligh e Dyer (1959), em que 10g das amostras do fruto (casca e polpa) *in natura* e 1g das amostras liofilizadas foram pesadas e transferidas para tubo de ensaio, foram adicionados 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Os tubos foram colocados em agitador rotativo por 30 minutos, e adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%, em seguida os tubos foram agitados vigorosamente por 2 minutos e centrifugados a 1000 rpm. O sobrenadante metanólico foi succionado e descartado, a fase clorofórmica foi filtrada em papel filtro com sulfato de sódio anidro, e 5 mL do filtrado foram transferidos a um béquer de 50 mL, previamente padronizado, o qual foi levado a estufa a 105°C, por 30 minutos. O béquer foi resfriado em dessecador e pesado novamente. O cálculo para determinação de lipídios totais foi realizado pela equação a seguir:

$$\%\text{Lípidios Totais} = \frac{p \times 4 \times 100}{g}$$

Onde: p (peso dos lipídios em gramas contido em 5 mL) e g (peso da amostra em gramas).

3.2.1.4 Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo processo de digestão de Kjeldahl de acordo com a metodologia da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). O experimento consiste de três etapas: digestão, destilação e titulação. Na primeira foram pesadas 1g das amostras do fruto (casca e polpa) *in natura* e liofilizadas, e procedeu-se a digestão com ácido sulfúrico e catalisador $CuSO_4$ e K_2SO_4, formando sulfato amoniacal. Na segunda etapa, houve a destilação por arraste de vapor da amônia, a qual é recebida em erlenmeyer contendo ácido

bórico a 4%, gerando um complexo de coloração verde. Na terceira etapa, a amônia destilada da amostra foi titulada com ácido sulfúrico 0,02M até viragem da coloração verde para um complexo cor-de-rosa. O cálculo para a determinação de proteínas foi realizado pela equação a seguir:

$$\%\text{Proteínas} = V \times 0{,}14 \times \frac{f}{P}$$

Onde: V (Volume de ácido sulfúrico gasto na titulação), P (Peso da amostra) e f (Fator de conversão = 6,25).

3.2.1.5 Fibras totais

A determinação de fibras totais foi realizada pelo método da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). Para esta metodologia foi pesado 2g das amostras do fruto (casca e polpa) *in natura* e liofilizadas, transferidas para um erlenmeyer de 500 mL e, adicionados 200 mL de solução quente de ácido sulfúrico a 0,255N (1,25%). A digestão foi iniciada logo após a fervura, que teve início 1 minuto após a adição da solução ácida. Após 30 minutos, as amostras foram filtradas rapidamente em pano resistente e, seus resíduos foram lavados com água fervente para que ocorra uma neutralização. Os resíduos obtidos foram transferidos para um Erlenmeyer de 500 mL com auxílio de uma solução de NaOH 0,313N (1,25%) quente, dando início a digestão alcalina como ocorreu com a digestão ácida. Após o término de 30 minutos, a amostras foram filtradas em cadinhos previamente identificados e tarados. Os cadinhos foram levados para secar em estufa a 60°C, esfriados e pesados. Após serem pesados foram levados a mufla a 500°C, até a formação de cinzas, com auxílio de 3 gotas de ácido nítrico concentrado. Para o resfriamento foram transferidos para dessecador, e em seguida foram pesados e os resíduos calculados, pela seguinte equação:

$$\%\text{Fibras Totais} = \frac{\text{Peso do resíduo (g)} - \text{Peso cinza obtida (g)}}{\text{Peso da Amostra (g)}} \times 100$$

3.2.1.6 Carboidratos

Os teores de carboidratos foram calculados utilizando a seguinte equação:

100 - % Umidade - % Lípidios - % Proteína - % Fibras alimentares - % Cinzas

3.2.1.7 Valor Energético Total

O valor energético total é estimado utilizando os fatores de conversão de 4 $kcal.g^{-1}$ de proteína ou carboidrato e 9 $kcal.g^{-1}$ de lipídios (OSBORNE; VOOGT, 1978). A equação para o cálculo do valor energético (VET) é a seguinte:

$$VET = (Px4) + (Cx4) + (Lx9)$$

Onde: P (proteínas), C (carboidratos) e L (lipídios).

3.2.2 Determinação da atividade antioxidante das amostras liofilizadas do fruto (casca e polpa) de *E. pyriformis* Cambess.

3.2.2.1 Doseamento de Polifenóis Totais

O doseamento de polifenóis totais foi realizado com as amostras liofilizadas do fruto (casca e polpa) de *E. pyriformis* foram diluídos em metanol (1000 mg/mL). A metodologia foia realizada conforme a Tabela 3.

TABELA 3 - SOLUÇÕES COM RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES PARA A METODOLOGIA DE FOLIN-CICALTEAU

Soluções	Branco	1° Tubo	2° Tubo	3° Tubo	4° Tubo	5° Tubo	6° Tubo	7° Tubo
Água	3,6 mL	3,6 mL	3,6 mL	3,6 mL	3,6 mL	3,6 mL	3,6 mL	3,6 mL
Folin	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Água:etanol (1:1)	160 µl	120 µl	100 µl	80 µl	60 µl	40 µl	20 µl	-
Amostra	-	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl	120 µl	140 µl	160 µl

FONTE: O autor (2016).

Após o preparo das soluções, os tubos foram agitados e após 3 minutos foi colocado a solução de carbonato de cálcio 10% (SLINKARD; SINGLETON, 1977). Após 30 minutos, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis-160A a um comprimento de onda de 760 nm. Para a realização do doseamento foi utilizada uma curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 µg/mL, as leituras foram realizadas em triplicata. Os teores de fenólicos totais foram determinados em miligramas equivalente de ácido gálico (EG) por grama de amostra, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração: $y=0,0392x–0,0583$, $R^2=0,9964$.

3.2.2.2 Doseamento de Flavonoides Totais

As amostras liofilizadas do fruto (casca e polpa) de *E. pyriformis* diluídas em metanol (1000 µg/ml) foram adicionados a 2 ml de uma solução de cloreto de alumínio a 2%. Após 60 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 420 nm utilizando curva de calibração de quercetina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata (CHANG; YANG; WEN, 2002). Os teores de flavonoides totais foram determinados, em miligramas equivalentes de quercetina (EQ) por grama de amostra, utilizando a seguinte equação com base na curva de calibração:

$$y=0,0314x–0,0164,\ R^2=0,9996.$$

3.2.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela redução do radical DPPH

O potencial de redução do radical DPPH das amostras liofilizadas do fruto (casca e polpa) de *E. pyriformis* foi analisado espectrofotometricamente de acordo com Mensor *et al.* (2001). As amostras foram diluídas em metanol e as concentrações variaram de 5 µg/mL a 450 µg/mL, dependendo da intensidade da atividade antioxidante. Em tubo de ensaio foram adicionados 2,5 mL da amostra a ser testada e depois adicionado 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada através da fórmula abaixo:

$$AA\% = \frac{100 - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle negativo}}$$

Os valores de concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC_{50}) são calculadas no gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras testadas. A equação da reta do gráfico, do tipo y = ax+ b, serve de base para determinação do valor de IC_{50}.

3.2.3 Determinação do teor de Ácido L-Ascórbico por CLAE

A quantificação de ácido L-ascórbico foi realizada pelo método descrito por Vinci e colaboradores (1995) com algumas modificações. Foram pesadas 1g das amostras liofilizadas do fruto (casca e polpa) de *E. pyriformis* e adicionados 30 mL de solução de ácido metafosfórico (4,5%) em água ultrapura. As amostras foram agitadas vigorosamente e deixadas em repouso por 1 hora. Após repouso foram

adicionados 20 mL de água ultrapura, centrifugadas a 7000 rpm por 10 minutos e filtradas através de membrana milipore 0,22 µm (TPP, Trasadingen, Suiça). O sobrenadante foi recolhido e uma alíquota de 20 µl da amostra foi injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Durante todo o procedimento as amostras permaneceram protegidas da luz.

Para as dosagens foi utilizado o sistema de CLAE (HPLC-Shimadzu), utilizando o detector UV-visível a 254 nm. A separação foi desenvolvida utilizando um sistema de gradiente composto de água ultrapura:ácido acético (99,9:0,1) e metanol, com fluxo de 0,8 mL/min. Os picos foram identificados em comparação aos tempos de retenção de padrões de ácido L-ascórbico e sua quantificação baseada em curva de calibração deste mesmo padrão. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/100g de fruta liofilizada.

A curva padrão do ácido L-ascórbico foi obtida com as concentrações de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 mg/mL, apresentando como equação da reta:

$$y = +7{,}982944e{+}008x;\ r^2: 0{,}999486.$$

3.2.4 Determinação de Antioxidantes Lipofílicos

A determinação de antioxidantes lipofílicos (Clorofila *a*, Clorofila *b*, Licopeno e β-caroteno) das amostras liofilizadas do fruto (casca e polpa) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Nagata e Yamashita (1992). Em um tubo de ensaio foi pesado 150mg de cada amostra a ser testada e, em seguida adicionou-se 10 mL de uma mistura de acetona:hexano (4:6 v/v). As amostras foram agitadas vigorosamente e deixadas em repouso por 1 hora. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro Multiskan FC Thermo Scientific nos comprimentos de onda de 453, 505, 645 e 663 nm, para o branco foi utilizada a solução extratora. Os resultados foram expressos em mg/mL de amostra liofilizada. O teste foi realizado em triplicata.

Os valores foram calculados de acordo com as seguintes equações:

Clorofila *a* = 0,999 *A*663 – 0,0989 *A*645

Clorofila *b* = -0,328 *A*663 + 1,77 *A*645

Licopeno = -0,0458 *A*663 + 0,204 *A*645 + 0,372 *A*505 – 0,0806 *A*453

β-Caroteno = 0,216 *A*663 – 1,22 *A*645 – 0,304 *A*505 + 0,452 *A*453

Onde: *A* (absorbância da amostra).

3.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. pyriformis*.

3.3.1 Extração do Óleo Essencial

Para a extração do óleo essencial das folhas de *E. pyriformis* foi empregado o método de hidrodestilação por arraste de vapor d'água, realizado em aparato de Clevenger modificado (BRASIL, 2010). 600 gramas de folhas secas a temperatura ambiente e trituradas foram colocadas em balão de fundo redondo de 3000 mL, adicionando-se quantidade suficiente de água destilada (5 a 10 vezes o seu peso) para cobrir o material e permitir o andamento da extração. O balão foi conectado ao aparato de Clevenger e submetido a uma temperatura em torno de 100ºC, por um período de 6 horas. Decorrido este tempo, o óleo obtido foi coletado, seu volume medido e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração para posteriores análises.

3.3.2 Rendimento do Óleo Essencial

O rendimento foi calculado em mililitros de óleo essencial por 100g do vegetal seco (mL%), conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

3.3.3 Determinação da Densidade

Devido à ausência de picnômetro de capacidade adequada para a pequena quantidade de óleo obtida na extração, o ensaio de determinação da densidade foi realizado a partir da média aritmética das massas de alíquotas de 20 µL (volume constante) de óleo essencial de *E. pyriformis,* em 10 repetições, à temperatura de

25°C. A razão entre a massa e o volume constante (aferidos em balança analítica e pipeta automática) das alíquotas de óleo essencial foi determinada aplicando a seguinte fórmula:

$$d = \frac{m}{v}$$

Onde: d (densidade), m (massa) e v (volume).

3.3.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu® CG-EM – QP 2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo splitless a 250°C, interface e fonte de íons a 300°C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 350, utilizando He como gás de arraste. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250ºC, pressão da coluna de 20 psi, iniciando-se com temperatura de 50ºC por 5 minutos elevando-se para 200ºC a uma razão de 5º C/min, no Departamento de Química da UFPR.

3.3.5 Determinação da atividade antioxidante do Óleo Essencial de *E. pyriformis*.

3.3.5.1 Doseamento de Polifenóis Totais

O óleo essencial diluído em metanol foi testado em concentrações entre 80 µg/mL e 320 µg/mL. O procedimento foi realizado de acordo com o item 3.2.2.1.

3.3.5.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela redução do radical DPPH

O óleo essencial foi preparado em metanol e as concentrações variaram de 5 µg/mL a 500 µg/mL, dependendo da intensidade da atividade antioxidante. A solução de DPPH foi preparada em metanol a 0,03 mmol/mL. O procedimento foi realizado de acordo com o item 3.2.2.3.

3.3.5.3 Método da formação do Complexo Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante através do método de redução do complexo fosfomolibdênio foi realizada utilizando soluções padrão de rutina, que foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol e 0,5% de DMSO, bem como a amostra (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A absorbância foi lida a 695 nm. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação aos padrões, utilizando a equação:

AAR% = [(Absorbância da amostra - Absorbância do branco) / (Absorbância do padrão - Absorbância do branco)] X 100

A variância dos resultados obtidos foi avaliada pelo teste ANOVA e pela diferença entre as médias verificadas pelo teste de Scott e Knott ($p < 0,05$).

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES POR APARELHO DE SOXHLET

Os extratos brutos foram obtidos a partir de 2,43 kg de caule, 1,70 kg de folhas e 0,440 de casca liofilizada dos frutos. Inicialmente, as amostras foram submetidas à extração com acetona em refluxo contínuo por 6 horas, em aparelho de Soxhlet. Estas mesmas amostras após extração por acetona, foram secas ao ar, até completa evaporação do solvente. Após este processo, as amostras em aparelho de Soxhlet foram submetidas à extração com etanol 96°GL por um período de 6 horas (CARVALHO, 2001). Os extratos obtidos foram submetidos à filtração com algodão, concentrados em evaporador rotatório e armazenados em frascos âmbar até o momento do fracionamento.

3.4.1 Determinação do Teor de Sólidos

A determinação do teor de sólidos foi realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Em placas de Petri, previamente

dessecadas e resfriadas, foram transferidos 1 mL dos extratos brutos cetônico e etanólico do caule,
das folhas e da casca do fruto, e levadas a estufa a 105°C até peso constante. O resultado foi apresentado em quantidade de sólidos em 1 mL e em porcentagem do teor de sólidos em relação ao material vegetal.

3.4.2 Particionamento dos Extratos Brutos Cetônico e Etanólico

Em Soxhlet modificado (CARVALHO, 2001), segundo patente INPI (PI 0601703-7A), foi realizado o particionamento líquido/líquido com uma parte dos extratos brutos cetônico e etanólico com solventes em diferentes graus de polaridade. Obtendo-se a partir do extrato cetônico as frações hexano (FH), clorofórmio (FC), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica remanescente (FR) e do extrato etanólico as frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente do caule, das folhas e do fruto (casca).

O aparelho de Soxhlet modificado foi conectado a um condensador de bolas e um balão de fundo chato de capacidade para 150 mL. O sistema foi levado a aquecimento em manta aquecedora em refluxo contínuo por 6 horas.

Ao final do processo, todas as frações obtidas foram submetidas a destilação em evaporador rotatório, para a remoção do solvente, armazenadas em frascos e levadas à secura em banho-maria (40-50°C), para posterior pesagem.

Durante a obtenção da fração cetônica clorofórmica do caule, das folhas e do fruto (casca) ocorreu a formação de um precipitado marrom-avermelhado.

3.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para o ensaio foram utilizadas cromatoplacas de sílica gel 60 UV_{254}, da marca Whatman®, de dimensões 20 x 20 cm, onde foram aplicados 5 µl dos extratos e frações obtidos de *E. pyriformis* com auxílio de microseringas. As análises foram realizadas utilizando fase móvel e revelador específico para a pesquisa de determinados grupos químicos conforme a Tabela 4.

Após a corrida cromatografica e sua revelação, as placas foram avaliadas em luz ultravioleta. A análise foi realizada em triplicata.

TABELA 4 - PESQUISA DE GRUPOS QUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

GRUPO QUÍMICO	FASE MÓVEL (PROPORÇÃO)	REVELADOR	MÉTODO
Esteróides / Triterpenos	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Vanilina 1%:ácido sulfúrico (1:1)	(WAGNER, 1996).
Flavonoides / Taninos	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Reativo de NEU (Flavonoides) Cloreto férrico 1% (Taninos)	(WAGNER, 1996).
Alcaloides	Clorofórmio:metanol (95:5) universo amônio	Dragendorff	(VALENTE et al., 2006).

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Difenolboriloxietilamino a 1% em metanol (Reativo de NEU); tetraiodeto bismuto de potássio (Dragendorff).

3.6 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

3.6.1 Fração Hexano

A fração hexano (12,197 gramas) obtida a partir do extrato cetônico de caule foi fracionada através de cromatografia em coluna (CC), utilizando fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,2 mm Merck®). A amostra foi dissolvida em metanol e incorporada a 2 partes de sílica-gel 60 para cada parte da amostra, em constante homogeneização em cápsula de porcelana, promovendo a evaporação do solvente, até a formação da pastilha. A coluna foi empacotada com sílica-gel na proporção de cinco partes em relação a pastilha, sendo que as mesmas foram separadas por um papel de filtro, a fim de minimizar possíveis perturbações da coluna.

A eluição da amostra foi realizada com Hexano/Acetato de etila, com gradientes de polaridade crescentes. Iniciou-se com 100 % de hexano num volume de 100 mL, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5% em 5%, até 100% de acetato de etila. Subfrações de aproximadamente 10 mL

foram coletadas em 179 frascos de vidro. Para limpeza da coluna foram utilizados 100% de metanol.

Nos frascos 29, 30 e 31 após evaporação do solvente, foram observados a formação de um precipitado esbranquiçado. Estes frascos foram lavados com éter de petróleo e levados ao freezer, por repetidas vezes, promovendo sua purificação. As amostras foram reunidas, analisadas por CCD e encaminhadas para as análises espectroscópicas.

3.6.2 Fração Acetato de Etila

A fração acetato de etila (4,56 gramas) obtida a partir do extrato cetônico de folhas também foi fracionada através de CC, utilizando fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol, com gradientes de polaridade crescentes. Iniciou-se com uma mistura de 50% hexano e 50% acetato de etila, com variação de 5% em 5% até uma concentração de 100% acetato de etila, em seguida acetato de etila/metanol também, com variação de 5% em 5% até concentração de 50% acetato de etila e 50% metanol. Foram coletadas subfrações de aproximadamente 10 mL em 144 frascos de vidro. Para limpeza da coluna foram utilizados 100% de metanol.

Após evaporação a temperatura ambiente dos solventes, as subfrações obtidas foram analisadas através de CCD utilizando cromatoplacas de sílica-gel60 (F254 Merck®). Os sistemas eluentes utilizados foram acetato de etila/acetona/água (25:8:2) e acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:27). Os reveladores utilizados para a visualização dos compostos foram luz ultravioleta em 254 e 366 nm (método físico) e pulverização com solução de NEU (difenilboriloxietilamina 1% em metanol seguido de polietilenoglicol-4000 5% em etanol).

As subfrações foram agrupadas de acordo com o perfil observado na CCD. Para isolamento dos constituintes foi utilizada uma coluna aberta (3,0 x 50 cm) empacotada com a fase estacionária Sephadex® LH20 (Amersham Pharmacia, G&E), eluída com 300 mL de metanol e as amostras solubilizadas em 5 mL de metanol. As amostras foram coletadas em frascos e monitoradas através de CCD

em placas Merck® 60 F254, com fase móvel constituída por acetato de etila/acetona/água (25:8:2) e como revelador NEU.

Para verificação do perfil da amostra foi utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelho Merck-Hitashi® – Elite Lachrom, com detector diodo (DAD) em 295 nm, coluna XTerra® RP18 5 µm, 4,6x250 mm, volume de injeção de 20 µL, fluxo 1,00 $mL.min^{-1}$. Como fase móvel foi utilizado gradiente de concentração o sistema H_2O:H_3PO_4 a 0,1% (A) e MeOH (B) na seguinte programação: 1-45 min, iniciando com 20% de fase B e finalizando em 45 min com 100% de fase B. O MeOH utilizado foi grau HPLC (TEDIA) e a água MilliQ.

Após a verificação as amostras foram encaminhadas para identificação dos compostos através de RMN de ^{1}H e ^{13}C.

3.6.3 Obtenção da β-Amirina e α-Amirina

A β-Amirina e α-Amirina foram obtidos na *Universitá del Piemonte* na Itália pela equipe do Prof. Dr. Giovanni Baptista Appendino.

633g de folhas de *E. pyriformis* Cambess., coletadas em São Joaquim, Santa Catarina, exsicata MBM 313460, picadas, foram colocadas em Soxhlet e extraídas com acetona (4 L) por 24 horas. O extrato cetônico primário foi filtrado por gravimetria em um funil protegido por um filtro de papel. A concentração foi feita em um frasco de 2 L e a evaporação final em um frasco de 500 mL.

3.6.3.1 Coluna Cromatográfica Gravimétrica

A coluna cromatográfica gravimétrica de purificação foi feita de acordo com as seguintes especificações e conforme Tabela 5.

Carrego: 60 g de extrato cetônico primário encapsulado em sílica (SiO_2)
Fase estacionária: 180 mL de SiO_2
Eluente: Pe (Éter de petróleo) 100%
Volume do frasco: 100 mL

TABELA 5 - COLUNA CROMATOGRÁFICA GRAVIMÉTRICA DE PURIFICAÇÃO DA β-AMIRINA E α-AMIRINA.

Eluente	Frações	Identificação	UV	Quantidade	Nota
Pe 100%	1-2	ECP_A	+	706 mg	Cera e ácido graxo
Pe 100%	3-9	ECP_B	+	3.4 g	Fração lipofílica
Pe 100%	10-18	ECP_C	+	800 mg	β-Amirina e α-Amirina misturadas com outros compostos
Pe 100%	19-54	ECP_D	-	2.86 g	β-Amirina e α-Amirina misturadas com outros compostos

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Pe, éter de petróleo.

As amostras obtidas pela coluna gravimétrica foram monitoradas em CCD (Macherey-Nagel Alugram®Sil G/UV254) 0,20 mm, as quais para visualização dos compostos foi utilizado uma lâmpada de UV e banho em soluções 5% de H_2SO_4 em metanol e aquecimento.

3.6.3.2 Cristalização da β-Amirina

Em um balão de 150 mL foram colocados 3,66g de β-Amirina impura (ECP_C + ECP_D), dissolvidos em 40 mL de metanol e deixados ferver durante 10 minutos (70°C), no final do qual foi levado para resfriar até temperatura ambiente e mantido a -18°C durante 12 horas. Quando a precipitação ocorreu, este material foi filtrado em um funil sinterizado. O material obtido após a filtração mostra β-Amirina e α-Amirina ainda com impurezas. Uma segunda cristalização foi realizada com acetona utilizando manta aquecedora com refluxo durante 10 minutos a 70°C. Segue o mesmo processo de resfriamento a -18°C e subsequente filtração, obtendo 1,38g de β-Amirina pura. Para a separação da α-Amirina, que estava presente na solução de acetona em menor qunatidade, foi necessária fazer uma nova cristalização para purificação conforme descrito anteriormente.

3.6.4 Identificação dos Compostos

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C foram realizados em espectrofotômetro Bruker® modelo DPX 200 MHz observando os núcleos de ^{1}H e ^{13}C a 200,12 e 50,56 MHz e Bruker® de 400MHz observando os núcleos de ^{1}H e ^{13}C a 400,13 e 100,61 MHz. O solvente utilizado nas espectroscopias de RMN de ^{13}C e ^{1}H foi metanol e DMSO deuterado. Após a obtenção dos espectros de RMN a identificação das substâncias foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos com dados disponíveis na literatura. Estes experimentos foram realizados no departamento de Química (UFPR).

3.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os testes de atividade antifúngica foram realizados com as cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Aspergillus flavus* ATCC 20434, *Trychophyton mentagrophytes* ATCC 9533 e 20 isolados clínicos de *Candida albicans* do Hospital de Clínicas da UFPR.

O projeto de pesquisa intitulado como "Avaliação do Potencial Antimicrobiano, Sinérgico e Toxicológico de óleos essenciais, extratos, frações e substâncias isoladas obtidos de plantas da Flora brasileira" foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do HC-UFPR sob número CAAE 53331715.0.0000.0096 e aprovado com número de comprovante 010240/2016.

Para a análise antifúngica, os extratos, frações, compostos isolados (β-Amirina e α-Amirina) e o ácido gálico (Sigma/Aldrich, Darmstadt, Germany) foram preparados em etanol 10% e DMSO 2%, enquanto as amostras de óleo essencial em Polisorbato 80 a 10% para melhorar a solubilidade. Após o preparo os compostos foram filtrados através de membrana milipore 0,22 µm (TPP, Trasadingen, Suiça) para garantir sua esterilidade. Os testes foram realizados em duplicata.

3.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica de Microdiluição em caldo para Fungos Leveduriformes

Em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de "U" foram preparadas diluições seriadas das amostras em um intervalo de concentração de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL em 100 µL de meio líquido RPMI 1640 (Gibco/Invitrogem, Nova York, EUA) (CLSI, 2008a). As diferentes suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração inicial de 1,0 x 10^6 UFC/mL, referentes ao tubo 0.5 da escala McFarland. Estas foram diluídas em meio líquido até atingir uma concentração final de 1,0 a 5,0 x 10^3 UFC/mL e em seguida inoculados 100 µL nos orifícios da placa.

O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes (etanol, DMSO e Polisorbato 80) foram preparados em 100 µL de RPMI e 100 µL dos inóculos fúngicos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 µL de RPMI e 100 µL das amostras testadas. O controle positivo ou de viabilidade fúngica, foi preparado com 100 µL de RPMI e 100 µL dos inóculos fúngicos.

As microplacas foram incubadas por 48 horas a 35°C. Após este período foram adicionados 20 µL de Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC – Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,5% e as placas foram reincubadas por três horas a 35°C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados, conforme explicado no item 3.7.3.

Para validação da técnica e controle metodológico foi verificado se as cepas utilizadas estavam dentro do intervalo de confiança estipulado pelo CLSI (2008b). Utilizando Fluconazol e *C. albicans* ATCC 90028 os testes foram validados com CIMs entre 0,25 e 1,0 µg/mL.

3.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Técnica de Microdiluição em caldo para Fungos Filamentosos

As CIMs das amostras de *E. pyriformis* e Anfotericina B foram determinadas através da microdiluição em caldo. As amostras e a Anfotericina B foram preparadas através de diluições seriadas em meio líquido RPMI 1640, a fim de que o intervalo

das concentrações finais ficasse entre 1000 e 3,9 µg/mL e entre 16 e 0,0313 µg/mL, respectivamente.

Para induzir a formação de conídios e esporangiosporos, os fungos filamentosos *Aspergillus flavus* ATCC 204304 e *Trychophyton mentagrophytes* ATCC 9533 foram cultivados separadamente em um tubo de vidro contendo ágar dextrose batata, durante 7 dias a 35°C. Após esse período, as colônias foram cobertas com aproximadamente 1000 µL de solução salina estéril acrescida de 10 µL de Polisorbato 80 e preparada uma suspensão mexendo delicadamente as colônias com a ponta de uma pipeta de transferência. A mistura resultante foi retirada e transferida para um tubo de ensaio estéril. A densidade da suspensão foi lida e ajustada para uma densidade óptica (DO) que variou de 0,09 a 0,11. Essa suspensão foi diluída 1:50 em meio líquido RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), correspondendo a 2 vezes a densidade necessária, de 0,4 x 10^4 e 5 x 10^4 UFC/mL, aproximadamente.

Após o preparo do inóculo, cada poço da microplaca estéril de 96 cavidades recebeu previamente 100 µL das soluções em estudo nas concentrações seriadas decrescentes, e em seguida, foi inoculado 100 µL da suspensão de 0,4 x 10^4 e 5 x 10^4 UFC/mL, aproximadamento do inóculo de conídios ou esporangiosporos. Esta etapa diluiu as concentrações da droga e a densidade do inóculo, nas concentrações finais desejadas.

O poço do controle de crescimento foi feito com 100 µL da suspensão diluída do inóculo e 100 µL do meio de cultivo RPMI 1640, sem agente antifúngico. O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes (etanol, DMSO e Polisorbato 80) foram preparados em 100 µL de RPMI e 100 µL dos inóculos fúngicos. Todas as placas de microdiluição foram incubadas a 35°C. A leitura foi realizada após 46 a 50 horas de incubação, como preconizado para a maioria dos fungos filamentosos oportunistas e explicado no item 3.7.3.

Para validação da técnica e controle metodológico foi realizada a quantificação do inóculo e verificado se a linhagem referência utilizada de *Aspergillus flavus* ATCC 204304 estava com a sensibilidade dentro do intervalo de confiança estipulado pelo CLSI para Anfotericina B, entre 0,5 e 4 µg/mL (CLSI, 2008a).

3.7.3 Interpretação dos resultados pela Técnica de Microdiluição em caldo

A formação da coloração vermelha nos orifícios das microplacas foi interpretada como ausência da atividade antifúngica pela substância em estudo, enquanto que a não formação da coloração vermelha foi considerada como presença de atividade. A CIM foi considerada como a menor concentração de um agente antifúngico capaz de inibir o crescimento microbiano (ou seja, a ausência de coloração vermelha no orifício). Pelo teste de microdiluição, o crescimento em cada poço foi comparado com o do controle de crescimento.

