

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA**

**Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa
do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam.**

Karine Custódio Garcia

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

**Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa
do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, Universidade Estadual Paulista -
UNESP, como parte dos requisitos para o
título de mestre em Biociências e
Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de
concentração: Bioquímica

Karine Custódio Garcia

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

G216a Garcia, Karine Custódio
Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam. / Karine Custódio Garcia. - Araraquara, 2016.
167 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti.

1. *Eugenia brasiliensis*. 2. Grumixama. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Oxigênio e Nitrogênio (Espécies reativas). 5. Atividade antioxidante. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

KARINE CUSTÓDIO GARCIA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA POLPA DO
FRUTO DA *EUGENIA BRAZILIENSIS* LAM**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 27 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI



CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE



ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por iluminar, abençoar e guiar os meus passos em todos os obstáculos presentes nesta caminhada. Obrigada por me levantar, sempre me dando forças para prosseguir.

Aos meus pais, Luiz e Rosa, por me ensinarem a nunca perder a fé e a paciência. Por me proporcionarem inúmeras oportunidades e por abdicarem de seus sonhos para realizar os meus, serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim. Agradeço a vocês, pelos momentos que, em minha ausência, souberam respeitar e valorizar meus esforços, apesar da saudade. Obrigada sempre pelo carinho, apoio e compreensão. Agradeço também ao meu irmão Luizinho que sempre me ajudou de alguma forma no meu trabalho, apoiando sempre minhas decisões. Amo muito vocês.

Agradeço meu noivo, Rodolfo, que mesmo longe, vivenciou meu dia a dia e sempre esteve disposto a me ajudar da melhor maneira possível, não tenho como agradecer as belas palavras e ao carinho, mesmo em meus piores momentos. Obrigada também por entender minha ausência em todo esse período e que mesmos assim sempre esteve ao meu lado. Amo você lindo!

A minha tia e segunda mãe, Anna Rita (*in memoriam*), que partiu durante o meu mestrado. Aonde quer que esteja me transmite a certeza da sua proteção e amor em todos os momentos. Sua presença ainda é constante na minha vida e sei que além de me proteger de todos os perigos, me dá forças para buscar tudo aquilo que almejo. Cheguei aonde cheguei nesta vida graças também a você. Obrigada por sempre acreditar em mim. Saudades das nossas conversas! Amo você.

Agradeço imensamente ao meu querido orientador, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, que se dedicou ao máximo para que este trabalho se realizasse. Obrigada por depositar em mim sua confiança e por me tornar uma aluna melhor a cada dia. Tenho grande respeito e admiração. Agradeço também por me acolher, por dispensar seu tempo e conhecimento comigo, principalmente por confiar naquilo que faço. Deixo o meu muito obrigado a este profissional que abriu todas as portas e deu todas as possibilidades para tornar meu sonho realidade. Sou uma profissional muito diferente, daquele que começou o mestrado a 2 anos atrás.

Minha sincera gratidão a Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, por acreditar em meu potencial e força de vontade. Também teve fundamental importância para que eu ingressasse no mundo acadêmico. Gostaria que ela soubesse que é tão bonita por fora

como é bonita por dentro. Gostaria de me tornar pelo menos um décimo da profissional que é.

Agradeço aos Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos e Profa. Dra. Taís Maria Bauab por ceder gentilmente às dependências de seus laboratórios para que eu pudesse realizar parte deste trabalho. Obrigada por serem sempre tão solícitos, pela atenção, disponibilidade, ajuda e interesse. Agradeço muito a vocês por isso.

A toda equipe do laboratório de Bioquímica, principalmente ao Carlos pela atenção e Renata, que sempre me auxiliou tanto nos experimentos quanto em toda a finalização deste trabalho. Obrigada pela disposição.

A toda equipe do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, pela atenção e carinho, principalmente ao meu querido amigo Matheus, que teve grande contribuição para este trabalho. Agradeço do fundo do meu coração pela amizade e pelas belas palavras que sempre me ergueram. Você é um grande profissional, tem tudo para alcançar o que almeja.

Agradeço também ao laboratório de Farmacognosia e ao técnico Caio, pela atenção sempre que solicitado. Obrigada por me auxiliarem e permitirem meu avanço na pesquisa.

O meu obrigada também a equipe do laboratório de Imunologia e a técnica Marisa, principalmente a amiga Francine por toda prestatividade para a realização dos ensaios de citotoxicidade e contribuição ao trabalho, além de partilhar de um companheirismo saudável e cheio de bons momentos.

Meus sinceros agradecimentos às minhas queridas amigas Marília, que veio morar comigo e Francine; amigas que ganhei durante este mestrado, que sempre me apoiaram, me ajudaram em momentos difíceis e participaram de muitos momentos bons. Obrigada pelo carinho e cuidado. Vocês fizeram e fazem toda diferença todos os dias. Estarão no meu coração pro resto da vida.

E por último, mas não menos importante, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU) são afecções comuns, que podem resultar em níveis significantes de morbidade. Os agentes etiológicos associados a ITU são bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além do fungo comensal *Candida albicans*. Além dos parâmetros clássicos associados à infecção, as ITU proporcionam o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, o que também acarreta injúria tecidual, bem como, também ocorre um alto índice de micro-organismos resistentes aos fármacos disponíveis na clínica médica, o que demanda na prospecção por novas abordagens terapêuticas complementares. No Brasil, a espécie *Eugenia brasiliensis* Lam. é conhecida como “berry brasileira” ou grumixama, e existem poucos relatos na literatura demonstrando sua atividade biológica. Este fator associado à escassez de estudos sobre a espécie brasileira *E. brasiliensis*, despertou o interesse em novos estudos relacionados à sua ação sobre microrganismos relacionados a ITU e atividade antioxidante. Os extratos utilizados neste estudo foram obtidos a partir da polpa do fruto liofilizado de *E. brasiliensis* com diferentes solventes, com objetivo de obter dados de sua composição fitoquímica, avaliar suas atividades antioxidantes, antimicrobianas e citotóxicas. Foram utilizados como padrões para os ensaios de atividade antioxidante o ácido elágico, quercetina, ácido gálico, ácido cafeico e trolox. Na caracterização química dos extratos foram determinados, os teores de flavonoides totais, compostos fenólicos totais, antocianinas totais e açúcares totais e realizados testes de identificação para taninos; além disso, um perfil cromatográfico por CLAE-UV foi obtido. O extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana para cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Candida albicans* ATCC18804, enquanto o extrato aquoso demonstrou atividade antimicrobiana apenas frente ao *S. aureus*. Em relação à atividade antioxidante observou-se que os “padrões” ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico e quercetina foram mais eficientes do que as amostras para todos os ensaios, e entre os extratos de *E. brasiliensis*, o extrato etanólico demonstrou ter maior eficiência para a captura das espécies reativas $O_2^{\bullet-}$, $ABTS^{+ \bullet}$, $HOCl/OCl^-$ e $TauCl$; enquanto que o extrato aquoso apresentou maior eficiência para o ensaio de clareamento da crocina na captura do radical $ROO^{\bullet}$ e maior potencial redutor do íon férrico. Para o ensaio do $NO^{\bullet}$ e H_2O_2 nenhum dos extratos apresentou atividade. Quanto ao potencial citotóxico, os extratos de *E. brasiliensis* não apresentaram citotoxicidade frente as linhagens celulares de origem não tumoral (macrófagos, linfócitos e células VERO).

PALAVRAS-CHAVE: *Eugenia brasiliensis*, grumixama, atividade antimicrobiana, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, atividade antioxidante.

