



Universidade de Brasília- UnB
Faculdade de Ciências da Saúde- FS
Departamento de Farmácia

Brenda de Lucena Costa

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA
E ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Eugenia uniflora*.**

Brasília- DF

JULHO 2015

Universidade de Brasília- UnB
Faculdade de Ciências da Saúde- FS
Departamento de Farmácia

Brenda de Lucena Costa

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA
E ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Eugenia uniflora*.**

“Monografia de conclusão de curso apresentada ao curso de graduação em Farmácia da
Universidade de Brasília, como requisito parcial à conclusão do curso”.

Orientadora Professora Dra. Sílvia Ribeiro de Souza.

Brasília- DF

JULHO 2015

Brenda de Lucena Costa

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA
E ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Eugenia uniflora*.**

“Monografia de conclusão de curso apresentada ao curso de graduação em Farmácia da
Universidade de Brasília, como requisito parcial à conclusão do curso”.

Aprovada em 07 de julho de 2015

Banca Examinadora:

Profª Dra. Lorena Carneiro Albernaz

Membro

Profª. Dra. Mariana Laundry de Mesquita

Membro



Profª. Dra. Sílvia Ribeiro de Souza

Orientadora

Dedico este trabalho à minha
família que sempre acreditou na
minha capacidade e me apoiou em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por permitir a realização deste sonho.

À minha Mãe Santíssima, Maria, que sempre roga por mim e me acolhe em seu colo diante das dificuldades.

Aos meus pais, José Luiz e Marlucia, que com seu belo exemplo ensinaram-me a batalhar pelos meus objetivos com honestidade, humildade, garra e determinação.

Aos meus irmãos: Brunno, Brenno, Wanderson e Eduardo, e em especial, à minha sobrinha, Ana Beatriz, que me instiga a ser uma pessoa cada vez melhor.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Sílvia Ribeiro de Souza, pela oportunidade, confiança depositada na realização dos trabalhos e por sempre acreditar na minha capacidade como aluna e ser humano.

Às Prof^{as}. Dra. Janice Lisboa de Marco e Lorena Carneiro Albernaz pela ajuda e empenho nas realizações dos testes antimicrobianos.

Aos membros do Laboratório de Farmacognosia da UnB, em especial ao Allan, que esteve comigo o tempo todo me auxiliando nos trabalhos de pesquisa.

Aos meus colegas de curso, em especial, Cibele, Aline, Rachel e Danielli, pelo companheirismo e o ombro amigo durante essa longa caminhada.

“Buscai primeiro o Reino de Deus e a Sua justiça, e todas as coisas vos serão dadas em acréscimo”. (Mateus 6, 33)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Extratos da raiz da <i>Eugenia uniflora</i> obtidos por diferentes solventes de extração.....	24
Figura 2: Halo de inibição da atividade antibacteriana do extrato em acetato de etila sobre a <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 3: Ensaio de taninos.....	32
Figura 4: Ensaio de alcaloides (Reação de Dragendorff).....	32
Figura 5: Ensaio de saponinas	32
Figura 6: Ensaio de flavonoides	32
Figura 7: Ensaio de flavonoides leitura no UV-VIS em λ 254 nm de absorbância.....	32
Figura 8: Ensaio positivo de flavonoides leitura no UV- VIS em λ 365nm de absorbância.....	32
Figura 9: Curva de calibração empregada para o experimento de DPPH.....	33
Figura 10: Atividade antioxidante dos extratos de <i>Eugenia uniflora</i> nas concentrações 1 (7,81); 2 (15,63); 3 (31,25); 4 (62,5); 5 (125); 6 (250); 7 (500) μ g/mL	33
Figura 11: Cromatograma do extrato em acetato de etila registrado em 230 nm	35
Figura 12: Cromatograma do extrato metanólico registrado em 230 nm.....	35
Figura 13: Cromatograma do extrato hexânico registrado em 210 nm	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos extratos obtidos da raiz da Pitangueira.....	23
Tabela 2: Resultados do teste de antifúngico.....	24
Tabela 3: Halo de inibição dos extratos da raiz da <i>Eugenia uniflora</i> de diferentes polaridades em diluição seriada frente à <i>Candida albicans</i>	25
Tabela 4: Halo de inibição dos extratos da raiz da <i>Eugenia uniflora</i> de diferentes polaridades em diluição seriada frente ao <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Tabela 5: Halo de inibição dos extratos da raiz da <i>Eugenia uniflora</i> de diferentes polaridades em diluição seriada frente à <i>Escherichia coli</i>	27
Tabela 6: Halo de inibição dos extratos da raiz da <i>Eugenia uniflora</i> de diferentes polaridades em diluição seriada frente ao <i>Bacillus cereus</i>	28
Tabela 7: Resultados do screening fitoquímico.....	29
Tabela 8: Teor de compostos fenólicos dos extratos da <i>Eugenia uniflora</i>	33

RESUMO

Este trabalho avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos hexânico, em acetato de etila e metanólico da raiz da *Eugenia uniflora*, planta da família Myrtaceae, amplamente encontrada no Cerrado. Os extratos foram obtidos por meio de extração à quente utilizando aparelho Soxhlet. Os ensaios de susceptibilidade antibacteriana e antifúngica foram realizados por difusão em ágar e diluição em caldo, respectivamente. Avaliou-se a atividade antioxidante dos extratos empregando-se o reagente DPPH e o teor de fenóis totais foi determinado. Verificou-se a atividade antioxidante nos extratos em acetato de etila e metanólico. O screening fitoquímico demonstrou a presença de taninos, esteroides, flavonoides e alcaloides em todos os extratos avaliados, sendo a presença de flavonoides confirmada em análises preliminares por HPLC. Avaliou-se a atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Os resultados dos ensaios biológicos demonstraram uma potencial atividade antimicrobiana do extrato em acetato de etila frente à *Candida albicans*, e *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chaves: antioxidante, raiz, *Eugenia uniflora*, antimicrobiana.

ABSTRACT

This study evaluated the antimicrobial activity of hexane, ethyl acetate and methanol extracts root of *Eugenia uniflora*, Myrtaceae family, widely found in the Cerrado. The extracts were obtained by extraction using Soxhlet apparatus. Assays of antibacterial and antifungal susceptibility were performed by agar diffusion and broth dilution, respectively. We evaluated the antioxidant activity of the extracts employing the DPPH reagent and the total phenols content was determined. It is the antioxidant activity in the extracts in ethyl acetate and methanol. The phytochemical screening showed the presence of tannins, steroids, flavonoids and alkaloids in all extracts evaluated, and the presence of flavonoids confirmed in preliminary analyzes by HPLC. We evaluated the antimicrobial activity to microorganisms: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. The results of biological testing showed a potential antimicrobial activity of the extract in ethyl acetate front *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: antioxidant, root, *Eugenia uniflora*, antimicrobial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1. Coleta do material vegetal.....	17
2.2. Obtenção dos extratos.....	17
2.3. Cultura dos dermatófitos.....	17
2.3.1. Teste biológico: atividade frente aos dermatófitos.....	18
2.4. Cultura da levedura.....	19
2.4.1. Teste biológico: atividade frente à <i>Candida albicans</i>	19
2.5. Cultura das bactérias.....	19
2.5.1. Preparação do pré-inóculo.....	19
2.5.2. Ensaio biológico: atividade frente às bactérias.....	20
2.6. Screening fitoquímico.....	20
2.6.1. Saponinas.....	21
2.6.2. Taninos/Fenóis.....	21
2.6.3. Alcaloides.....	21
2.6.4. Esteroides/Triterpenoides.....	21
2.6.5. Flavonoides.....	21
2.7. Ensaio de prospecção de atividade antioxidante.....	22

2.7.1. Ensaio de determinação de fenóis totais.....	22
2.7.2. Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	22
2.8. Análise do perfil químico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD).....	23
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	23
4. CONCLUSÃO.....	36
5. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

As doenças bacterianas, fúngicas e parasitárias mantêm-se como um dos maiores problemas de saúde pública mundial há décadas. Anualmente, centenas de milhões de pessoas são infectadas, resultando em um aumento significativo na mortalidade mundial, com consequências sociais e econômicas devastadoras (MARCHAL *et al.*, 2011). Os tratamentos atuais são limitados, com potencial para desenvolverem resistência, são onerosos, longos e altamente tóxicos (MACHADO *et al.*, 2012).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, do tipo cocos considerada como patógeno humano oportunista, frequentemente associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar, que podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (GELATTI, *et al.*, 2009). É encontrado colonizando a flora natural, principalmente da pele, tornando-se patogênico em algumas condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. Os traumas que comprometem a integridade da barreira cutânea constituem-se na principal causa de mudança de comportamento desse micro-organismo a agente etiológico mais comum de infecções cutâneas. Responsável por uma grande variedade de infecções, como infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia (SILVA *et al.*, 2012).