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e ausência de atividade antifúngica (maiores que 1000 µg/mL) (AYRES et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

3.7.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Técnica da Macrodiluição

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) também foram determinados através da técnica da macrodiluição em caldo (CLSI, 2008b) para a fração etanólica acetato de etila de folhas (FEAEF), para o Fluconazol e uma linhagem referência de *C. albicans* ATCC 90028. Em tubos estéreis de vidro foram preparadas diluições seriadas consecutivas em meio líquido RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) da FEAEF e o Fluconazol. Sendo o intervalo de concentração final de 1000 µg/mL a 0,0004 µg/mL para a FEAEF e entre 256 µg/mL e 0,125 µg/mL para o Fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Lous, EUA).

As suspensões fúngicas foram preparadas em 5 mL de solução salina estéril e a densidade celular, ajustada com espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm, equivalente de uma solução padrão da escala tubo 0.5 de McFarland. Esse procedimento fornece uma suspensão padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. A suspensão de trabalho é produzida fazendo-se uma diluição 1:100, seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL.

Em seguida 100 µl de cada uma das diferentes concentrações de agente antifúngico foram transferidas para os tubos de vidro estéreis e acrescentados 900 µL do inóculo ajustado, a cada tubo da série de concentrações. Para controle de crescimento utilizou-se apenas 100 µL do diluente em 900 µL do inóculo ajustado e para o controle negativo foi utilizado apenas meio de cultivo.

Os tubos foram incubados em estufa a 35°C, durante período de 46 a 50 horas, em temperatura ambiente. Após este período, foi realizada a leitura dos resultados.

Para validação da técnica e controle metodológico foi verificado se a linhagem referência utilizada, *Candida albicans* ATCC 90028, quando testada contra o Fluconazol, estava dentro do intervalo de confiança estipulado pelo CLSI, entre 0,25 e 1 µg/mL.

3.7.5 Interpretação dos resultados pela Técnica de Macrodiluição

A quantidade de crescimento nos diferentes tubos contendo o agente antifúngico ou a FEAEF é comparada, visualmente, com a quantidade de crescimento observada no tubo controle para a levedura (sem droga) usado em cada série de testes, da seguinte maneira. Para o fluconazol os pontos finais da reação são menos claramente evidenciados. Quando a turbidez persiste, acima da CIM, é frequentemente, idêntica para todas as concentrações da droga. O grau de turbidez aceito pode ser estimado diluindo-se 200 µL da suspensão do controle de crescimento, isento da droga, em 800 µL do meio de cultura, produzindo um padrão de inibição de 80% (CLSI, 2008b).

3.7.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinação da CFM, foi utilizada a placa de microdiluição em caldo em que se determinou a CIM da FEAEF contra *Candida albicans* ATCC 90028. Foram subcultivadas alíquotas de 1 µL em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose dos poços da CIM e todas as concentrações acima da CIM, além do

controle de crescimento. Após 24 a 48 horas de incubação a 35ºC, foi realizada a leitura das placas, com a contagem de colônias, para avaliar a CFM.

A CFM foi definida como a menor concentração do composto que inibiu mais de 99,9% do crescimento do microrganismo em comparação ao inóculo final (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; CANTÓN et al., 2003).

Os ensaios da atividade fungicida foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como a média aritmética obtida.

3.7.7 Técnica para Determinação do Limite de Detecção

O limite de quantificação foi determinado com a linhagem referência de *Candida albicans* ATCC 90028. Uma suspensão do fungo foi feita em água destilada estéril e ajustada para o tubo 0.5 do padrão de turbidez de McFarland. Em seguida, uma série de diluições, utilizando água estéril, foram feitas com a suspensão padronizada, resultando em quatro suspensões com concentrações fúngicas de aproximadamente 500, 100, 50 e 10 UFC/mL. O volume de 100 µL de cada suspensão foram removidos e plaqueados em placas de ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas a 35°C e contagens de colônias viáveis foram realizadas após 24 a 48 h. Os experimentos foram em triplicata.

3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO

Neste estudo a avaliação do potencial sinérgico foi realizado com a amostra FEAEF de *E. pyriformis* que apresentou valor de CIM inferior a 100 µg/mL frente aos microrganismos testados.

3.8.1 Ensaio de *Time Kill*

A técnica foi parcialmente realizada como descrito por Klepser *et al.* (1998), uma vez que, até o momento, não existe método padronizado pelo CLSI para o teste de atividade antifúngica utilizando o ensaio de *Time Kill*. O ensaio foi realizado para verificar a atividade antifúngica da FEAEF em duas concentrações derivadas da CIM

(1 x CIM e 2 x CIM), e o Fluconazol, na CIM obtida previamente através da macrodiluição em caldo contra *Candida albicans* ATCC 90028.

O inóculo inicial foi preparado em um tubo contendo água destilada estéril a partir de uma placa de ágar Sabouraud dextrose e ajustada a turbidez para o tubo 0.5 da escala de McFarland (1 x 10^6 a 5 x 10^6 UFC/mL). Em seguida, uma alíquota foi adicionada em cada tubo contendo meio líquido RPMI 1640 nas diferentes concentrações, a fim de se obter um inóculo de aproximadamente 10^5 UFC/mL. Um tubo sem droga foi incluído como controle de crescimento e um tubo sem droga ou microrganismo foi utilizado como controle negativo. Todos os tubos foram incubados a 35°C.

Nos tempos predeterminados (0, 6, 12, 24 e 48 horas), com auxílio de um vórtex, os tubos foram agitados e uma alíquota de 100 µL retirada e diluída serialmente em RPMI 1640. Um volume de 100 µL de cada diluição foi espalhada em uma placa de ágar Sabouraud dextrose. A contagem de colônias foi realizada após incubação das placas a 35°C por 48 horas. O ensaio foi realizado em duplicata e a contagem de colônias expressa como a média aritmética dos resultados obtidos em UFC/mL. Um gráfico foi construído (*Time Kill curve*) plotando as contagens de colônias obtidas (log_{10} UFC/mL) em função do tempo (horas).

A atividade fungicida foi definida como uma redução de ≥ 3 log_{10} (≥99,9%) da contagem do inóculo inicial em UFC/mL. A atividade fungistática foi considerada como redução do crescimento < 3 log_{10} ou menor que 99,9% e a atividade sinérgica caracterizada quando ocorreu redução de ≥ 2 log_{10} da contagem do inóculo inicial em UFC/mL da combinação de drogas em relação ao agente mais ativo avaliado isoladamente (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004).

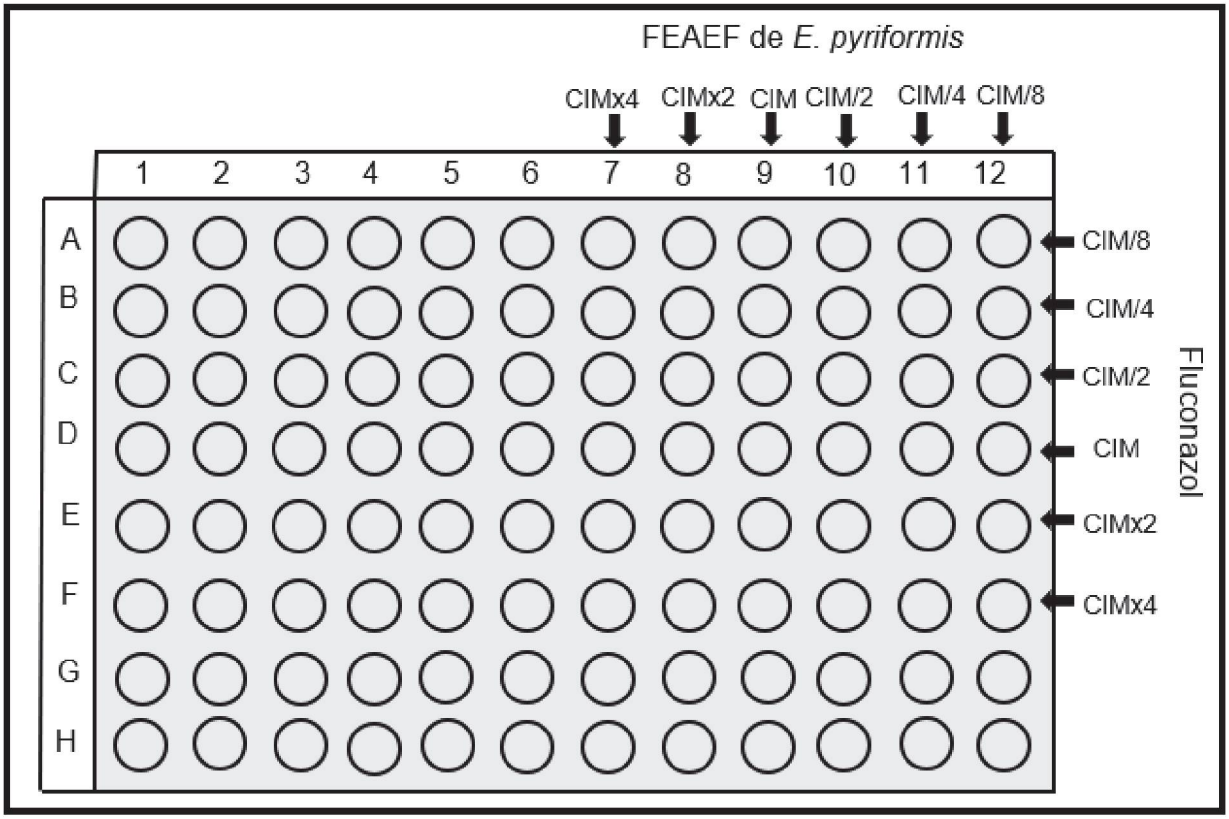
3.8.2 Técnica *Checkerboard*

A FEAEF de *E. pyriformis* e o Fluconazol foram testados em combinação nas concentrações CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2 e CIMx4 de cada amostra contra *Candida albicans* ATCC 90028.

Em microplaca estéril de 96 cavidades com fundo em forma de "U" (CLSI, 2008) foram adicionados 50 µL de FEAEF nas concentrações CIM/8, CIM/4, CIM/2,

CIM, CIMx2 e CIMx4 no sentido vertical da microplaca e 50 µL do Fluconazol nas concentrações CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2 e CIMx4 no sentido horizontal da microplaca (Figura 7). A suspensão fúngica de *C. albicans* foi preparada em solução salina fisiológica na concentração inicial de 1,0 x 10^6 UFC/mL. Esta foi diluída em meio líquido RPMI 1640 até atingir uma concentração final de 1,0 a 5,0 x 10^3 UFC/mL e em seguida inoculado 100 µL nos orifícios. A microplaca foi incubada por 48 horas a 35 °C. Após este período foram adicionados 20 µL de TTC 0,5% e a placa foi reincubada por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados. O ensaio foi realizado em duplicata.

FIGURA 7 – ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DA TÉCNICA *CHECKERBOARD*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: FEAEF, Fração Etanólica acetato de Etila de Folha; CIM, Concentração Inibitória Mínima.

A análise das associações da FEAEF com Fluconazol foi obtida através do cálculo do Índice de concentração inibitória fracionada (FICI). O FICI é a soma do FIC_A + FIC_B, onde A, representa a FEAEF de *E. pyriformis* e B o Fluconazol. O FIC_A

foi calculado através da relação CIM_A em combinação/CIM_A independente, enquanto que o FIC_B é a CIM_B em combinação/CIM_B independente.

Para análise dos resultados, os FICIs foram calculados com as CIMs mais efetivas obtidas nas amostras combinadas, e interpretados como sinergismo (≤0,5); aditividade (entre 0,5 e 4,0) ou antagonismo (>4,0) (CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010).

Para caracterizar a natureza das interações entre as várias combinações da FEAEF de *E. pyriformis* e Fluconazol contra *C. albicans* ATCC 90028, foi construído um gráfico do tipo isobolograma, utilizando as combinações CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2 e CIMx4 de FEAEF-Fluconazol, nas quais não foi verificado crescimento microbiano pela técnica *Checkerboard*. Para análise dos resultados, foram traçadas linhas entre os FICI, discriminando visualmente as interações conforme a classificação acima descrita (CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010). Os gráficos e isobologramas foram construídos através do programa GraphPadPrism® Versão 7.

3.8.3 Técnica dos Discos Combinados e Disco aproximação

Para avaliar a presença de sinergismo e antagonismo entre a FEAEF e o Fluconazol foram utilizadas as técnicas dos discos combinados e disco aproximação (LORIAN, 1991). O inóculo foi preparado suspendendo 3 a 5 colônias de uma cultura de *Candida albicans* ATCC 90028 previamente cultivada em ágar Sabouraud dextrose e incubada por 24 horas. A turbidez foi ajustada de acordo com o tubo 0.5 da escala de McFarland e, em seguida, com auxílio de um swab, a suspensão foi inoculada em duas placas contendo de ágar RPMI 1640.

Para a técnica do disco aproximação foram inseridos dois discos de papel em uma placa, um contendo a FEAEF (30µg) e outro contendo Fluconazol (30µg), separados a uma distância de 20 mm, centro a centro. A distância entre os discos foi definida de acordo com o tamanho do halo de inibição de cada uma das amostras. A placa foi incubada a 35ºC durante 24-48 horas. Um resultado positivo para sinergismo foi indicado quando a zona de inibição ao redor de um dos discos

aumentou na direção do outro disco. Uma redução no halo de inibição foi considerada como presença de antagonismo.

Para a técnica dos discos combinados, em uma placa foram inseridos três discos de papel, um impregnado apenas com o extrato vegetal (10µg), um contendo Fluconazol (10µg) e outro contendo a FEAEF em associação com o Fluconazol, na mesma concentração. A placa foi incubada a 35ºC durante 24-48 horas. Após a incubação, com auxílio de uma régua, os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos foram medidos. A presença de sinergismo foi considerada presente se o diâmetro do halo de inibição com o disco combinado for maior do que aqueles com os discos contendo as substâncias isoladamente. A redução no halo de inibição ao redor do disco contendo as substâncias combinadas em comparação com os halos de inibição ao redor dos discos contendo as substâncias isoladamente foi caracterizado como antagonismo.

3.9 ENSAIOS DE CITOXICIDADE

3.9.1 Frente à *Artemia salina* Leach

O ensaio de toxicidade do óleo essencial, extratos e frações de *E. pyriformis* frente à *A. salina* foi realizado pelo método descrito por Meyer et al. (1982) adaptado pela Petrobrás (1996). Neste método 200mg de ovos de *A. salina* foram colocados para eclodir em 400 mL de uma solução preparada com 30 gramas de sal marinho em 1000 mL de água destilada, com pH ajustado entre 8,0 e 9,0. Os ovos foram incubados durante 48 horas em temperatura de 27-30°C, mantendo-se constante iluminação artificial, aeração leve e pH, para evitar o risco de morte das larvas durante a incubação.

As amostras foram preparadas nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 10 µg/mL, dissolvidas em 1% de DMSO e solução salina marinha. Após a eclosão dos ovos, foram adicionados 1,5 mL das amostras previamente preparadas em tubos criogênicos e 10 larvas de *A. salina.* Para o controle positivo foi utilizado solução de Dodecil sulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 50, 40, 30, 20 e 10 µg/mL e salina marinha como controle negativo.

As amostras e controles foram incubados em temperatura de 27-30°C, por 24 horas, após este período foi realizada a contagem dos náuplios mortos com auxílio de lupa e iluminação incandescente. Os testes foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos foram analisados pelo método estatístico Probitos, sendo determinados a CL_{50} e o intervalo de confiança de 95%.

3.9.2 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada através dos métodos de hemólise em tubo e hemólise por difusão em placa de ágar sangue.

3.9.2.1 Hemólise em tubo

O teste de hemólise em tubo foi realizado segundo o método de Banerjee et al. (2008), com adaptações. Para o ensaio uma suspensão de sangue de carneiro a 2% em PBS (tampão fosfato salino) foi preparada no momento do uso. Em um tubo de ensaio foram transferidos 5 mL de sangue de carneiro, previamente homogeneizado com agitação lenta, e levado a centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, e o restante lavado com tampão PBS gelado. Este procedimento de lavagem foi repetido por seis vezes, até que o sobrenadante se tornou incolor. Em seguida foi realizada uma diluição a 2% de papa de hemácia obtida em tampão PBS.

As amostras do óleo essencial, extratos e frações foram preparadas nas concentrações de 1000, 500, 200 e 100 µg/mL, diluídas em metanol 10% e PBS. As análises foram realizadas em tubos criogênicos, onde foram colocados 200 µL das amostras e 200 µL de suspensão de hemácias a 2%. Como controle negativo foi utilizado 200 µL de PBS em 200 µL de solução de hemácias de carneiro a 2%. Como controle positivo foi utilizado 200 µL de água destilada, e como branco 200 µL de metanol. Para o controle de solvente foram utilizados 20 µL de etanol e 180 µL de PBS em 200 µL de suspensão de hemácias a 2%. As amostras, controles e branco foram realizados em triplicata.

Após o preparo das diluições, os tubos criogênicos foram homogeneizados com leve agitação manual e incubados durante 3 horas em estufa a 37°C. Após a incubação foram levados a centrifugação, em centrífuga Minispin Plus (Eppendorf®) a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para microplacas de 96 cavidades, para posterior leitura em fotômetro de microplaca Multiscan FC (Thermo Scientific®) a 540 nm. Para comparação entre as médias dos índices de atividade (IA%), foi utilizado o teste de Duncan (DUNCAN, 1955). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

3.9.2.2 Hemólise por difusão em placa de Ágar Sangue

Em discos de papel de filtro Whatman número 1 estéreis, com aproximadamente 7 mm de diâmetro, foram impregnados com 20 µL de extratos, frações e óleo essencial de *E. pyriformis* para se obter no disco uma concentração final de 1000µg. Após a secagem dos discos, estes foram colocados em placas de ágar sangue e incubadas à 37°C por 24 horas. Após este período verificou-se a formação de halo de hemólise ao redor do disco de papel. Como controles positivos foram utilizados solução de saponina R e Triton 1000µg, como controle negativo discos inertes (em branco). Para descartar a influência do solvente utilizado no preparo da amostra, discos impregnados com metanol foram submetidos ao teste (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005).

3.9.3 Avaliação da Citotoxidade em Células-Tronco Mesenquimais

As três linhagens celulares utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária. Os experimentos de avaliação da citotoxicidade foram realizados no Núcleo de Tecnologia celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (NTC-PUCPR).

Para a avaliação da citotoxicidade foi selecionada a fração etanólica acetato de etila de folha (FEAEF), por apresentar boa atividade inibitória com valores de CIM inferiores a 100 µg/mL frente aos microrganismos testados.

Após o descongelamento as linhagens celulares foram centrifugadas a 400 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o botão de células foi

ressuspendido em meio IMDM (GIBCO, Invitrogen™) com 20% de soro bovino fetal (GIBCO, Invitrogen™) acrescido de solução de antibiótico composta de estreptomicina e penicilina (GIBCO, Invitrogen™). As células foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 e mantidas em incubadora com atmosfera umidificada e suplementada com 5% CO_2 a 37ºC. Três diferentes concentrações da FEAEF foram testadas: 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL em dois tempos diferentes de 24 horas e cinco (5) dias. No final dos testes foi avaliada a viabilidade das células em contato com as diferentes concentrações da droga. As células foram incubadas com 10 µL do corante 7-AAD (BD Pharmingen) por 20 minutos, lavadas com PBS e fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído. A aquisição das células para a citometria de fluxo foi realizada pelo equipamento FACS Calibur (BD Biosciences) e a análise foi realizada pelo software FlowJo (FlowJo, Ashland, OR, USA). O 7-ADD é um corante fluorescente que se liga seletivamente ao DNA, permitindo a descriminação das células mortas das células vivas, uma vez que, durante o processo apoptótico a membrana citoplasmática vai sendo progressivamente alterada, tornando-se permeável ao corante. Este corante permite identificar as células apoptóticas tardias e necróticas, uma vez que, no caso das células necróticas a membrana citoplasmática encontra-se danificada sendo permeável ao corante, já no caso das células apoptóticas precoces a integridade da membrana permanece inalterada, sendo, por isso, impermeável ao corante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS OBTIDAS DO FRUTO (CASCA E POLPA) DE *E. pyriformis* CAMBESS.

4.1.1 Caracterização e Composição Proximal das amostras obtidas do fruto de *E. pyriformis*

A caracterização e composição proximal das amostras *in natura* e liofilizadas da casca e polpa do fruto de *E. pyriformis* estão presentes na Tabela 6.

TABELA 6 – CARACTERÍZAÇÃO E COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS AMOSTRAS *in natura* E LIOFILIZADAS DA CASCA E DA POLPA DO FRUTO DE *E. pyriformis* CAMBESS.

Parte do Fruto	Casca		Polpa	
	In natura	Liofilizada	*In natura*	Liofilizada
Umidade (g/100g ± DP)	89,17 ± 1,10	1,38 ± 0,08	92,19 ± 0,51	1,96 ± 0,19
Cinzas totais (g/100g ± DP)	0,20 ± 0,01	1,67 ± 0,21	0,14 ± 0,03	3,22 ± 0,23
Lipídios (g/100g ± DP)	2,26 ± 0,20	9,13 ± 0,19	0,64 ± 0,05	1,43 ± 0,3
Proteínas (g/100g ± DP)	5,03 ± 0,21	8,71 ± 0,12	5,05 ± 0,01	3,52 ± 0,05
Fibras (g/100g ± DP)	1,43 ± 0,31	15,03 ± 0,06	0,47 ± 0,23	5,32 ± 0,94
Carboidratos (g/100g)	1,91	64,08	1,51	84,55
Valor energético total (kcal/100g)	48,10	373,33	54,05	365,15

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Desvio Padrão (DP).

O teor de umidade encontrado para as amostras *in natura* foi de 89,17% e 92,19%, e para as amostras liofilizadas foi de 1,38% e 1,96% para casca e polpa do fruto, respectivamente. O teor de umidade da polpa *in natura* encontra-se semelhante ao citado por Oliveira e colaboradores (2010) com 92,47% e Silva et al. (2014a) com 91,0%. O teor de umidade para polpa de Uvaia liofilizada encontra-se abaixo do valor encontrado por Oliveira e colaboradores (2010), que encontraram um teor de umidade para a polpa do fruto de 14,0%. As possíveis causas para essa

diferença podem estar no processo de congelamento da amostra ou no tempo em que a amostra permaneceu no liofilizador. A liofilização é um processo de desidratação de produtos alimentares que ocorre em condições de pressão e temperatura, possibilitando que a água previamente congelada, passe ao estado gasoso. Este processo reúne os dois métodos mais confiáveis de conservação, o congelamento e a desidratação (OLIVEIRA; GODOY; BORGES, 2011). O conteúdo de umidade de um alimento é a principal causa da deteriorização por microrganismos e alterações por reações químicas enzimáticas. O processo de liofilização promove um aumento na vida útil dos alimentos, com mínimas perdas de nutrientes e uma rápida reidratação do produto seco (CELESTINO, 2010). O alimento desidratado perde certo conteúdo de umidade de peso e, por isso, haverá um aumento na concentração de nutrientes por unidade de peso, comparado com o produto fresco (OLIVEIRA; GODOY; BORGES, 2011).

O valor mais significativo para cinzas foi para a polpa liofilizada (3,22 g/100g) e para a casca liofilizada (1,67 g/100g), seguido das amostras de casca e polpa *in natura* não diferindo entre si. Oliveira e colaboradores (2010) encontrou teor de cinzas para a polpa liofilizada e *in natura* de 5,73 g/100g e 0,39 g/100g, respectivamente. Este alto teor de cinza encontrada na polpa liofilizada pode estar relacionado a uma maior concentração de minerais. Os minerais são elementos essenciais para o organismo humano e podem ser obtidos naturalmente através dos alimentos.

Para a análise de lipídios totais, os valores mais significativos foram para a casca liofilizada (9,13 g/100g) e para a casca *in natura* (2,26 g/100g). A polpa *in natura* apresentou teor de 0,64 g/100g e a polpa liofilizada 1,43 g/100g.

O teor de proteína bruta encontrado para a casca liofilizada (8,71 g/100g) foi maior que os valores encontrados para as demais amostras. O teor de proteína bruta de 5,05 g/100g encontrado para a polpa *in natura* foi próximo ao valor de 5,5 g/100g obtido no estudo de Silva e colaboradores (2014a) para a polpa de uvaia *in natura*. Em relação ao teor de proteínas e lipídios a maioria das frutas frescas de coloração amarela (banana maçã, 1,8 e 0,1%; laranja pera, 1,4 e 0,3%; caqui, 0,4 e 0,1% e abacaxi, 0,9 e 0,1%) (TACO, 2011) não são uma fonte representativa destes

nutrientes. Porém, os resultados encontrados para a casca e polpa *in natura* e liofilizada sugerem que a Uvaia é uma boa fonte de proteínas e lípidos totais.

O teor de fibras total encontrado foi de 15,03 g/100g para casca liofilizada e de 5,32 g/100g para polpa liofilizada. De acordo com a Tabela Taco (2011) as frutas com maior teor de fibras alimentares são o pequi (19 g/100g), macaúba (13,4 g/100g), caqui (6,5 g/100g) e goiaba branca (6,3 g/100g). A casca e polpa liofilizada de *E. pyriformis* representam uma boa fonte de fibras alimentares. A ingestão diária recomendada de fibra alimentar é de 20-30 g/dia, mas a grande maioria de adultos e crianças (> 90%) não atingem esses valores (POGORZELSKA-NOWICKA et al., 2018). As fibras promovem no organismo humano efeitos locais e sistêmicos, interferindo na capacidade de retenção de água, viscosidade, fermentação, adsorção e são responsáveis por implicações metabólicas no trato gastrointestinal (SARMENTO; BERNAUD; RODRIGUES, 2013). Estes efeitos proporcionam benefícios à saúde humana, influenciando na redução do peso, estimulando o sistema imunológico e diminuindo o risco de desenvolvimento de coagulação disseminada vascular, glicemia e distúrbios gastrointestinais (POGORZELSKA-NOWICKA et al., 2018; SAWICKI et al., 2017).

Para a análise do teor de carboidratos, os valores mais significativos foram encontrados para as amostras de casca liofilizada (64,08 g/100g) e para a polpa liofilizada (84,55 g/100g). As amostras liofilizadas de casca e polpa apresentaram os maiores índices de teor energético com 373,33 e 365,15 kcal/100 g, respectivamente.

4.1.2 Doseamento de Polifenóis Totais, Flavonoides Totais e Atividade Antioxidante frente ao radical DPPH

Os resultados encontrados no doseamento de polifenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante frente ao radical DPPH estão descritos na Tabela 7.

TABELA 7 - DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS, FLAVONOIDES E DPPH DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS DO FRUTO (CASCA E POLPA) DE *E. pyrifomis* CAMBESS.

Parte do Fruto	**Casca**	**Polpa**
Polifenóis totais (mg/100g ± DP)	198,0 ± 0,02	182,0 ± 0,03
Flavonoides totais (mg/100g ± DP)	106,0 ± 0,05	38,0 ± 0,02
DPPH (IC_{50}) (g fruta/g DPPH ± DP)	366,38 ± 0,37	396,46 ± 0,23
Rutina	6,20 ± 0,07	
Vitamina C	4,75 ± 0,19	

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Desvio Padrão (DP).

O conteúdo de polifenois avaliado para a casca e polpa liofilizadas de *E. pyriformis* foi de 198,0 e 182,0 mg/100g, respectivamente. Para flavonoides totais os resultados foram para a casca 106,0 mg/100g e para a polpa 38,0 mg/100g.

Fenólicos totais e flavonoides são os metabólitos secundários mais importantes das plantas e espalhados pelo reino vegetal. Muitas atividades biológicas e benefícios à saúde das plantas podem ser atribuídos à atividade antioxidante dos flavonoides e compostos fenólicos que elas contêm (JING et al., 2015). De acordo com a classificação elaborada por Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008) e seguida por Rufino et al. (2010), que avaliaram o conteúdo fenólico de frutas do Equador, e do Brasil, respectivamente, existem 3 categorias para classificação de compostos fenólicos em frutas, são elas: baixo (<1000 mg/100g), médio (1000-5000 mg/100g), alto (>5000 mg/100g) na amostra seca. A casca e a polpa liofilizada de *E. pyriformis* encontram-se classificados como baixo teor de compostos fenólicos, com conteúdo abaixo de 1000 mg/100g.

O potencial antioxidante detectado pelo método DPPH foi para a casca e polpa liofilizada de *E. pyriformis* de 366,38 e 396,46 g fruta/g DPPH, respectivamente. O resultado difere do valor de 170,26 g fruta/g DPPH encontrado por Pereira e colaboradores (2012).

Porém, os resultados obtidos para a casca e polpa liofilizada de *E. pyriformis* superam o potencial antioxidante de outras frutas frescas amarelas como o umbu

(856 g fruta/g DPPH), jambolão (457 g fruta/g DPPH) e o caju (936 g fruta/g DPPH) (PEREIRA et al., 2012).

O método DPPH envolve os mecanismos de transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, e fundamenta-se na capacidade dos antioxidantes em reduzir o radical DPPH•. Este método é considerado um dos mais simples, precisos e reprodutivos, muito utilizado para frutas, extratos de plantas e substâncias puras (NIKI, 2010).