ABSTRACT

The urinary tract infections (UTI) are common disorders, which may result in significant levels of morbidity. The etiological agents associated with UTI are Gram-negative and Gram-positive, plus commensal *Candida albicans* fungus. In addition to the classics associated with infection parameters, the ITU provide increased formation of reactive oxygen and nitrogen species, which also causes tissue damage, as well as a high rate of resistant microorganisms to drugs available in clinical practice, which requires the prospecting for new medicinal approaches. In Brazil, the specie *Eugenia brasiliensis* Lam. are known as “brazilian berry” or grumixama, and there are few reports in the literature demonstrating your biologic activity. This factor associated with the lack of studies on the brazilian specie *E. brasiliensis* stir up interest in new research related to the activities of microorganisms related to ITU and antioxidant activity. The extracts used in this study were obtained from the fruit pulp lyophilized of *E. brasiliensis* with different solvents in order to get data from their phytochemical composition, evaluate their antioxidant activity, antimicrobial and cytotoxicity. For the evaluation of antioxidant activity it was used like standards acid elagic, quercetina, acid gallic, acid cafeico and trolox. In the chemical characterization of the extracts were determined, the contents of total flavonoids, total phenolics, total anthocyanins and total sugars were determined and were performed to tannins; moreover, a profile by HPLC-UV chromatogram was obtained. The ethanol extract showed activity antimicrobial for the strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Candida albicans* ATCC18804, while the aqueous extract only demonstrated activity antimicrobial for *S. aureus*. In relation to the antioxidant activity it is observed that the “standards” ellagic acid, gallic acid, caffeic acid and quercetin were more efficient and among extracts of *E. brasiliensis* ethanolic extract showed greater efficiency for capture of reactive species $O_2^{\bullet-}$, $ABTS^{\bullet+}$, $HOCl/OCl^-$ and $TauCl$; while the aqueous extract was more efficient for crocina bleaching assay in capturing the radical $ROO^{\bullet}$ and higher potential reducer of ferric ion. For the test of $NO^{\bullet}$ and H_2O_2 none of the extracts showed activity. As to the cytotoxic potential, *E. brasiliensis* extracts showed no cytotoxicity on cell lines of non-tumor origin (macrophages, lymphocytes and VERO).

KEYWORDS: *Eugenia brasiliensis*, berries, antimicrobial activity, reactive oxygen and nitrogen species, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam. variedade amarela (A) e variedade roxa (B).....	22
Figura 2. Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu (Adaptado de Oliveira et al. (2009).....	38
Figura 3. Formação do complexo flavonoide-Al ³⁺	39
Figura 4. Reação de oxidação da carbonila pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico.....	41
Figura 5. Ensaio de determinação da CIM pela técnica de diluição em microplacas revelada com solução de resazurina	45
Figura 6. Representação da redução da resazurina em resarufina.	45
Figura 7. Ensaio de determinação da CIM por meio de diluição em microplacas revelada com solução aquosa de TTC	47
Figura 8. Representação da redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada).	47
Figura 9. Representação da formação do ABTS ^{•+}	49
Figura 10. Representação da geração do ânion superóxido e a ação de um antioxidante para inibir a formação de formazana.	50
Figura 11. Representação oxidação do TNB à DTNB pelo H ₂ O ₂	51
Figura 12. Estrutura química da crocina.	52
Figura 13. Reações envolvidas no clareamento da crocina termólise do AAPH e a ação de um antioxidante que inibe este processo.	53
Figura 14. Representação do mecanismo de detecção do nitrito usando o reagente de Griess.	55
Figura 15. Curva analítica do ácido gálico para determinação de compostos fenólicos totais.....	59
Figura 16. Curva analítica da quercetina para determinação de flavonoides totais.	62
Figura 17. Curva analítica da glicose para determinação de açúcares totais.	65
Figura 18. Cromatogramas do extrato aquoso (A) e etanólico (B) de <i>E. brasiliensis</i> utilizando CLAE-DAD (270 nm).....	69
Figura 19. Espectros no UV/Vis dos picos do extrato aquoso referentes ao cromatograma da figura 18(A): 6 (A), 10 (B) e 20 (C).	70
Figura 20. Espectros no UV/Vis dos picos do extrato etanólico referentes ao cromatograma da figura 18 (B): 5 (A), 11 (B) e 21 (C).....	71
Figura 21. Espectros no UV/Vis dos picos 3 referentes aos cromatogramas dos extratos aquoso (A) e etanólico (B).	73

Figura 22. Curva de inibição dos extratos aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> contra a cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	77
Figura 23. Curvas de inibição dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de <i>E. brasiliensis</i> contra as cepas de <i>S. saprophyticus</i>	77
Figura 24. Curvas de inibição dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de <i>E. brasiliensis</i> contra as cepas de <i>E. coli</i>	78
Figura 25. Curvas de inibição dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de <i>E. brasiliensis</i> contra as cepas de <i>C. albicans</i>	80
Figura 26. Inibição (captura) do ABTS ^{•+} (IC ₅₀ µg/mL), pelos padrões, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS ^{•+} na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).	83
Figura 27. Inibição (captura) do ABTS ^{•+} (IC ₅₀ µg/mL), pelos extratos aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> , em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS ^{•+} na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).....	84
Figura 28. Inibição (Captura) do ABTS ^{•+} (IC ₅₀ µg/mL), pelos padrões e extratos. Análise estatística, onde (a) representa a comparação vs gálico, (b) vs ácido elágico, (c) vs quercetina, (d) vs cafeico, (e) vs trolox, (f) vs extrato etanólico, (g) vs extrato aquoso; letras diferentes denotam diferença significativa, com p<0,05.....	84
Figura 29. Inibição (captura) do O ₂ ^{•-} (IC ₅₀ µg/mL), pelos padrões, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH8,3. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).	86
Figura 30. Inibição (captura) do O ₂ ^{•-} (IC ₅₀ µg/mL), pelos extratos aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> , em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH8,3. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS ^{•+} na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).	87
Figura 31. Inibição (Captura) do O ₂ ^{•-} (IC ₅₀ µg/mL), pelos padrões e extratos. Análise estatística, onde (a) representa a comparação vs elágico, (b) vs ácido gálico, (c) vs quercetina, (d) vs cafeico, (e) vs trolox, (f) vs extrato etanólico, (g) vs	

extrato aquoso; letras diferentes denotam diferença significativa, com $p < 0,05$	88
Figura 32. Inibição (captura) do H_2O_2 pela catalase, em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 6,6. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TNB na presença de diferentes concentrações de catalase.	90
Figura 33. Potencial redutor para o íon férrico pelos padrões ($\mu\text{g/mL}$), em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6. As figuras apresentam a média das absorbâncias do complexo azul da Prússia formado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).	91
Figura 34. Potencial redutor para o íon férrico pelos extratos aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> ($\mu\text{g/mL}$), em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6. As figuras apresentam a média das absorbâncias do complexo azul da Prússia formado na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).	92
Figura 35. Potencial redutor para o íon férrico pelos padrões e extratos de <i>E. brasiliensis</i> ($\mu\text{g/mL}$), em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6	92
Figura 36. Representação entre as razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de clareamento da crocina com da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).	95
Figura 37. Representação entre as razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de clareamento da crocina com os extrato aquoso (A) e etanólico (B) de <i>E. brasiliensis</i>	96
Figura 38. Inibição (captura) de NO^* (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pela quercetina, ácidos gálico, cafeico e trolox em tampão fosfato de sódio 20 mmol/L, pH 7,4. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias de nitrito formado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido gálico (B), ácido cafeico (C) e trolox (D).	99
Figura 39. Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelos padrões, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).	101