Escherichia coli é uma bactéria bacilar Gram-negativa, anaeróbica facultativa, não produtora de esporos e que habita normalmente o intestino humano e de alguns animais. Sua presença na água ou nos alimentos se deve à contaminação dos mesmos pelas fezes e podem causar doenças como a gastroenterite e infecção urinária (MOURA *et al.*, 2012).

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, e responsável pela maior parte das doenças de histórico alimentar. Sob a forma de esporo, este micro-organismo está presente no solo e por isso quase sempre é o agente patológico responsável pela infestação de toda uma plantação. Uma vez colhidos da plantação, os alimentos vem contaminados e se não houver uma preparação adequada, contaminarão tudo à volta. Esses esporos produzem duas toxinas

preocupantes: uma delas é termo-lábil que provoca diarreias, e a outra é termo-estável que provoca vômitos (MENDES *et al.*, 2011)

As infecções por dermatófitos são encontrados em todo o mundo, especialmente em países de clima quente e úmido. Pacientes imunocomprometidos podem apresentar complicações clínicas extensas e atípicas. (ARNAUD *et al.*, 2011).

As dermatofitoses são infecções na pele causadas por fungos incluídos em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. As espécies desses gêneros, que são queratinofílicas e causam doenças, recebem o nome de dermatófitos. São considerados microorganismos queratinofílicos aqueles que são capazes de quebrar queratina e usá-la para a sua nutrição. As espécies do gênero *Microsporum* são responsáveis por acometer a pele e os pelos. As do gênero *Trichophyton* afetam unha, pele e pelos; já as espécies do gênero *Epidermophyton* acometem pele e unha. Esse último gênero apresenta apenas uma espécie que causa doenças no homem (*E. floccosum*). O parasitismo dos dermatófitos começa com a germinação de esporos depositados sobre a pele ou enxerto de um fragmento do filamento (FRIAS *et al.*, 2009).

O dermatófito *Trichophyton rubrum* é um agente comum nas micoses superficiais, podendo causar lesões extensas pauci-inflamatórias de evolução crônica, especialmente em imunocomprometidos (PEIXOTO *et al.*, 2010).

Trichophyton mentagrophytes é um dermatófito zoofílico e está presente, principalmente, em roedores e camelos. Pode também gerar dermatofitoses em humanos, especialmente na área da cabeça (*Tinea capitis*) e do corpo (*Tinea corporis*), na forma de favos. A transmissão animal-animal ou animal-humano ocorre por contato direto ou indireto (FRIAS *et al.*, 2009).

Candida albicans é um patógeno oportunista responsável por um grande espectro de infecções, de micose superficial a doenças sistêmicas, as candidíases. Sua capacidade em crescer de

várias formas morfológicas, como levedura unicelular de brotamento ou pseudo hifas filamentosas, contribui para a sua sobrevivência nos diversos microambientes que encontra no hospedeiro (GUEDOUARIA *et al.*, 2014).

O uso de plantas medicinais aumentou durante as últimas décadas e tem seguido por uma demanda crescente em todo o mundo sendo uma fonte de novas substâncias ativas e de novas drogas de interesse farmacêutico (LEITÃO *et al.*, 2014). Além de estar em uma localização estratégica o Cerrado abriga espécies da maioria dos biomas brasileiros (floresta amazônica, caatinga e floresta atlântica), o que lhe confere uma biodiversidade comparável a da floresta amazônica, sendo considerada uma das 25 áreas do mundo prioritárias para a conservação (EMBRAPA, 2011).

As raízes das plantas produzem uma variedade de compostos que não estão diretamente envolvidas no crescimento e desenvolvimento da planta, mas são muito importantes nas condições de estresse. Estes incluem compostos alifáticos, aromáticos e ácidos graxos, esteróis, enzimas, compostos fenólicos, flavonoides, e outros metabolitos secundários (SINGH *et al.*, 2014).

Em um sistema biológico, um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em concentrações baixas, em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou evita a oxidação do referido substrato (MOHAMED *et al.*, 2013), deste modo compostos com atividade antioxidante são de grande valia para o organismo pois controlam a ação de radicais livres envolvidos em diversos processos patológicos, como câncer, cardiopatias, diabetes (YILDRIN *et al.*, 2001), mal de Alzheimer (ALLISON *et al.*, 2001), arteriosclerose, entre outros. Nos organismos vivos, os compostos antioxidantes podem responder de formas diferentes a diferentes radicais livres ou oxidantes, devido aos vários mecanismos oxidativos envolvidos (MARATHE *et al.*, 2011).

Muitas plantas têm sido investigadas em decorrência da sua composição que indicam propriedades antimicrobianas, analgésicas, sedativas, anti-inflamatórias (BAKKALI *et al.*, 2008) além de atividades antioxidantes potentes (MOHAMED *et al.*, 2013) e outras.

Eugenia uniflora é frequentemente utilizada como alimento e remédio na medicina popular devido às suas propriedades antimicrobiana e antioxidante. Conhecida no Brasil como pitangueira, esta planta tem sido estudada devido às suas atividades antioxidantes, hipotensoras, fotossensibilizante e moduladora da atividade antibacteriana (SANTOS *et al.*, 2013).

As propriedades antioxidantes de extratos e fitoderivados do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* foram avaliadas e confirmadas pelos ensaios DPPH, ABTS e FRAP; encontrou-se atividades antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogene*, antifúngica sobre *Candida lipolytica* e *Candida guilliermondii* (VICTORIA *et al.*, 2012) e atividade antidepressiva (VICTORIA *et al.*, 2013).

Dentre os estudos com os extratos das folhas, observou que o extrato bruto aquoso demonstrou efeito hipotensor em camundongos (CONSOLINI *et al.*, 2002), e os extratos etanólicos apresentaram atividade hipoglicemiante e hipotriglicemiante em camundongos (ARAI *et al.*, 1999). A fração flavonoidica do extrato butanólico diminuiu a mortalidade em 30% por sepse induzida por ligadura e perfuração cecal em camundongos, pois preveniu a acumulação de neutrófilos nos pulmões, diminuiu a expressão de TNF- α e IL-1 β no soro, iNOS e COX-2 pelas células do íleo (RATTMANN, *et al.*, 2012). A infusão de folhas secas demonstrou atividade anti-inflamatória em ratazanas quando administrada por via oral uma hora antes da injeção subplantar de carragenina. Essa infusão também aumentou o tempo de sono e a motilidade intestinal sem causar efeito tóxico agudo (SCHAPOVAL *et al.*, 1994).

Nos extratos do fruto, observou-se que o extrato etanólico apresentou atividade *in vitro* anti-epimastigota e com baixa atividade citotóxica frente ao *Trypanosoma cruzi* (SANTOS *et al.*,

2012). Nesses extratos também encontraram atividade antiproliferativa, citotóxica e apoptótica em células estreladas hepáticas de murinos (DENARDIN *et al.*, 2014).

Não foram encontrados estudos sobre a composição química e atividades biológicas dos extratos da raiz da pitangueira nas bases de dados: Science Direct, PubMed e Periódicos Capes. Este estudo teve por objetivo fazer o screening fotoquímico de extratos de raiz de *Eugenia uniflora*, Myrtaceae, bem como avaliar sua atividade antioxidante por meio dos ensaios de sequestro de radical livre DPPH e quantificação de fenóis totais, e antibacteriana sobre *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*, e antifúngica sobre *C. albicans* e *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* podendo desta forma contribuir para o conhecimento de um bioma tão pouco explorado e para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas e que envolvam processos oxidativos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal foi coletado no bairro Carlos Prates, cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, em 2013.

2.2. Obtenção dos extratos

A da raiz da *E. uniflora* depois de seca a temperatura ambiente, foi pulverizada. Em seguida obteve-se os extratos por meio da extração a quente utilizando aparelho Soxhlet durante 24 horas. Foram obtidos três extratos a partir de solventes: hexano (1), acetato de etila (2) e metanol (3). A quantificação dos extratos foi realizada através de pesagem em balança analítica, sendo o rendimento expresso em porcentagem.

2.3. Cultura dos dermatófitos

Os fungos LMGO correspondem aos isolados clínicos de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, cedidos pela Profa. Maria do Rosário Rodrigues Silva/UFG.