Sabe-se que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta pode produzir uma ação protetora efetiva contra processos oxidativos que ocorrem no organismo. Estas substâncias reduzem a incidência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, acidente vascular cerebral, câncer e distúrbios relacionados ao envelhecimento (GREGORIS et al., 2013).

4.1.3 Determinação de Antioxidantes Lipofílicos e Ácido L-Ascórbico por CLAE

A presença de compostos antioxidantes lipofílicos, como a Clorofila-*a*, Clorofila-*b*, Licopeno e β-Caroteno, e a concentração de ácido L-Ascórbico nas amostras liofilizadas da casca e polpa do fruto de *E. pyriformis* foram determinadas e seus resultados estão demonstrados na Tabela 8.

TABELA 8 - DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES LIPOFÍLICOS E ÁCIDO L-ASCÓRBICO POR CLAE DAS AMOSTRAS LIOFILIZADAS DA CASCA E DA POLPA DO FRUTO DE *E. pyrifomis* CAMBESS.

Parte do Fruto	**Casca**	**Polpa**
Clorofila-*a* (µg/100g)	14,07 ± 1,23	1,80 ± 1,70
Clorofila-*b* (µg/100g)	13,54 ± 0,14	2,89 ± 2,72
Licopeno (µg/100g)	n.d.	n.d.
β-Caroteno (µg/100g)	708,81 ± 23,18	145,37 ± 6,82
Ácido L-Ascórbico (mg/100g)	48,00	116,00

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Desvio Padrão (DP), não detectado (n.d.).

Os resultados da determinação da clorofila-*a* e clorofila-*b* apresentaram valores semelhantes para as amostras de casca liofilizada de 14,07 e 13,54 µg/100g, respectivamente. Para as amostras de polpa liofilizada os resultados foram 1,80 e 2,89 µg/100g, respectivamente. As clorofilas são importantes por apresentarem propriedades antimutagênicas, antigenotóxicas e anti-inflamatórias, e são indutores de genes citoprotetores, protegendo as células por danos oxidativos (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

Na determinação de antioxidantes lipofílicos nas amostras analisadas de *E. pyriformis* não foi detectado licopeno. Porém valores significativos de β-Caroteno foram encontrados nas amostras de casca liofilizada (708,81 µg/100g) e de polpa liofilizada (145,37 µg/100g). Rocha e colaboradores (2013) avaliaram o teor de β-Caroteno de frutos de *E. dysenterica* obtendo-se um teor de 201,23 µg/100g. A dieta rica em β-Caroteno pode reduzir os riscos de mortalidade através de vários mecanismos, entre eles, desempenhando um importante papel na atividade da pró-vitamina A, exercendo uma ação fisiológica com efeitos antioxidantes e pró-oxidantes, melhorando a função de células imunes e proporcionando a prevenção de doenças crônicas (ZHAO et al., 2016).

Os carotenóides são importantes devido a suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, considerados como biomarcadores presentes nas frutas e vegetais (ABAR et al., 2016). Mais de 600 carotenóides são conhecidos e são divididos em dois grupos principais. No primeiro grupo fazem parte os hidrocarbonetos altamente insaturados consistindo em licopeno, α-, β- e γ-caroteno, enquanto no segundo grupo estão as xantofilas. São moléculas predominantemente coloridas, construídas por plantas, fungos e bactérias em fase de fotossíntese (CHEN et al., 2015).

As análises de ácido L-Ascórbico por CLAE nas amostras de *E. pyriformis* mostrou valores para a casca liofilizada (48,00 mg/100g) e para a polpa liofilizada (116,00 mg/100g). Pereira e colaboradores (2012) obtiveram em seu estudo com polpa *in natura* de *E. pyriformis,* um teor de ácido áscorbico de 70 mg/100g. Rocha et al. (2013) avaliaram os frutos de *E. dysenterica* encontrando valores de ácido ascórbico de 126,3 mg/100g.

O teor de ácido ascórbico encontrado na polpa liofilizada de *E. pyriformis* demonstra ser uma boa fonte de ácido ascórbico quando comparado a outras frutas amarelas comumente consumidas como a laranja pera (53,7 mg/100g), mamão formosa (78,5 mg/100g), mamão papaia (82,2 mg/100g) e banana nanica (5,9 mg/100g) (TACO, 2011). O ácido L-Ascórbico atua como agente redutor e quelante, tem um importante papel no mecanismo de defesa antioxidante e elimina os radicais livres nas células e tecidos (WOJDYŁO et al., 2016).

4.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *E. pyriformis*.

4.2.1 Rendimento do Óleo Essencial

O rendimento do óleo de *E. pyriformis*, obtido através de hidrodestilação por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger foi de 0,14% (p/v) em relação as folhas. Desta forma, a cada 100 gramas de folhas foi possível obter 0,14 mL de óleo essencial.

4.2.2 Determinação da Densidade do Óleo Essencial

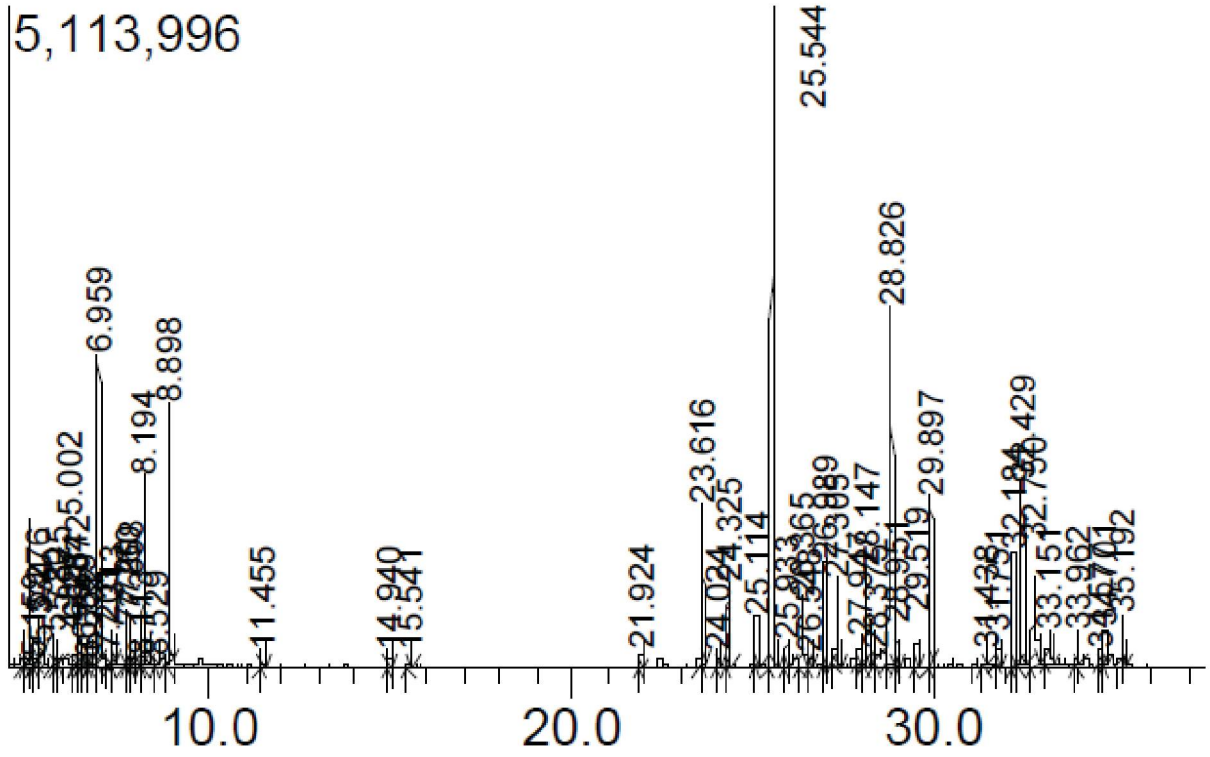
A densidade do óleo essencial de *E. pyriformis* foi determinada em 0,8825 g/mL. Óleos essenciais de uma espécie podem apresentar diferenças nos valores de densidade relativa, por apresentarem diferentes composições químicas. Em estudo realizado por Silva (2010) foi caracterizada a densidade relativa para o óleo essencial de *E. unifora* em 0,924 g/mL.

4.2.3 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

O cromatograma obtido a partir da análise do CG/EM do óleo essencial das folhas de *E. pyriformis* está representado na Figura 8. Os compostos foram identificados com base no índice de retenção linear calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos (IR) e no padrão de fragmentação observado nos espectros de massas, por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007) e a biblioteca do software do espectrômetro (NIST 2014s).

Os compostos químicos identificados na composição do óleo essencial de *E. pyriformis*, por análise em CG/EM estão descritos na Tabela 9.

FIGURA 8 - ANÁLISE EM CG/MS DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.



FONTE: O autor (2016).

TABELA 9 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.

(continua)

	Compostos	TR	IRc	IRt	(%)
1	Cumeno	6,733	960	924	0,37
2	β-Pineno	7,200	976	974	0,16
3	Mesitileno	7.720	995	994	0,60
4	n-Decano	7,760	996	1000	0,91
5	n-Undecano	11,457	1097	1100	0,28
6	Terpinen-4-ol	14,94	1178	1174	0,34
7	α-Terpineol	15,54	1193	1186	0,35
8	δ-Elemeno	21,923	1337	1335	0,39
9	α-copaeno	23,617	1376	1374	3,83
10	β Bourboneno	24,023	1385	1387	0,35
11	β-Elemeno	24,323	1392	1389	1,97
12	α-Gurjuneno	25,113	1411	1409	1,29
13	**β-cariofileno**	**25,543**	**1421**	**1417**	**17,82**
14	β-Copaeno	25,933	1430	1430	0,68
15	Aromandreno	26,363	1440	1439	2,21
16	α-Guaieno	26,547	1445	1437	0,37
17	α-Humuleno	26,990	1455	1452	2,69
18	9-epi-(E)-Cariofileno	27,307	1463	1464	2,17
19	γ-Muuroleno	27,947	1478	1478	0,70
20	Germacreno-D	28,147	1483	1484	2,79
21	β-Selineno	28,377	1488	1489	0,25
22	**Biciclogermacreno**	**28,827**	**1499**	**1500**	**12,84**
23	α-Muuroleno	28,950	1502	1500	1,06
24	γ-Cadineno	29,520	1516	1513	0,54
25	**δ-Cadineno**	**29,97**	**1525**	**1522**	**4,33**
26	Espatulenol	32,183	1582	1577	3,24
27	**Globulol**	**32,430**	**1588**	**1590**	**5,96**
28	Viridiflorol	32,750	1596	1592	3,52
29	Rosifoliol	33,150	1606	1600	1,18
30	5-epi-7-epi-α-Eudesmol	33,960	1627	1607	0,91
31	Tau-muurolol	34,700	1647	1640	1,03
32	α-Cadinol	34,93	1660	1652	1,30
	Total (identificado)				76,43

TABELA 9 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA ANÁLISE EM CG/EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.

(conclusão)

Compostos	TR	IRc	IRt	(%)
Hidrocarbonetos aromáticos				0,97
Hidrocarbonetos alcanos				0,28
Hidrocarbonetos monoterpenicos				0.16
Monoterpenos oxigenados				0,69
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				57,19
Sesquiterpenos oxigenados				17,14

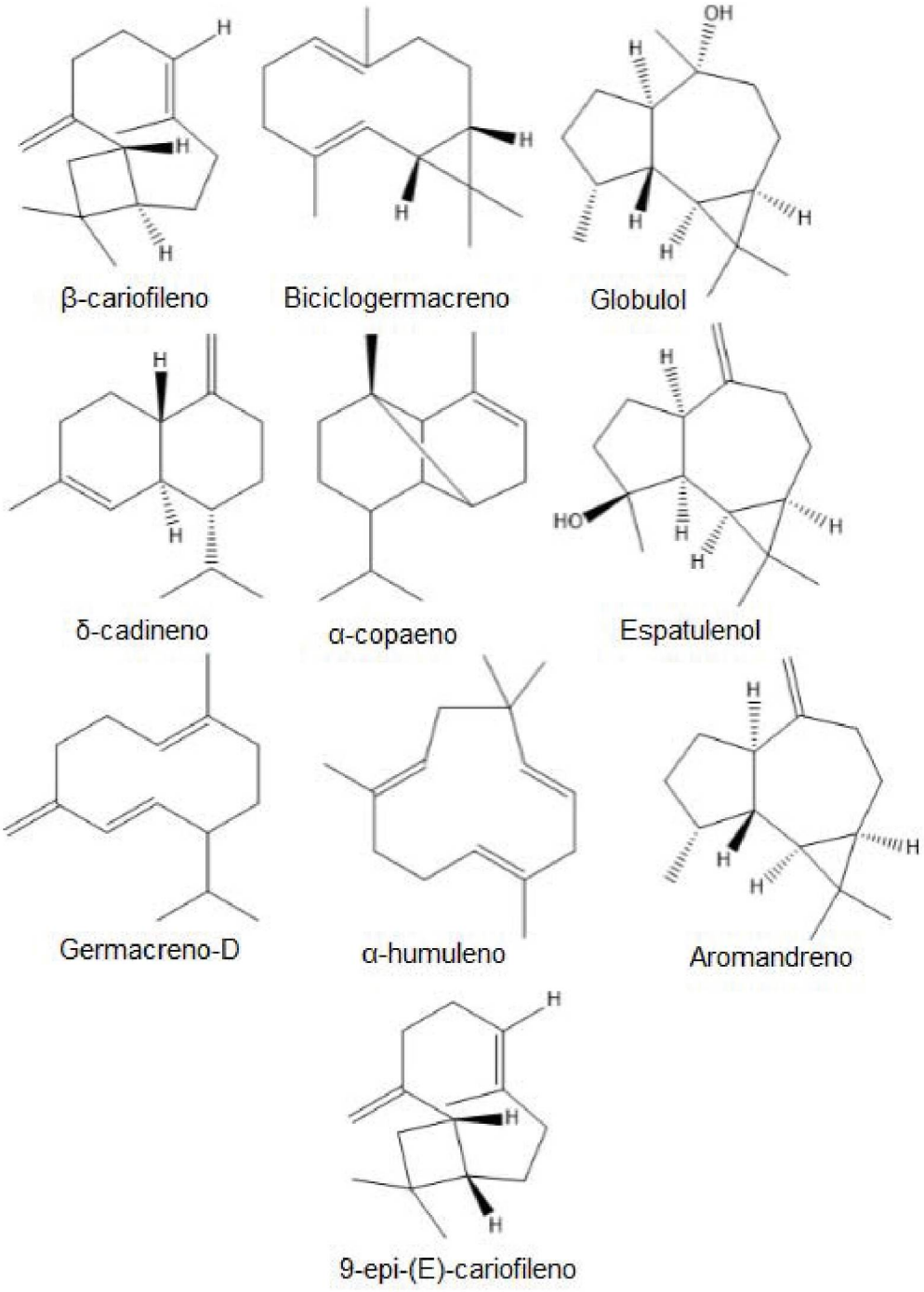
FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: TR = Tempo de Retenção (minutos), IRc = Índice do Tempo de Retenção Calculado, IRt = Índice do Tempo de Retenção da Literatura (Adams, 2007), % = Porcentagem de Compostos. Compostos majoritários em negrito.

A análise do óleo essencial de *E. pyriformis* indicou a presença de 32 compostos, que representaram 76,43% da sua composição total. Os principais componentes foram hidrocarbonetos sesquiterpênicos (57,19%) e monoterpenos oxigenados (17,14%). Estavam presentes em pequenas quantidades hidrocarbonetos monoterpênicos (0,16%), hidrocarbonetos alcanos (0,28%) e hidrocarbonetos aromáticos (0,97%). Os compostos majoritários foram β-cariofileno (17,82%), biciclogermacreno (12,84%), globulol (5,96%) e δ-cadineno (4,33%). Outros compostos incluem α-copaeno (3,83%), espatulenol (3,24%), germacreno-D (2,79%), α-humuleno (2,69%), aromandreno (2,21%) e 9-epi-(E)-cariofileno (2,17%) ilustrados na Figura 9.

O óleo essencial obtido das espécies de *Eugenia* apresentam altos níveis de sesquiterpenos cíclicos e baixos níveis de monoterpenos. Algumas espécies produzem pequenas quantidades de compostos alifáticos e aromáticos, representando concentrações abaixo de 1%. O sesquiterpeno β-cariofileno e o monoterpeno α-pineno são os compostos mais abundantes na composição química de óleos essenciais das espécies de *Eugenia* (PASCOAL; SALVADOR, 2011).

FIGURA 9 - COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.



FONTE: O autor (2016).

Estudos anteriores mostram que o β-cariofileno e biciclogermacreno estão presentes no óleo essencial obtido de outras espécies de *Eugenia*. β-cariofileno é o componente majoritário do óleo essencial de *E. klotzschiana* (CARNEIRO et al.,

2017), *E. moraviana* (APEL et al., 2002a), *E. argentea* (RAJ; GEORGE; SETHURAMAN, 2011) e *E. involucrata* (RASEIRA et al., 2008). β-cariofileno é encontrada abundantemente no óleo essencial de *E. stipitata* (MEDEIROS et al., 2003) e *E. umbelliflora* (APEL et al., 2002a). β-Cariofileno e biciclogermacreno estão presentes em quantidades moderadas no óleo essencial de *E. burkartiana* (APEL et al., 2002a), *E. ramboi* (APEL et al., 2002a), *E. repanda* (APEL et al., 2002b), *E. cuprea*, *E. pitanga* (APEL et al., 2004), *E. beaurepaireana* (APEL et al., 2004), *E. hyemalis* (APEL et al., 2004), *E. mattosii* (MAGINA et al., 2009b) e *E. klotzschiana* (CARNEIRO et al., 2017; COLE; HABER; SETZER, 2007).

Os compostos sesquiterpênicos são amplamente encontrados nos óleos essenciais de plantas e frutas e possuem diferentes aplicações para promover a saúde humana (PETRONILHO et al., 2012). O β-Cariofileno possui várias propriedades, tais como antiedematosa, anti-inflamatória, antitumoral, espasmolítica, propriedades bactericidas (CARNEIRO et al., 2017) e biciclogermacreno apresenta atividade antifúngica (SILVA et al., 2007).

A composição do óleo essencial pode ser influenciada por diversos fatores, como variações fisiológicas, climáticas e ambientais. Assim, na mesma espécie podem ocorrer variações na composição do óleo essencial durante o período vegetativo e reprodutivo das plantas. Estas considerações foram observadas no estudo realizado por Stefanello e colaboradores (2009), onde uma variabilidade nos compostos do óleo essencial de *E. pyrifomis* foram encontradas nas amostras de folhas coletadas em diferentes períodos do ano.

4.2.4 Determinação do teor de Polifenóis totais e Atividade antioxidante do óleo essencial de *E. pyriformis* Cambess.

Os resultados da atividade antioxidante do óleo essencial de *E. pyriformis* estão descritos na Tabela 10.

TABELA 10 – TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO E REDUÇÃO DO RADICAL DPPH DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.

Amostra	Óleo Essencial
Polifenóis totais (GAE= mg/g ± DP)	148,16 ± 0,018
Fosfomolibdênio (% AA em relação a rutina ± DP)	59,66 ± 2,499
DPPH (IC_{50} µg/mL)	>500
Rutina	6,20 ± 0,07
Vitamina C	4,75 ± 0,19

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: GAE, Equivalente de ácido gálico; AA, Atividade antioxidante. Resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 3).

O teor de polifenóis totais do óleo essencial de *E. pyriformis* foi de 148,16 ± 0,018 equivalentes de ácido gálico/g. Compostos fenólicos têm propriedades redox, que lhes permitem agir como antioxidantes. Como sua capacidade de escavação de radicais livres é facilitada por seus grupos hidroxila, a concentração fenólica total pode ser usada como base para triagem rápida da atividade antioxidante (FURTADO et al., 2018). A atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio foi de 59,66 ± 2,449 % de atividade total em relação a rutina, considerado como atividade moderada de fosfomolibdênio, devido ao alto teor de compostos fenólicos observados pelo teste Folin-Ciocalteu. O método do fosfomolibdênio foi baseado na redução de Mo (VI) para Mo (V) pelo composto antioxidante e a formação de um complexo fosfato verde / Mo (V) com uma absorção máxima a 695 nm (PAULA et al., 2014). O resultado para o método DPPH demonstrou que concentrações acima de 500 µg/mL foram necessárias para reduzir 50% do DPPH presente no meio reacional. Resultado semelhante de atividade antioxidante foi observado no óleo essencial de *E. uniflora*, demonstrando atividade de DPPH com IC_{50} de 833,3 ± 20,7 µg/mL (VICTORIA et al., 2012). A atividade antioxidante moderada observada para o óleo essencial de *E. pyriformis* pode estar relacionada à alta presença de compostos fenólicos com poder redutor. A capacidade de combater os radicais livres está ligada à composição química (ZUBAIR et al., 2017). Sendo que os principais compostos que possuem atividade redutora de radicais livres são os compostos fenólicos

devido à sua propriedade redutora e estrutura química que pode neutralizar ou sequestrar radicais (SANGEETHA et al., 2016; SOUSA et al., 2007).

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE CAULE E FOLHAS DE *E. pyriformis.*

As determinações de umidade e cinzas totais do caule e das folhas de *E. pyriformis* foram realizadas em triplicata e os resultados estão expressos na Tabela 11.

TABELA 11 - DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS DO CAULE E FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.

Parte Vegetal	Caule	Folhas
Umidade (% ± DP)	9,77 ± 0,21	9,75 ± 1,49
Cinzas Totais (% ± DP)	1,38 ± 0,88	3,13 ± 1,86

FONTE: O autor (2015).

LEGENDA: Desvio Padrão (DP).

Após análise verificou-se que o caule e folhas de *E. pyriformis* apresentaram um teor de água de 9,77 ± 0,21 e 9,75 ± 1,49, respectivamente. A perda de umidade por dessecação das amostras estudadas apresentaram teor abaixo de 14%, que é o limite máximo recomendado pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) para drogas vegetais. O alto teor de água favorece a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação dos constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias, alterando assim, a qualidade do material vegetal (AMARAL et al., 2003).

Para a análise de cinzas totais, os resultados encontrados para as amostras de caule foram de 1,38 ± 0,88 e para as folhas de 3,13 ± 1,86. A determinação de teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis na droga vegetal como metais pesados, areia ou pedra (BRASIL, 2010). É uma metodologia rápida, simples e pode ser facilmente aplicada no controle de qualidade da espécie

vegetal seca, permitindo detectar adulterações e evitar a exposição do consumidor ao risco real do uso de material vegetal inadequado (BRAGA et al., 2007).

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *E. pyriformis*

Os extratos brutos cetônico e etanólico foram obtidos em aparelho de Soxhlet a partir de 2,43 kg de caule, 1,70 kg de folhas e 0,440 kg de fruto (casca liofilizada) de *E. pyriformis*. A obtenção de extratos com solventes orgânicos em extrator de Soxhlet, é um processo considerado eficiente e amplamente empregado. Nesta metodologia utiliza-se um volume pequeno de solvente, que fica sob aquecimento e a todo o momento em contato com a amostra promovendo uma maior interação entre as moléculas (PAIVA et al., 2004).

Após a obtenção dos extratos brutos cetônico e etanólico de *E. pyriformis,* determinou-se o teor de sólidos em relação ao material vegetal seco. O rendimento dos extratos brutos foi calculado a partir dos resultados obtidos no teor de sólidos (Tabela 12). A partir da massa total obtida nos extratos, 8 gramas de cada extrato foram pesados e separados para a realização dos ensaios biológicos e, o restante foram destinados ao particionamento. Obtendo-se a partir do extrato cetônico as frações hexano (FH), clorofórmio (FC), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica remanescente (FR) e do extrato etanólico as frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente do caule, das folhas e do fruto (casca liofilizada).

O cálculo do rendimento das frações obtidas foi calculado em relação ao peso do material vegetal seco utilizado no processo de extração (Tabela 12).

TABELA 12 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇOES OBTIDAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.

FRAÇÕES	Massa obtida (g)	Rendimento (%)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
EXTRAÇÃO CETÔNICA	CAULE		FOLHAS		FRUTO (Casca)	
Extrato Bruto	73,37	3,03	91,68	5,38	69,11	16,04
Hexano	14,19	0,58	27,32	1,60	12,25	2,78
Clorofórmio	3,23	0,13	21,91	1,28	22,38	5,08
Acetato de Etila	5,56	0,22	6,91	0,40	9,23	2,09
Hidroalcoólica	32,55	1,33	10,01	0,58	8,61	1,95
Precipitado	1,30	0,05	2,26	0,13	51,39	11,66
EXTRAÇÃO ETANÓLICA	CAULE		FOLHAS		FRUTO (Casca)	
Extrato Bruto	39,74	1,66	91,47	5,36	40,76	9,26
Clorofórmio	2,03	0,08	31,7185	1,86	9,83	2,23
Acetato de Etila	1,55	0,06	6,26	0,37	0,94	0,21
Hidroalcoólica	21,88	0,90	38.075	2,24	8,28	1,87

FONTE: O autor (2016).

4.5 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *E. pyriformis* POR CCD

Através do método de CCD foi realizada a avaliação fitoquímica dos extratos e frações de *E. pyriformis,* e os resultados encontrados estão descritos na Tabela 13.

TABELA 13 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE *E. pyriformis* CAMBESS.

AMOSTRAS	FLAVONOIDES	TANINOS	TERPENOS	ALCALOIDES
EXTRAÇÃO CETÔNICA	CAULE / FOLHAS / FRUTO (Casca)			
Extrato Bruto	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -
Hexano	- / - / -	- / - / -	+ / + / +	- / - / -
Clorofórmio	- / - / +	- / - / -	+ / + / -	- / - / -
Acetato de Etila	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	- / - / -
Hidroalcoólica	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	- / - / -
Precipitado	+ / + / +	+ / + / +	- / - / +	- / - / -
EXTRAÇÃO ETANÓLICA	CAULE / FOLHAS / FRUTO (Casca)			
Extrato Bruto	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -
Clorofórmio	- / - / +	- / - / +	+ / + / +	- / - / -
Acetato de Etila	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	- / - / -
Hidroalcoólica	+ / + / +	+ / + / +	- / - / -	- / - / -

FONTE: O autor (2015).

LEGENDA: + (Presença), - (Ausência).

Os resultados encontrados confirmam o estudo realizado por Armstrong (2011). Neste estudo a prospecção fitoquímica de *E. pyriformis* revelou a presença de glicosídeos flavônicos e esteroides e/ou triterpenoides particularmente no extrato hidroalcoólico de folha, enquanto que saponinas, taninos e ácidos fixos foram detectados no extrato aquoso, tanto de folha como de caule de *E. pyriformis*. Em comparação com estudos publicados do gênero, Cecílio et al. (2012) demonstraram resultados concordantes para *E. uniflora* e *E. dysenterica*, que verificaram a ocorrência de taninos, flavonoides, terpenos e saponinas. Fiúza et al. (2008) vericaram para *E. uniflora*, a presença de antraquinonas além dos compostos previamente citados.

A cromatografia é um método de separação de misturas, amplamente utilizada em laboratórios de produtos naturais, análises orgânicas e organometálicas. É um método considerado de ampla aplicação para diferentes amostras, alta sensibilidade, grande reprodutibilidade, rapidez na separação e baixo custo (SANTOS et al., 2007).

4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

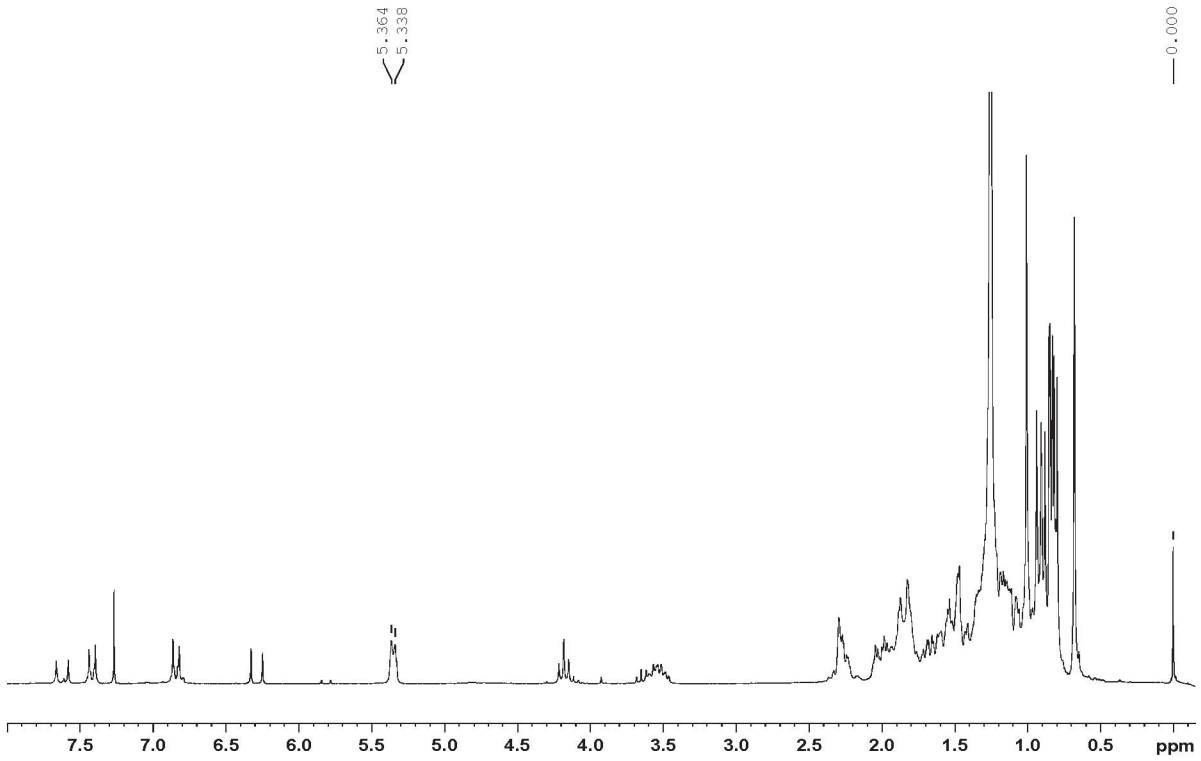
Foram identificados cinco compostos da espécie *E. pyriformis* Cambess.