Figura 40. Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ (IC ₅₀ µg/mL), pelos extratos aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> , em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).	102
Figura 41. Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ (IC ₅₀ µg/mL),pelos extratos e padrões. Análise estatística, onde (a) representa a comparação vs quercetina, (b) vs ácido elágico, (c) vs ácido gálico, (d) vs cafeico, (e) vs trolox, (f) vs extrato etanólico, (g) vs extrato aquoso; letras diferentes denotam diferença significativa, com p<0,05.....	102
Figura 42. Inibição (captura) de TauCl (IC ₅₀ µg/mL), pelos padrões, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido gálico (B), ácido cafeico (C) e trolox (D).....	104
Figura 43. Inibição (captura) de TauCl (IC ₅₀ µg/mL), pelo extrato aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> , em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).	105
Figura 44. Inibição (captura) da TauCl pelos extratos e padrões. Análise estatística, onde (a) representa a comparação vs ácido gálico, (b) vs ácido cafeico, (c) vs trolox, (d) vs quercetina, (e) vs extrato etanólico, (f) vs extrato aquoso; letras diferentes denotam diferença significativa, com p<0,05.	105
Figura 45. Determinação da viabilidade celular em Macrófago	108
Figura 46. Determinação da viabilidade celular em Linfócito	108
Figura 47. Determinação da viabilidade celular em VERO	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Obtenção e rendimento dos extratos.....	58
Tabela 2. Concentração de compostos fenólicos totais (CFEAG).....	60
Tabela 3. Concentração de flavonoides totais (FLAVEQ).....	62
Tabela 4. Concentração de antocianinas totais (C3G)	63
Tabela 5. Açúcares totais em mg de açúcar total ou açúcares não redutores ou açúcares redutores equivalentes a glicose por g de extratos de <i>E. brasiliensis</i>	65
Tabela 6. Resultados obtidos nos ensaios na identificação de taninos no extrato bruto de <i>E. brasiliensis</i>	67
Tabela 7. Concentração inibitória mínima para as cepas bacterianas dos extratos aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> e controle positivo.....	74
Tabela 8. Concentração inibitória mínima para as cepas fúngicas dos extratos aquoso e etanólico de <i>E. brasiliensis</i> e controle positivo.	78
Tabela 9. Comparação para absorbâncias igual a 2,0 entre as concentrações dos extratos de <i>E. brasiliensis</i> e padrões ($\mu\text{g/mL}$).	93
Tabela 10. Equação de competição cinética, comparação entre valores de IC_{50} e o coeficiente angular, para o ensaio de clareamento da crocina entre os extratos de <i>E. brasiliensis</i> e padrões.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPH – 2,2'-Azobis-2-metilpropionamidina
CBM – concentração bactericida mínima
CFM – concentração fungicida mínima
CIM – concentração inibitória mínima
CMH – caldo Müeller Hinton
CSD – caldo Sabouraud Dextrose
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
AMH – agar Müeller Hinton
ASD – agar Sabouraud Dextrose
UFC – unidades formadoras de colônia
DMSO – dimetilsulfóxido
DTNB – ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB)
ERON – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
HOCl – ácido hipocloroso
 IC_{50} – concentração necessária para inibir 50% da atividade total.
ITU – infecção do trato urinário
 NAD^+ – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NBT – azul de nitrotetrazólio
 $\text{NO}^\bullet$ – óxido nítrico
 $\text{O}_2^{\bullet-}$ – radical ânion superóxido
 OCl^- – ânion hipoclorito
PMS – metassulfato de fenazina
 $\text{ROO}^\bullet$ – radical peroxila
TauCl – taurina cloramina
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNB – ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Capítulo 1.....	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Justificativa	18
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	21
1.2.1. Gênero <i>Eugenia</i>	21
1.2.2. <i>Eugenia Brasiliensis</i> Lam.	22
1.2.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e enxofre (ERE) ..	23
1.2.3.1. Ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$)	24
1.2.3.2. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	25
1.2.3.3. Radical hidroxila ($HO^{\bullet}$)	26
1.2.3.4. Ácido hipocloroso ($HOCl$)	27
1.2.3.5. Óxido Nítrico ($NO^{\bullet}$) / Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)	28
1.2.3.6. Radical peroxila ($ROO^{\bullet}$) e alcóxila ($RO^{\bullet}$)	29
1.2.3.7. Oxigênio singlete (1O_2)	29
1.2.4. Estresse Oxidativo	30
1.2.5. Antioxidantes	31
1.3. Infecção do trato urinário	33
1.4. Processo inflamatório e estresse oxidativo	36
2. OBJETIVOS	37
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Material vegetal	37
3.2. Obtenção dos extratos	37
3.3. Quantificação de compostos fenólicos totais	38
3.4. Quantificação de flavonoides totais	38
3.5. Quantificação de antocianinas totais	39
3.6. Quantificação de açúcares totais	40
3.7. Extração e identificação de taninos	41
3.8. Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE	42
3.9. Determinação da atividade antimicrobiana	43
3.9.1. Micro-organismos	43
3.9.2. Estocagem e manutenção das cepas microbianas	43
3.9.3. Avaliação da atividade antibacteriana	43
3.8.3.1. Padronização dos inóculos bacterianos	43
3.8.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	44
3.8.3.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	44
3.8.3.4. Leitura com revelador	44

3.9.4. Avaliação da atividade antifúngica	45
3.9.4.1. Padronização dos inóculos fúngicos.....	45
3.9.4.2.Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	46
3.9.4.3.Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	46
3.9.4.4. Leitura com revelador.....	46
3.9.4.5.Leituras espectrofotométricas.....	47
3.10. Avaliação da atividade antioxidante.....	48
3.10.1. Ensaio de captura do ABTS ^{•+}	48
3.10.2. Ensaio de captura do O ₂ ^{•-}	49
3.10.3. Ensaio de captura do H ₂ O ₂	50
3.10.4. Determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP)	51
3.10.5. Ensaio do clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina: captura do ROO [•]	52
3.10.6. Ensaio de captura para óxido nítrico (NO [•])	54
3.10.7. Ensaio de captura para o HOCl/OCl ⁻ e para a taurina cloramina (TauCl)	55
3.11. Avaliação do potencial citotóxico	56
3.11.1. Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos.....	56
3.11.2. Avaliação da citotoxicidade contra cultura de células Vero	57
3.11.3. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT.....	57
3.12. Análise estatística	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1. Rendimento dos extratos	58
4.2. Quantificação de fenóis totais.....	58
4.3. Quantificação de flavonoides totais.....	62
4.4. Quantificação de antocianinas totais	63
4.5. Quantificação de açúcares totais.....	64
4.6. Identificação de taninos.....	66
4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.....	68
4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana	73
4.9. Avaliação da atividade antioxidante	81
4.9.1. Ensaio de captura do ABTS ^{•+}	82
4.9.2. Ensaio de captura para O ₂ ^{•-}	85
4.9.3. Ensaio de captura do H ₂ O ₂	89
4.9.4. Determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP).....	90
4.9.5. Ensaio do clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina: captura para ROO [•]	94
4.9.6. Ensaio de captura para NO [•]	98
4.9.7. Ensaio de captura para HOCl/OCl ⁻	100
4.9.8. Ensaio de captura para TauCl	103
4.10. Avaliação do potencial citotóxico	106
5. CONCLUSÕES	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
Capítulo 2.....	136
Artigo: Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities and cytotoxicity of the fruit pulp of <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.....	138

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

O excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) no organismo são combatidos por antioxidantes endógenos ou obtidos da dieta. O consumo de antioxidantes presentes nos vegetais está associado à diminuição de danos celulares, que prejudicam as funções metabólicas importantes, pois previnem o estresse oxidativo. Estas disfunções metabólicas estão relacionadas às doenças cardiovasculares, câncer, doenças crônicas e neurodegenerativas, entre outras (DRÖGE, 2002; OLIVEIRA et al., 2009, BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

Atualmente, existe um interesse renovado e crescente na investigação das propriedades de componentes vegetais e seus derivados, com a finalidade de descrever compostos naturais biologicamente ativos (SEIDIL, 2000; ARAÚJO et al, 2004; LIMA et al, 2005, DEL RE, JORGE, 2012). Além das propriedades nutricionais, as frutas têm sido recomendadas por sua riqueza em componentes com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, entre outras (LIN, MORRISON, 2002; GAO, FENG, JIANG, 2013). Produzidos com variedade estrutural, o que lhes confere propriedades diferenciadas, estes compostos biossintetizados são classificados como alcaloides, terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, dentre outras classes (JIN-MING et al., 2003; EZZATZADEH et al., 2012). Os principais compostos de origem vegetal que apresentam ação antioxidante são a vitaminas C e E, taninos, flavonoides e outros compostos fenólicos (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; SANDES; DI BLASI, 2000; SIMÕES et al., 2010).

A capacidade fitoquímica de certos extratos em inibir ou retardar a oxidação de outras moléculas através de supressão da iniciação ou propagação de reações de oxidação em cadeia tornou-se uma alternativa na medicina complementar. Devido a esses princípios terapêuticos são utilizados como antimicrobianos, agentes antitumorais, anti hepatotóxicos, nutracêuticos, adoçantes, aditivos alimentares, alimentos para animais, entre outras aplicações (GORTZI et al., 2008; VERMA et al, 2009; PRASANNABALAJI et al., 2012; DOUGHARI et al, 2012; MAHBOUBI et al, 2013).

Dentro deste contexto, também há o crescente interesse na descoberta de novos agentes com potencial antimicrobiano advindos de produtos naturais contra uma série de agentes infecciosos. Diversos vegetais têm apresentado marcante atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, justificando dessa maneira a intensa busca na

etnomedicina a caracterização de propriedades antimicrobianas de compostos presentes nas plantas (DIAZ et al., 2010).

Na extração e isolamento de compostos a partir de amostras vegetais utiliza-se métodos de separação, com diferentes solventes polares e apolares para extração de compostos individuais (SU et al., 2012). Aumentando de forma gradual a polaridade do solvente na extração sequencial tal como clorofórmio, acetato de etila, etanol, água e metanol, pode-se obter qualidade e quantidade melhores de compostos de espécies vegetais (NCUBE et al., 2012). Porém, em um estudo utilizando extração simples, mostrou resultados mais significativos contra doenças do que uma fração isolada ou específica purificada. Estes dados foram explicados pela interação entre os diferentes grupos de bioativos no extrato que aumentam o efeito terapêutico mais do que os compostos individuais (WILLIAMSON, 2001; MOHAMED et al., 2010).