Os dermatófitos *T. rubrum* (LMGO 06) e *T. mentagrophytes* (LMGO 09) foram repicados em meio ágar batata dextrose, em temperatura ambiente, por um período de 5 dias para a realização do teste. Para a realização do ensaio, verteu-se a solução salina estéril 0,85% no tubo de ensaio que continha o fungo e utilizando-se uma alça de platina foi realizada uma raspagem na superfície do fungo até que a solução salina adquirisse a turbidez referente a 0,5 na escala de McFarland. Recuperou-se a suspensão e realizou-se uma diluição em meio RPMI na proporção de 1:10. A cultura e o teste biológico foram realizados conforme o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008).

2.3.1. Teste biológico: atividade frente aos dermatófitos

O teste de microdiluição foi realizado em triplicata em uma placa estéril de 96 poços de fundo em “U”. Inicialmente colocou-se 100 µL de meio RPMI em todos os poços da placa. Em seguida nos poços da primeira coluna adicionou-se 10 µL dos extratos na proporção de 1:10 e posteriormente foi realizada a diluição seriada, exceto nos controles positivos e negativos, o volume de cada poço foi ajustado para 200 µL, sendo assim, foi pipetado mais 90 µL do inóculo. A concentração dos extratos nos poços na diluição seriada variaram de 1000 a 1,95 µg/mL. A concentração dos controles positivos no primeiro poço foi anfotericina B e itraconazol a 16 µg/mL e fluconazol a 64 µg/mL.

A leitura do resultado foi realizada visualmente da direita para a esquerda, observando o crescimento do fungo no poço. O primeiro poço onde não foi observado o crescimento do fungo foi considerado o valor do CIM (Concentração Inibitória Mínima). Foi considerado ativo os extratos que apresentaram inibição do crescimento dos dermatófitos em concentrações menores que 125µg/mL.

2. 4- Cultura da levedura

Foi inoculado uma colônia de *Candida albicans* em 5 mL de meio YPD líquido, em seguida foi incubada a 28° C sob agitação. A cultura e o teste biológico foram realizados conforme o protocolo M2-A8 (CLSI, 2003).

2.4.1- Teste biológico: atividade frente à *Candida albicans*

Após 24 horas de incubação, foi semeado 100 µL da cultura em uma placa de petri 150 mm com meio ágar. Foram feitos seis poços de seis milímetros de diâmetro cada na superfície do meio de cultura LB ágar, em seguida, pipetou-se 50 µL de cada extrato distribuídos nas placas, conforme a seguinte ordem: 1- somente o micro-organismo; 2- somente o solvente; 3- 200µg/mL do extrato; 4- 100µg/mL do extrato; 5- 50µg/mL do extrato; 6- 25µg/mL do extrato. Posteriormente, foram incubados a 28° C. A leitura foi feita a partir da medição do halo de inibição de cada amostra.

2.5. Cultura das bactérias

As culturas de *E. coli* e *S. aureus* foram doadas pelo Laboratório de Biologia Molecular da UnB, a *C. albicans*, SC 5314, cedida pelo laboratório de biologia molecular da UnB e o *Bacillus cereus* foi isolado no parque nacional de Caldas Novas/ GO em janeiro de 2008, mantida em glicerol 25% e a temperatura de -80,0 °C.

2.5.1. Preparação do pré-inóculo

Uma colônia de bactéria foi inoculada em 5 ml de meio de cultura Luria-Bertani, incubou-se a 37°C e 200rpm por 18 horas. Foram contabilizadas $1,968 \times 10^9$ céls/mL de *B. cereus*, $5,76 \times 10^8$ céls/mL de *S. aureus* e $1,128 \times 10^9$ céls/mL de *E. coli*. Os cálculos foram feitos por meio da densidade óptica (OD) utilizando o espectrofotômetro, em que cada 1(uma) OD equivale a 8×10^8 céls/mL.

2.5.2. Ensaio biológico: atividade frente às bactérias

Teste de sensibilidade foi realizado pelo método de difusão modificada (OKEKE *et al.*, 2001). Resumidamente, após 24 horas de incubação, foram semeados 100 µL da cultura em uma placa de Petri 150 mm com bicamada de meio de cultura LB ágar. Realizou-se a abertura de seis poços de seis milímetros de diâmetro na superfície do meio de cultura LB ágar, em seguida pipetou-se 50µl de cada extrato distribuídos nas placas, conforme a seguinte ordem: 1- somente o microrganismo; 2- controle negativo; 3- 20.000µg/mL do extrato; 4- 10.000µg/mL do extrato; 5- 5.000µg/mL do extrato; 6- 2.500 µg/mL do extrato. Posteriormente, foram encubados a 37°C por 24 horas. A leitura foi feita a partir da medição do halo de inibição em milímetros de cada amostra do extrato em diferentes concentrações. Os extratos que obtiveram atividade antibacteriana na concentração de 2.500 µg/mL, foram submetidos a novos testes com uma nova diluição seriada para determinar a concentração inibitória mínima (MIC). O controle positivo foi avaliado nas concentrações de 6,5 µg/ml a 50 µg/ml. O DMSO foi utilizado como controle negativo, exceto no extrato hexânico, pois essa amostra é insolúvel em DMSO, portanto, nos experimentos com esse extrato foi utilizado o hexano como controle negativo. O cloranfenicol foi utilizado como controle positivo. Foi considerado ativo o extrato que obteve um halo de inibição menor ou igual a 8 mm.

2.6. Screening fitoquímico

Foram realizadas reações de identificação dos seguintes grupos de metabólitos: esteroides/triterpenoides, flavonoides, taninos/fenóis, saponinas e alcaloides. O extrato hexânico foi solubilizado em clorofórmio e os demais extratos, acetato de etila e metanólico, foram solubilizados em seus próprios solventes respectivamente. As amostras foram preparadas a 10% para a realização dos testes.

2.6.1. Saponinas

Em 2 mL do extrato adicionou-se 2 mL de água destilada e 3 gotas de ácido clorídrico (HCl), em um tubo de ensaio. Em seguida a solução foi agitada permanentemente por 3 minutos. A formação de espuma persistente e abundante indica a presença de saponina.

2.6.2. Taninos/Fenóis

Colocou-se em um tubo de ensaio contendo 2 mL do extrato, adicionou-se três gotas de solução alcóolica de FeCl₃, agitando fortemente, observou-se qualquer variação de cor. Precipitado de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, e verde, a presença de taninos condensados.

2.6.3. Alcaloides

Adicionou-se 2 mL de extrato, 1 ml de HCl e 4 gotas de reativo de Dragendorff em um tubo de ensaio. A presença de precipitados insolúveis e floculoso confirma a presença de alcaloides.

2.6.4. Esteroides/Triterpenoides

Os testes para esteroides/triterpenoides foram realizados pela reação de Lieberman-Burchard, anidrido acético com ácido sulfúrico concentrado, tomando 2 mL do extrato e misturando-o a 2 mL de clorofórmio, em seguida 1 mL de anidrido acético, agitando suavemente, e acrescentou-se cuidadosamente três gotas de ácido sulfúrico concentrado, agitando suavemente e observando se haveria desenvolvimento de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde indicou a presença de esteroides/triterpenoides respectivamente.

2.6.5. Flavonoides

Realizou-se o teste de Shinoda, HCl concentrado e magnésio. Onde adicionou a 2 ml do extrato, 2 ml de HCl aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita com 2 ml de ácido clorídrico

concentrado. O fim da reação dar-se-á pelo término da efervescência. O aparecimento de coloração que varia de parda a vermelha indica a presença de flavonoides no extrato.

Realizou-se a reação com cloreto de alumínio, umedeceu-se áreas diferentes de uma tira de papel de filtro com os extratos obtidos, colocou-se sobre uma das regiões uma gota de solução de AlCl_3 a 5% e comparou-se a fluorescência sob luz ultravioleta (ondas longas). Observou-se a fluorescência nos comprimentos de onda de 254nm e 365nm.

2.7. Ensaio de prospecção de atividade antioxidante

2.7.1. Determinação de fenóis totais

Os extratos de diferentes polaridades da raiz da Pitangueira foram dissolvidos em metanol, a fim de se obter uma concentração de 0,5 mg/mL e analisados utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A quantidade total de fenóis de cada extrato foi quantificada por meio de curva padrão preparada com ácido gálico nas concentrações de 0 - 1000 mg/L e expresso como equivalentes de ácido gálico (GAE). Para a reação colorimétrica, a uma alíquota de 0,5 mL de cada extrato foi adicionada a 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C e, posteriormente, a absorbância 760 nm foi medida usando-se branco como referência. A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada em triplicata (ROESLER *et al*, 2007).