4.6.1 Isolados EP1

O composto EP1 foi isolado da fração hexano de caule, obtida do extrato cetônico, a partir das subfrações 29 a 31, com aspecto de um precipitado branco. Para identificação do composto isolado foi utilizado RMN, conforme descrito no item 3.6.4.

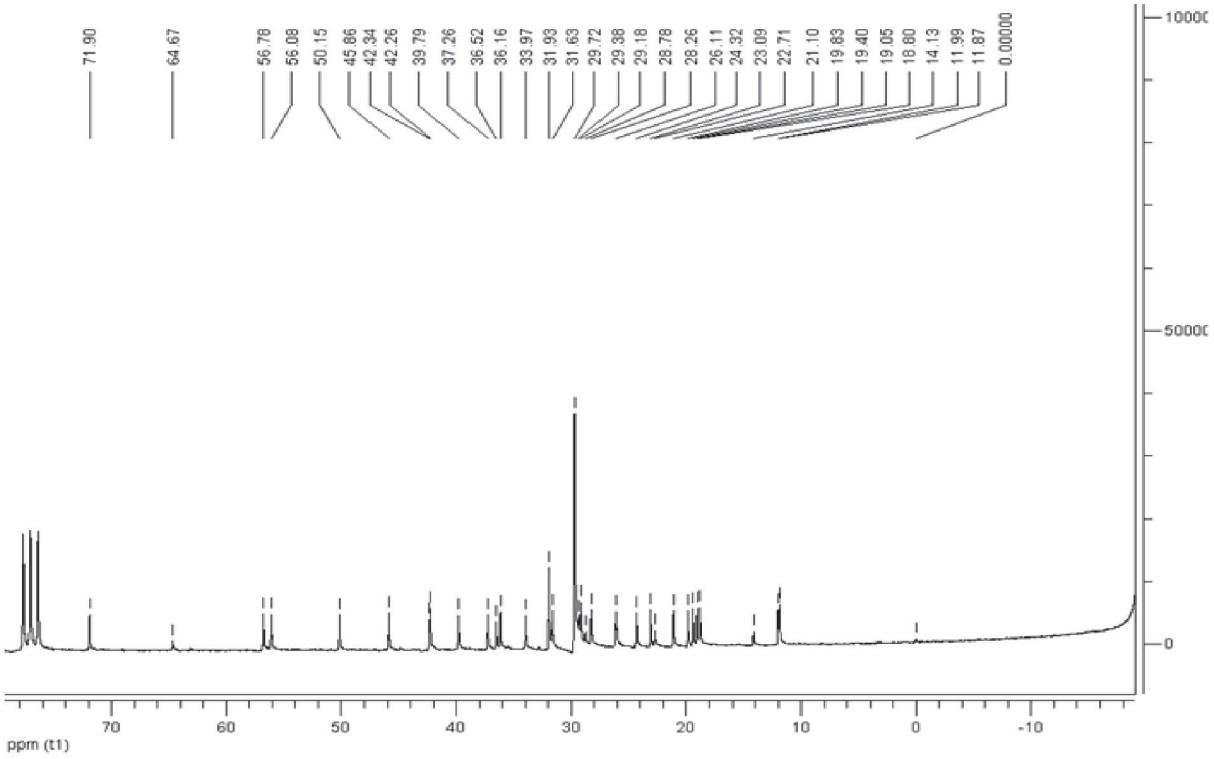
A análise do espectro de RMN ^{1}H (Figura 10) mostrou a presença do H-3 (multipleto) na região 3,52 ppm e do hidrogênio olefínico H-6 em δH 5,35 ppm (*J* = 5,1 Hz, *d*) e o acúmulo de sinais na região de 0,60 - 2,40 ppm atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos são sinais característicos dos esteróides β-sitosterol e campesterol. Pela análise dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 11 e 12) podem-se observar entre outros, sinais de carbonos insaturados em δC 140,7 (C), 121,7 (CH) e 129,9 (CH).

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP1



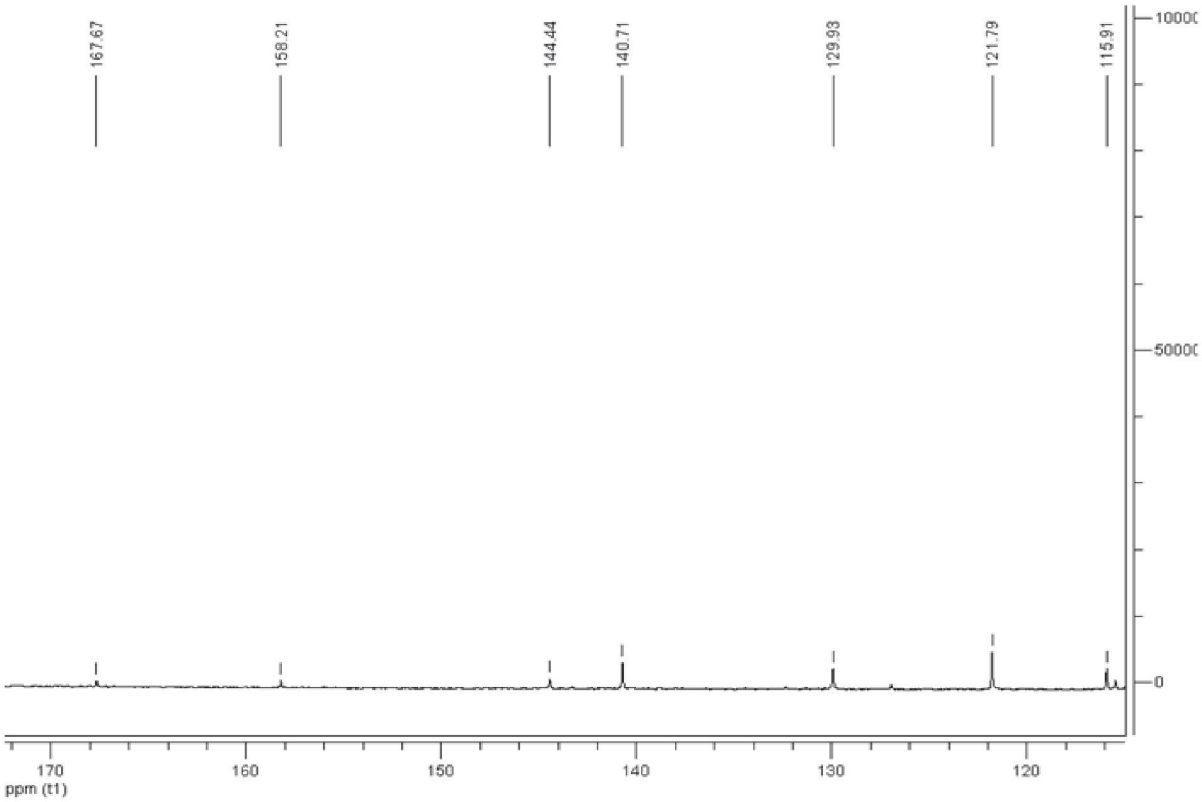
FONTE: O autor (2015).

FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP1



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP1



FONTE: O autor (2015).

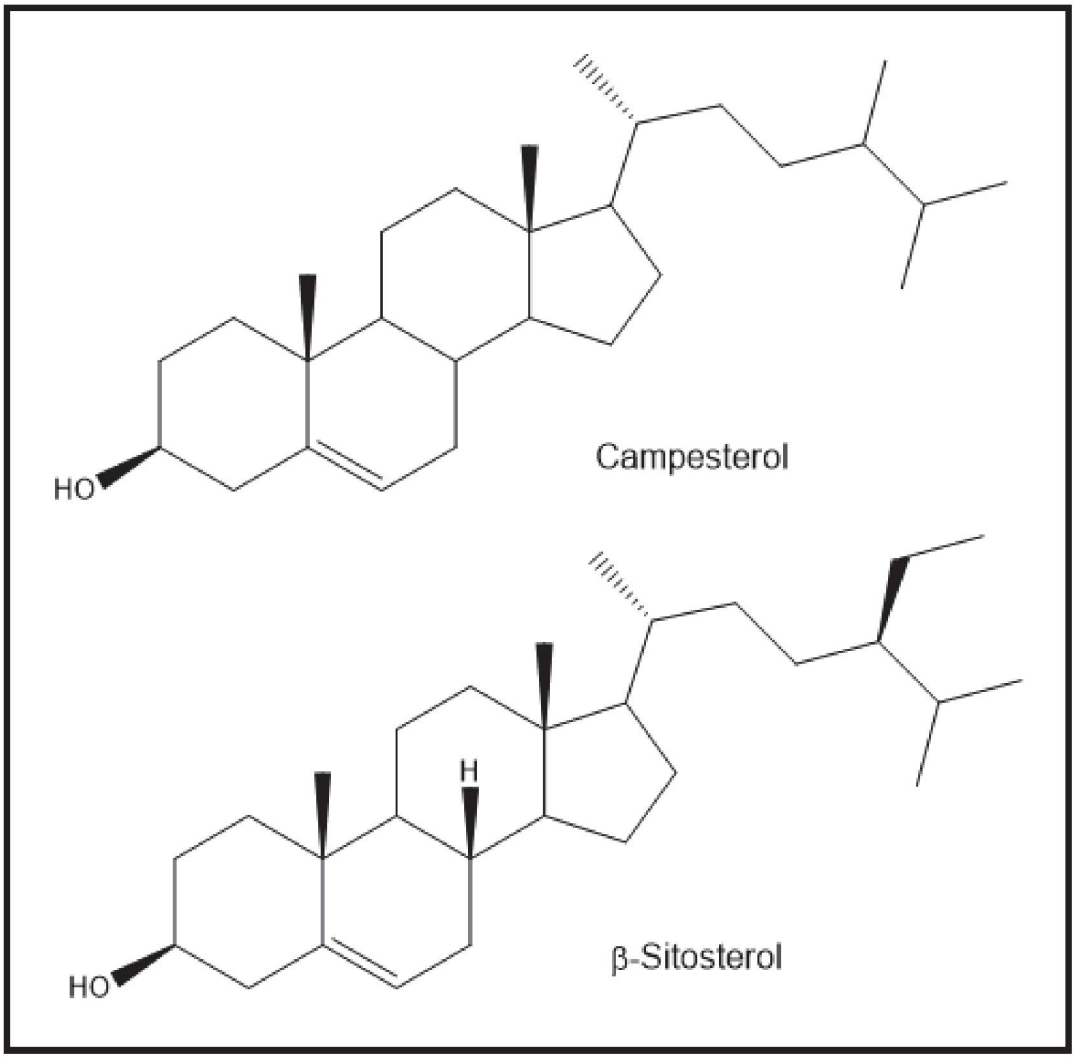
De acordo com os dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C e por comparação com dados da literatura (ANDRADE, 2003) (Tabela 14), o composto isolado foi identificado como sendo uma mistura dos esteroides β-sitosterol e campesterol, cujas estruturas químicas são ilustradas na Figura 13. A análise dos espectros de RMN ^{13}C mostra a presença de sinais de carbonos insaturados que correspondem a outras estruturas químicas presentes na mistura que não foram identificadas.

TABELA 14 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DOS ESTERÓIDES β-SITOSTEROL E CAMPESTEROL EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA.

RMN ^{13}C	β-SITOSTEROL	CAMPESTEROL	β-SITOSTEROL (ANDRADE, 2003)	CAMPESTEROL (ANDRADE, 2003)
1	37,25	37,25	37,27	37,27
2	31,66	31,66	31,65	31,65
3	71,80	71,80	71,82	71,82
4	42,29	42,29	42,29	42,29
5	140,76	140,76	140,77	140,77
6	121,68	121,68	121,72	121,72
7	31,89	31,89	31,91	31,91
8	31,89	31,89	31,91	31,91
9	50,15	50,15	50,15	50,15
10	36,51	36,51	36,52	36,52
11	21,05	21,05	21,09	21,09
12	39,77	39,77	39,79	39,79
13	42,29	42,29	42,29	42,29
14	56,76	56,76	56,78	56,78
15	24,27	24,27	24,32	24,32
16	28,20	28,20	28,26	28,26
17	56,08	56,08	56,07	56,07
18	11,82	11,82	11,87	11,87
19	19,36	19,36	19,41	19,41
20	36,13	36,13	36,16	36,16
21	19,01	19,36	19,04	19,41
22	31,89	33,98	31,91	33,96
23	29,65	26,21	29,70	26,09
24	39,77	45,85	39,79	45,85
25	31,66	29,21	31,65	29,16
26	21,05	18,74	21,09	18,79
27	19,78	19,36	19,83	19,41
28	18,74	23,08	18,79	23,08
29	11,82	-	11,99	-

FONTE: O autor (2015).

FIGURA 13 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTERÓIDES IDENTIFICADOS NO ISOLADO EP1.



FONTE: O autor (2015).

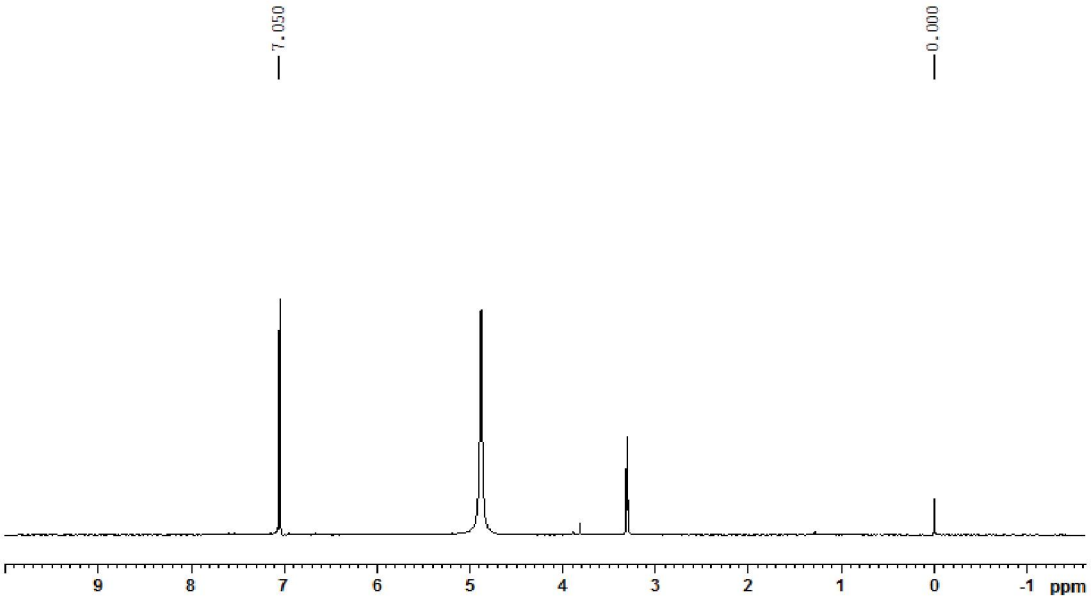
4.6.2 Isolado EP2

O composto EP2 foi isolado da fração acetato de etila de folhas (extração cetônica) de *E. pyriformis* obtida das subfrações de 56 a 77, com aspecto de um precipitado sólido branco. Para identificação do composto isolado foi utilizado RMN ^{1}H e ^{13}C, conforme os espectros na Figura 14 e 15.

O espectro de RMN ^{1}H mostrou o aparecimento de sinais de δ= 5,10 ppm, respectivo as 3 hidroxilas no anel aromático e um sinal em δ= 7,05 ppm correspondente aos dois hidrogênios do anel aromático que são correspondentes, esses valores indicam a presença de núcleo aromático. A análise do espectro de ^{13}C indicou o sinal da carbonila de ácido carboxílico em δ 169,42, enquanto o sinal de C-

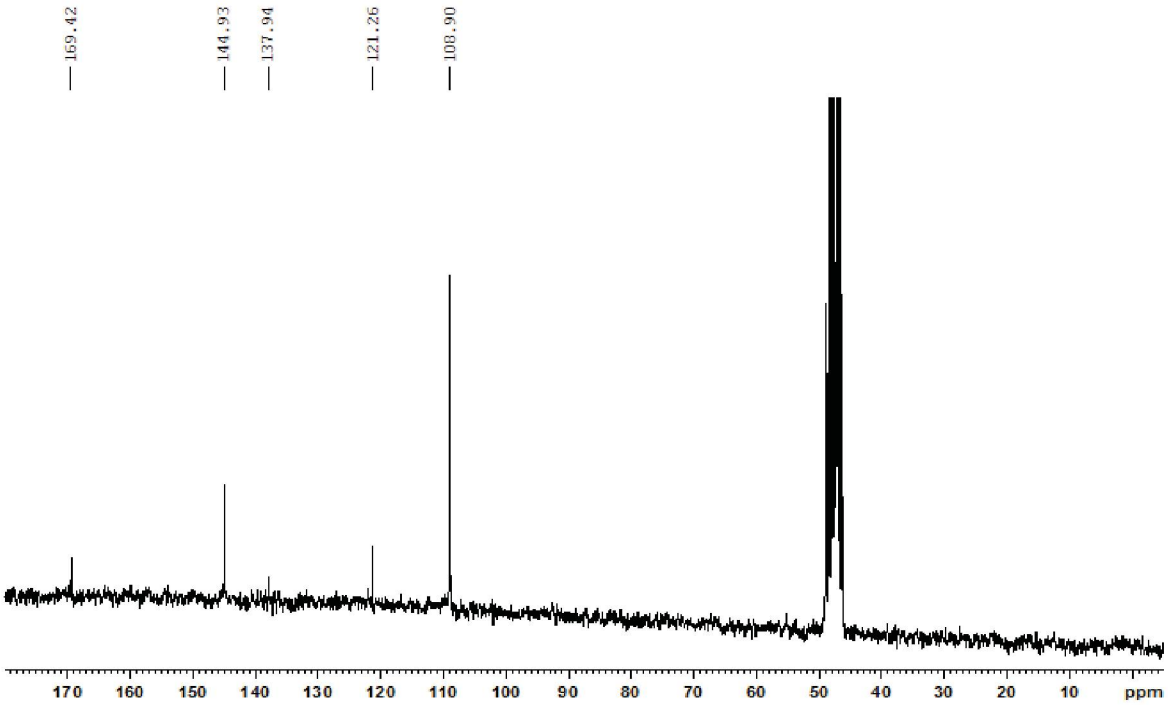
2 e C-6 está presente em δ 108,9. Os demais sinais dos carbonos quaternários foram visualizados em δ 121,26 (C-1), 137,94 (C-4), 144,93 (C3 e C5).

FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP2



FONTE: O autor (2015).

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP2



FONTE: O autor (2015).

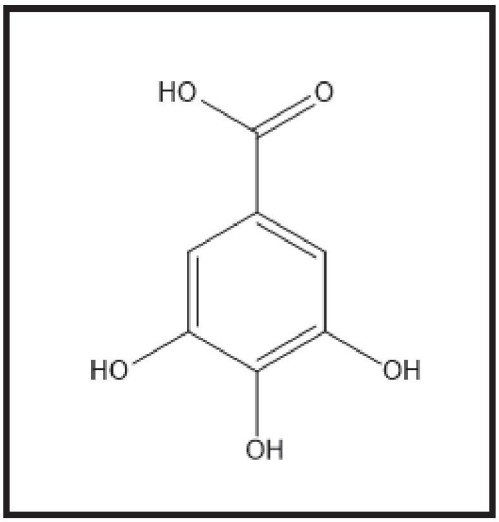
De acordo com os dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C e por comparação com dados da literatura (Tabela 15), o isolado EP2 foi identificado como Ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, conhecido como Ácido gálico (Figura 16).

TABELA 15 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^{1}H E ^{13}C DO ÁCIDO 3,4,5-TRIIDROBENZÓICO (ÁCIDO GÁLICO).

	RMN ^{1}H	RMN^{13}C	ÁCIDO GÁLICO RMN ^{1}H (ALMEIDA et al., 2005)	ÁCIDO GÁLICO RMN^{13}C (ALMEIDA et al., 2005)
1		121,26		120,7
2	7,05	108,9	7,08	109,1
3		144,9		145,1
4		137,9		138,3
5		144,9		145,1
6		108,9		109,1
7		169,4		169,1

FONTE: O autor (2015).

FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO IDENTIFICADO NO ISOLADO EP2



FONTE: O autor (2015).

O ácido gálico é um metabólito amplamente encontrado no reino vegetal, ocorrendo em muitas plantas. Poucos estudos relatam o isolamento de ácido gálico em espécies de *Eugenia*. Magina (2009b) isolou o ácido gálico em folhas de *E. beaurepaireana*. Esse ácido fitoquímico é bem conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antimutagênicas,

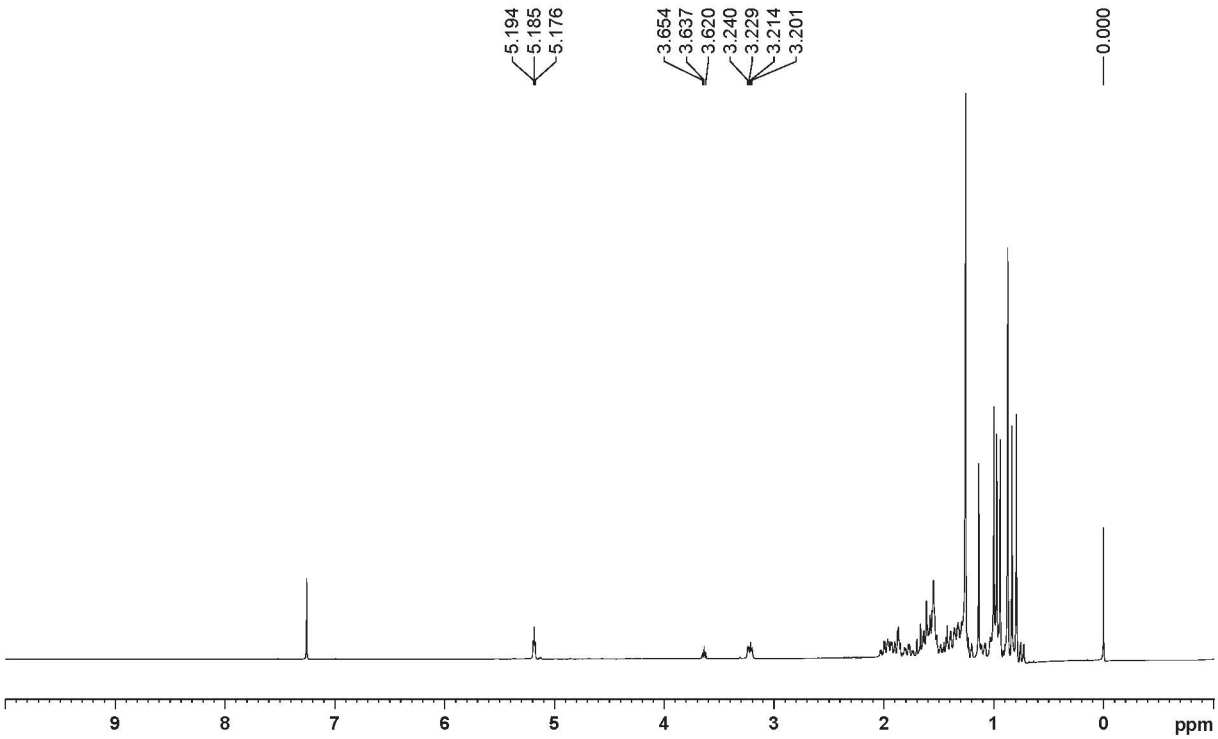
anticarcinogênicas, antivirais e analgésicas (BIROSOVÁ; MIKULÁSOVÁ; VAVERKOVÁ, 2005; KANG et al., 2008; LOPES et al., 2011).

4.6.3 Isolados EP3 e EP4

O extrato cetônico primário foi obtido na quantidade de 32,94g, correspondente a um rendimento de 5,2%. Através de coluna gravimétrica foi feita a purificação do extrato primário e o isolamento dos compostos EP3 e EP4.

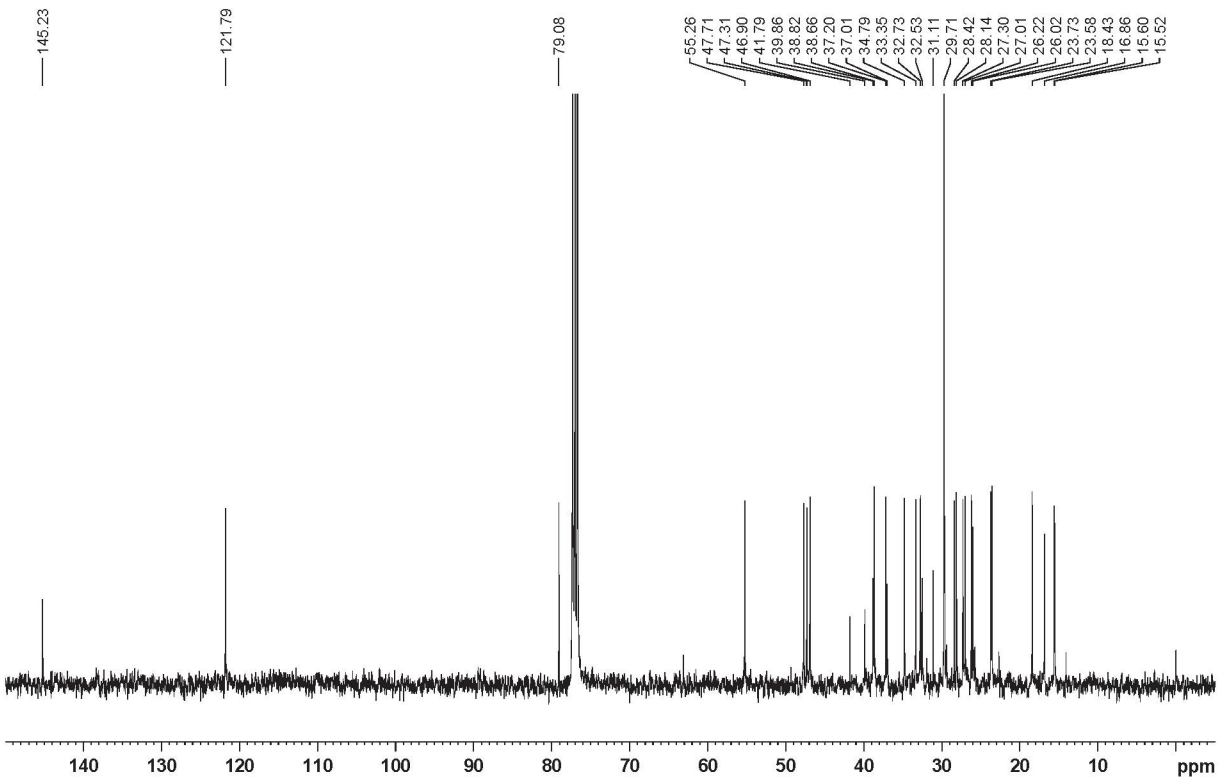
Para identificação dos compostos isolados EP3 e EP4 foi utilizado RMN ^{1}H e ^{13}C. O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 17 e 19) apresentou uma grande quantidade de sinais na região de 0-2 δ dentre eles, vários singletos na região de 0,79 a 1,6 δ, que é característico dos triterpenoides, referente aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos presentes em sua estrutura. Em δ 3,23 foi observada a presença de um duplo dubleto, correspondente ao H-3, que geralmente é observado em triterpenos do tipo 3β-OH. Em δ 5,12 e 5,18, observaram-se dois tripletos característicos de olefinas, correspondentes aos H-12 e H-13, respectivamente (MAHATO; KUNDU, 1994; NAGASAMPAGI, 2004). O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 18 e 20) apresentou sinais em δ 79,0 atribuídos ao carbono carbinólico C-3. Na região de olefinas foram observados sinais em δ 145,2 e δ 121,7, correspondentes aos C-13 e C-12, respectivamente. Dois sinais caracterizam a β-amirina, diferenciando-a da α-amirina, uma vez que nesta última estes sinais olefínicos são verificados em torno de δ 139,0 (C-13) e 124,0 (C-12). O composto EP3 foi identificado como β-amirina e EP4 como α-amirina. Normalmente aparecem juntas como uma mistura, porém neste estudo foi possível isolar β-amirina da α-amirina (Figura 21). Os valores correspondentes aos carbonos da β-amirina e da α-amirina, obtida da fração metanólica do extrato cetônico bruto podem ser observados na Tabela 16 quando comparados com os dados da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994; NAGASAMPAGI, 2004).