Dentre os produtos naturais, obtidos de amostras vegetais, e usualmente muito utilizadas são preparações (produtos) a partir de berries como por exemplo a *Vaccinium macrocarpon* Aiton para prevenção de infecções do trato urinário, as quais vêm sendo estudada desde a década de 1920, quando pesquisadores americanos verificaram a acidificação da urina após a ingestão de grandes quantidades da fruta (BLATHERWICK, LONG, 1923). Posteriormente, estudos utilizando o extrato dos frutos de *V. macrocarpon* mostraram sua capacidade de prevenir infecções do trato urinário após transplante renal, e ainda promover a redução da intensidade dos sintomas desta infecção em pacientes hospitalizados (MCMURDO et al., 2005; PAGONAS et al., 2012). Além desses mecanismos recentemente postulados, segundo Vasileiou (2013) esta berry (*V. macrocarpon*) também tem capacidade antioxidante sobre espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio geradas no estresse oxidativo concomitante à infecção renal (PATEL et al.; 2011).

As infecções de trato urinário respondem por grande parte dos processos infecciosos, comunitários e hospitalares. Estão entre as doenças infecciosas mais diagnosticadas, perdendo apenas para as infecções respiratórias, e podem resultar em uma significativa mortalidade; são responsáveis por uma grande proporção do consumo de agentes antimicrobianos, e possuem amplo impacto sócio econômico, sendo a principal causa das infecções nosocomiais (BLACK, 2002; REMONATTO, 2006).

Pertencente ao gênero *Eugenia*, um dos maiores dentro da família Myrtaceae, a *Eugenia brasiliensis* Lam, comumente conhecida como grumixama, ou berry brasileira é um exemplo de planta com potencial uso antioxidante e antimicrobiano. Em estudo

realizado por Silva et al. (2014), constatou-se a presença de compostos fenólicos na *E. brasiliensis* Lam. Além disso, o extrato etanólico 80% da polpa de *E. brasiliensis* demonstrou ação antioxidante na captura de algumas espécies reativas e atividade anti-inflamatória (INFANTE et al., 2016). Alguns trabalhos demonstram outros potenciais terapêuticos de espécies do gênero *Eugenia*, como: efeito hipoglicemiante, antioxidante (RAVI et al., 2004; TAKAO et al., 2015), efeito protetor contra a hipertrofia renal causada pelo diabetes em ratos tratados com extrato etanólico da *Eugenia jambolana* Lam (GROVER, et al., 2001), efeito antitumoral de seus taninos hidrolisáveis isolados em células HL-60 (YANG, et al., 2000) e efeito anticonvulsivante em camundongos tratados com o óleo essencial da *Eugenia caryophyllata* Thunb (POURGHOLAMI et al., 1999).

Estudos mostraram que espécies do gênero *Eugenia* apresentam atividade antibacteriana, como, por exemplo, a *Eugenia caryophyllus* (Spreng), que apresentou inibição do crescimento de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* (POURGHOLAMI et al., 1999). A mesma espécie inibiu também o crescimento de *Helicobacter pylori*, bactéria associada à pelo aparecimento de úlcera gástrica (LI et al., 2005). O óleo essencial obtido das folhas de *Eugenia uniflora* L. demonstrou forte inibição do crescimento de cepas de *Bacillus cereus* (OGUNWANDE et al., 2005). A atividade antibacteriana da espécie *Eugenia umbelliflora* O. Berg também já foi descrita na literatura, quando folhas e frutos destas espécies mostraram atividade promissora contra micro-organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* (MACHADO et al., 2005).

As espécies *E. brasiliensis* e *V. macrocarpon*, conhecidas popularmente como berries são encontradas em regiões geográficas distintas e, apesar de possuírem diferentes classificações taxonômicas, apresentam grande potencial farmacológico, no que diz respeito a propriedades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, além de semelhanças na composição química. Atualmente o gênero *Eugenia* contém espécies bem descritas em relação potencial das mesmas propriedades supracitadas. Estes fatores, associados à falta de estudos da espécie brasileira *Eugenia brasiliensis* despertam o interesse para novas pesquisas relacionadas à sua atuação sobre infecções no trato urinário e renal, bem como, nos permite prospectar se os extratos provenientes desta espécie são possíveis agentes terapêuticos, promissores no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, tal como a ITU.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Gênero *Eugenia*

A família Myrtaceae compreende cerca de 80 gêneros, com aproximadamente 3.000 espécies de árvores e arbustos, largamente espalhadas nas florestas brasileiras e distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do globo (VIEIRA et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2005). Esta família está dividida em duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae. No Brasil, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, onde se inclui o gênero *Eugenia* (LIMBERGER et al., 2004).

O gênero *Eugenia* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente 500 espécies de árvores e arbustos, dos quais cerca de 400 distribuem-se no Brasil (DE OLIVEIRA et al., 2005) e assumem destaque especial, por fornecer extratos utilizados na medicina popular como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios (HUSSEIN et al., 2003), antidiabéticos, nas arritmias ou insuficiência cardíaca (VENDRUSCOLO et al., 2005) entre outras aplicações (TIMBOLA et al., 2002).

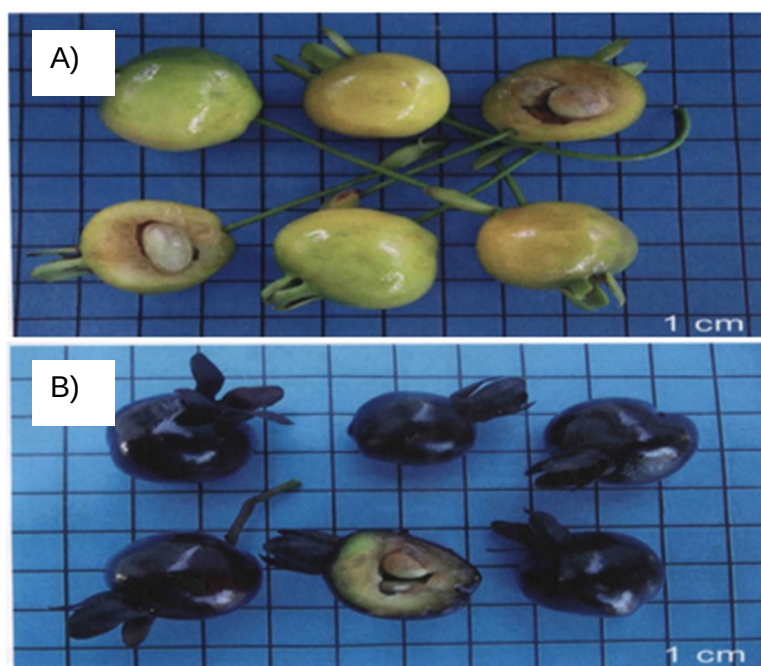
No Brasil, entre as espécies mais conhecidas e apreciadas de *Eugenia* encontram-se *E. uniflora* L., *E. edulis*, *E. jambolana* e *E. caryophyllus*, comumente conhecidas como pitangueira, jabuticabeira, jambolão e cravo-da-Índia, respectivamente (REVILLA, 2002; PEPATO et al., 2005, BANDYOPADHYAY et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; HEMALATHA et al., 2015).

Estudos químicos com espécies do gênero *Eugenia* mostraram a presença de metabólitos secundários das classes de flavonoides, taninos hidrolisáveis, terpenos, incluindo também metabólitos voláteis presentes em óleos essenciais (LUNARDI et al., 2001; MAHMOUD et al., 2001; HUSSEIN et al., 2003, FRIGHETTO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; PRADO et al., 2014), enquanto, sob o ponto de vista farmacológico, estudos realizados com extratos e compostos isolados, comprovaram as atividades anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antibacteriana, antipirética, antidiabética e antioxidante (KUSKOSKI et al., 2003; VELÁZQUEZ et al., 2003; RAVI et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2005; LIMA et al., 2006; OUSSALAH et al., 2007; BAGETTI et al., 2009; JASNA et al. 2013; TAKAO et al.; 2015). A análise dos dados da literatura demonstra que o gênero *Eugenia* possui importantes espécies vegetais que, apresentam diversas ações farmacológicas, porém a espécie *E. brasiliensis* ainda é pouco estudada.

1.2.2. *Eugenia Brasiliensis* Lam.