2.7.2. Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A avaliação da capacidade em sequestrar o radical livre DPPH foi feita de acordo com metodologia descrita por (MENSOR *et al.*, 2001), com adaptações. Assim, 2,5 mL das amostras, nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15, 63 e 7,81 µg/mL, reagiram com 1 mL de solução etanólica de DPPH (50 µg/mL) durante 30 min, ao abrigo da luz. A medida da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 518 nm em espectrofotômetro UV-VIS Quimis. O branco foi preparado substituindo-se o DPPH por etanol na mistura reacional. O controle negativo foi

preparado a partir da adição de 1 mL de DPPH em 2,5 mL de etanol. O BHT foi utilizado como padrão. A percentagem de sequestro de radical livre (%SRL) foi calculada de acordo com a equação abaixo, onde Ac equivale à absorbância do controle, e Aa absorbância da amostra. (SÁ *et al.*, 2012).

$$\%SRL = 100 \times [(Ac-Aa)/Ac]$$

2.8. Análise dos compostos químicos dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

A fase móvel utilizada foi uma solução de H₂O/H₃PO₄ 0,1% (A) e MeOH (B) composta por 75% de A e 25% de B durante 25 minutos, sendo eluição isocrática. A temperatura da coluna foi mantida constante a 30 °C com fluxo de 1,5 mL/minuto. Para os extratos foi utilizado um volume de injeção de 20 µL. Os dados espectrais foram registrados em 320 nm durante todo o experimento (SÁ *et al.*, 2012).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os extratos hexânico, em acetato de etila e metanólico tiveram seus rendimentos variando de 0,1986% a 3,9188%.

Tabela 1: Rendimento dos extratos obtidos da raiz da Pitangueira.

Solvente de extração	Parte	Quantidade (g)	Quantidade do extrato (g)	Rendimento do extrato (%)
Hexano (1)	raiz	849,267	2,861	0,33%
Acetato de Etila (2)	raiz	833,943	1,657	0,20%
Metanol (3)	raiz	789,571	30,942	3,92%

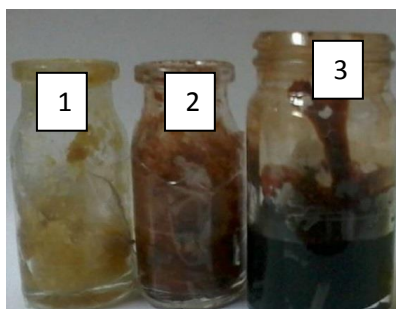


Figura 1: Extratos da raiz da *E. uniflora* obtidos por diferentes solventes de extração

1- Extrato hexânico; 2- Extrato acetato de etila; 3- Extrato metanólico

Tabela 2: Resultados do teste antifúngico

Amostras		<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
Extratos da raiz da <i>E. uniflora</i>	Hexano (1)	*	*
	Acetato de etila (2)	Atividade a 1000 µg/mL	*
	Metanol (3)	Atividade a 500 µg/mL	*
Antifúngicos	Itraconazol	Ativo a 9 µg/mL	Ativo a 9 µg/mL
	Fluconazol	Ativo a 32 µg/mL	*
	Anfotericina B	Ativo a 16 µg/mL	*

* Extrato não ativo

Não existe um consenso na literatura de qual valor da CIM deve ser considerado promissor para o fracionamento. Alguns autores consideram um extrato potente quando o valor de CIM é inferior a 1000 µg/mL (WEBSTER et al., 2008), enquanto outros consideram CIM > 500 µg/mL (ALGIANNIS et al., 2001). O Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília (UnB/FS) considera os extratos com CIM < 125 µg/mL. Considerando o parâmetro do laboratório e as atividades antifúngicas dos extratos 2 e 3 que obtiveram CIM de 1000 e 500 µg/mL,

respectivamente, frente ao *T. mentagrophytes*, conclui-se que os extratos de diferentes polaridades da raiz da pitangueira não foram ativos nesses micro-organismos.

Tabela 3: Halo de inibição dos extratos da raiz da *E. uniflora* de diferentes polaridades em diluição seriada frente à *Candida albicans*.

Micro-organismo	Extrato 1 ($\mu\text{g/ml}$)	Halo (mm)	Extrato 2 ($\mu\text{g/ml}$)	Halo (mm)	Extrato 3 ($\mu\text{g/ml}$)	Halo (mm)
<i>Candida albicans</i>	20000	2	20000	10	20000	6
	10000	1	10000	7	10000	5
	5000	2	5000	5	5000	5
	2500	4	2500	3	2500	3
	1250	*	1250	1	1250	*
	620	*	620	*	620	*
	310	*	310	*	310	*
	150	*	150	*	150	*
<i>Candida albicans</i>	Itraconazol ($\mu\text{g/ml}$)				Halo (mm)	
	32				8	
	16				7	
	8				6	
	4				8	

* Extrato não ativo nessa concentração; Extratos: hexânico (1), acetato de etila (2) e metanólico (3)

Foi considerado ativo o extrato que obteve o halo de inibição maior que 8 mm, sendo assim, considerando os resultados da tabela 3, conclui-se que somente o extrato 2 foi ativo tendo a sua atividade maior que a do controle positivo, Itraconazol a 32 $\mu\text{g/mL}$. Pois demonstrou uma maior atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, apresentando um halo de inibição de 10 mm na concentração de 20.000 $\mu\text{g/mL}$ e uma CIM de 1,25 mg/ml.

Tabela 4: Halo de inibição dos extratos da raiz da *E.uniflora* de diferentes polaridades em diluição seriada frente ao *S. aureus*.

Micro-organismo	Extrato 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)	Extrato 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)	Extrato 3 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	20000	*	20000	*	20000	*
	10000	*	10000	8	10000	4
	5000	*	5000	6	5000	6
	2500	*	2500	5	2500	5
	1250	*	1250	2	1250	2
	620	*	620	1	620	1
	310	*	310	*	310	*
	150	*	150	*	150	*
<i>S. aureus</i>	Cloranfenicol ($\mu\text{g/ml}$)		Halo de inibição (mm)			
	50		7			
	25		5			
	12,5		3			
	6,25		3			

* Extrato não ativo nessa concentração; Extratos: hexânico (1), acetato de etila (2) e metanólico (3)

Foi considerado ativo o extrato que obteve o halo de inibição maior que 8 mm, sendo assim, considerando os resultados da tabela 4, conclui-se que somente o extrato 2 na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ foi ativo, apresentando também uma CIM em 620 $\mu\text{g/mL}$. A sua atividade antibacteriana foi maior que a do controle positivo, o Cloranfenicol. Desta forma, o extrato 2 é uma fonte promissora para o desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica para infecções causadas pelo *S. aureus*.

Tabela 5: Halo de inibição dos extratos da raiz da *E. uniflora* de diferentes polaridades em diluição seriada frente à *E. coli*.

Micro-organismo	Extrato 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)	Extrato 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)	Extrato 3 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)
<i>Escherichia coli</i>	20000	*	20000	10	20000	*
	10000	*	10000	7	10000	6
	5000	*	5000	6	5000	5
	2500	*	2500	4	2500	5
	1250	*	1250	*	1250	3
	620	*	620	*	620	1
	310	*	310	*	310	*
	150	*	150	*	150	*
<i>Escherichia coli</i>	Cloranfenicol				Halo de inibição	
	($\mu\text{g/ml}$)				(mm)	
	50				7	
	25				5	
	12,5				2	
6,25				2		

* Extrato não ativo nessa concentração; Extratos: hexânico (1), acetato de etila (2) e metanólico (3)

Foi considerado ativo o extrato que obteve o halo de inibição maior que 8 mm, sendo assim, considerando os resultados da tabela 5, conclui-se que somente o extrato 2 na concentração de 20.000 $\mu\text{g/mL}$ foi ativo, apresentando também uma CIM em 2.500 $\mu\text{g/mL}$. A sua atividade antibacteriana foi maior que a do controle positivo, o Cloranfenicol. Desta forma, o extrato 2 é uma fonte promissora para o desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica para infecções causadas pela *E. coli*.

Tabela 6: Halo de inibição dos extratos da raiz da *E. uniflora* de diferentes polaridades em diluição seriada frente ao *B. cereus*.