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP3



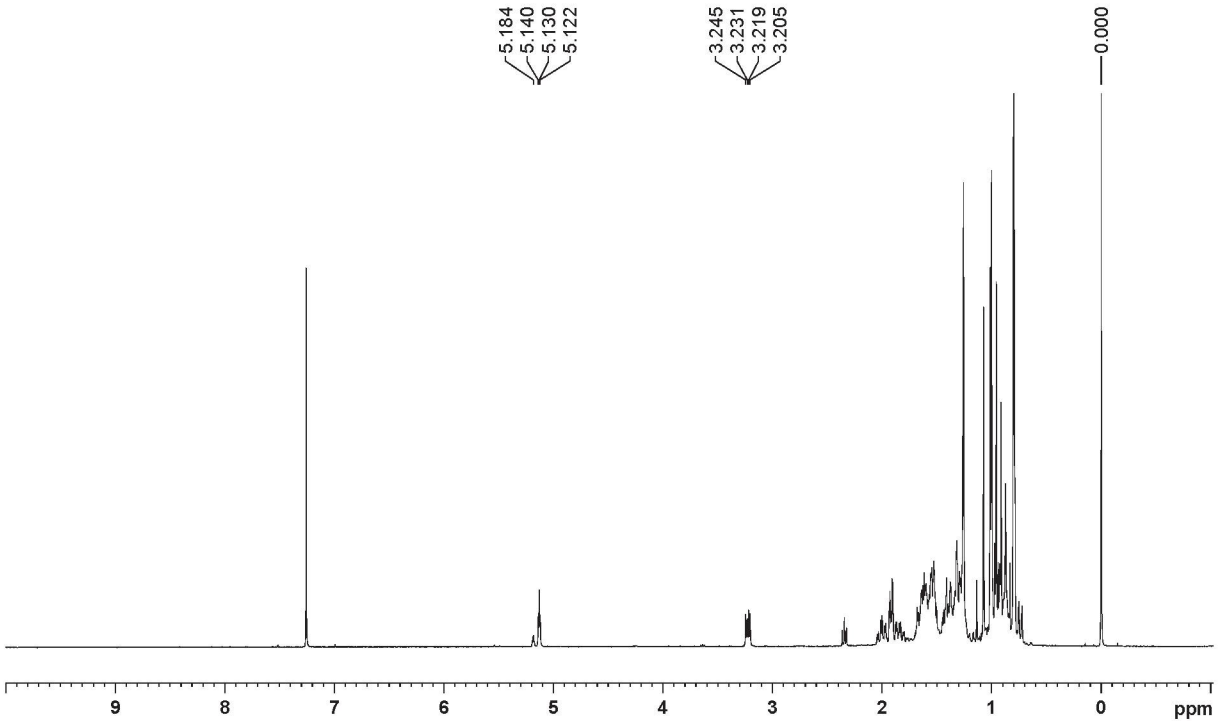
FONTE: O autor (2017).

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP3



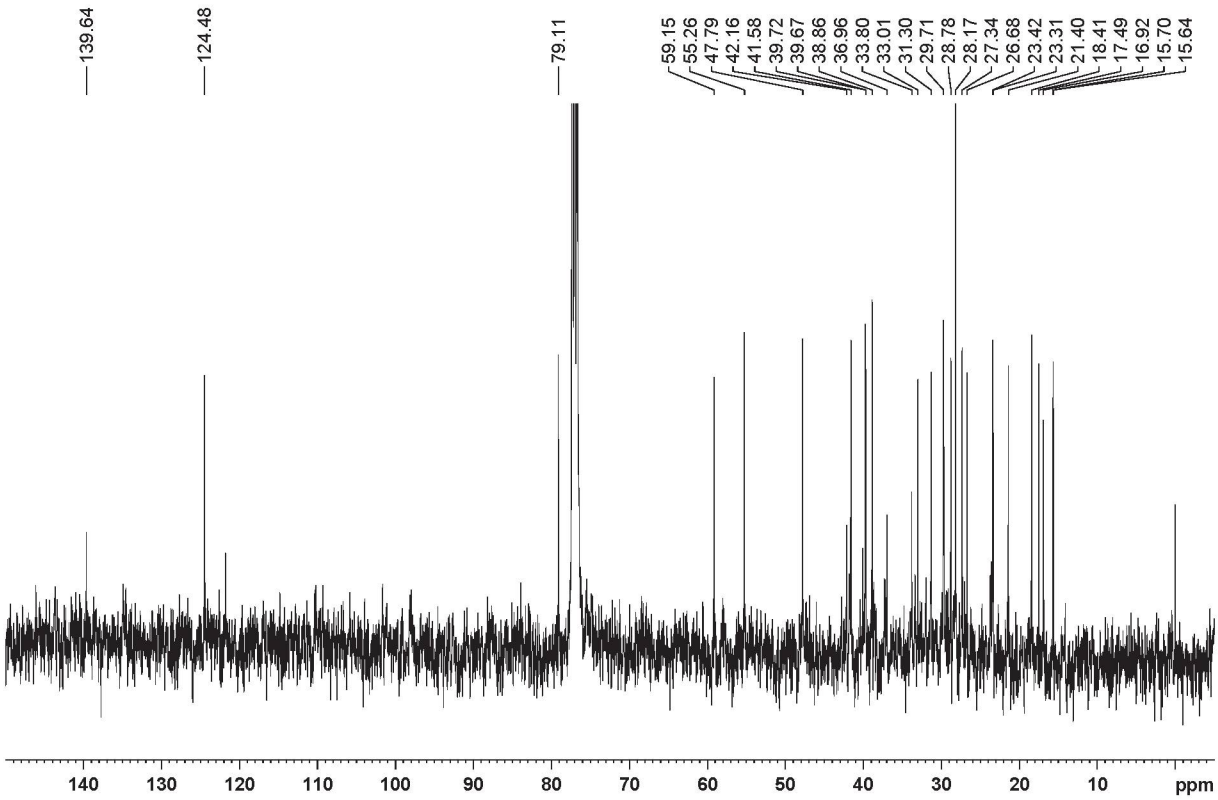
FONTE: O autor (2017).

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN ^{1}H DO ISOLADO EP4



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO ISOLADO EP4



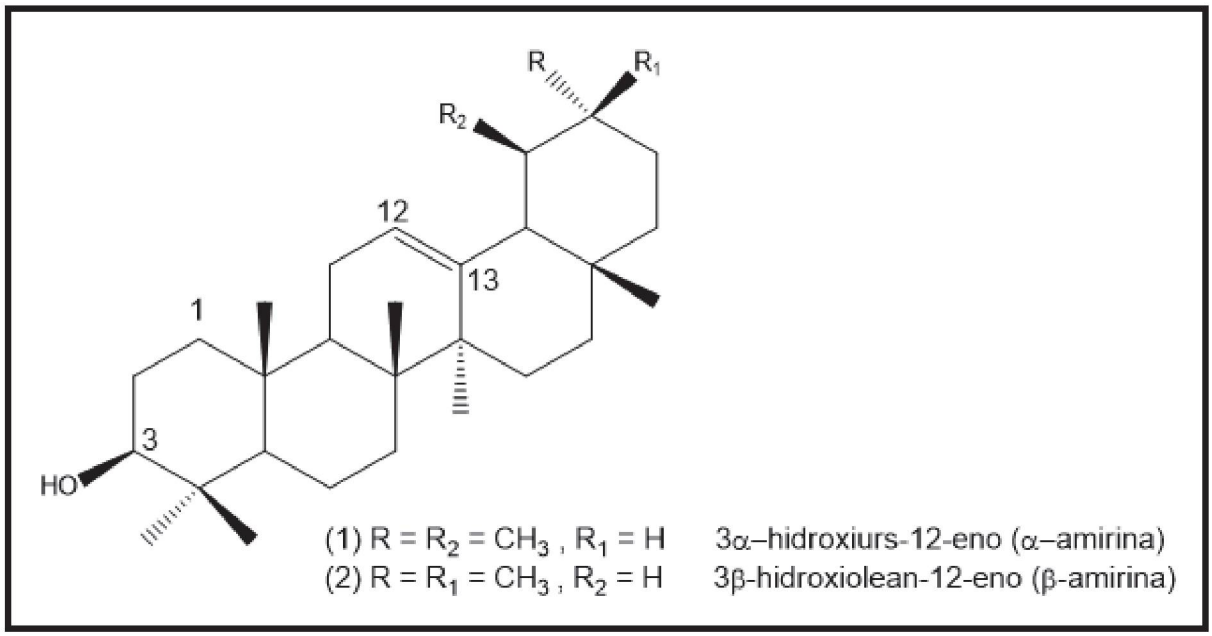
FONTE: O autor (2017).

TABELA 16 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DE β-AMIRINA E α-AMIRINA EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA.

RMN ^{13}C	β-Amirina	α-Amirina	β-Amirina (MAHATO; KUNDU, 1994).	α-Amirina (BANDEIRA et al., 2007).
1	38,6	38,8	38,7	39,2
2	27,0	27,3	27,3	-
3	79,0	79,1	79,0	79,1
4	38,8	38,6	38,8	-
5	55,2	55,2	55,3	55,2
6	18,4	18,4	18,5	19,6
7	32,7	33,0	32,8	32,4
8	39,8	39,6	38,8	39,3
9	47,7	47,7	47,7	47,1
10	37,0	36,9	36,6	36,6
11	23,5	23,4	23,6	23,6
12	121,7	124,4	121,8	121,2
13	145,2	139,6	145,1	145,2
14	41,7	41,5	41,8	41,8
15	26,0	26,6	26,2	26,0
16	27,0	27,3	27,0	26,8
17	31,1	31,3	32,5	32,1
18	47,3	47,7	47,4	46,8
19	46,8	-	46,9	46,7
20	29,7	-	31,1	35,0
21	34,7	-	34,8	34,6
22	37,1	36,9	37,2	37,0
23	28,4	28,1	28,2	-
24	15,5	15,6	15,5	15,1
25	15,6	15,7	15,6	15,7
26	16,8	16,9	16,9	16,9
27	26,0	23,3	26,0	23,3
28	28,1	28,7	28,4	28,8
29	33,3	17,4	33,3	17,5
30	23,7	21,4	23,7	21,4

FONTE: O autor (2015).

FIGURA 21 - ESTRUTURA QUÍMICA DA α-AMIRINA E β-AMIRINA IDENTIFICADOS NOS ISOLADOS EP3 E EP4.



FONTE: O autor (2017).

Alguns estudos relatam o isolamento de α- e β-amirinas em espécies de *Eugenia*. Estes compostos triterpênicos foram isolados e identificados em mistura nas espécies *E. umbelliflora* (MEYRE-SILVA et al., 2009), *E. beaurepaireana* (MAGINA et al., 2009a), *E. pyriformis* (ARMSTRONG, 2011) e *E. brasiliensis* (MAGINA et al., 2012). Vários estudos farmacológicos com α- e β-amirinas tem revelado efeitos antiinflamatórios, antitumorais, ansiolíticos, antidepressivos, gastroprotetores e hepatoprotetores (MELO et al., 2010; ARAGÃO et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007; OTUKI et al., 2005).

4.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.7.1 Atividade antifúngica para fungos leveduriformes

Na análise da atividade antifúngica, os resultados sugerem eficiente atividade de *E. pyriformis* sobre os fungos leveduriformes, com CIMs baixas, conforme demonstrado na Tabela 17. Amostras com CIM abaixo de 100 µg/mL apresentam interesse para uso clínico (MITSHER et al., 1972). Os extratos brutos cetônico e etanólico e as frações acetato de etila e hidroalcoólica do caule e das

folhas, na extração cetônica e etanólica mostraram valores de CIMs menores e igual a 7,81 µg/mL para as cepas testadas. Estudos realizados por Souza et al. (2014) encontraram para o extrato etanólico e cetônico de caule e folhas e, para a fração etanólica acetato de etila de folhas CIMs com valores entre 7,81 e 62,5 µg/mL contra cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Chavasco e colaboradores (2014) estudaram extratos etanólicos de caule, folhas, flores, raízes e frutos de *E. pyriformis*, os resultados encontrados mostraram bom potencial inibitório (CIMs= 12,5 - 50 µg/mL) contra *C. albicans*.

A presença de compostos fenólicos nos extratos e nas frações acetato de etila e hidroalcoólica de *E. pyriformis* revelada pelo screening fitoquímico, além do isolamento do ácido gálico (ácido fenólico) na FAE, são fatores que podem estar relacionados ao bom potencial inibitório contra *Candida* spp. As propriedades anti-Candida dos compostos fenólicos têm sido comentadas na literatura, incluindo inativação na produção enzimática e efeito antibiofilme (TEODORO et al., 2015).

TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE, FOLHAS E FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS LEVEDURIFORMES.

Microrganismos	EXTRAÇÃO CETÔNICA						EXTRAÇÃO ETANÓLICA			
	EB	FH	FC	FAE	FR	PR	EB	FC	FAE	FR
	Caule (µg/mL)									
Fungos Leveduriformes										
C. albicans ATCC 90028	<7,81	250	>1000	<7,81	<7,81	<7,81	7,81	500	<7,81	7,81
C. krusei ATCC 6258	<7,81	250	31,25	<7,81	<7,81	<7,81	<7,81	62,5	<7,81	<7,81
C. parapsilosis ATCC 22019	<7,81	500	62,5	<7,81	<7,81	<7,81	7,81	500	<7,81	<7,81
	Folhas (µg/mL)									
Fungos Leveduriformes										
C. albicans ATCC 90028	125	>1000	500	<7,81	<7,81	7,81	7,81	31,25	<7,81	7,81
C. krusei ATCC 6258	7,81	>1000	125	<7,81	<7,81	<7,81	<7,81	7,81	<7,81	<7,81
C. parapsilosis ATCC 22019	15,62	1000	125	<7,81	7,81	<7,81	<7,81	31,25	<7,81	<7,81
	Fruto (Casca) (µg/mL)									
Fungos Leveduriformes										
C. albicans ATCC 90028	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	250	>1000
C. krusei ATCC 6258	>1000	>1000	>1000	>1000	125	>1000	125	>1000	250	>1000
C. parapsilosis ATCC 22019	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	>1000	1000	>1000

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: (EB) Extrato Bruto, (FH) Fração Hexano, (FC) Fração Clorofórmio, (FAE) Fração Acetato de Etila, (FR) Fração Hidroalcoólica remanescente, (PR) Precipitado.

Na Tabela 18 estão inseridos os resultados obtidos na atividade antifúngica do óleo essencial, os isolados α, β-amirinas e ácido gálico comercial (Sigma/Aldrich, Darmstadt, Germany). A atividade antifúngica para as amostras de óleo essencial de *E. pyriformis* mostrou CIMs acima de 1000 µg/mL, e foram classificados com ausência de atividade inibitória para as cepas testadas. O ácido gálico comercial mostrou bom potencial inibitório contra as cepas de fungos leveduriformes testadas, mostrando CIMs com valores iguais ou inferiores a 7,81 µg/mL. Os compostos isolados α e β-amirinas foram classificados com ausência de potencial inibitório contra as cepas testadas, com CIMs acima de 1000 µg/mL.

TABELA 18 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E ALGUNS COMPOSTOS ISOLADOS DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS LEVEDURIFORMES.

Microrganismos	**Óleo essencial (µg/mL)**	**Ácido Gálico (Sigma/Aldrich, Darmstadt, Germany) (µg/mL)**	**β-Amirina (Isolado) (µg/mL)**	**α-Amirina (Isolado) (µg/mL)**
Fungos Leveduriformes				
C. albicans ATCC 90028	>1000	7,81	>1000	>1000
C. krusei ATCC 6258	>1000	<7,81	>1000	>1000
C. parapsilosis ATCC 22019	>1000	<7,81	>1000	>1000

FONTE: O autor (2017).

Estudos realizados com óleo essencial das espécies *E. axillaris* mostrou CIM de 625 µg/mL contra cepas de *C. albicans* ATCC 10231 (SCHMIDT et al., 2006) e, para *E. uniflora* CIMs de 208,3 µg/mL contra cepas de isolados clínicos de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (VICTORIA et al., 2012).

A fração etanólica acetato de etila de folhas (FEAEF) foi escolhida para avaliar a atividade antifúngica contra cepas clínicas de *C. albicans*. Esta fração foi selecionada por três motivos principais; a) ser obtida através de extração etanólica, sendo esta extração a mais comumente empregada no desenvolvimento de fármacos; b) o isolamento e identificação do composto ácido gálico obtido a partir da fração acetato de etila e, c) por esta fração apresentar atividade antifúngica contra fungos leveduriformes com valores de CIMs inferiores a 7,81 µg/mL.

A FEAEF foi testada contra 20 isolados clínicos de *C. albicans* obtidas a partir de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os resultados estão incluídos na Tabela 19.

TABELA 19 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans*.

***C. albicans* (Isolados Clínicos)**	**FEAEF (µg/mL)**
Isolado 374	7,81
Isolado 375	15,62
Isolado 376	7,81
Isolado 377	3,9
Isolado 378	7,81
Isolado 379	7,81
Isolado 380	3,9
Isolado 381	3,9
Isolado 382	3,9
Isolado 383	3,9
Isolado 384	3,9
Isolado 385	3,9
Isolado 386	3,9
Isolado 387	3,9
Isolado 388	3,9
Isolado 389	3,9
Isolado 390	15,62
Isolado 391	15,62
Isolado 392	15,62
Isolado 393	62,5

FONTE: O autor (2017).

A análise da atividade antifúngica contra isolados clínicos de *C. albicans* mostrou eficiente atividade da FEAEF de *E. pyriformis* sobre os isolados testados, com valores de CIMs entre 3,9 e 62,5 µg/mL. A CIM_{50} foi estabelecida em 3,9 µg/mL e a CIM_{90} em 15,62 µg/mL, sendo definidas como concentrações mínimas que inibem o crescimento de 50% e 90% das amostras testadas. A proximidade nos

valores da CIM_{50} e CIM_{90} representa elevada atividade da FEAEF contra os microrganismos testados.

A CIM da FEAEF contra a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 foi também determinada pela técnica da macrodiluição e o valor encontrado foi confirmado em 1,95 µg/mL.

A CFM foi determinada em 62,5 µg/mL, ou seja, caracterizada em 32 vezes a CIM. Os valores da CFM correlacionam melhor com o desfecho clínico que a CIM, permanecendo como uma das principais investigações nos testes de susceptibilidade a antifúngicos. Porém, os parâmetros utilizados para a avaliação da CFM não estão totalmente padronizados (ARIKAN, 2007), vários estudos mostram diferentes parâmetros para sua determinação (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

4.7.2 Atividade antifúngica para fungos filamentosos

Os resultados obtidos na atividade antifúngica para fungos filamentosos estão representados nas Tabelas 20 e 21. Na análise da atividade antifúngica os resultados sugerem bom potencial inibitório observado no extrato cetônico bruto de caule e nas frações cetônica e etanólica acetato de etila de caule e folhas de *E. pyriformis* contra *Trychophyton mentagrophytes* ATCC 9533, com CIMs oscilando entre 7,81 e 62,5 µg/mL. Moderado potencial inibitório foi encontrado para o extrato etanólico bruto do caule, para as frações cetônicas hexano e clorofórmio, para o precipitado e para a fração etanólica residual com valores de CIMs entre 250 e 500 µg/mL. A fração hidroalcoólica remanescente do fruto (casca) mostrou moderado potencial inibitório contra *T. mentagrophytes* ATCC 9533 com CIM de 125 µg/mL.

As frações da extração cetônica de caule acetato de etila e hidroalcoólica, a fração etanólica acetato de etila de caule e a fração etanólica acetato de etila de folhas mostraram CIM de 500 µg/mL.

TABELA 20 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO CAULE, FOLHAS E FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS.

Microrganismos	EXTRAÇÃO CETÔNICA					EXTRAÇÃO ETANÓLICA				
	EB	**FH**	**FC**	**FAE**	**FR**	**PR**	**EB**	**FC**	**FAE**	**FR**
	Caule (µg/mL)									
Fungos Filamentosos										
Aspergillus flavus ATCC 204304	1000	>1000	>1000	500	500	1000	>1000	>1000	500	>1000
Trychophyton mentagrophytes ATCC 9533	62,5	500	500	7,81	62,5	250	500	>1000	15,62	500
	Folhas (µg/mL)									
Fungos Filamentosos										
Aspergillus flavus ATCC 204304	>1000	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	>1000
Trychophyton mentagrophytes ATCC 9533	250	>1000	>1000	7,81	62,5	500	500	500	15,62	>1000
	Fruto (Casca) (µg/mL)									
Fungos Filamentosos										
Aspergillus flavus ATCC 204304	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Trychophyton mentagrophytes ATCC 9533	250	>1000	>1000	>1000	125	>1000	>1000	1000	>1000	1000

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: (EB) Extrato Bruto, (FH) Fração Hexano, (FC) Fração Clorofórmio, (FAE) Fração Acetato de Etila, (FR) Fração Hidroalcoólica remanescente, (PR) Precipitado.

Alguns estudos têm demonstrado que outras espécies de *Eugenia* apresentam atividade antifúngica contra dermatófitos, entre elas as espécies *E. umbellifora* e *E. uniflora.* Machado e colaboradores (2009) estudaram as frações acetato de etila de folhas de *E. umbelliflora* mostrando CIM de 600 µg/mL contra *T. mentagrophytes*, CIM de 500 µg/mL contra *Trychophyton rubrum* e CIM de 1000 µg/mL contra *Epidermophyton flocosum*. Biasi-Garbin et al. (2016) estudaram os extratos brutos obtidos de *E. uniflora* contra cepas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* encontrando valores de CIMs de 125 µg/mL, para ambas as espécies de fungos filamentosos.

Na atividade antifúngica das amostras de *E. pyriformis* contra *A. flavus*, foi encontrado um moderado potencial inibitório para as frações cetônicas acetato de etila e hidroalcoólica de caule, a fração etanólica acetato de etila de caule e a fração etanólica acetato de etila de folhas com CIMs de 500 µg/mL. Para as demais frações foram encontrados valores de CIMs de 1000 µg/mL e superior a 1000 µg/mL.

Extratos brutos de *E. umbelliflora* foram avaliados contra cepas de *A. niger*, *A. fumigatus* e *A. flavus* com valores de CIMs acima de 1000 µg/mL (MACHADO et al., 2009). Extratos obtidos de folhas de *E. uniflora* foram testados contra *A. fumigatus* encontrando valores de CIMs acima de 500 µg/mL (CORREA-ROYERO et al., 2010).

A atividade antifúngica para o óleo essencial de *E. pyriformis* (Tabela 21) contra os fungos filamentosos mostrou CIMs contra *A. flavus* e *T. mentagrophytes* acima de 1000 µg/mL e de 1000 *µg/mL*, respectivamente. Para os isolados α e β-amirinas (Tabela 21) os resultados encontrados foram CIMs acima de 1000 µg/mL para as cepas testadas. Para o ácido gálico comercial (Sigma/Aldrich, Darmstadt, Germany) (Tabela 21) foram encontrados valores de CIMs de 500 µg/mL conta *A. flavus* e 125 µg/mL contra *T. mentagrophytes.* As CIMs encontradas para o ácido gálico podem justificar os resultados encontrados para as amostras de *E. pyriformis*.

TABELA 21 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E ALGUNS COMPOSTOS ISOLADOS DE *E. pyriformis* CAMBESS. CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS.

Microrganismos	Óleo essencial (µg/mL)	Ácido Gálico (Sigma/Aldrich, Darmstadt, Germany) (µg/mL)	β-Amirina (Isolado) (µg/mL)	α-Amirina (Isolado) (µg/mL)
Fungos Filamentosos				
Aspergillus flavus ATCC 204304	>1000	500	>1000	>1000
Trychophyton mentagrophytes ATCC 9533	1000	125	>1000	>1000

FONTE: O autor (2017).

Óleos essenciais de *E. axillaris* foram testados contra cepas de *A. niger* com valores de CIM de 625 µg/mL (CORREA-ROYERO et al., 2010).

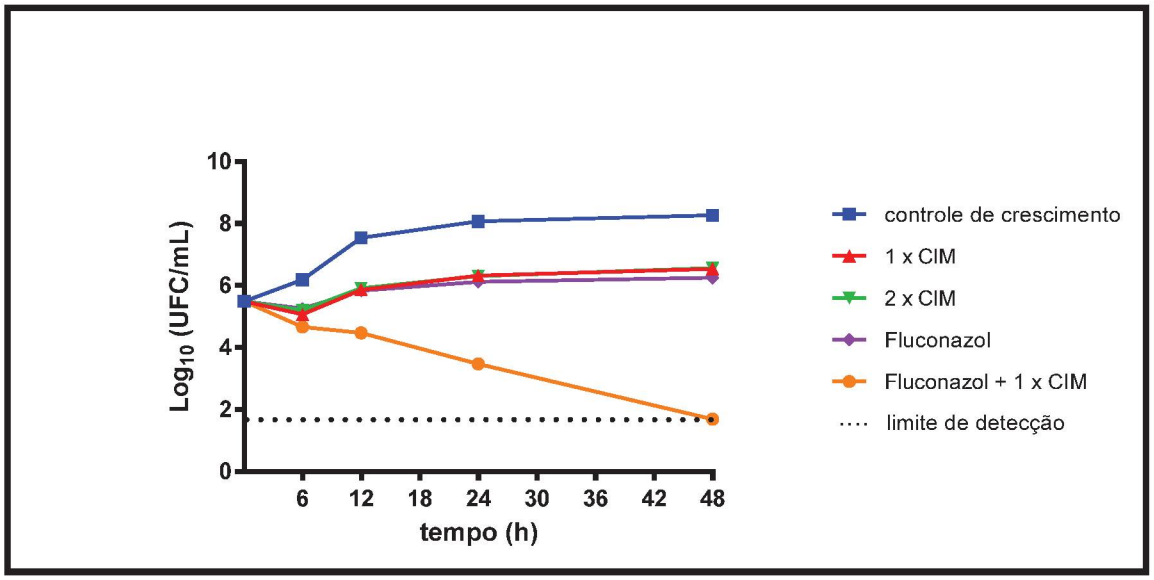
4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO

Estudos de sinergismo entre produtos naturais e alguns antibióticos ou antifúngicos tem sido descrito nos últimos anos por vários pesquisadores (MANDALARI et al., 2010; PUHL et al., 2011; FERNANDES et al., 2012).

A metodologia do *Time Kill* foi realizada com a FEAEF e o fluconazol contra a cepa de *C. albicans* ATCC 90028. Para a realização da metodologia foram determinados os valores da CIM da FEAEF (1,95 µg/mL) e para o fluconazol (1,00 µg/mL) contra *C. albicans.*

Ao analisar o gráfico (Figura 22) obtido através da técnica de *Time Kill*, foi possível observar que a FEAEF apresentou atividade fungistática, assim como o Fluconazol. Ocorreu uma redução do crescimento de *C. albicans* $< 3 \log_{10}$ ou menor que 99,9% em relação ao inóculo inicial, em todos tempos testados e indiferente das concentrações utilizadas. Porém, a FEAEF foi menos ativa contra a linhagem referência de *C. albicans* ATCC 90028 que o Fluconazol.

FIGURA 22 - GRÁFICO DA TÉCNICA *TIME KILL.*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: UFC, Unidade formadora de colônias; CIM, Concentração Inibitória Mínima

A partir das 24 horas, a FEAEF em associação com o Fluconazol (Fluconazol + 1 x CIM) apresentou potencial sinérgico, caracterizado pela redução do crescimento fúngico de ≥ 2 log_{10} da contagem em UFC/mL da combinação de drogas (Fluconazol + 1 x CIM) quando comparada ao Fluconazol, droga mais ativa avaliada isoladamente. Também foi observada atividade fungicida, no período final de incubação (48 horas), onde houve uma redução do crescimento fúngico ≥ 3 log_{10} (≥99,9%) da contagem do inóculo inicial em UFC/mL.

O resultado da análise de sinergismo pela técnica *Checkerboard* da FEAEF de *E. pyriformis* contra *C. albicans* ATCC 90028 estão descritas na Tabela 22. O estudo indicou que houve interação de aditividade na associação de Fluconazol com FEAEF frente ao microrganismo testado, com valor de FICI de 1,49.