A espécie vegetal *Eugenia brasiliensis* Lamarck (família Myrtaceae) é popularmente conhecida como grumixama, cereja-brasileira ou berry brasileira. É nativa do Brasil, e encontrada nas regiões da mata litorânea, desde o sul da Bahia até Santa Catarina (LORENZI, 1992; FISCHER et al., 2005). Existem três variedades da espécie de acordo com a cor dos frutos: variedade α apresenta frutos roxos, sendo a mais comum; variedade β , com frutos vermelhos e variedade γ , com frutos amarelos (Figura 1) (MORENO et al., 2007).

Figura 1. *Eugenia brasiliensis* Lam. variedade amarela (A) e variedade roxa (B).



Nota: Fotografia retirada do livro série frutas da mata atlântica, de Sérgio Fernando Sartori.

Tem sido amplamente estudada por suas propriedades farmacológicas, tais como: anticolinesterásica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (SERAFIN, 2006; MAGINA, et al., 2009; SIEBERT et al., 2014; INFANTE et al., 2016). Recentemente, estudos *in vivo* demonstram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* apresenta efeito antidepressivo, em baixas concentrações; tal efeito foi associado a sua interação com os receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A} e 5-HT₂), noradrenérgicos (α ₁) e dopaminérgicos (D₁ e D₂) (COLLA et al., 2012). Além disso, antocianinas isoladas desta espécie, como delfinidina e cianidina, foram capazes de

inibir a liberação de interleucina-8, uma citocina pró-inflamatória; em cultura de células, após estímulo inflamatório (PIETROVSKI et al., 2008).

Para a espécie *E. brasiliensis*, já foram identificados alguns compostos. No óleo essencial das folhas estão presentes α - e β -pineno, α - e β -selineno, β -cariofileno, espatulenol e T-cadinol. Nos frutos já foram identificados carotenoides, sesquiterpenos oxigenados, antocianinas (delfinidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo), ácido ursólico, flavonoides (miricetina, rutina, kaempferol e quercetina) e taninos hidrolisáveis (VÉRIN, 1996; APEL, et. al., 2004; FISCHER et al., 2005; FRIGHETTO et al., 2005; MORENO et al., 2007; REYNERTSON et al., 2008, ABE, et al., 2011, FLORES et al. 2012; SILVA et al., 2014, TEIXEIRA et al.; 2015).

1.2.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e enxofre (ERE)

Por definição, radicais livres são espécies geradas durante processos de oxido-redução que ocorrem no metabolismo celular dos seres vivos, onde estão envolvidos com a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de biomoléculas importantes. O radical livre é um átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo; é bem estabelecido que os elétrons sejam mais estáveis quando se encontram pareados, ou seja, com a valência saturada. Desta forma, os radicais livres são em sua maioria altamente instáveis e reativos. A reatividade dos radicais livres ocorre para uma variedade de moléculas ou substratos (BARREIROS, DAVID, DAVID 2006). Há também, espécies não radicalares como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl), que embora não possuam elétrons desemparelhados apresentam alta reatividade e podem gerar espécies radicalares na presença de algumas biomoléculas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2010)

A produção de ERO e/ou espécies ERN são parte integrante da homeostase do metabolismo e, portanto, observada em diversos processos fisiológicos (NOGUTI et al., 2013). Porém, a produção excessiva desses oxidantes pode resultar em estresse oxidativo, ou seja, em um desequilíbrio entre processos pró e antioxidantes. O dano celular resulta basicamente do ataque destas ERO e/ou ERN sobre macromoléculas, tais como DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos. Existem evidências de que o estresse oxidativo altera os processos de transformação e morte celular, com consequências diretas sobre a fisiopatologia de doenças crônicas, como: autoimunidade, infecções,

doenças cardiovasculares, pulmonares, renal, intoxicações por xenobióticos e o câncer (VASCONCELOS et al., 2007; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2010; ROSSO, 2013).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente aceitando até quatro elétrons, resultando na formação de 2 H_2O . Durante esse processo, podem ser formados intermediários reativos, como radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Outras espécies reativas formadas durante os processos metabólicos são o oxigênio singlete (1O_2), radical alquila ($R^{\bullet}$), radical alcóxila ($RO^{\bullet}$), peróxila ($ROO^{\bullet}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). As ERO podem surgir também de outras fontes, como em reações da NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase, da auto-oxidação de catecolaminas, e até com o aumento dos níveis de angiotensina II, aldosterona, e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Raios-X, ultra-som e luz ultravioleta são fatores físicos que também podem promover a formação dessas moléculas reativas (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006; BERRY, HARE, 2004; CHATTERJEE, 2009; MATTILA et al., 2015). Além disso, nas reações inflamatórias, neutrófilos e monócitos, que desempenham um papel essencial na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos, liberam $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$ e o HOCl, associados aos peptídeos microbianos e proteases presentes nestas células, constituem um potente arsenal antimicrobiano (EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009, PISOSCHI, POP, 2015).

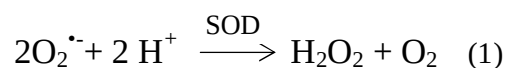
1.2.3.1. Ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$)

A produção de $O_2^{\bullet-}$ ocorre principalmente dentro da mitocôndria após a redução monoelétrica do oxigênio, durante a cadeia de transporte de elétrons e por complexos enzimáticos. A partir desta produção poderá ocorrer a formação das demais ERO, como o $HO^{\bullet}$, que possui reatividade ainda maior. Além disto, ocorre produção de $O_2^{\bullet-}$ em reações de oxidação não catalíticas, como a auto-oxidação de grupos heme (WINTERBOURN, 1990; KNIGHT, 1998). Estas espécies podem provocar sérios danos, reagindo com proteínas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos (DRÖGE, 2002; NELSON; COX, 2011).

Nas mitocôndrias ativas, cerca de 0,1 a 4 % do oxigênio utilizado na respiração forma o $O_2^{\bullet-}$ e esta quantidade é suficiente para ter efeitos letais, porém isso não acontece por ele ser rapidamente removido dos tecidos pelos mecanismos de defesa

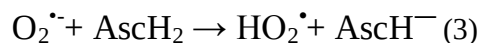
antioxidante do organismo como a presença da superóxido dismutase (SOD) (MATTILA et al., 2015; NELSON; COX, 2014).

O peróxido de hidrogênio é formado por dismutação espontânea do $O_2^{\bullet-}$ ou em reação catalisada pela SOD (reação 1), o que remove o $O_2^{\bullet-}$ dos sítios de sua formação (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; NELSON; COX, 2014).



Apesar dos danos que podem ser causados pelo $O_2^{\bullet-}$, este radical também é gerado pela ativação da NADPH oxidase que está presente na membrana de fagócitos, células presentes em processos inflamatórios, para combater vírus, bactérias e fungos. Apesar de apresentar fraca ação bactericida, a partir dele são geradas outras espécies reativas com forte atividade antimicrobiana, como HOCl e ONOO⁻ (DIAZ et al., 1998; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O radical pode ser protonado pela abstração de um próton ou de doadores de prótons, como o ácido ascórbico (Asc) (reações 2 e 3, respectivamente) em pH 7,0. Porém somente 0,25 % do $O_2^{\bullet-}$ sofre protonação, formando um oxidante mais forte, o radical hidroperoxil ($HO_2^{\bullet}$), que atravessa mais facilmente as membranas biológicas.



1.2.3.2. *Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)*

O H_2O_2 pode ser gerado pela dismutação espontânea do $O_2^{\bullet-}$ ou em reação, catalisada pela SOD (reação 1). Porém, a atividade de oxidases localizadas nos peroxissomas, como urato oxidase, glicose oxidase, oxidase D-aminoácido pode resultar na síntese direta de peróxido de hidrogênio pela redução bieletrônica de O_2 . H_2O_2 é capaz de produzir radicais altamente reativos como resultado da sua interação com íons de metal como o ferro e o cobre, em reações que produzem o $HO^{\bullet}$, e este radical pode assim participar na lipoperoxidação de membranas. A ação direta de H_2O_2 envolve o ataque sobre a estrutura de heme proteínas com a liberação de ferro, inativação de enzimas e, além disso, oxidação de DNA, lipídeos, grupos-SH, e geração de ceto-ácidos