Micro-organismo	Extrato 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)	Extrato 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)	Extrato 3 ($\mu\text{g/mL}$)	Halo (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	20000	*	20000	5	20000	6
	10000	*	10000	5	10000	5
	5000	*	5000	6	5000	4
	2500	*	2500	4	2500	2
	1250	*	1250	1	1250	*
	620	*	620	1	620	*
	310	*	310	*	310	*
	150	*	150	*	150	*
<i>B. cereus</i>	Cloranfenicol ($\mu\text{g/ml}$)				Halo de inibição (mm)	
	50				10	
	25				13	
	12,5				12	
	6,25				13	

* Extrato não ativo nessa concentração; Extratos: hexânico (1), acetato de etila (2) e metanólico (3)

Foi considerado ativo o extrato que obteve o halo de inibição maior que 8 mm, sendo assim, considerando os resultados da tabela 6, conclui-se que nenhum extrato obteve a atividade desejada.



Figura 2: Halo de inibição da atividade antibacteriana do extrato em acetato de etila frente à *E. coli*.

1- Somente o microrganismo; 2- somente o solvente (DMSO); 3- extrato a 20 mg/ml; 4- extrato a 10 mg/ml; 5- extrato a 5 mg/ml; 6- extrato a 6,5 mg/ml.

Tabela 7: Resultados do screening fitoquímico

Amostras	Esteroides	Flavonoides	Taninos	Saponinas	Alcaloides
Extrato Hexânico (1)	+	+	Condensados	-	+
Extrato em Acetato de Etila (2)	+	+	Condensados	-	+
Extrato Metanólico (3)	+	+	Hidrolisáveis	-	+

+ Compostos encontrados;- Compostos ausentes

A realização do screening fitoquímico sugere a presença de taninos condensados nos extratos 1 e 2, verificada pela presença de precipitados verdes nas amostras após a adição dos reagentes específicos e de taninos hidrolisáveis no extrato 3, pois a amostra apresentou precipitados insolúveis de tonalidade azul; nenhum extrato demonstrou a presença de saponinas, pois não houve o aparecimento de espuma persistente. As reações indicativas de alcaloides, sugerem a presença dos mesmos nos extratos 1, 2 e 3, pois em meio ácido os alcaloides formam

precipitados insolúveis. Demonstrou-se também a presença de esteroides em todos os extratos, pela visualização da coloração azul evanescente seguida de verde após a adição dos reagentes específicos. O aparecimento da coloração que variou de parda a vermelha nos extratos, após a adição dos reagentes específicos, bem como a intensificação de fluorescência após a adição de $AlCl_3$ a 5% e visualização sob luz ultravioleta, sugerem a presença de flavonoides.

Na determinação do perfil fitoquímico foi detectado a presença de alcaloides em todos os extratos pela formação de precipitado floculoso. Isso ocorre porque os alcaloides, semelhante a outras aminas, formam sais complexos obtidos na forma de precipitados em soluções alcalinas ou levemente ácidas pelo reagente de Dragendorff (SIMÕES, 2007). Foram encontrados também taninos em todos os extratos pela formação de precipitado, pois tais compostos possuem habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatinas e metais (COSTA, 2002). Os taninos se distribuem em padrões diferentes no reino vegetal. Os taninos são classificados em hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são constituídos por diversas moléculas de ácidos fenólicos, como o gálico e o elágico, que estão unidos a um resíduo de glucose central. São chamados de hidrolisáveis, uma vez que suas ligações ésteres são passíveis de sofrerem hidrólise por ácidos ou enzimas. Em solução desenvolvem coloração azul com cloreto férrico, assim como o ácido gálico. Os taninos condensados incluem todos os outros taninos verdadeiros. Suas moléculas são mais resistentes à fragmentação e estão relacionadas com os pigmentos flavonoides, tendo uma estrutura "polimérica" do flavan-3-ol, como a catequina, ou do flavan-3,4-diol, da leucocianidina. Sob tratamento com ácidos ou enzimas esses compostos tendem a se polimerizar em substâncias vermelhas insolúveis, chamadas de flobafenos. Essas substâncias são responsáveis pela coloração vermelha de diversas cascas de plantas. Em solução, desenvolvem coloração verde com cloreto férrico, assim como o catecol (SIMÕES, 2007).

Triterpenos/esteroides foram detectados em todos os extratos pelo aparecimento de cor azul evanescente seguida de verde, pois tanto os triterpenoides, quanto os esteroides, são compostos

apolares, podendo aparecer, portanto, em solventes apolares, como o hexano, ou, em menor quantidade, em solventes de polaridade intermediária, como o acetato de etila. A presença de flavonoides foi detectada em todos os extratos pelo aparecimento de cor vermelha. A extração com solventes menos polares (hexano e acetato de etila) permite recuperar agliconas livres pouco polares, como flavonas, flavonois e flavanonas. Não foi detectada a presença de saponinas nos extratos pela formação de espuma persistente. Essa propriedade das saponinas é decorrente da sua estrutura que possui uma parte lipofílica (aglicona ou sapogenina) e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (COSTA *et al.*, 2010).

Os flavonoides e os ácidos fenólicos possuem ações: anti-inflamatória (GESSER *et al.*, 2015), citotóxica (FROZZA *et al.*, 2013), antiaterogênica (DALEPRANE *et al.*, 2012), cicatrizante (ALMEIDA *et al.*, 2013) , regeneradora de tecido cartilaginoso e pulpar dental (FERREIRA *et al.*, 2007), antioxidante, antibacteriana e antifúngica (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

Os alcaloides apresentam atividades biológicas distintas, destacando-se as ações antimicrobianas (SILVA *et al.*, 2010; SEVERINO, 2008) e antiparasitárias (LAVAUD *et al.*, 1995, MAFEZOLI *et al.*, 2000).

Os terpenos são ativos contra bactérias, vírus, fungos e protozoários. Terpenos são citados por apresentarem atividade antimicrobiana contra várias bactérias, tais como: *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e menor atividade contra *Candida albicans*, dependendo do terpeno (COWAN *et al.*, 1999). Assim estes compostos podem estar envolvidos, isoladamente ou em associação, na atividade antimicrobiana do extrato da raiz da pitangueira em acetato de etila.

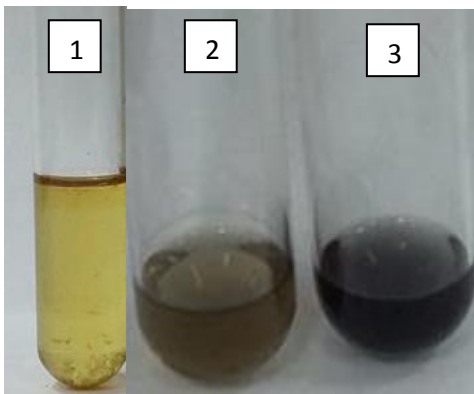


Figura 3: Ensaio de taninos

(1) Extrato hexânico; (2) Extrato em acetato de etila; (3) Extrato metanólico

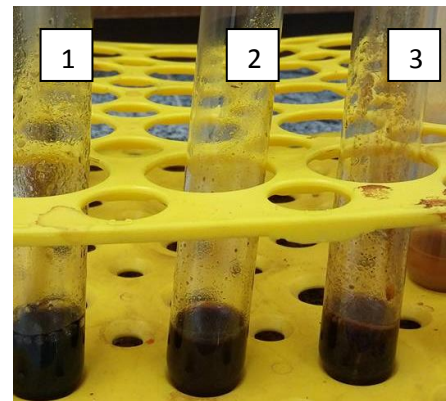


Figura 4: Ensaio de alcaloides (Reação de Dragendorff)