TABELA 22 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FIC) E ÍNDICES FIC NA ANÁLISE DE SINERGISMO PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD.*

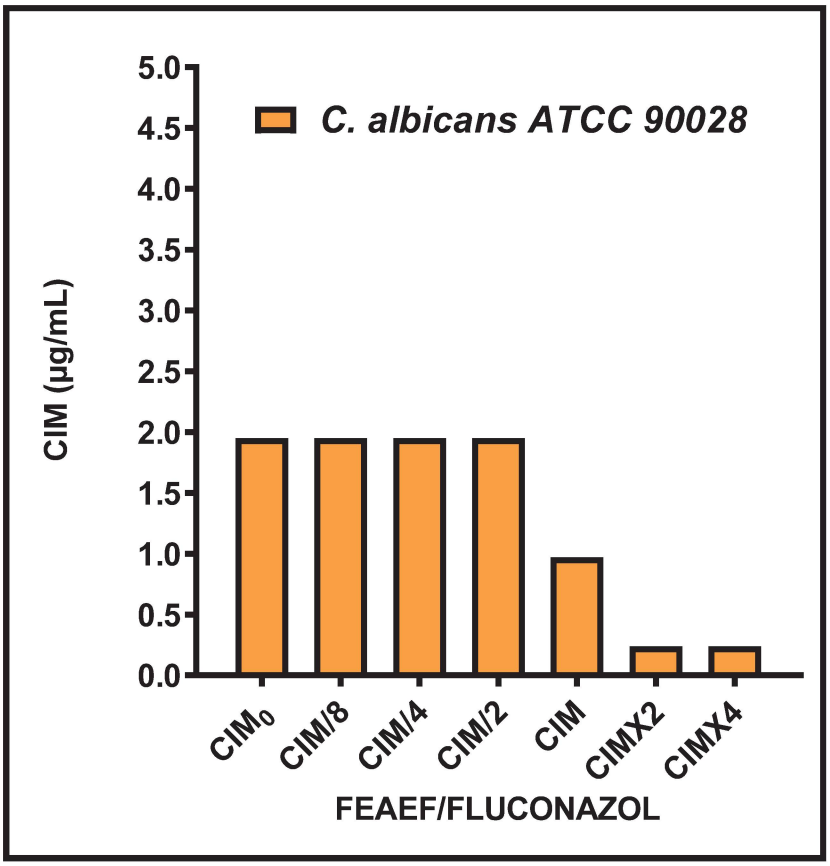
Microrganismo	*C. albicans* ATCC 90028			
	CIM_0 (µg/mL)	**CIM_C (µg/mL)**	**FIC**	**FICI**
FEAEF	1,95	0,97	0,49	1,49
Fluconazol	1,00	1,00	1,00	

FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: FEAEF, Fração etanólica acetato de etila de folhas de *E. pyriformis*; CIM_0, CIM de amostra independente; CIM_C, CIM mais efetiva da amostra combinada.
FIC DE FEAEF = CIM de FEAEF em combinação com Fluconazol / CIM de FEAEF independente
FIC de Fluconazol = CIM de Fluconazol em combinação com FEAEF / CIM de Fluconazol independente.
FICI = FIC de FEAEF + FIC de Fluconazol.

A Figura 23 expressa os resultados obtidos pelas associações da FEAEF e Fluconazol frente a *C. albicans*. Os valores para CIM/8, CIM/4 e CIM/2 foram iguais a CIM_0 com valor de 1,95 µg/mL, para a associação CIM foi de 0,97 µg/mL e para as demais associações foram de 0,24 µg/mL.

FIGURA 23 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* COM FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans*.

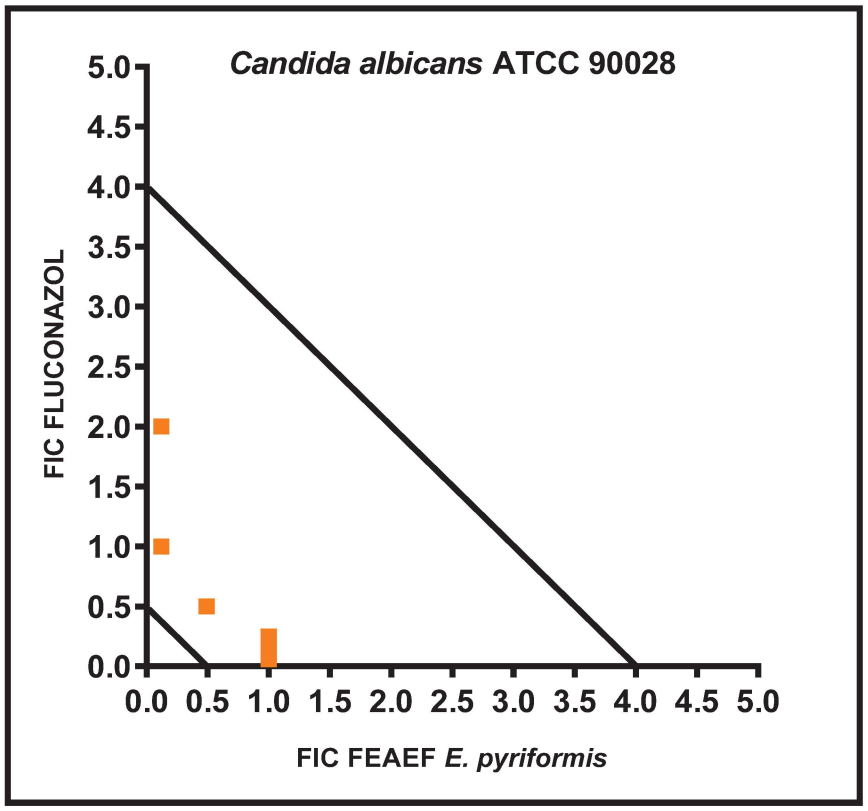


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: CIM, Concentração inibitória mínima;
FEAEF, Fração etanólica acetato de etila de folhas.

A maneira gráfica para representar os resultados de estudos de associação é através da utilização de um isobolograma introduzido por Loewe e Muischnek (1926). Os isobolograma foram construídos calculando-se o FIC das diversas associações estudadas, através da relação entre a CIM de cada concentração e a CIM independente de cada amostra. Os valores de FIC foram plotados, através do programa GraphPadPrism, onde foram traçadas linhas permitindo a visualização das interações encontradas. O isobolograma da associação entre a FEAEF e fluconazol contra *C. albicans* ATCC 90028 demonstrou aditividade para todas as associações analisadas com valores de FIC entre 0,5 e 4,0 (Figura 24).

FIGURA 24 - ISOBOLOGRAMA DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL CONTRA *C. albicans*.



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0);
FIC, concentração inibitória fracionada;
FEAEF, fração etanólica acetato de etila de folhas.

Estudos de potencial sinérgico realizados por Souza e colaboradores (2014) avaliaram a associação dos extratos brutos etanólico e cetônico e, as frações acetato de etila e hidroalcoólica de folhas de *E. pyriformis* com Fluconazol contra *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* demonstrando interações sinérgicas com valores de FICI entre 0,24 e 0,37.

O estudo de potencial sinérgico pela técnica *Checkerboard* revelou que a FEAEF de *E. pyriformis* não mostrou interferência sobre a atividade antifúngica do Fluconazol, sendo observados efeitos de aditividade sobre o microrganismo testado. Vale ressaltar, que a CIM da FEAEF e do Fluconazol apresentam valores muito próximos, podendo desta forma, não ter influenciado de maneira significativa os resultados desta associação. Ao contrário do que foi observado pela técnica *Time kill*, onde apresentou potencial sinérgico, caracterizado pela redução de ≥ 2 $\log_{10}$ da

contagem em UFC/mL da combinação de Fluconazol + 1 x CIM de FEAEF quando comparada ao Fluconazol.

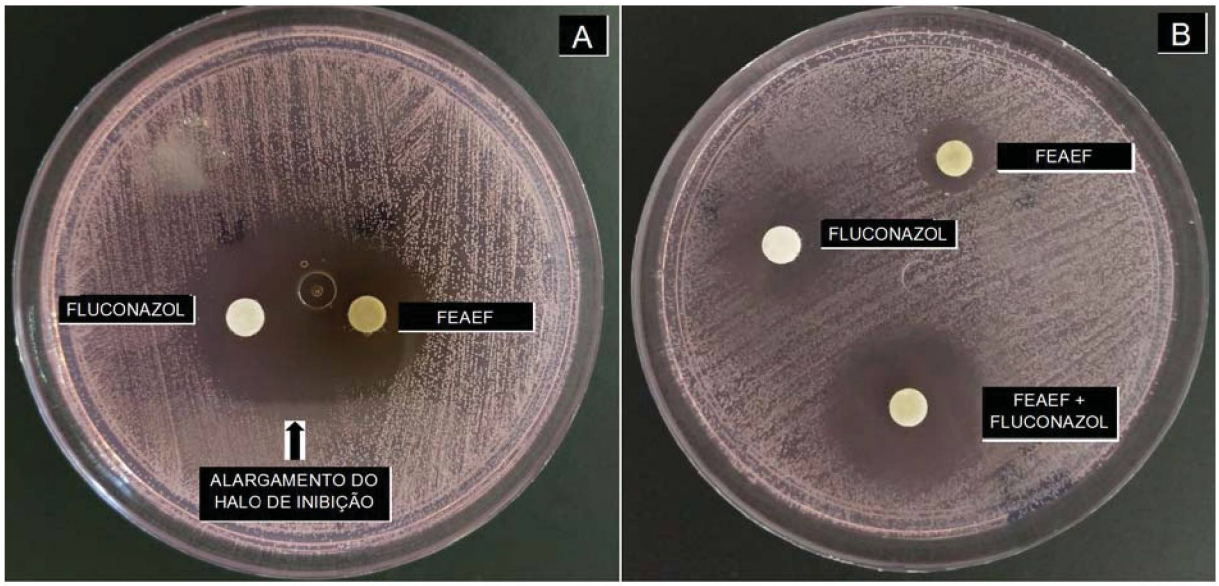
Poucos estudos de atividade sinérgica em derivados de produtos naturais têm sido realizados. Endo e colaboradores (2010) estudaram através das metodologias *Checkerboard* e *Time Kill*, o sinergismo de extratos e compostos isolados de *Punica granatum* (Punicaceae) em associação com fluconazol contra *C. albicans*. A técnica *Time Kill* é utilizada na prática clínica em estudos para verificar a eficácia de agentes antifúngicos com o uso de terapia combinada.

Na técnica de disco aproximação, outra metodologia para determinar a interação entre dois fármacos, foi evidenciado um aumento no halo de inibição entre os discos da FEAEF e do Fluconazol, demonstrando a presença do efeito sinérgico (Figura 25A).

Através da técnica de discos combinados foram determinados os diâmetros dos halos de inibição para a FEAEF, Fluconazol e a FEAEF em associação com o Fluconazol em 13 mm, 15 mm e 25 mm, respectivamente (Figura 25B), caracterizando sinergismo.

Apesar de serem técnicas mais simples quando comparadas ao *Time Kill* e *Checkerboard* foi confirmado o efeito sinérgico através das técnicas de discos combinados e disco aproximação, pois a associação da FEAEF avaliada simultaneamente com o Fluconazol proporcionou maior efeito do que quando testados separadamente. Não foram encontrados outros estudos de atividade sinérgica de produtos naturais desenvolvidos pelas técnicas de disco aproximação e discos combinados.

FIGURA 25 – LEITURA DOS RESULTADOS DA TÉCNICA DE DISCO APROXIMAÇÃO E DOS DISCOS COMBINADOS.



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A, Técnica do disco aproximação;
B, Técnica dos discos combinados.

4.9 ENSAIOS DE CITOXICIDADE

4.9.1 Frente à *Artemia salina* Leach

Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 23.

TABELA 23 – RESULTADO DO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE *A. salina* LEACH DAS DIFERENTES AMOSTRAS OBTIDAS DE *E. pyriformis.*

AMOSTRAS	CL_{50} (µg/mL)			IC 95% (µg/mL)		
Extração Cetônica	**Caule**	**Folhas**	**Fruto (Casca)**	**Caule**	**Folhas**	**Fruto (Casca)**
Extrato Bruto	179,9	>1000	862	136,37-237,51	-	-
Fr. Hexano	323,28	171,0	>1000	251,65-415,29	25,86-1130,92	>1000
Fr. Clorofórmio	47,51	>1000	342,9	28,47-79,28	-	-
Fr. Acetato de Etila	204,60	199,53	314,4	136,43-306,81	142,54-279,29	282,2-348,6
Fr. Hidroalcoólica	416,04	416,04	>1000	379,63-455,95	379,63-455,95	>1000
Precipitado	199,53	146,78	>1000	142,54-279,29	98,75-218,17	>1000
Extração Etanólica	**Caule**	**Folhas**	**Fruto (Casca)**	**Caule**	**Folhas**	**Fruto (Casca)**
Extrato Bruto	938,93	745,46	>1000	686,93-808,99	686,93-808,99	>1000
Fr. Clorofórmio	13,94	292,86	>1000	251,84-340,58	251,84-340,58	>1000
Fr. Acetato de Etila	215,44	731,79	905,3	677,34-790,63	677,34-790,63	634->1000
Fr. Hidroalcoólica	583,52	184,78	>1000	129,49-263,70	129,49-263,70	>1000
Óleo essencial		125,64			102,28-154,32	

Controle positivo SDS: CL_{50} = 16,27 µg/mL

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Fração (Fr.), Concentração Letal 50% (CL_{50}), Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%).

O ensaio frente a *A. salina* é usado para avaliar a toxicidade aguda e é considerado essencial como ensaio preliminar no estudo de compostos com atividades biológicas potenciais (KALEGARI et al., 2011). Este método se correlaciona com os resultado da citotoxicidade em células 9Kb e 9PS (leucemia), confirmando que é uma ferramenta útil para a determinação preliminar de atividade antitumoral (MCLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998; MEYER et al., 1982).

O óleo essencial de *E. pyriformis* apresentou toxicidade positiva neste ensaio, demonstrando CL_{50} de 125,64 µg/mL. O potencial tóxico de óleos essenciais de espécies de plantas para *A. salina*, está bem documentado na literatura. Estudos

com óleo essencial de *Eugenia uniflora* mostraram CL_{50} de 253,43 µg/mL (LEITE et al., 2009).

De acordo com Meyer et al. (1982), pode-se considerar tóxicas as amostras que apresentarem uma CL_{50} inferior a 1000 µg/mL. Porém, Amarante e colaboradores (2011) descreveram uma relação entre o grau de toxicidade e a CL_{50}, de forma mais detalhada, considerando altamente tóxicas amostras com CL_{50} menores que 100 µg/mL, moderadamente tóxicas CL_{50} entre 100 e 500 µg/mL e com baixa toxicidade CL_{50} acima de 500 µg/mL.

Segundo Petrobrás (1996), a CL_{50} do dodecilsulfato de sódio (SDS) em *A. salina* deve estar entre 13,1 e 30,9 mg/mL, que foi confimado nos resultados obtidos neste ensaio (CL_{50} = 16,27 µg/mL).

A fração clorofórmio de caule apresentou CL_{50} de 47,51 e 13,94 µg/mL nas extrações cetônica e etanólica, respectivamente, sendo classificadas como altamente tóxicas. As frações acetato de etila cetônica e etanólica apresentaram de moderada a baixa toxicidade frente a *A. salina* com valores de CL_{50} oscilando entre 199,53 e 905,3 µg/mL.

Várias espécies de *Eugenia* foram avaliadas frente a *A. salina.* O extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* foi avaliado e mostrou valores de CL_{50} acima de 250 µg/mL, com intervalo de confiança de 95% (194,2-433,7) (ARCANJO et al., 2012; BOUZADA et al., 2009). Amostras de extrato etanólico de *E. brasiliensis* mostraram uma CL_{50} de 807,2 µg/mL, a fração diclorometano apresentou uma CL_{50} de 816,6 µg/mL e a fração acetato de etila apresentou uma CL_{50} de 788,9 µg/mL, com intervalo de confiança de 95% (738,6-1060,2) (MAGINA et al., 2012).

4.9.2 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica das amostras de *E. pyriformis* foram determinadas através de dois métodos, conhecidos por hemólise em tubo e hemólise em placas de ágar sangue.

4.9.2.1 Hemólise em tubo

Os resultados obtidos para as amostras de óleo essencial, extratos e frações de caule, folhas e fruto (casca) de *E. pyriformis* estão demonstrados nas Tabelas 24 a 27 e nos gráficos de 1 a 7.

Na atividade hemolítica observou-se que os extratos brutos e as frações de caule e folhas de *E. pyriformis* possuem uma resposta dose dependente. Concentrações baixas promovem menor hemólise e na concentração de 1000 µg/mL demonstram resultados mais expressivos. Para os extratos brutos e frações obtidos pela extração cetônica de caule e de folhas, as maiores porcentagens de hemólise em relação ao controle foram encontradas na fração hexano do caule nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, com 81,89% e 92,12%, respectivamente. As frações hexânicas, devido à baixa polaridade, podem interagir com a membrana lipídica dos eritrócitos e ocasionar hemólise. Os extratos e demais frações apresentaram concentrações de hemólise próximas e abaixo de 50%.

Para os extratos e frações da extração etanólica, a fração clorofórmio demonstrou a maior porcentagem de hemólise nestas amostras. A fração clorofórmio de caule nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL demonstrou 59,15% e 71,16% de hemólise, respectivamente. Para a fração clorofórmio da folha foi observado na concentração de 500 µg/mL uma porcentagem de 42,85% e para 1000 µg/mL um resultado de 91,60%. O extrato bruto etanólico da folha apresentou na concentração de 1000 µg/mL uma porcentagem de 57,58%. As demais amostras apresentaram resultados abaixo de 50% de hemólise.

Os extratos brutos e frações do fruto (casca) de *E. pyriformis* não apresentam resposta dose dependente. As maiores concentrações de hemólise foram encontradas para a fração cetônica hexano nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, com 50,55 e 48,60%, respectivamente. A fração etanólica clorofórmio demonstrou na concentração de 1000 µg/mL uma porcentagem de 53,88%. O extrato bruto etanólico na concentração de 1000 µg/mL (40,26%) e o precipitado na concentração de 500 µg/mL (45,84%) foram as amostras que demonstraram maior teor de hemólise, as demais amostras mostraram valores abaixo de 35% de hemólise.

Os precipitados obtidos da fração clorofórmio e o óleo essencial apresentaram resultados inferiores a 25% de hemólise. A maior porcentagem de hemólise em comparação com o controle ocorreu na fração cetônica hexano de caule nas concentrações de 1000 µg/mL e 500 µg/mL, seguido pela fração clorofórmio de folha na concentração de 1000 µg/mL. Demonstrando que estas frações apresentam alta atividade hemolítica.

A análise estatística pelo teste de Duncan foi realizada para cada tipo de extração e materiais (caule, folhas, casca do fruto e óleo essencial). Para todos os grupos testados as amostras apresentaram uma grande variação estatística nas concentrações testadas para os extratos, frações e óleo essencial em relação ao controle (água) de 100%.

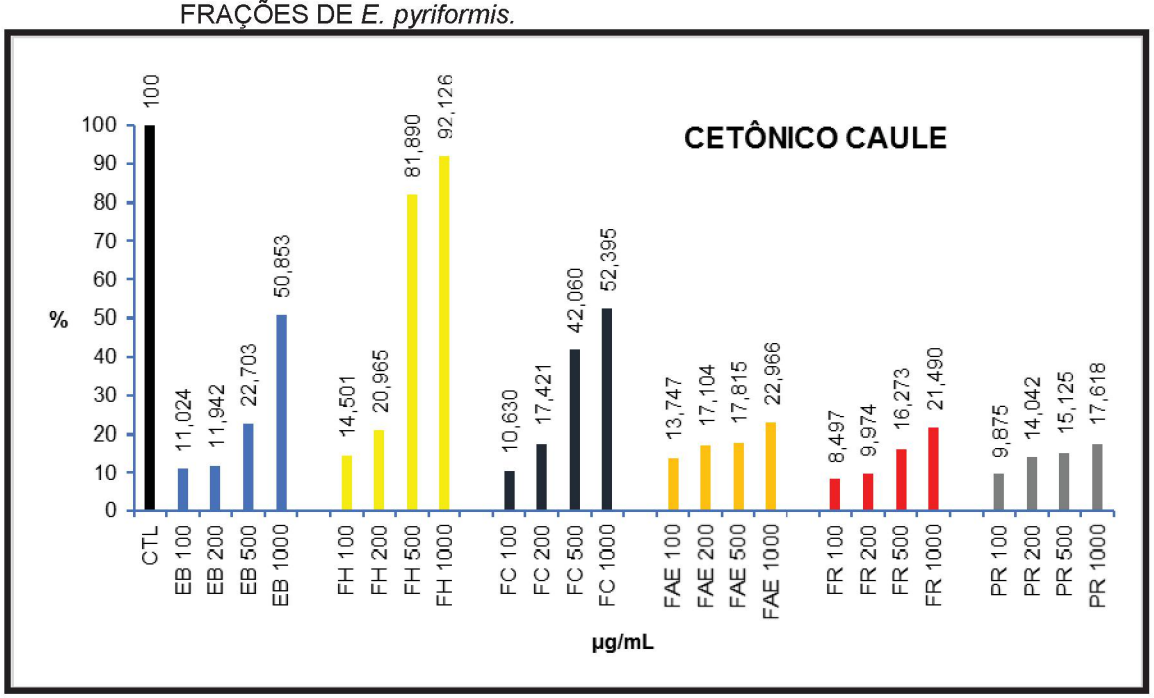
TABELA 24 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE CAULE DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO.

Amostra	Concentração da amostra (µg/ml)	% Hemólise	Classificação do Teste de Duncan												
Água	-	100	a												
EXTRAÇÃO CETÔNICA															
Extrato Bruto	100	11,024										j	k	l	m
	200	11,942										j	k	l	m
	500	22,703						f							
	1000	50,853				d									
Fração Hexano	100	14,501											k	l	m
	200	20,965						f	g	h					
	500	81,890			c										
	1000	92,126		b											
Fração Clorofórmio	100	10,630										j	k	l	
	200	17,421								h	i				
	500	42,060					e								
	1000	52,395				d									
Fração Acetato de Etila	100	13,747									i	j	k	l	
	200	17,104								h	i				
	500	17,815							g	h	i				
	1000	22,966						f							
Fração Hidroalcoólica	100	8,497													m
	200	9,974												l	m
	500	16,273									i				
	1000	21,490						f	g						
Precipitado	100	9,875												l	m
	200	14,042									i	J			
	500	15,125									i	J			
	1000	17,618							g	h	i				
EXTRAÇÃO ETANÓLICA															
Extrato Bruto	100	8,727										j			
	200	10,827									i				
	500	14,042								h					
	1000	22,736						f							
Fração Clorofórmio	100	9,514									i	j			
	200	13,714								h					
	500	59,154		b											
	1000	71,161			c										
Fração Acetato de Etila	100	10,039									i				
	200	18,570							g						
	500	25,853					e								
	1000	30,085				d									
Fração Hidroalcoólica	100	10,171									i				
	200	10,433									i				
	500	14,304								h					
	1000	17,881							g						

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Análise estatística pelo teste de Duncan foi avaliada para cada tipo de extração, letras iguais correspondem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente.

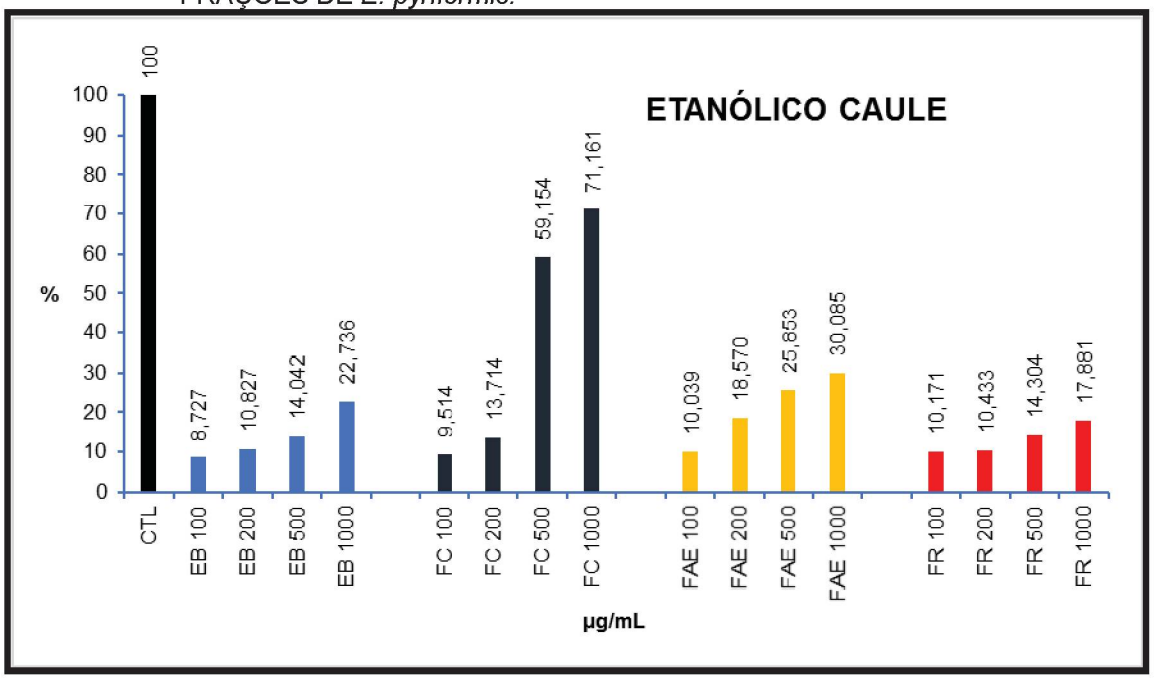
GRÁFICO 1 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO DE CAULE E FRAÇÕES DE *E. pyriformis.*



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Controle (CTL), Extrato Bruto Cetônico (EB), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Hidroalcoólica Remanescente (FR) e Precipitado (PR).

GRÁFICO 2 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE CAULE E FRAÇÕES DE *E. pyriformis.*



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Controle (CTL), Extrato Bruto Etanólico (EB), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Hidroalcoólica Remanescente (FR).

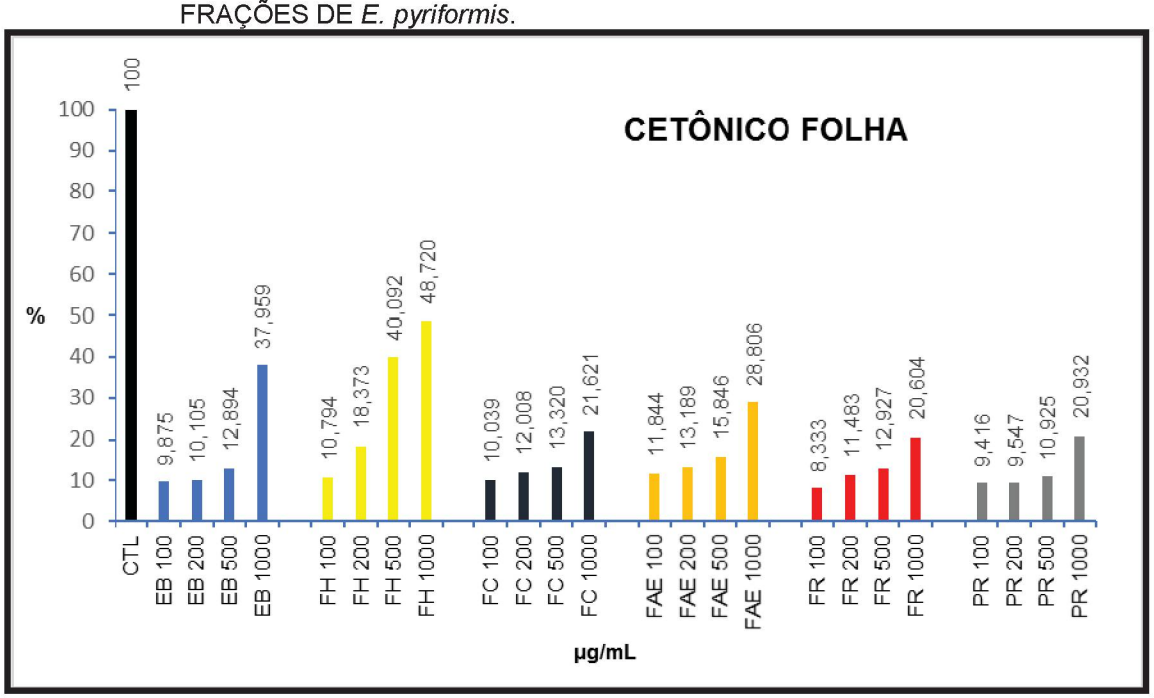
TABELA 25 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHA DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO

Amostra	Concentração da amostra (µg/ml)	% Hemólise	Classificação do Teste de Duncan												
Água	-	100	a												
EXTRAÇÃO CETÔNICA															
Extrato Bruto	100	9,875								h	i	j			
	200	10,105								h	i	j			
	500	12,894							g	h	i				
	1000	37,959			c										
Fração Hexano	100	10,794								h	i	j			
	200	18,373					e	f							
	500	40,092			c										
	1000	48,720		b											
Fração Clorofórmio	100	10,039								h	i	j			
	200	12,008								h	i				
	500	13,320							g	h					
	1000	21,621					e								
Fração Acetato de Etila	100	11,844								h	i	j			
	200	13,189							g	h					
	500	15,846						f	g						
	1000	28,806				d									
Fração Hidroalcoólica	100	8,333										j			
	200	11,483								h	i	j			
	500	12,927							g	h	i				
	1000	20,604					e								
Precipitado	100	9,416									i	J			
	200	9,547									i	j			
	500	10,925								h	i	j			
	1000	20,932					e								
EXTRAÇÃO ETANÓLICA															
Extrato Bruto	100	9,810											k		
	200	13,976									i				
	500	19,226							g						
	1000	57,579			c										
Fração Clorofórmio	100	13,615									i				
	200	18,045							g						
	500	42,848				d									
	1000	91,601		b											
Fração Acetato de Etila	100	11,713										j			
	200	15,781								h					
	500	24,180						f							
	1000	28,084					e								
Fração Hidroalcoólica	100	8,783											k		
	200	9,022											k		
	500	13,648									i				
	1000	16,240								h					

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Análise estatística pelo teste de Duncan foi avaliada para cada tipo de extração, letras iguais correspondem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente.