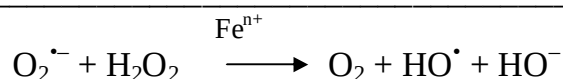
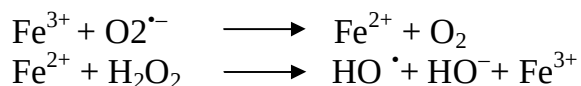
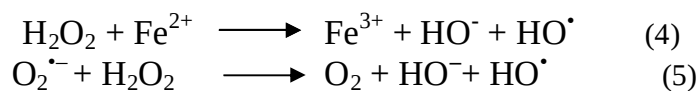
(GUTTERIDGE, 1994; KOHEN, NYSKA, 2002; VASCONCELOS et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Entretanto esse composto também possui ações benéficas ao nosso organismo, como por exemplo, a sua utilização pelos fagócitos na produção de ácidos hipohalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus e bactérias (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO et al., 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O H_2O_2 apresenta reatividade intermediária em relação ao $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{HO}^{\bullet}$ e, por ser uma molécula pequena, atravessa as membranas celulares, gerando o radical $\text{HOO}^{\bullet}$. Nos neutrófilos, que tem como função proteger os tecidos, e que contêm a enzima mieloperoxidase (MPO) (EC 1.11.1.7) catalisa a reação do H_2O_2 com Cl^- , produzindo outra ERO, o HOCl (NELSON; COX, 2014; BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

1.2.3.3. *Radical hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$)*

O $\text{HO}^{\bullet}$ é um dos radicais mais reativos, pois tem uma meia-vida praticamente determinada pelo tempo de colisão com uma biomolécula alvo, é da ordem de nanossegundos. Com alto potencial oxidante é capaz de reagir com várias biomoléculas, portanto uma vez formado pode causar modificações no DNA, danos nas proteínas, causando a inativação de enzimas e peroxidação lipídica; soma-se a isso o fato dos organismos não apresentarem mecanismos de defesa contra esse radical (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; BAYNES; DOMINICZAK, 2015)

Para a produção de $\text{HO}^{\bullet}$, existem dois mecanismos possíveis: a reação de Fenton (reação 4), onde a redução do H_2O_2 é catalisada por metais de transição como íons Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ti^{3+} , esse radical também pode ser formado a partir da reação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ com H_2O_2 , reação de Haber-Weiss (reação 5), porém, em meio aquoso, a constante de velocidade dessa reação é próxima a zero. Entretanto, na presença de metais de transição, essa reação ocorre com velocidade significativa, podendo causar danos oxidativos *in vivo* (RAMOS et al., 1992; LAURINDO et al., 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; RADA et al., 2008).



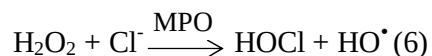
Assim, se o radical for produzido próximo ao DNA (ácido desoxirribonucleico) e a este DNA estiver fixado um metal de transição, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e/ou pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. O HO[•] pode, também, inativar várias proteínas (enzimas e de membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas a pontes dissulfeto e de forma relevante iniciar a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (peroxidação lipídica) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; LIMA, ABDALLA, 2001).

Primeiramente, esse radical reage com as biomoléculas por reações de abstração de hidrogênio gerando radicais, os quais sofrem reações subsequentes, formando produtos característicos denominados biomarcadores de estresse oxidativo. A membrana celular é um dos principais alvos desses radicais por ser rica em ácidos graxos poli-insaturados que podem ser rapidamente oxidados. Esse dano peroxidativo afeta a funcionalidade e integridade das membranas, produzindo assimetria na membrana fosfolipídica e impossibilitando a célula de manter gradientes iônicos entre os meios intra e extracelular (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

1.2.3.4. Ácido hipocloroso (HOCl)

Em fagócitos, a maior parte do H₂O₂ produzido é co-substrato da enzima MPO que é liberada dos grânulos azurófilos, originando um intermediário redox a MPO I, que oxida o íon cloreto formando o HOCl; é a única da classe das peroxidases que possui a propriedade de catalisar a conversão do H₂O₂ e Cl⁻ à HOCl (reação 6) (HAMPTON et al., 1998; EL-BENNA et al., 2005; PISOSCHI, POP; 2015). O HOCl é o principal e o mais potente microbicida produzido por essas células (SILVA, 2001; PREISER, 2012). No entanto, nos sítios inflamatórios é capaz de atacar biomoléculas de importância fisiológica, como grupos tióis e aminas de aminoácidos, bem como, nucleotídeos e ascorbato; além disso, as células de mamíferos há ausência de defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (WEISS, 1989; LAPENNA, CUCCURULLO, 1996; EL-

BENNA et al., 2005; BROWN, GRIENDLING, 2009; BAYNES; DOMINICZAK, 2015).



Torna-se importante salientar a reação entre o HOCl e o grupamento NH_2 presente em aminoácidos gera as cloraminas, compostos altamente reativos, estendendo a capacidade microbicida do HOCl. As cloraminas são oxidantes mais estáveis e menos tóxicos que o HOCl. Dentre os aminoácidos, o β -aminoácido taurina, de maior abundância em neutrófilos, é um dos principais alvos que reagem com o HOCl formando taurina cloramina (TauCl) (ZGLICZYNSKI et al., 1971; KHALIL, 2005).

1.2.3.5. Óxido Nítrico ($\text{NO}^\bullet$) / Peroxinitrito (ONOO^-)

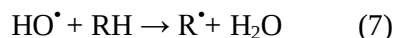
O radical $\text{NO}^\bullet$ é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica por ser um radical livre, o que a torna um agente altamente reativo. Está envolvida em inúmeros processos fisiológicos que variam desde a neurotransmissão (KATZUNG, 2006; YUAN et al., 2009) até a modulação do tônus muscular endotelial como também do estado inflamatório, agindo na vasodilatação e agregação plaquetária (SAHA et al., 2006), quimiotaxia e tem ação bactericida (KATZUNG, 2006). O $\text{NO}^\bullet$ é um potente oxidante produzido tanto pelas células endoteliais quanto por macrófagos e pode exercer efeitos protetores ou aterogênicos, dependendo da sua fonte de produção. Quando sintetizado a partir de óxido nítrico sintase endotelial, sua função vasodilatadora oferece proteção contra a hipertensão e a progressão de aterosclerose (DEANFIELD, HALCOX e RABELINK, 2007). O $\text{NO}^\bullet$ liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contém o grupo heme ocorrendo o término de sua atividade biológica (SNYDER, 1992).

Em altas concentrações o $\text{NO}^\bullet$ pode reagir com o $\text{O}_2^{\bullet -}$ produzindo o ânion potencialmente deletério, o ONOO^- (PELUFFO, RADI, 2007), aumentando o estresse oxidativo, induzindo peroxidação lipídica, desestabilidade nas membranas, oxidação e nitração de proteínas e danos ao DNA (ROBINSON et al., 2001, VIRÁG et al., 2003; IPPOUSHI, 2009; YUAN et al., 2009).

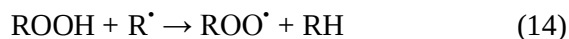
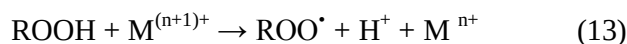
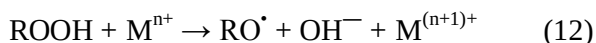
1.2.3.6. *Radical peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•)*

Os radicais ROO• e RO• podem ser considerados produtos da lipoperoxidação, na qual há reações de carbono radicalar com oxigênio e decomposição de peróxidos orgânicos. O ROO• apresenta a maior meia-vida das ERO, aproximadamente 7 s, enquanto que o radical RO• apresenta 1 μs. Outras ERO, principalmente, ¹O₂ e HO• são as precursoras para a sua formação (VALKO et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007; MATTILA et al., 2015).

Com o aparecimento do radical ROO• ocorre a formação de um radical RO• e hidroperóxidos de lipídeos (ROOH). As reações a seguir (reações 7 – 14) demonstram a formação dessas espécies reativas (MATTILA et al., 2015).



Na reação (7) ocorre o início do processo onde aparecem os radicais de lipídeos e na (8), a adição de uma molécula de oxigênio no radical de carbono (R•), formando o radical ROO•. Após (reação 9), este radical gerado abstrai um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídeo, como ocorre na reação (7). A reação (9) é conhecida como a reação que encadeia a propagação, pois ela fornece os radicais de carbono para a reação (8) e leva a acumulação de ROOH que pode ser decomposto espontaneamente em condições críticas como, por exemplo, altas temperaturas, ou através da oxidação ou redução de metais de transição, ou interações com radicais (reações 10 - 14) (MATTILA et al., 2015).