(1) Extrato hexânico; (2) Extrato em acetato de etila; (3) Extrato metanólico

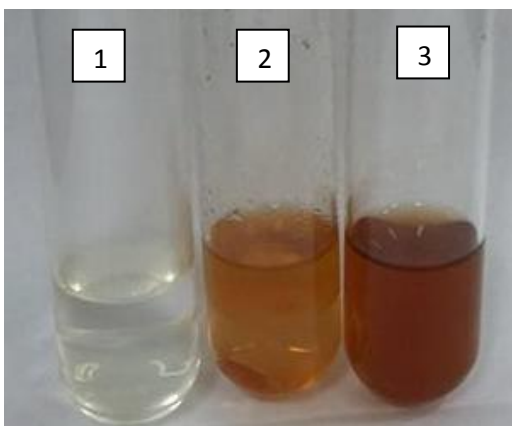


Figura 5: Ensaio de saponinas

(1) Extrato hexânico; (2) Extrato em acetato de etila; (3) Extrato metanólico

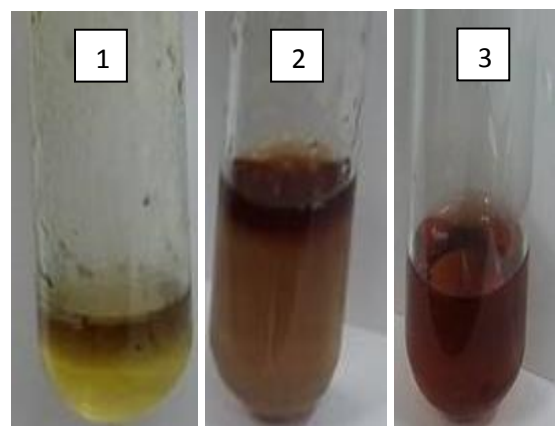


Figura 6: Ensaio de flavonoides

(1) Extrato hexânico; (2) Extrato em acetato de etila; (3) Extrato metanólico

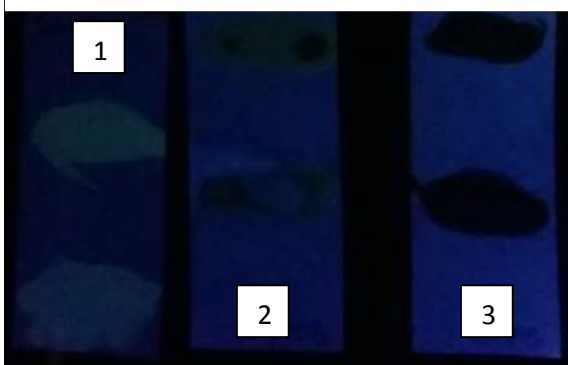


Figura 7: ensaio de flavonoides leitura no UV-VIS em γ 254nm de absorbância

(1) Extrato hexânico; (2) Extrato em acetato de etila; (3) Extrato metanólico

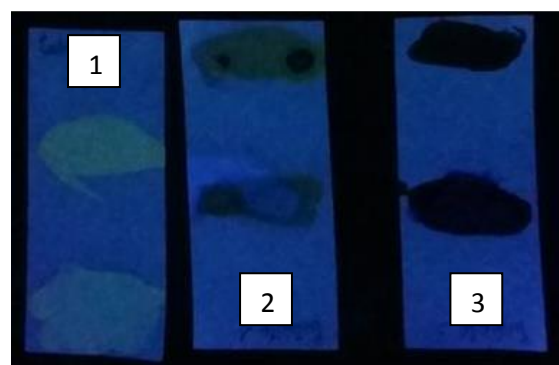


Figura 8: ensaio de flavonoides leitura no UV- VIS em γ 365nm de absorbância.

(1) Extrato hexânico; (2) Extrato em acetato de etila; (3) Extrato metanólico

Tabela 8: Teor dos compostos fenólicos dos extratos de *E. uniflora*

Amostras/Padrões	Compostos fenólicos em mg GAE.g ⁻¹
Extrato Hexânico (1)	172,77
Extrato em Acetato de Etila (2)	885,5
Extrato Metanólico (3)	776,86

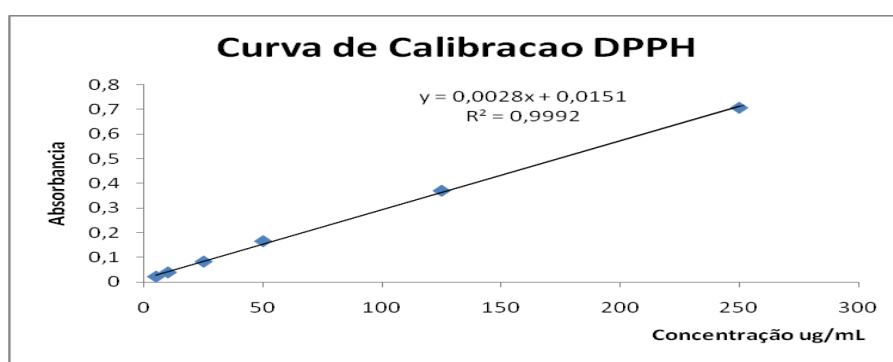


Figura 9: Curva de calibração empregada para o experimento de DPPH.

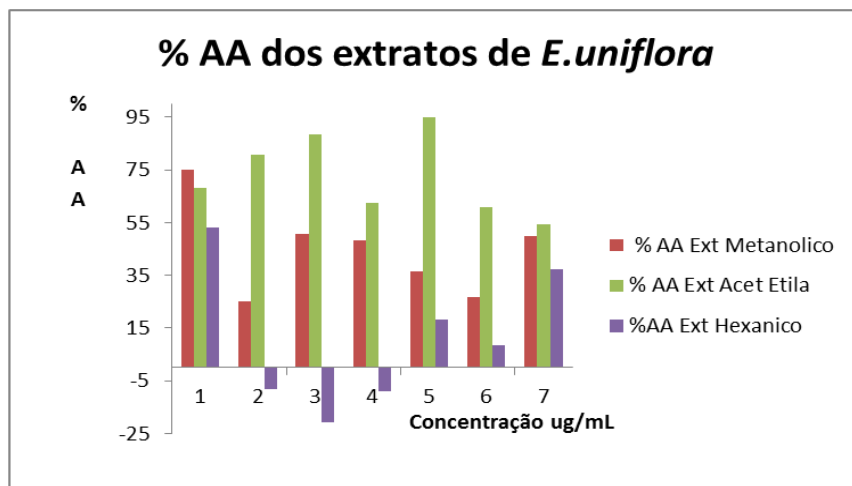


Figura 10: Atividade antioxidante dos extratos de *E. uniflora* nas concentrações 1 (7,81), 2 (15,63), 3 (31,25), 4 (62,5), 5 (125), 6 (250) e 7 (500) µg/mL

Os extratos de *E.uniflora* foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante, pelo uso dos métodos do sequestro do radical livre DPPH e o teor de fenólicos totais determinado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu.

A Figura 9 refere-se à curva de calibração empregada para o experimento de DPPH. Com a finalidade de avaliar a capacidade dos constituintes dos extratos de *E.uniflora* em capturar radicais livres (DPPH) foi feita análise de soluções deste extrato com DPPH. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (Figura 9).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando o ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W.

O extrato em acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante em relação aos demais extratos. A atividade antioxidante encontrada no extrato hexânico foi mínima, pois esses métodos que buscam identificar atividade antioxidante são mais efetivos em amostras polares, sendo assim, é necessário realizar outro teste que detecte com maior precisão a atividade antioxidante do extrato 1.

Acredita-se que este valor negativo de porcentagem de atividade antioxidante (%AA) esteja relacionado às substâncias presentes no extrato, que ao invés de atuarem como bons doadores de elétrons ou hidrogênio, reduzindo conseqüentemente o radical ABTS, promoveram efeito contrário, agindo então como agente pró-oxidante. Portanto é necessário novos estudos para o isolamento dos constituintes químicos dos extratos que atuam como agentes antioxidantes.