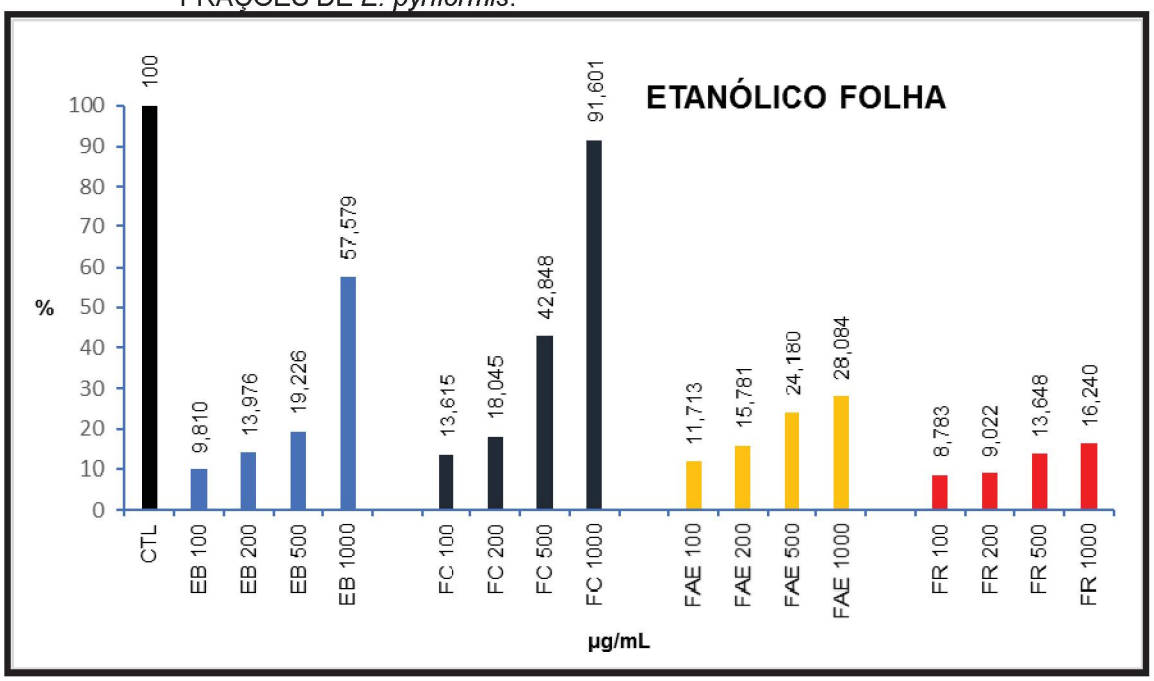
GRÁFICO 3 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO DE FOLHA E FRAÇÕES DE *E. pyriformis*.



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Controle (CTL), Extrato Bruto Cetônico (EB), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Hidroalcoólica Remanescente (FR) e Precipitado (PR).

GRÁFICO 4 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE FOLHA E FRAÇÕES DE *E. pyriformis*.



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Controle (CTL), Extrato Bruto Etanólico (EBE), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Hidroalcoólica Remanescente (FR).

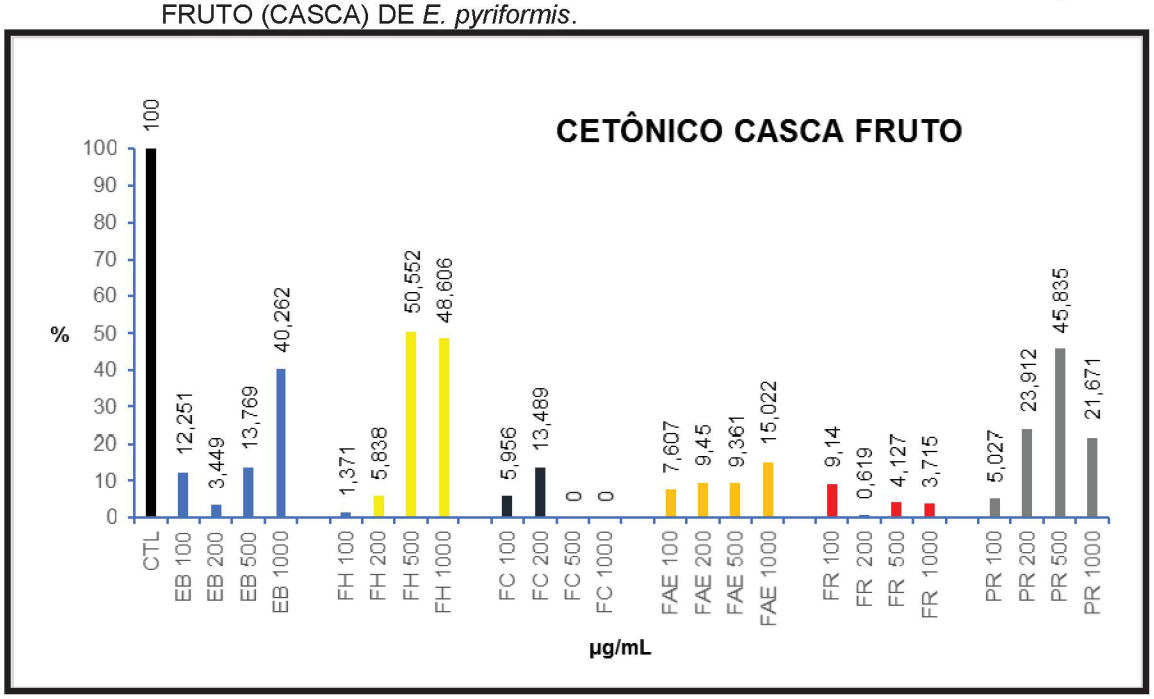
TABELA 26 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DO FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO

Amostra	Concentração da amostra (µg/mL)	% Hemólise	Classificação do Teste de Duncan												
Água	-	100	a												
EXTRAÇÃO CETÔNICA															
Extrato Bruto	100	12,251					e	f	g						
	200	3,449								h	i	j			
	500	13,769					e	f							
	1000	40,262			c										
Fração Hexano	100	1,371									i	j	k		
	200	5,838							g	h	i	j			
	500	50,552		b											
	1000	48,606		b											
Fração Clorofórmio	100	5,956							g	h	i	j			
	200	13,489					e	f							
	500	0												l	
	1000	0												l	
Fração Acetato de Etila	100	7,607						f	g	h	i				
	200	9,450					e	f	g	h					
	500	9,361					e	f	g	h					
	1000	15,022					e								
Fração Hidroalcoólica	100	9,140					e	f	g	h					
	200	0,619										j	k		
	500	4,127								h	i	j			
	1000	3,715								h	i	j			
Precipitado	100	5,027								h	i	j			
	200	23,912				d									
	500	45,835		b	c										
	1000	21,671				d									
EXTRAÇÃO ETANÓLICA															
Extrato Bruto	100	18,605					e	f							
	200	0,574								h					
	500	7,695							g	h					
	1000	16,511					e	f	g						
Fração Clorofórmio	100	38,965			c										
	200	32,773			c	d									
	500	26,345				d	e								
	1000	53,884		b											
Fração Acetato de Etila	100	6,044							g	h					
	200	9,464						f	g	h					
	500	0								h					
	1000	0								h					
Fração Hidroalcoólica	100	16,600					e	f	g						
	200	7,710							g	h					
	500	3,361								h					
	1000	0,265								h					

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Análise estatística pelo teste de Duncan foi avaliada para cada tipo de extração, letras iguais correspondem ao mesmo grupo e não diferem estatisticamente.

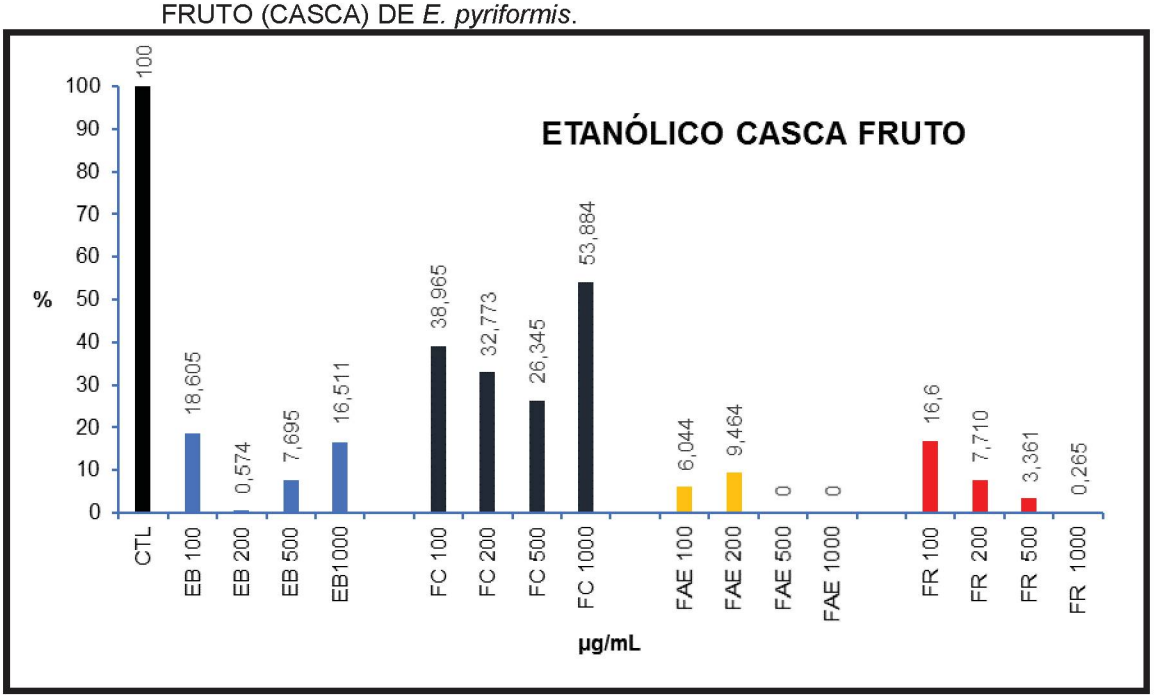
GRÁFICO 5 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO CETÔNICO E FRAÇÕES DO FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis*.



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Controle (CTL), Extrato Bruto Cetônico (EB), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Hidroalcoólica Remanescente (FR) e Precipitado (PR).

GRÁFICO 6 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DO FRUTO (CASCA) DE *E. pyriformis*.



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Controle (CTL), Extrato Bruto Cetônico (EBA), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Hidroalcoólica Remanescente (FR).

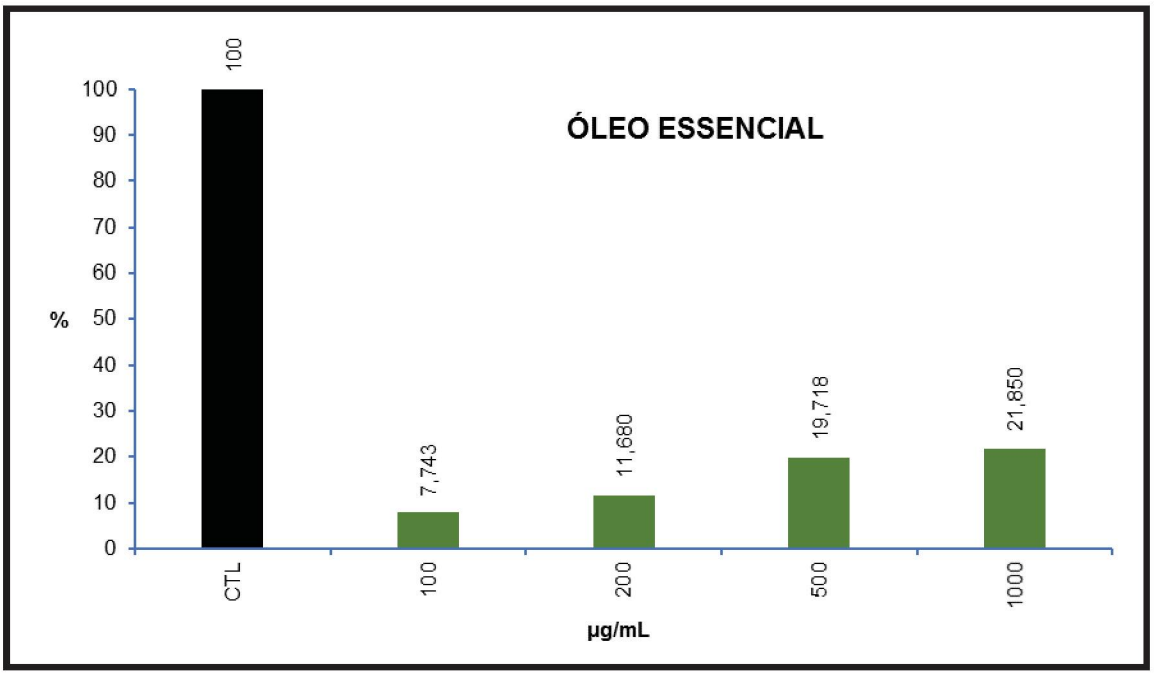
TABELA 27 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. pyriformis* UTILIZANDO SANGUE DE CARNEIRO.

Amostra	Concentração da amostra (µg/ml)	% Hemólise	Classificação do Teste de Duncan
Água	-	100	a
EXTRAÇÃO CETÔNICA			
Óleo Essencial	100	7,743	c
	200	11,680	c
	500	19,718	b
	1000	21,850	b

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Teste de Duncan, amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 7 - ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. pyriformis*.



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Controle (CTL).

Conforme os resultados apresentados para o potencial hemolítico, pode-se perceber que todas as amostras se apresentaram ligeiramente hemolíticas. As frações hexano e clorofórmio, frações estas mais lipofílicas, foram consideravelmente mais hemolíticas que as demais. Este fato pode ser justificado, uma vez que as membranas celulares são bicamadas lipídicas e podem serem dissolvidas por outros componentes lipídicos. As frações acetato de etila e

hidroalcoólica remanescente apresentaram porcentagem de hemólise abaixo de 30% para todas as concentrações testadas.

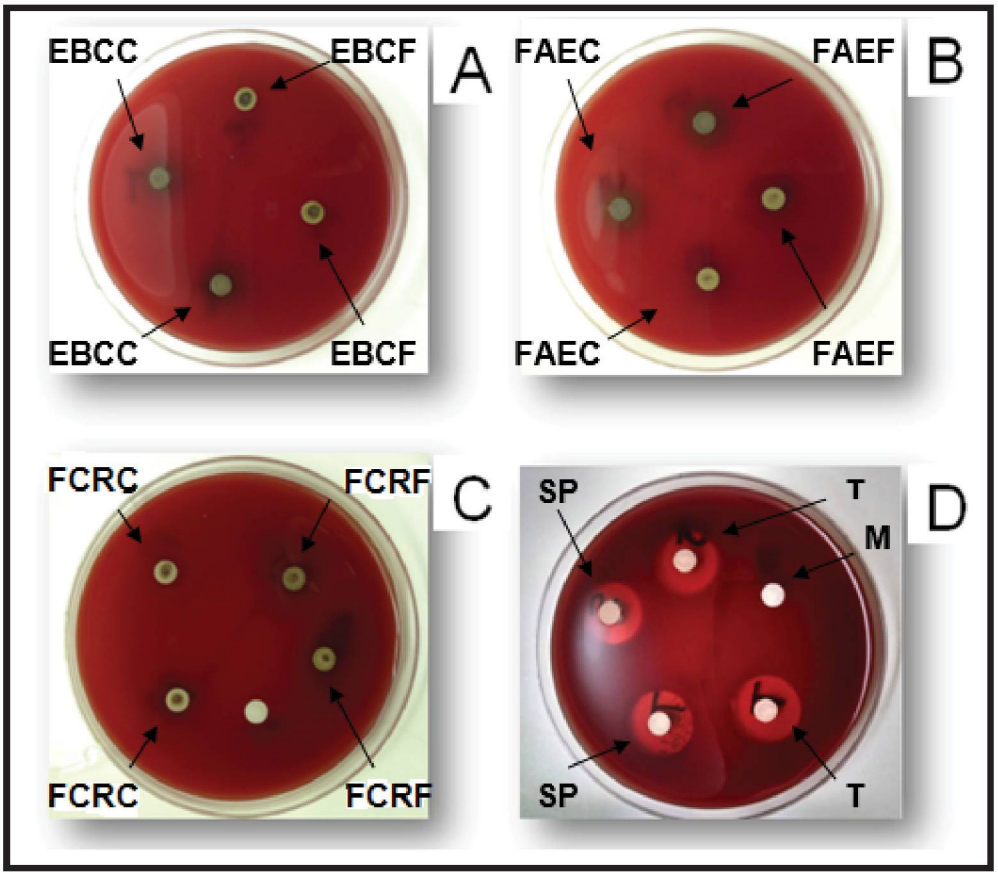
Os métodos para determinação da atividade hemolítica *in vitro* consistem na verificação de potenciais danos causados pelas substâncias presentes nos extratos, frações e óleo essencial às membranas dos eritrócitos, que ao serem submetidos ao teste, promovem a lise da membrana e liberação de hemoglobina (SOBRINHO et al., 2016). Vários relatos na literatura indicaram a presença de alta quantidade de saponinas esteroidais nas plantas. A propriedade mais característica das saponinas é a sua capacidade de causar hemólise. As saponinas quando presentes nas amostras e, adicionadas a uma suspensão de sangue, produzem alterações nas membranas dos eritrócitos, causando difusão da hemoglobina no meio circundante (KAROU et al., 2011).

4.9.2.2 Hemólise por difusão em placa de Ágar Sangue.

As amostras testadas não apresentaram halos de hemólise ao redor dos discos impregnados com amostras na concentração de 1000 µg/mL, comparadas aos controles positivo Triton X-100 e Saponina, que apresentaram halos de hemólise de 18 mm e 17 mm, respectivamente. O controle do solvente e do disco inerte não apresentaram halos de hemólise.

Os resultados obtidos no teste de hemólise por difusão em placa de Ágar Sangue podem ser observados na Figura 26.

FIGURA 26 - TESTE DE HEMÓLISE POR DIFUSÃO EM PLACA DE ÁGAR SANGUE



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: (A) EBCC, Extrato Bruto Cetônico de caule e EBCF, Extrato Bruto Cetônico de folha; (B) FAEC, Fração Cetônica Acetato de Etila de caule e FAEF, Fração Cetônica Acetato de Etila de folha; (C) FCRC, Fração Cetônica Hidroalcoólica Remanescente de caule e FCRF, Fração Cetônica Hidroalcoólica Remanescente de folha e, Branco; (D) SP, Controle Positivo de Saponina; T, Controle Positivo de Triton; M, Controle de Solvente metanol.

4.9.3 Citotoxicidade em Células-Tronco Mesenquimais

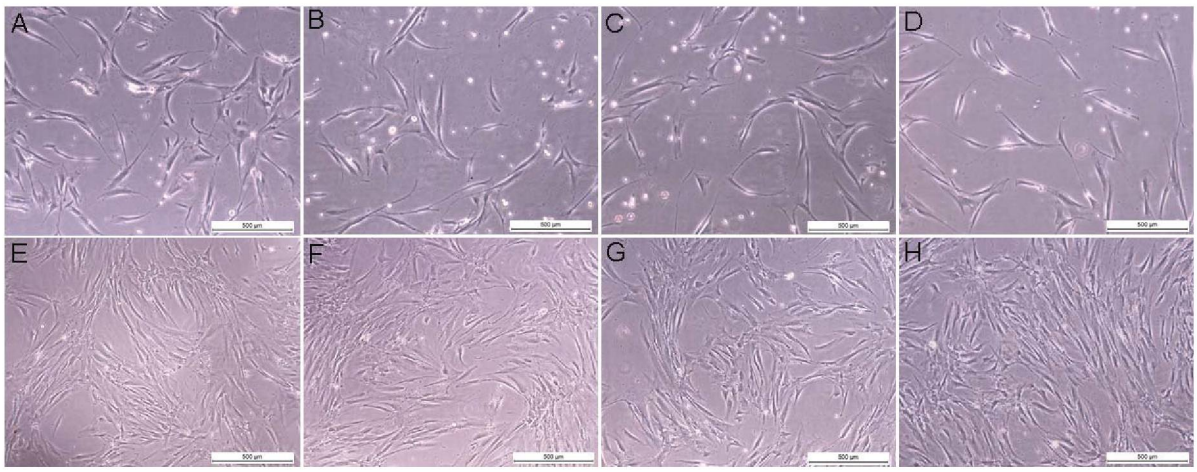
As diferentes concentrações testadas da fração etanólica acetato de etila de folha (FEAEF); 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL ou tempo em contato com a FEAEF não demonstraram ter nenhum efeito citotóxico nas células conforme descrito na Tabela 28 e ilustrado na morfologia das células (Figura 27) e nos gráficos obtidos após a análise por citometria de fluxo (Figura 28). A viabilidade das células-tronco mesenquimais sofreu alterações mínimas de acordo com o previsto para células em cultivo.

TABELA 28 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE INCUBAÇÃO COM A FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.

	TEMPO					
	24 horas			5 dias		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL
Linhagem Celular	**Viabilidade Celular**			**Viabilidade Celular**		
1	91,92	91,72	90,66	91,32	91,93	90,47
2	97,47	94,97	95,99	89,2	90,63	89,5
3	97,59	97,25	96,96	96,15	95,92	94,84

FONTE: O autor (2018).

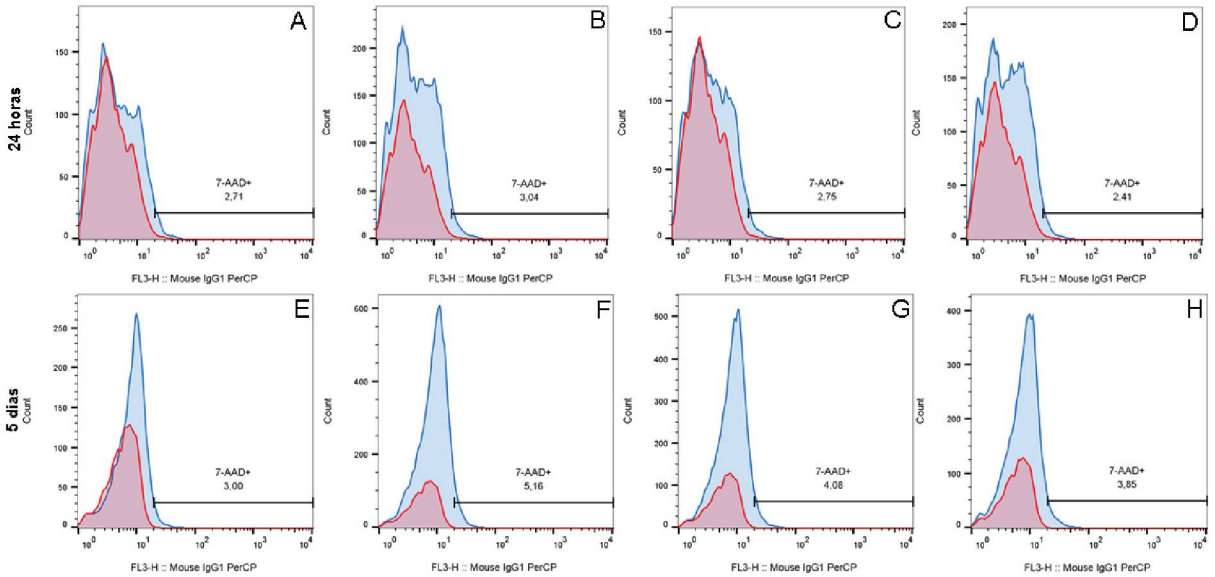
FIGURA 27 - FIGURA REPRESENTATIVA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE INCUBAÇÃO COM A FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis.*



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: A-E= Controle sem FEAEF; B-F= 10 µg/mL FEAEF; C-G= 50 µg/mL FEAEF; D-H= 100 µg/mL FEAEF.

FIGURA 28 - VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO DA FRAÇÃO ETANÓLICA ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *E. pyriformis* CAMBESS.



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: Gráfico representativo da viabilidade das linhagens de células-tronco mesenquimais (CTMS) na presença de diferentes concentrações e tempos de incubação com a FEAEF. O controle isotípico está representado no histograma em vermelho. O corante 7-aad marca a porcentagem de células mortas. A e E: grupo controle sem FEAEF; B e F: 10 µg/ml de FEAEF; C e G: 50 µg/ml de FEAEF; D e H: 100 µg/ml de FEAEF.

A utilização de células-tronco como modelo de cultura celular para a predição da toxicidade é uma metodologia alternativa, uma vez que elas podem ser isoladas de vários tecidos, têm potencial de autorrenovação, podem se diferenciar em células de diferentes tecidos e são fáceis de manter *in vitro* (VIA; FRIZZIERO; OLIVA, 2012). As células-tronco mesenquimais têm sido usadas para testar a toxicidade de muitas substâncias, como nanopartículas (MANCUSO; CAO, 2014; MURGIA et al., 2016), agentes quimioterápicos (BELLAGAMBA et al., 2016; MAY et al., 2012), substâncias químicas comumente usadas na indústria como cosméticos ou produtos de limpeza (GUO et al., 2012; SHE et al., 2013) e anestésicos (BREU et al., 2013; LUCCHINETTI et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

As análises físico-químicas das amostras *in natura* da casca e polpa do fruto de *E. pyriformis* revelaram um fruto com alto teor de umidade, característica que lhe atribui alta susceptibilidade à deterioração microbiana. A perda de umidade observada nas amostras liofilizadas demonstra a eficiência do processo de liofilização. A casca do fruto liofilizado se apresentou como uma importante fonte de fibras, proteínas e lipídios.

Em relação à atividade antioxidante o fruto de *E. pyriformis* possui média atividade sendo classificado como um fruto de baixo conteúdo de polifenóis e flavonoides totais. O fruto é rico em β-caroteno e ácido L-Ascórbico, demonstrando uma importante característica como fonte de pró-vitamina A e atividade anti-radical livre no organismo humano.

As amostras analisadas de caule e folhas com relação aos parâmetros farmacopeicos, teor de água e cinzas totais, estão de acordo com o estabelecido na Farmacopeia Brasileira.

A análise cromatográfica (CG/EM) do óleo essencial extraído das folhas de *E. pyriformis* identificou a presença majoritária de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (57,19%) e monoterpenos oxigenados (17,14%). Os compostos majoritários foram β-cariofileno (17.82%), biciclogermacreno (12.84%), globulol (5.96%) e δ-cadineno (4.33%).

A atividade antioxidante do óleo essencial nas duas metodologias empregadas, mostrou resultados pouco expressivos. Pelo método da redução do fosfomolibdênio o óleo essencial apresentou a melhor atividade, 59,66% em relação ao padrão rutina. Pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) o óleo essencial apresentou valor de IC_{50} acima de 500 µg/mL.

A análise da composição fitoquímica realizada através da técnica de CCD revelou a presença nos extratos brutos de compostos triterpênicos, flavonoides e taninos; nas frações hexano e clorofórmio compostos terpênicos e nas frações acetato de etila e hidroalcoólica remanescente flavonoides e taninos.

Por procedimentos cromatográficos de RMN ^{1}H e ^{13}C foram identificados 5 compostos, sendo eles, no extrato cetônico das folhas os compostos β-amirina e α-amirina, na fração hexano de caule os compostos esteróides β-sitosterol e campesterol e, na fração acetato de etila de folhas foi identificado o composto ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, conhecido como ácido gálico.

Nos ensaios de atividade antifúngica as frações acetato de etila e hidroalcoólica de caule e de folhas demonstraram relevante potencial inibitório frente aos fungos leveduriformes com valores de CIMs inferiores a 7,81 µg/mL. A análise da atividade antifúngica contra isolados clínicos de *C. albicans* mostrou eficiente atividade da fração etanólica acetato de etila de folhas de *E. pyriformis* sobre as cepas testadas, com valores de CIMs entre 3,9 e 62,5 µg/mL. A fração acetato de etila de caule e de folhas mostrou bom potencial inibitório frente ao fungo filamentoso *Trychophyton mentagrophytes* com valores de CIMs oscilando entre 7,81 e 15,62 µg/mL.

Nas investigações de sinergismo a avaliação da fração etanólica acetato de etila de folhas pela técnica *Time Kill* mostrou atividade fungistática contra a linhagem referência de *C. albicans* ATCC 90028. A fração etanólica acetato de etila de folhas em associação com o Fluconazol (Fluconazol + 1 x CIM) no tempo 24 horas apresentou potencial sinérgico. Porém, pela técnica *Checkerboard* a associação desta fração com fluconazol indicou que houve interação de aditividade frente ao microrganismo testado.

Nos ensaios de citotoxicidade frente à *Artemia salina* o óleo essencial de *E. pyriformis* apresentou toxicidade positiva neste ensaio, demonstrando CL_{50} de 125,64 µg/mL. A fração clorofórmio de caule apresentou nas extrações cetônica e

etanólica CL_{50} de 47,51 e 13,94 µg/mL, respectivamente, sendo classificadas como altamente tóxicas. A fração etanólica acetato de etila de folhas apresentou baixa toxicidade com CL_{50} de 731,79 µg/mL.