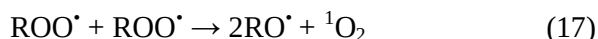
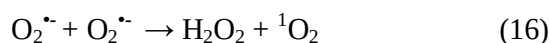


1.2.3.7. *Oxigênio singlete (¹O₂)*

Uma das formas deletérias do oxigênio ao organismo é o oxigênio singlete (¹O₂), pois é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O₂ em organismos vivos. O seu tempo de meia-vida depende muito do meio onde se encontra. Em meio

aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois ele se choca com as moléculas de H₂O transferindo sua energia de excitação, desativando-se e retornando ao estado fundamental de oxigênio triplete. Em meio orgânico é mais comum o choque com transferência de energia, sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor. Esse tipo de choque é denominado “quenching” colisional e representa a forma como a água desativa o ¹O₂, com a inversão do spin do elétron no orbital antiligante. Porém, em meio orgânico, a meia-vida do oxigênio singlete é maior e, portanto, pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação de O₂. A diferença entre essa ERO e o oxigênio molecular está na ausência de restrição na transferência de elétrons, sendo altamente reativo. Sua formação pode ocorrer através da reação entre H₂O₂ e HOCl ou pela dismutação espontânea do O₂^{•-} (reações 15 - 18) (BECKMAN; AMES, 1998; EBERHARDT, 2000; MATTILA et al., 2015).

Pode causar danos nas proteínas pela oxidação dos aminoácidos, principalmente da histidina, metionina e triptofano e, também, dar início ao processo de lipoperoxidação, produzindo os ROO[•] e RO[•] (BRADLEY; MIN, 1992; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).



1.2.4. Estresse Oxidativo

As espécies reativas alteram as funções de diversas classes de biomoléculas; os principais alvos de oxidação das ERO são os ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico, que levam ao malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal, marcadores reconhecidos do estresse oxidativo. Além do marcador MDA, os antioxidantes endógenos, como metaloenzimas (Cu, Zn-SOD) e glutathiona peroxidase dependente de selênio (GSHPx) são considerados muito importantes. Em várias patologias é observado o aumento do nível de MDA quando há excesso de ERO, sendo possível a correlação entre o estresse oxidativo e os danos causados. A Cu, Zn-SOD é uma enzima intracelular encontrada em todas as células aeróbias e sua atividade depende das reservas de cobre e zinco dos tecidos. Através dela ocorre a dismutação catalisada do O₂^{•-} em uma espécie menos tóxica, o

H₂O₂. A GSHPx é uma enzima intracelular encontrada em muitas células de mamíferos que pode metabolizar o H₂O₂ e hidroperóxidos de lipídeos. A sobrecarga oxidativa no microambiente celular causa oxidação dos lipídeos, proteínas e DNA que geram produtos como alcoóis, aldeídos, cetonas e óxidos de colesterol que, em sua maioria, também são tóxicos aos linfócitos e macrófagos, prejudicando o sistema de defesa (FERRARI, 2000; CHERUBINI et al., 2005; GANDHI, ABRAMOV, 2012; RAHAL et al., 2014).

Portanto, pode-se considerar que o de estresse oxidativo não se restringe a danos dos radicais livres às biomoléculas, mas depende da intensidade do desequilíbrio redox nas células (LÓPEZ-ALARCÓNA, DENICOLA, 2013). Sendo um processo bastante complexo, o impacto do estresse oxidativo no organismo depende de alguns fatores como o tipo de oxidante, o local e intensidade de sua produção, a composição e atividade de vários antioxidantes e a habilidade dos sistemas de defesa antioxidante (DURACKOVÁ, 2007).

As ERO estão envolvidas diretamente em patologias como doença de Alzheimer, esclerose múltipla, mal de Parkinson, câncer, síndrome de Down, entre outras. No processo de envelhecimento, o estresse oxidativo é consequência do desacoplamento das reações de transporte de elétrons e da elevação e acúmulo dos níveis de metais o que causa aumento das oxidações biomoleculares, como as proteínas, alterando a homeostase celular ou até mesmo levando à apoptose celular (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SALGANIK, 2001; VALKO et al., 2006; RODRIGUES, 2007; DURACKOVÁ, 2010; NIKI et al., 2010).

1.2.5. Antioxidantes

A prevenção da toxicidade das ERO inclui vários antioxidantes definidos como compostos que quando presentes em baixas concentrações, comparadas às do substrato oxidável, regeneram o substrato ou previnem significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2010; NIKI, 2010); entre estes agentes observa-se antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. De acordo com o mecanismo de ação sobre as ERO, os antioxidantes podem ser denominados “*scavenger*”, quando agem transformando uma ERO numa outra menos reativa, ou “*quencher*” quando conseguem neutralizar completamente a ERO absorvendo a energia de excitação, como no caso do ¹O₂. Esses mecanismos são utilizados para prevenção e/ou tratamento de diversas doenças. Assim, a investigação sobre agentes antioxidantes obtidos de produtos naturais

se torna importante, em especial no estudo dos alimentos funcionais (EVELSON, 2002; HIRATA et al., 2004; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; RIBEIRO et al., 2008).

O organismo dispõe de mecanismos antioxidantes que controlam a quantidade de espécies reativas evitando a ocorrência de danos teciduais, como por exemplo, as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSHPx) e glutathione reductase (GSHRd), através dos quais o organismo mantém a concentração das ERO dentro dos limites fisiológicos; glutathione S-transferases, que atuam na detoxificação de agentes alquilantes; e a tioredoxina reductase, que age na regulação da expressão de genes redox-sensíveis. Incluem ainda as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial: glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconolactona (SHARMA, MONGAN, 2001; WICKENS, 2001).

Além desses mecanismos enzimáticos para o equilíbrio das espécies reativas, existem a atuação dos antioxidantes não enzimáticos, que incluem moléculas do próprio organismo e outras exógenas, sintéticas ou naturais, incluindo moléculas lipofílicas e hidrofílicas, as quais são provenientes da dieta. Entre as biomoléculas naturalmente antioxidantes, destacar o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (KLAUNIG et al., 2010). Sua atividade também depende da sua solubilidade, além disso, o pH é um parâmetro determinante na capacidade oxidativa destes compostos, sendo assim, o pH dos meios biológicos é um fator que pode influenciar na sua atividade (MORGAN et al., 1997).

O sistema de defesa celular pode atuar em duas linhas. Uma delas é constituída por glutathione reduzida (GSH), SOD, catalase, GSHPx e pela vitamina E, e atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. A outra linha de defesa, constituída pelo ácido ascórbico, GSHRd, GSHPx, entre outros, tem a função de reparar a lesão provocada pelos radicais (ROSS, MOLDEUS, 1991, FERREIRA, MATSUBARA, 1997) e está relacionada com a remoção de danos da molécula de DNA e constituição das membranas celulares danificadas (EVELSON, 2002).

De relevância para este estudo é o envolvimento das ERO na iniciação e progressão da doença renal crônica, com destaque da intensa atividade do transporte ativo, no túbulo proximal que promove o aumento no consumo de oxigênio. Além disso, várias doenças renais congênitas e adquiridas induzem a formação de ERO em

células do túbulo proximal (MIYATA et al., 2010). Portanto, os antioxidantes podem auxiliar no tratamento/prevenção de doença renal crônica (LAI, TANG, 2011).

1.3. Infecção do trato urinário

Os malefícios relacionados à patogenicidade de espécies microbianas classificam-se como um problema de saúde pública, por desencadear uma série de manifestações clínicas patogênicas que causam diversos efeitos nocivos à saúde do homem e podem levar muitas vezes ao óbito do paciente acometido (BATISTA et al., 2013). Embora o avanço nas pesquisas relacionadas com a descoberta de novos fármacos seja crescente, as doenças infecciosas ainda são motivo de preocupação em nível mundial, uma vez que diversos microrganismos mostram-se resistentes a muitos fármacos disponíveis em prática clínica. Na atualidade, até mesmo os países mais desenvolvidos, estão dando uma atenção maior às doenças infecciosas, devido à quantidade de óbitos e o custo exacerbado em saúde pública. De modo geral, o termo doenças infecciosas abrangem infecções desencadeadas por micro-organismos patogênicos ou oportunistas, como bactérias, fungos, vírus ou parasitas, podendo ser transmitidas direta ou indiretamente de uma pessoa para outra (BIBI et al., 2011).

As infecções do trato urinário (ITU) são consideradas como afecções relativamente comuns, entretanto, em alguns casos podem resultar em níveis significantes de mortalidade (VIERA NETO, 2003; SILVA et al., 2005).

A colonização microbiana do trato urinário pode promover o comprometimento dos tratos urinários superiores e inferiores. Estes tipos de infecções podem provocar várias patologias, as quais são denominadas cistite, pielonefrite, bacteriúria assintomática e síndrome uretral. Uma vez estabelecida a infecção em qualquer parte do trato urinário, todo o sistema urinário poderá ser afetado (VIERA NETO, 2003; CAVAGNARO, 2005; SOARES et al., 2006; SILVA, NEUFELD, 2006).