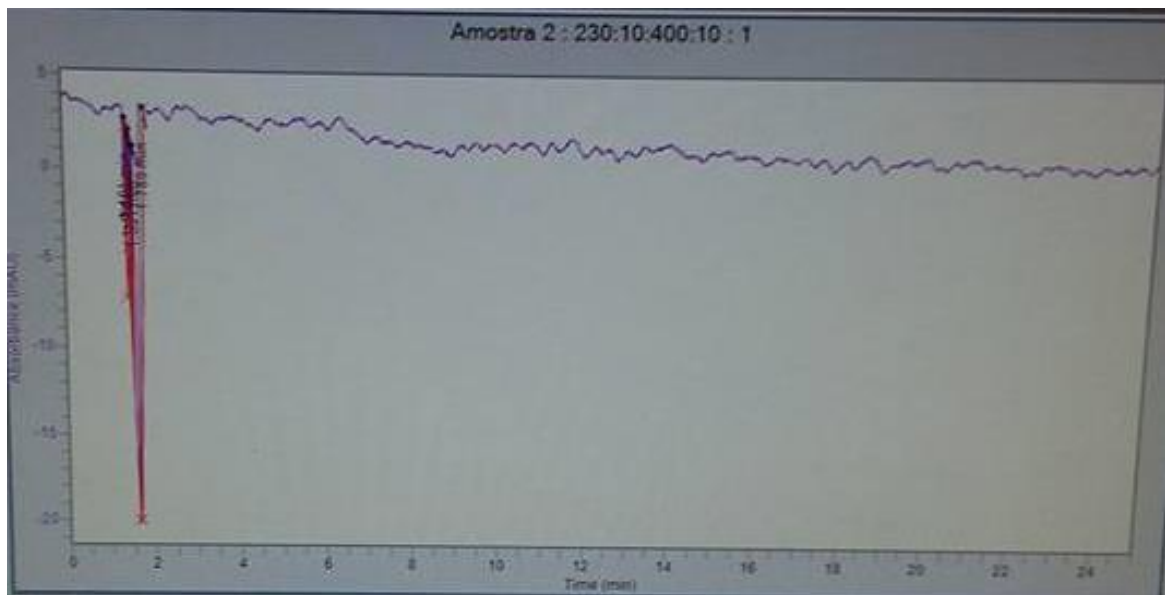


Figura 11: Cromatograma do extrato em acetato de etila registrado em 230 nm

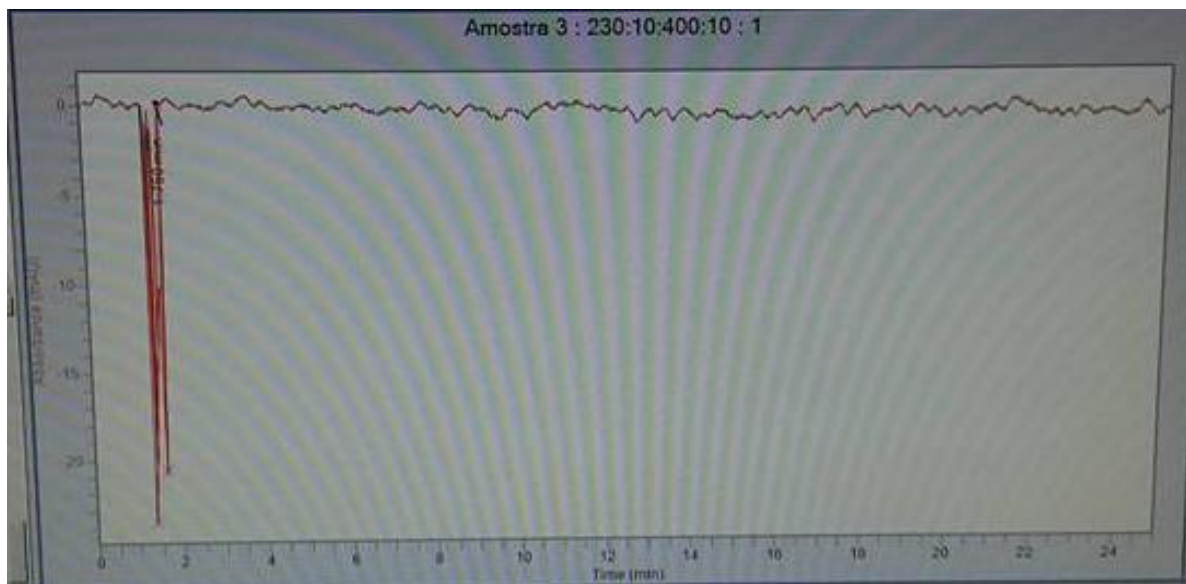


Figura 12: Cromatograma do extrato metanólico registrado em 230 nm

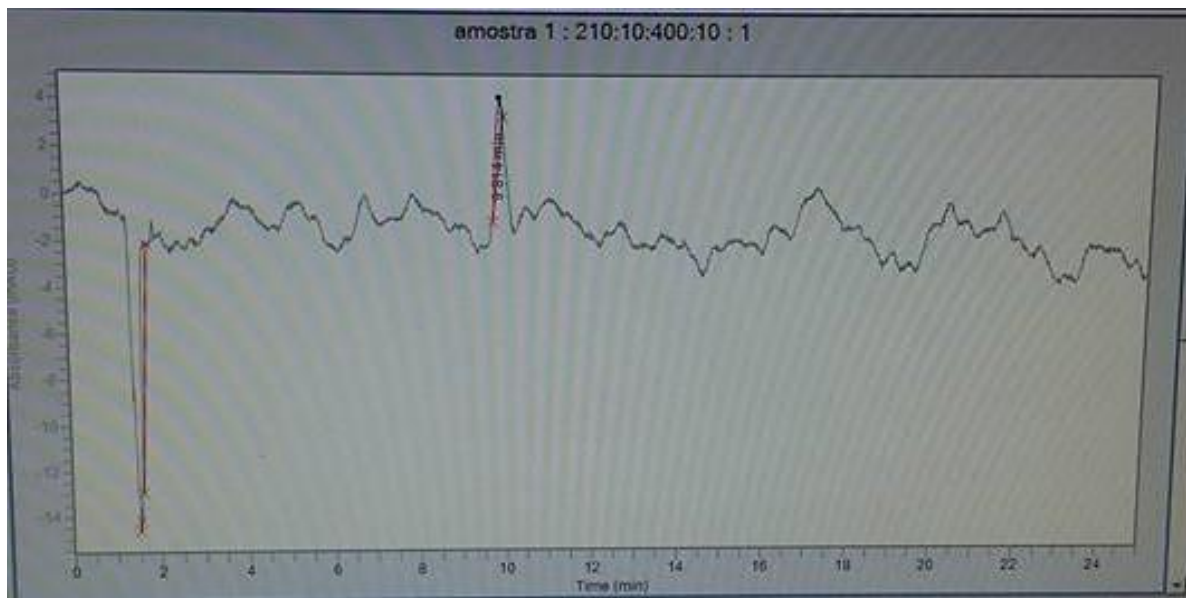


Figura 13: Cromatograma do extrato hexânico registrado em 210 nm

Foi observada a presença de significativa de flavonoides no extrato hexânico, sendo registrado em 210, 230 e 320 nm. Nos extratos em acetato de etila e metanólico foi observada a presença mínima desses compostos, pois na análise a amostra encontrava-se em pequena concentração. Foi utilizado como padrões a quercetina, epicatequina e naringina.

4. CONCLUSÃO

A difusão em ágar é mais indicada para amostras polares, sendo assim, extratos apolares como o hexânico tem dificuldade em difundir e isso pode resultar em um falso negativo. Por isso, o teste em difusão em ágar é preliminar, sendo necessária a realização de testes de microdiluição para determinar a CIM da amostra. Portanto, com essa técnica só foi possível identificar atividade antimicrobiana com os extratos em acetato de etila e metanólico, sendo que o extrato em acetato de etila apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana promissora frente ao *S. aureus* e *C. albicans*.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que os extratos em acetato de etila e metanólico possuem atividades antioxidante e antimicrobiana. As atividades apresentadas podem estar relacionadas à presença de substâncias dos alcaloides, flavonoides, esteroides e taninos que

podem agir sozinhos ou em sinergismo. É necessário estudos para o isolamento dos constituintes químicos da raiz da pitangueira, para determinarmos os compostos responsáveis pelas atividades biológicas dos extratos.

No extrato hexânico foi observada a presença significativa de flavonoides pela técnica de CLAE-DAD, por esse motivo, conclui-se que a amostra possui características para ter atividade antimicrobiana e antioxidante, sendo necessário realizar novos testes com técnicas indicadas para extratos apolares.

5. REFERÊNCIAS

- ALGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, K.; MITAKU, S.; CHINO, L.B.; Composition and antimicrobial activity of essential oil of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 4168-4170. 2001
- ALLISON, A.C; CACABELOS, R.; LOMBARDI, V.R.M.; ÁLVAREZ, X.A.; VIGO, C. Celastrol, um antioxidante e anti-inflamatório potente, como um possível tratamento para a doença de Alzheimer. *Progress in Neuro-Psychopharmacology e Psiquiatria Biológica*. Volume 25, Issue 7,1341-1357, 2001.
- ALMEIDA, E.B.; CORDEIRO, C.J.; LIMA, A.K.L.; OLIVEIRA, N.L.; PONTES-FILHO, N.T.; OLIVEIRA, S.L. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology*. 147(2): 419-25. 2013
- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 307–314. 1999.
- ARNAUD, P., PASSERON, T., GARI-TOUSSAINT, M. Épidermophytie rapidement extensive à *Trichophyton mentagrophytes* chez un sujet immunocompétent. *Journal Mycology Medical*, 21, pp. 277–280. 2011.
- BAGA, A.; BHATTACHARYYA, S.K.; PALB, N.K.; CHATTOPADHYAYA, R.R. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. *Microbiological Research* 167, 352– 357, 2012.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; M. IDAOMAR, M. Efeitos biológicos de óleos essenciais - Uma revisão. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 46, Issue 2 , 446-475, 2008.

- CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology* 81,57/63, 2002.
- COSTA, A. F. *Farmacognosia*. v.1. 6 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002, p. 202-315.
- COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; SILVA, W. C. S.; COST, CHAARLLYTON, L. S. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. *Acta Ama*, v.40, n.1, p. 207-212, 2010.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.564-82, 1999.
- DALEPRANE, J.B.; FREITAS, V.S.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L.A.; DÖRR, F.A. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *Journal Nutricional Biochemical*. 23(6): 557-66. 2012.
- DENARDIN, C.C.M.; PARISI, M.M.; MARTINS, L.A.M.; TERRA, S.R.; BOROJEVIC, R.; VIZZOTTO, M.; PERRY, M.L.S.; EMANUELLI, T.; GUMA, F.T.C.R. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells. *Cell biochemistry and function*. 32: 16–23. 2014.
- FERREIRA, F.B.; TORRES, S.A.; ROSA, O.P.; FERREIRA, C.M.; GARCÍA, R.B.; MARCUCCI, M.C. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 104(5): 709-16. 2007.
- FRIAS, D.F.R.I; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. vol.11 nº.2 Botucatu, 2009.

FROZZA, C.O.; GARCÍA, C.S.; GAMBATO, G.; SOUZA, M.D.; SALVADOR, M.; MOURA, S. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chemical Toxicology*. 52: 137-42. 2013

GELATTI, L.C.; BONAMIGO, R.R.; BECKER, A.P.; D'AZEVEDO, P.A.; *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 84(5):501-6. 2009.

GESSER, V.C.; TURECK, C.; LOCATELI, G.; PERALTA, R.M.; KOEHNLEIN, E.A. Estimativa do consumo de compostos fenólicos pela população brasileira. *Revista de Nutrição*. vol.28 no.2 .Campinas março / abr. 2015.

GUEDOUARIA, H., GERGONDEYA, R., BOURDAISA, A., VANPARISA, O., BULTEAUB, A.L., CAMADROA, J.M., AUCHÈREA, F. Changes in glutathione-dependent redox status and mitochondrial energetic strategies are part of the adaptive response during the filamentation process in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Volume 1842, Issue 9, Pages 1855–1869. September 2014.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; VASQUEZ, C.; MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry*, v.40, p. 317-20, 1995.

MACHADO, M., PIRES, P., DINIS, A.M., SANTOS- ROSA, M., ALVES, V., SALGUEIRO, L., CAVALEIRO, C., SOUSA, M.C., Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agentes. *Experimental Parasitology*. 130: 223-231. 2012.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, F.G.F.M.; ALBUQUERQUE, S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, p. 335- 40, 2000.

MARATHE, S.A.; RAJALAKSHMI, V.; JAMDAR, S.N.J.; SHARMA, A. Estudo comparativo da atividade antioxidante de diferentes variedades de leguminosas comumente consumidos na Índia. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 49, Issue 9 , 2005-2012, 2011.

MARCHAL, B.; VAN DORMAEL, M.; PIRARD M.; CAVALLI, A.; KEGELS G.; POLMAN, K. Doença tropical negligenciada controle (NTD) nos sistemas de saúde: A interface entre os programas e serviços gerais de saúde. *Acta Tropica*. Volume 120, suplemento 1 , Páginas S177-S185, setembro de 2011;

MENDES, R.A.; COELHO, A.I.M.; AZEREDO, R.M.C. Contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(9):3933-3938, 2011.

MENSOR, L.L.; MENEZES F.S.; LEITAO G.G.; REIS A.S.; SANTOS T.C.; COUBE C.S.; LEITAO S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*;15(2):127-30, 2001.

MOHAMED, Y.M.A.; VIK, A.; HOFER, T.; ANDERSEN, J.M.; HANSEN, T.V. Cromonas derivados de ácidos graxos poliinsaturados que exibem potente atividade antioxidante. *Chemistry*

MOURA, M.R.S.A.L.; MELLO, M.J.G.; CALÁBRIA, W.B.; GERMANO, E.M.; MAGGI, R.R.S.; CORREIA, J.B. Frequência de *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. *Revista Brasileira de Saúde Materna e Infantil*, Recife, 12 (2): 173-182 abr. / jun., 2012.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, M.C.; PEREIRA, D. J. S.; RIBEIRO, J. F. Viveiro e produção de mudas de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado. Embrapa Cerrados. Documentos, 147. 2. ed. rev. e ampl. p 86. 2011.

PEIXOTO, I; MAQUINE, G.; FRANCESCONI, V.A.; FRANCESCONI, F. Dermatofitose por *Tricophyton rubrum* como infecção oportunista em pacientes com doença de Cushing. Anais Brasileiros de Dermatologia. Vol.85 nº.6 Rio de Janeiro, Nov./Dec. 2010.

PINA-VAZ C., GONCALVES RODRIGUES A., PINTO E., et al. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol. 18(1): 73-78. 2004.

RATTMANN, Y.D.; SOUZA, L.M.; PAIVA, S.M.M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. Hindawi Publishing Corporation. Article ID 623940. 2012.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 27(1): 53-60, jan.-mar. 2007.

SÁ, P.G.S.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; SIQUEIRA FILHO, J.A; FONTANA, A.P.; PATRÍCIA DAMASCENO, K.F.; BRANCO, C.R.C; BRANCO, A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 33(4):561-566, 2012.

SANTOS, K.K.A., MATIAS, E.F.F., TINTINO, S.R., SOUZA, C.E.S., BRAGA, M.F.B.M., GUEDES, G.M.M., COSTA, J.G.M., MENEZES, I.R.A., COUTINHO, H.D.M., Enhancement of

the Antifungal Activity of Antimicrobial Drugs by *Eugenia uniflora* L. J Med Food 16 (7), 669–671. 2013.

SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E.F.F.; TINTINO, S.R.T.; SOUZA, C.E.S.; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES, G.M.M.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. Experimental Parasitology 131, 130–132. 2012

SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M.L.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. Journal of Ethnopharmacology 44. 137-142. 1994.

SEVERINO, V.G.P. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antimicrobiano de espécies de *Hortia* (Rutaceae): *H. oreadica*, *H. brasiliana*, *H. superba*. 2008. 191p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

SILVA, C.V.; Reis, A.L.V.; FERRER, S.R.; GUERREIRO, H.M.N.; BARROS, T.F.; VELOZO, E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.20, p. 355-60, 2010.

SILVA, E.C.B.F.; SAMICO, T.M.; CARDOSO, R.R.; RABELO, M.A.; NETO, A.M.B.; MELO, F.L.; ANA LOPES, A.C.S.; ACA, I.S.; MACIEL, M.A.V. Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. Revista da Escola de Enfermagem da USP. 46(1):132-7. 2012

SILVA, I.V.; MORAIS, R.B.; FRANCISCO, T.; DESSAI, S.; PASTILHA, P.; CUNHA, F. Dois casos de Quêrion por *Trichophyton mentagrophytes*. Nascer e Crescer - Revista do Hospital de Crianças Maria Pia. vol.21 no.4 Porto dez. 2012.

SIMÕES, C. M. O. (Org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2007, p 547-602.

SINGH, H.; DIXIT, S.; VERMA, P.C.; SINGH, P.K. Evaluation of Total Phenolic Compounds and Insecticidal and Antioxidant Activities of Tomato Hairy Root Extract. *Journal of Agricultural Food Chemical*. 62, 2588–2594. 2014.

SIQUEIRA, A.L.; DANTAS, C.G.; GOMES, M.Z.; PADILHA, F.F.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. *Revista de odontologia da UNESP* vol.43 n°6 Araraquara nov./dez. 2014.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evidence Based Complement Alternative Medicine*.; 3(2): 249-54. 2006.

VICTORIA ,F.N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SILVA, W.P.; MOTTA, A.S.; NASCENTE, P.S.; Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2668–2674. 2012.

VICTORIA,F.N.; BRAHMC, A.S.; SAVEGNAGOC, L.; LENARDÃO, E.J, Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity., *Neuroscience Letters* 544, 2 105–109. 2013.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plants extracts preliminary screening studies. *Journal Ethnopharmacology* 115:140-146. 2008.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *Journal Agricultural Food Chemical* 49, 4083-4089. 2001