Na atividade hemolítica observou-se que os extratos brutos e as frações de caule e folhas de *E. pyriformis* apresentaram uma resposta dose dependente. Concentrações baixas promovem menor hemólise e na concentração de 1000 µg/mL demonstram resultados mais expressivos. No teste de hemólise por difusão em ágar as amostras testadas não mostraram halos de inibição.

A avaliação da viabilidade das células-tronco mesenquimais pela fração etanólica acetato de etila de folhas sofreu alterações mínimas de acordo com o previsto para células em cultivo.

Os resultados obtidos nas avaliações microbiológicas analisadas, aliados às substâncias isoladas identificadas e a baixa toxicidade obtida justifica a continuidade da pesquisa na determinação de outras atividades biológicas com estas amostras, evidenciando a possibilidade de aplicação antifúngica de *E. pyriformis*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados promissores obtidos neste estudo juntamente com os realizados no mestrado, confirmam que a espécie vegetal *Eugenia pyriformis* Cambess., família Myrtaceae tem potencial de se tornar um medicamento fitoterápico. A espécie apresenta em sua constituição fitoquímica compostos triterpênicos, flavonoides e taninos e, estes grupos são responsáveis por diversas atividades farmacológicas já reconhecidas cientificamente. Estes resultados favorecem pesquisas posteriores no intuito de isolar novos compostos, elucidar mecanismos de ação, utilizar outras técnicas de combinação e realização de ensaios *in vivo*, com possibilidades de combinar o uso de extratos, frações e compostos isolados de *E. pyriformis* aos antimicrobianos tradicionais, no intuito de aumentar o potencial antimicrobiano destes agentes.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, através das análises realizadas no óleo essencial, nos extratos de caule, de folhas e da casca do fruto de *E. pyriformis*, é possível inferir à ela propriedades antifúngicas, sendo considerada uma espécie de interesse para futuras investigações com potencial desenvolvimento de futuros medicamentos antifúngicos.

REFERÊNCIAS

ABAR, L. et al. Blood concentrations of carotenoids and retinol and lung cancer risk: an update of the WCRF–AICR systematic review of published prospective studies. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 8, p. 2069–2083, 2016.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Pennsylvania: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALI SHAH, S. A. et al. Structural diversity, biological properties and applications of natural products from cyanobacteria. A review. **Marine Drugs**, v. 15, n. 11, 2017.

ALMEIDA, S. C. X. et al. Volatile and non-volatile chemical constituents of Cochlospermum vitifolium (Willdenow) Sprengel. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 57–60, 2005.

ALVES, C. T. et al. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 139–146, 2014.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de Screening para avaliação da atividade antibacteriana de Extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quimica nova**, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008.

AMARAL, F. M. M. et al. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 27–30, 2003.

AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 431–434, 2011.

ANDRADE, M. R. **Alcalóides de Rutaceae: química e atividade biológica**. 216 f. Tese de Doutorado em Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18 th. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

APEL, M. A. et al. Chemical Composition of the Essential Oils from Southern

Brazilian *Eugenia* Species Part II. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 3, p. 163–166, 2002a.

APEL, M. A. et al. Chemical composition of the essential oils from Southern Brazilian *Eugenia* species. Part III. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 259–262, 2002b.

APEL, M. A. et al. Essential Oils from *Eugenia* Species - Part VII: Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 2, p. 135–138, 2004.

ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 827–834, 2006.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St. Hill (Solanaceae). **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205–209, 2010.

ARCANJO, D. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505–509, 2012.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 569–587, 2007.

ARMSTRONG, L. **Estudo morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae**. 120 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ARMSTRONG, L.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 475–481, 2012.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas Medicinais de Uso Caseiro - Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1–6, 2005.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 90–97, 2008.

AZAM, A. G. et al. Plant toxins and acute medicinal plant poisoning in children : A systematic literature review. **Journal of Research in Medical Science**, v. 23, n. 26, p. 1–9, 2018.

BAKER, C. N. et al. Comparison of the *E-Test* to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge s. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 533–538, 1991.

BALBANI, A. P.; SILVA, D. H.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 4, p. 461–473, 2009.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BANDEIRA, P. N. et al. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α- e β-amirina. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 204–208, 2007.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, n. 2, p. 134–139, 2008.

BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological Research**, v. 196, p. 44–68, 2017.

BARNECHE, S. P. et al. Anti-*Staphylococcus* Activity of Uruguayan Riverside Forest Plants. **Pharmacognosy Journal**, v. 3, p. 69–71, 2011.

BEDNARCZUK, V. et al. Tests *in vitro* and *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 1518–5192, 2010.

BELLAGAMBA, B. C. et al. Human mesenchymal stem cells are resistant to cytotoxic and genotoxic effects of cisplatin *in vitro*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 129–134, 2016.

BERTUCCI, A. et al. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 20–25, 2009.

BIASI-GARBIN, R. P. et al. Antifungal potential of plant species from brazilian Caatinga against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 18–22, 2016.

BIESKI, I. G. C. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

BILAL, M. et al. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 554–574, 2017.

BIROSOVÁ, L.; MIKULÁSOVÁ, M.; VAVERKOVÁ, S. Antimutagenic effect of phenolic acids. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký Olomouc,** Czechoslovakia, v. 149, n. 2, p. 489–491, 2005.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BORGES, A. et al. New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. **Molecules**, v. 21, n. 7, 2016.

BOUZADA, M. L. M. et al. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 1, p. 44–52, 2009.

BRAGA, T. V. et al. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. Verticillata e Avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 287–290, 2007.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 2010.

BREITLING, R. et al. Metabolomics for Secondary Metabolite Research. **Metabolites**, v. 3, n. 4, p. 1076–1083, 2013.

BREU, A. et al. Cytotoxicity of local anesthetics on human mesenchymal stem cells *in vitro*. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 29, n. 10, p. 1676–1684, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CANTÓN, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of Amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 3, p. 203–206, 2003.

CARNEIRO, N. S. et al. Óleo Essencial das Flores de *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae): Composição Química e Atividades Tripanocida e Citotóxica *in vitro* o Title. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1381–1392, 2017.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do Nasturtum officinale R. Br., Brassicaceae.** 88 f. Dissertação de Mestrado em

Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CASCAES, M. M. et al. Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n. 10, p. 23881-23904, 2015.

CECÍLIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975–981, 2012.

CELESTINO, S. M. C. **Princípios de secagem de alimentos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010, 51 p.

CHABI, M. L. et al. Pulmonary aspergillosis. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 96, n. 5, p. 435–442, 2015.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CHAVASCO, J. K. J. M. et al. Evaluation of Antimicrobial and Activities of Plant Extracts From Southern Minas Gerais Cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13–20, 2014..

CHEN, P. et al. Lycopene and Risk of Prostate Cancer. **Medicine**, v. 94, n. 33, p. e1260, 2015.

CHO, K. S. et al. Terpenes from forests and human health. **Toxicological Research**, v. 33, n. 2, p. 97–106, 2017.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M38-A2**: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard Document. Wayne, PA, USA, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M27-A3**: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Wayne, PA, USA, 2008b.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Sul**.

Ministério do Meio Ambiente - MMA. Brasília, 2011.

CORREA-ROYERO, J. et al. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734–741, 2010.

COSTA, T. R. et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 111–117, 2000.

COSTA, J. G. et al. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 24, p. 331, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Products: a Continuing Source of Novel. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUNHA, C. et al. Human Genetic Susceptibility to Invasive Aspergillosis. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, p. 1–4, 2013.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Revista Matéria**, v. 12, p. 134–139, 2007.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jabouticabal: Novos Talentos, 2004.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.

DUNCAN, D. B. Multiple range and multiple F testes. **Biometrics**, v. 11, n. 1–42, 1955.

ENDO, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pormegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 534-540, 2010.

FARIA, N. C. G. et al. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 506–513, 2011.

FARIAS, V. et al. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 398–406, 2009.

FERNANDES, T. G. et al. *In vitro* synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strais. **Scientific World Jounal**, v. 2012, p. 158237, 2012.

FERREIRA, F. P. S. et al. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89–96, 2014.

FIÚZA, T. S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 245–250, 2008.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 291–296, 2005.

FURTADO, F. B. et al. Chemical composition and bioactivity of essential oil from *Blepharocalyx salicifolius*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2018.

GLOECKNER, H.; JONULEIT, T.; LEMKE, H. D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, n. 1–2, p. 131–138, 2001.

GOUFO, P.; TRINDADE, H. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ-oryzanol, and phytic acid. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 75–104, 2014.

GREGORIS, E. et al. Antioxidant properties of brazilian tropical fruits by correlation between different assays. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GUINOISEAU, E. et al. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal Clinical Microbiology & Infectiouns Diseases**, v. 29, p. 873–879, 2010.

GUO, L. W. et al. Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 262, n. 2, p. 117–123, 2012.

HESKES, A. M. et al. Localization of Oleuropeyl Glucose Esters and a Flavanone to Secretory Cavities of Myrtaceae. **Plos One**, v. 7, n. 7, 2012.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p.

1027–1031, 2002.

IVANAUSKAS, L. et al. Evaluation of phenolic acids and phenylpropanoids in the crude drugs. **Medicina**, v. 44, n. 1, p. 48–55, 2008.

JESUS, N. Z. T. et al. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3203–3228, 2012.

JING, L. et al. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.

KALEGARI, M. et al. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635–642, 2011.

KANG, M. S. et al. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **The Journal of Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 744–750, 2008.

KARAR, M. G. E.; KUHNERT, N. Herbal Drugs from Sudan: Traditional Uses and Phytoconstituents. **Pharmacognosy Review**, v. 11, n. 22, p. 83–103, 2017.

KAROU, S. D. et al. Antimicrobial, antiplasmodial, haemolytic and antioxidant activities of crude extracts from three selected Togolese medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 10, p. 808–813, 2011.

KLEPSER, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal Time-kill curve results: Proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: A clinical review. **European Respiratory Review**, v. 20, n. 121, p. 156–174, 2011.

LAMY, E. et al. The Effect of Tannins on Mediterranean Ruminant Ingestive Behavior: The Role of the Oral Cavity. **Molecules**, v. 16, n. March, p. 2766–2784, 2011.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The Genera of Myrtaceae in Brazil: An Illustrated Synoptic Treatment and Identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508, 1997.

LEITE, A. M. et al. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 842–846, 2009.

LEONOV, A. et al. Longevity extension by phytochemicals. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6544–6572, 2015.

LIMA, G. R.; BARROS, M. T.; LAURENTIZ, R. S. Medicinal Attributes of Lignans Extracted from *Piper Cubeba*: Current Developments. **Chemistry Open**, v. 7, n. 2, p. 180–191, 2018.

LOEWE, S.; MUISCHNEK, H. Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. **Pharmacology**, n. 114, p. 313-326, 1926.

LOPES, F. C. M. et al. *Alchornea glandulosa* ethyl acetate fraction exhibits antiangiogenic activity: preliminary findings from in vitro assays using human umbilical vein endothelial cells. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 10, p. 1244–53, 2011.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3 ed. New York: Wlliams & Wilkins, 1991, 1250 p.

LU, Y.; SU, C.; LIU, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 707-714, 2014.

LUCCHINETTI, E. et al. Antiproliferative Effects of Local Anesthetics on Mesenchymal Stem Cells. **Anesthesiology**, v. 116, n. 4, p. 841–856, 2012.

LUO, M. et al. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds in Renewable Parts of *Crataegus pinnatifida* inferred from Seasonal Variations. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 5, p. C1102–C1109, 2016.

MA, X. H. et al. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 11–12, p. 579–588, 2009.

MACHADO, K. E. et al. Antifungal activity of *Eugenia umbelliflora* against dermatophytes. **Natural product communications**, v. 4, n. 9, p. 1181–4, 2009.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAGINA, M. D. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 3, p. 345–350, 2009a.

MAGINA, M. D. A. et al. Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia beaurepaireana* (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 171–176, 2009b.

MAGINA, M. D. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Quimica Nova**, v. 35, n. 6, p. 1184–1188, 2012.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. 13C Nmr Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-a and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517–1575, 1994.

MANCUSO, L.; CAO, G. Acute toxicity test of CuO nanoparticles using human mesenchymal stem cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 7, p. 449–454, 2014.

MANDALARI, G. et al. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. **Lett Appl Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 83-89, 2010.

MARCHIORI, J. N. .; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: Myrtales**. 1 ed. UFSM, 1997, 304 p.

MATTOS, J. R. **Frutos indígenas comestíveis do Rio Grande do Sul**. 2 ed. Secretaria da Agricultura, Supervisão de Pesquisa, Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis, 1978.

MATUSCHEK, E.; BROWN, D. F. J.; KAHLMETER, G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, p. O255–O266, 2014.

MAY, J. E. et al. Development of a novel, physiologically relevant cytotoxicity model: Application to the study of chemotherapeutic damage to mesenchymal stromal cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 263, n. 3, p. 374–389, 2012.

MAZZARI, A. L. D. A.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: Pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 JUL, n. July, p. 1–12, 2014.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, n. 2, p. 513–524, 1998.

MEDEIROS, J. R. et al. Composition of the bioactive essential oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaugh ssp sororia from the Azores. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. October 2014, p. 293–295, 2003.

MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 2–3, p. 227–235, 2007.

MELO, C. M. et al. α,β-amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 34, p. 4272–4280, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp a convenient general bioassay for active plants constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, n. 5, p. 31–34, 1982.

MEYRE-SILVA, C. et al. Phytochemical analyses and gastroprotective effects of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) on experimental gastric ulcers. **Natural product communications**, v. 4, n. 7, p. 911–6, 2009.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240–16265, 2014.

MIOSO, R. et al. Cytotoxic compounds derived from marine sponges. A review (2010-2012). **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

MITSCHER, L. A. et al. **Antimicrobial agents from higher plants**. Lioydia, v. 35, p. 157-166, 1972.

MUKHERJEE, P. K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n.1, p. 163- 194, 2005.

MURGIA, A. et al. GC-MS metabolomics analysis of mesenchymal stem cells treated with copper oxide nanoparticles. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 8, p. 611–619, 2016.

NAGASAMPAGI, M. S. **Chemistry of natural products**. Nova Dehli: Narosa Publishing, 2004.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. **Food Science Technology** , v. 39, n. 102, p. 925–928, 1992.

NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: Uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49-58, 2013.

NEERGHEEN, V. S. et al. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. **Toxicology**, v. 278, n. 2, p. 229–241, 2010.

NEGRI, M. et al. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925–2956, 2014.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n.4, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, A. L. et al. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 1–5, 2006.

OLIVEIRA, E. N. A. et al. Obtainment of dehydrated ubaia by lyophilization process.

Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 4, n. 2, p. 235–242, 2010.

OLIVEIRA, L. F., GODOY, R. L. O.; BORGES, S. V. Quality of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*, Lam.) dehydrated under dfifferent processing conditions. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 241-248, 2011.

ORHAN, I. E. Pharmacognosy: Science of natural products in drug discovery. **BioImpacts**, v. 4, n. 3, p. 109–110, 2014.

OSBORNE, D. R.; VOOGT, P. **The analysis of nutrient in foods**. London: Academic Press, p. 251, 1978.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

OTUKI, M. F. et al. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1–3, p. 253–259, 2005.

OUF, S. A. et al. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 697–702, 2016.

OYEDEMI, S. O. et al. Phytochemicals analysis and medicinal potentials of hydroalcoholic extract from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A . Sm Stem Bark. **International Journal Molecular Science**, v. 13, n. 5, p. 6189–6203, 2012.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n. 2–3, p. 164–168, 2010.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.

PAPE, W. J.; HOPPE, U. Standardization of an *in vitro* red blood cell test for evaluating the acute cytotoxic potential of tensides. **Arzneimittelforschung**, v. 40, n. 4, p. 498-502, 1990.

PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73–94, 2011.

PAULA, C. S. et al. Potencial antioxidante *in vitro* das folhas da *Bauhinia ungulata* L. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 217–222, 2014.

PAIVA, S. R. et al. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **Anais da Academia Brasileira de**

Ciencias, v. 76, n. 3, p. 499–504, 2004.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 45–48, 2006.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3061–3067, 2012.

PETROBRAS. **Normas técnicas. Norma técnica N-2588**. Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemia* sp. 1996.

PETRONILHO, S. et al. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Industrial Crops & Products**, v. 40, p. 1–12, 2012.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 268–280, 2004.

PIO, I. D. S. L. et al. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco river, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 22, n. 3, p. 1–13, 2018.

POGORZELSKA-NOWICKA, E. et al. Bioactive compounds in functional meat products. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 1–19, 2018.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.

PUHL, M. C. M. et al. Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kutze and its synergism with different antibiotics. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9925-38, 2011.

RADULOVIĆ, N. S. et al. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 7, p. 932–52, 2013.

RAJ, G.; GEORGE, V.; SETHURAMAN, M. G. Chemical analysis of essential oil from the leaves of *Eugenia argentea* Bedd. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 3, p. 55–57, 2011.

RAJABI, S. et al. Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of

nanoparticles. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2015.

RAMALINGUM, N.; MAHOMOODALLY, M. F. The therapeutic potential of medicinal foods. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2014, 2014.

RAMIREZ, L. S.; CASTAÑO, D. M. Methodologies for evaluating the *in vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. **Scientia et Technica**, v. 42, p. 263–268, 2009.

RASEIRA, M. et al. Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Southern Brazil. **Latim American Journal Pharmaceutical**, v. 27, p. 172–177, March. 2008.

RASEIRA, M. DO C. B. et al. **Espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004, 122 p.

RAUSCH, O. High content cellular screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 4, p. 316-320, 2006.

RAUT, J. S. et al. Phenylpropanoids of plant origin as inhibitors of biofilm formation by *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1216–1225, 2014.

REDONDO, L. M. et al. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–7, March. 2014.

ROCHA, M. S. . et al. Physical and chemical Characterization and antioxidant activity (*in vitro*) of fruit of the Piaui Savanna. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 933–941, 2013.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

ROLLIN-PINHEIRO, R. et al. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1469–1484, 2016.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. DE. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529–548, 2006.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

RUSSO, G. I. et al. Dietary Consumption of Phenolic Acids and Prostate Cancer: A

Case-Control Study in Sicily, Southern Italy. **Molecules**, v. 22, p. 1–9, 2017.

SANGEETHA, K. S. S. et al. Flavonoids: Therapeutic Potential of Natural Pharmacological Agents. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 10, p. 3924–3930, 2016.

SANTOS, M. H. et al. Um espalhador de baixo custo de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada. **Terra**, v. 30, n. 7, p. 1747–1749, 2007.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008.

SARFRAZ, I. et al. Fraxinus : A Plant with Versatile Pharmacological and Biological Activities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

SARMENTO, F.; BERNAUD, R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metaboloma**, v. 57, n.6, p. 397-405, 2013.

SAWICKI, C. M. et al. Dietary fiber and the human gut microbiota: Application of evidence mapping methodology. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 1–21, 2017.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183–186, 1987.

SCHMIDT, J. M. et al. Abaco bush medicine: chemical composition of the essential oils of four aromatic medicinal plants from Abaco Island, Bahamas. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 12, p. 43–65, 2006.

SELLAMI, M. et al. Herbal medicine for sports: a review. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, n. 14, p. 1–14, 2018.

SHE, Y. et al. Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BM-MSCs. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 45, n. 12, p. 1011–1020, 2013.

SILVA, L. et al. Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 361–367, 2007.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo de ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas.** 75 f. Dissertação de Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 2010.

SILVA, N. A. D. et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072–5084, 2014a.

SILVA, L. et al. Avaliação de fenilpropanoides naturais frente a enzimas HIV-1 protease e HIV-1 integrase: um estudo utilizando ferramentas de quimioinformática. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, p. 14, 2014b.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. UFSC: Santa Catarina, 2010, 1104 p.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 746–757, 2009.

SIQUEIRA, J. M. et al. Activity-guided isolation of the constituents from bark of stem of *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, using brine shrimp lethality test (BSL). **Quimica Nova**, v. 24, n. 2, p. 185–187, 2001.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49–55, 1977.

SOBRINHO, A. C. N. et al. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 108–115, 2016.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, A. M. **Avaliação do Potencial Antimicrobiano de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae e Estudo da Associação Sinérgica com Agentes Antibacterianos e Antifúngicos de Uso Clínico.** 117f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SOUZA, A. M. et al. *In vitro* effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, 2014.

SOUZA, T. A.; OLIVEIRA, D. D.; SALES, E. M. Technological Forecasting: Molecule Bioativs Derived of Natural Products. **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 5, p. 148–154, 2014.

SOUZA, A. M. et al. Traditional uses, Phytochemistry and Antimicrobial activities of *Eugenia* species - A Review. **Planta Medica**. v. 17, p. 1-17, Jul. 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. Nova Odessa: Instituto

Plantarum, 2005.

SPROLL, C. et al. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 462–469, 2008.

STEFANACHI, A. et al. Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 1-12, 2018.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of Eugenia chlorophylla (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 1, p. 75–78, 2008.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Composição química e variação sazonal dos óleos essenciais de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 449–453, 2009.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidantee. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7–13, 2009.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2016, p. 3012462, 2016.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ed. revisada e ampliada. Campinas, SP: UNICAMP, 2011.

TAPAS, A.; SAKARKAR, D.; KAKDE, R. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089–1099, 2008.

TAYLOR, P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 3, p. 195–201, 2013.

TAYLOR, W. F.; JABBARZADEH, E. The use of natural products to target cancer stem cells. **American Journal Cancer Research**, v. 7, n. 7, p. 1588–1605, 2017.

TEODORO, G. R. et al. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–11, 2015.

TIWARI, B. K. et al. Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 2009.

UPADHYAY, A. et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

VALENTE, L. M. M. et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografi a em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 216–223, 2006.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 816–823, 2008.

VIA, A. G.; FRIZZIERO, A.; OLIVA, F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 2, n. 3, p. 154–62, 2012.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

VILLANUEVA, H.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical compositions of the leaf and fruit essential oils of Eugenia monteverdensis from Monteverde, Costa Rica. **Journal Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, n. 4, p. 443–446, 2009.

VINCI, G. et al. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 211–214, 1995.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157–166, 2009.

WAGNER, H. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996. p. 384.

WILLIS, K. J. **Useful Plants – Medicines**. London: Royal Botanic Gardens, Kell, 2017.

WOJDYŁO, A. et al. Phenolic composition, ascorbic acid content, and antioxidant capacity of Spanish jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) fruits. **Food Chemistry**, v. 201, p. 307–314, 2016.

YANG, L. et al. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional Chinese medicinal plants. **Science Bulletin**, v. 61, n. 1, p. 3–17, 2016.

ZHANG, J. et al. New lignans and their biological activities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 1, p. 1–54, 2014.

ZHAO, L. G. et al. Dietary, circulating beta-carotene and risk of all-cause mortality: a meta-analysis from prospective studies. **Scientific reports**, v. 6, p. 26983, 2016.

ZIMMERMAM-FRANCO, D. C. et al. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12561–12570, 2013.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421–1428, 2010.

ZUBAIR, M. et al. GC/MS profiling, *in vitro* antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Smilax macrophylla* leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1460–S1468, 2017.

ANEXO 1 – DEPÓSITO DE EXSICATAS

Prefeitura Municipal de Curitiba
Secretaria Municipal do Meio Ambiente
Departamento de Produção Vegetal
Divisão do Museu Botânico Municipal
Herbário MBM

DECLARAÇÃO

Declaro para os fins que se fizerem necessários que se encontram depositadas no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), duas exsicatas de planta pertencente à família Myrtaceae, cujo nome científico é *Eugenia pyriformis* Cambess., conforme discriminadas abaixo:

1) Local da coleta: Campo Comprido, Município de Curitiba, Estado do Paraná, Brasil, coordenadas geográficas 25°26'51,83"S ; 49°20'47,92"W ; Alt. 955m s.n.m., coletada por Souza, A.M. n° 1, registrada sob n° **MBM- 320419**; e
2) Local da coleta: Município de São Joaquim, Estado de Santa Catarina, Brasil, coordenadas geográficas 28°13'39,66"S ; 50°00'10,41"W ; Alt. 1279m s.n.m., coletada por Souza, A.M. n° 2, registrada sob n° **MBM- 313460.**
3)

As referidas exsicatas encontram-se depositadas no Herbário MBM, estando à disposição e podendo ser consultadas para todas e quaisquer eventualidades.

Curitiba, 11 de julho de 2016

José Tadeu Weidlich Motta
Curador do Herbário MBM

Prefeitura Municipal de Curitiba
Secretaria Municipal do Meio Ambiente
Departamento de Produção Vegetal
Divisão do Museu Botânico Municipal
Herbário MBM

DECLARAÇÃO

Declaro para os fins que se fizerem necessários que se encontra depositada no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), uma exsicata de planta pertencente à família Myrtaceae, cujo nome científico é *Eugenia pyriformis* Cambess, conforme discriminadas abaixo:

1) Local da coleta: Município da Lapa, Estado do Paraná, Brasil, coordenadas geográficas 25°49'14,05"S ; 49°54'29,86"W ; Alt. 812m s.n.m., coletada por Souza, A.M. n° 3, registrada sob n° **MBM- 349381**;

A referida exsicata encontra-se depositada no Herbário MBM, estando à disposição e podendo ser consultadas para todas e quaisquer eventualidades.

Curitiba, 17 de maio de 2018

José Tadeu Weidlich Motta
Curador do Herbário MBM
Matr. 35721

ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DO IBAMA

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011
Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela**:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF n.º 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa *"Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais"*.

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto n.º 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior
Presidente

ANEXO 3 – CERTIFICADO PLATAFORMA BRASIL

UFPR - HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -

CEP/HC/UFPR

Plataforma Brasil

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, SINÉRGICO E TOXICOLÓGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS OBTIDOS DE PLANTAS DA FLORA BRASILEIRA.
Pesquisador: ANGELA MARIA DE SOUZA
Versão: **2**
CAAE: 53331715.0.0000.0096
Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

DADOS DO COMPROVANTE

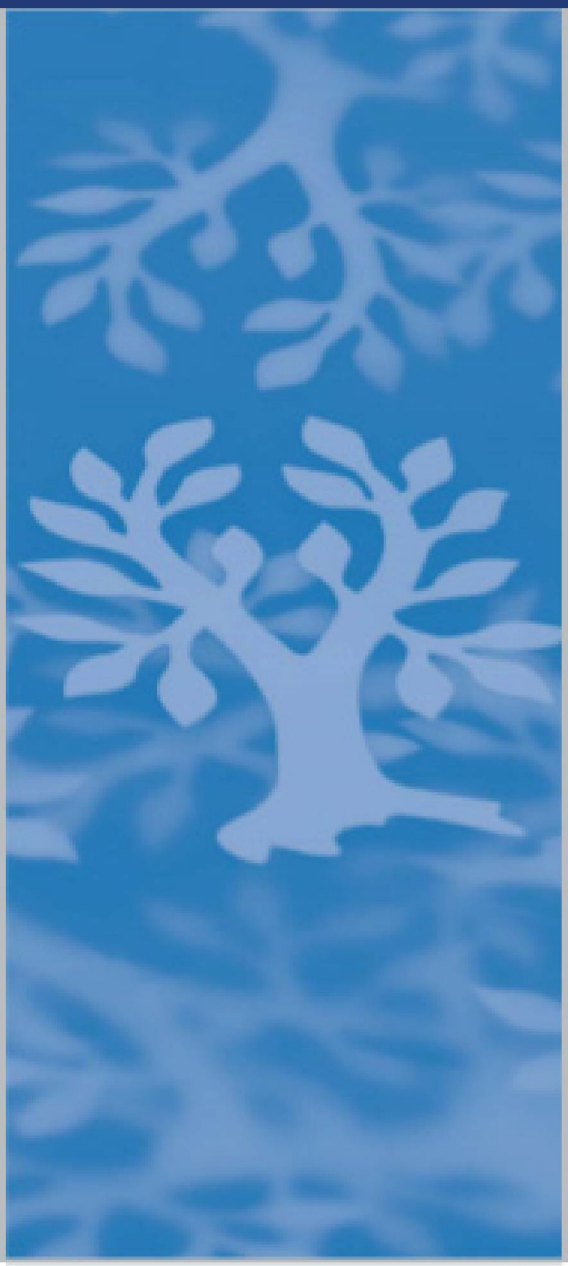
Número do Comprovante: 010240/2016
Patrocionador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, SINÉRGICO E TOXICOLÓGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS
OBTIDOS DE PLANTAS DA FLORA BRASILEIRA. que tem como pesquisador responsável ANGELA MARIA DE SOUZA, foi recebido para análise ética no CEP UFPR - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR em 18/02/2016 às 13:33.

ANEXO 4 – ARTIGO PUBLICADO REVISTA PLANTA MEDICA

Complimentary and personal copy for

Angela Maria de Souza, Camila Freitas de Oliveira, Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Fernando Cesar Martins Betim, Obdulio Gomes Miguel, Marilis Dallarmi Miguel



www.thieme.com

Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species – A Review

DOI 10.1055/a-0656-7262
Planta Med

This electronic reprint is provided for non-commercial and personal use only: this reprint may be forwarded to individual colleagues or may be used on the author's homepage. This reprint is not provided for distribution in repositories, including social and scientific networks and platforms.

Publishing House and Copyright:
© 2018 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 0032-0943

Any further use
only by permission
of the Publishing House

Thieme