Qualquer indivíduo é suscetível do ponto de vista epidemiológico, a ocorrência e prevalência desta infecção diferem com a idade, sexo e fatores predisponentes (anormalidade funcional ou anatômica do sistema urinário, defesas orgânicas deficientes e função renal comprometida). Ocorre com maior frequência em adultos, cerca de 3 a 4% das consultas médicas anuais em mulheres são devidas a queixas de disúria (micção dolorosa) e polaciúria (urgência e frequência miccional), e em pediatria é a segunda infecção mais frequente (ANVISA, 2000; STRASINGER, 2000; SANTOS FILHO, 2006).

De interesse neste trabalho existem duas vias comuns de colonização microbiana. Na via ascendente, que é a forma mais comum para o desenvolvimento das ITU, o uropatógeno inicialmente, se adere à superfície epitelial e, posteriormente coloniza e se dissemina ao longo da mucosa provocando danos teciduais. Após o período de colonização, o patógeno pode ascender à bexiga urinária resultando em bacteriúria sintomática ou assintomática. A progressão pode levar desde pielonefrite à insuficiência renal. Na via hematogênica, onde a infecção ocorre através da corrente sanguínea, as consequências são infecção com abscesso renal e perirrenal (COUTINHO, 2005; DAVIS, FLOOD, 2011).

Entre os agentes etiológicos predominantes associados à ITU, as bactérias Gram-negativas são responsáveis por mais de 95% dos casos de infecções, havendo maior prevalência de *Escherichia coli*, e entre as Gram-positivas mais comumente associadas às ITU encontram-se os *Staphylococcus ssp*; entre eles *Staphylococcus saprophyticus* (5% - 20%) que parece estar relacionada com sua capacidade de aderir às células do epitélio do trato urinário e, ocasionalmente, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp* e *Enterococcus faecalis* (RAMA et al., 2005; SATO et al., 2005; SOARES et al., 2006; MURRAY et al., 2006). Existem ainda microrganismos como as bactérias do gênero *Pseudomonas* e *S. aureus*, além do fungo comensal *C. albicans* que acomete pacientes imunocomprometidos (COUTINHO, 2005; WECKWERTH et al., 2012).

O principal fator de virulência das cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas são as adesinas, também chamadas de fímbrias (tipo 1: manose-sensíveis e tipo 2, também conhecida como fímbria P: manose-resistente), as quais favorecem a colonização e formação de biofilmes, impedindo sua eliminação pela micção, o que aumenta a probabilidade de alcançar o tecido renal (LICHTENDERGER, HOOTON, 2010).

Em circunstâncias normais, o trato urinário humano está bem protegido contra a invasão bacteriana por sistemas de defesa específicos e não específicos do sistema imunológico. No entanto, as bactérias, que são capazes de invadir o trato urinário resultando na infecção, estão equipadas com um arsenal variado de fatores de virulência para evadirem-se das células de defesas do hospedeiro (RAMA et al., 2005). A produção de citocinas e o influxo de neutrófilos ocorrem com a presença de *E. coli* ou de produtos bacterianos dentro do trato urinário. As interações entre as adesinas de *E. coli*, as células epiteliais e as células imunes do hospedeiro estimulam a expressão de várias moléculas pré – inflamatórias, interleucinas – 6 (IL-6) IL-8 e seu receptor, TNF-alfa e a enzima óxido nítrico sintase. A IL-8 e o seu receptor são importantes na indução

da migração transepitelial de neutrófilos durante as ITU. As moléculas de reconhecimento padrão (receptores Toll-like) cita-se como exemplo a TLR-4, também permitem que as células epiteliais do trato urinário detectem e combatam os constituintes bacterianos, como lipídeos e lipoproteínas, levando a sinalização transmembrana e alteração celular (ALBIGER et al., 2007; KAWAI, AKIRA, 2010). Em circunstâncias normais, a interação entre fagócitos e bactérias resulta em morte bacteriana com o mínimo de danos para o tecido hospedeiro. Contudo, a produção excessiva de ERO leva à deterioração dos fagócitos, acarretando injúria tissular (RAMA et al., 2005). A resistência bacteriana à ingestão pelos fagócitos induz geração de ERO.

O consumo do suco do fruto da *V. macrocarpon* mostra atividade inibitória sobre a adesão bacteriana no tecido hospedeiro, etapa inicial para instalação da infecção. Em *E. coli*, o suco do fruto foi capaz de inibir especificamente a adesão de fímbrias em células epiteliais do trato urinário. A atividade inibitória sobre a adesão do tipo 1 foi atribuída à frutose, e a inibição de fímbrias do tipo P foi associada à proantocianidinas, ambos compostos presentes no extrato (ZAFRIRI et al., 1989; HOWELL et al., 2005; DI MARTINO et al., 2006; LIU et al., 2006). Já foram identificados na composição de *V. macrocarpon* vários compostos como flavonóides, derivados do ácido hidroxicinâmico, ácidos orgânicos, isoprenoides, entre outros antioxidantes, que demonstram resultados satisfatórios sobre o metabolismo oxidativo (PATEL et al., 2011).

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Centros de Prevenção e Controle de Doenças (CDC), associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica (BECKER et al., 2006; HAMBRAEUS, 2006; CHANG et al., 2013; WHO, 2014). Vários estudos relatam a importância social e econômica da infecção urinária, um problema que pode trazer danos consideráveis à população, incluindo doença renal crônica (DRC) e até a morte. Além disso, o aumento na resistência dos uropatógenos aos antibióticos, tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar, aumenta a mortalidade em pacientes com bacteremia originária das vias urinárias, revelando a urgência de medidas defensivas, bem como a prospecção de novos agentes antimicrobianos (PRETTO, 2005; BAIL et al., 2006; SOARES et al., 2006; DEHBANIPOUR et al., 2016), advindos de produtos naturais (GRAGG, NEWMAN, 2013).

1.4. Processo inflamatório e estresse oxidativo

A inflamação é uma resposta fisiológica que acontece no organismo durante infecção ou lesão tecidual que permite que o indivíduo sobreviva às adversidades do meio e mantenha a homeostase dos tecidos sob diversas condições nocivas, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, monócitos, macrófagos e, em alguns casos, linfócitos), além da liberação de mediadores citotóxicos, inflamatórios e quimiotáticos que, em conjunto, agem para conter, destruir e remover os agentes invasores e patógenos. Em geral, as respostas do organismo à inflamação localizada são auto-limitadas e resultam na reparação da lesão (MEDZHITOV, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012).

A imunidade inata é um sistema que fornece mecanismos imediatos de defesa contra uma ampla variedade de patógenos, sem exigir uma exposição prévia (VASSELON, DETMERS, 2002). Neutrófilos e monócitos participam desta primeira linha de defesa do organismo, e desempenham um papel essencial na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos e nas reações inflamatórias; são atraídos por sinais quimiotáticos endógenos ou gerados por agentes invasivos. As ERO liberadas por estas células fagocíticas, tais como $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$ e o HOCl, associados aos peptídeos microbianos e as proteases presentes nestas células, constituem um potente arsenal antimicrobiano, porém quando ocorrem em excesso, podem se relacionar com o aparecimento de processos degenerativos das inflamações crônicas e diversas patologias (EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; SUZUKI, CHOW, DOWNEY, 2008; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009; WRIGHT et al., 2010). O processo de digestão do microrganismo envolve basicamente dois eventos celulares: degranulação no vacúolo fagocítico com a formação do fago lisossomo e o *burst* oxidativo com a produção de ERO; seguidos da liberação de citocinas inflamatórias (BABIOR, KIPNES, CURNUTTE, 1973; HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998; BABIOR, COHEN, 2000; FLANNAGAN, COSÍO, GRINSTEIN, 2009). As citocinas são proteínas do sistema imunológico produzidas, principalmente, por leucócitos, atuando como comunicadores químicos entre as células e regulando a defesa do organismo contra patógenos (BAIERLE et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar as atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos aquoso e etanólico obtidos de *E. brasiliensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente os extratos etanólico e aquoso por meio da quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais, açúcares totais, além da identificação de taninos.
- Realizar a análise cromatográfica, utilizando CLAE-DAD, para obtenção de perfil cromatográfico dos extratos em solventes polares.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais frente a cepas bacterianas e fúngicas.
- Determinar a atividade antioxidante utilizando o ensaio de captura do ABTS^{•+}; espécies reativas de oxigênio: O₂^{•-}, H₂O₂, ROO[•], HOCl e NO[•] e capacidade de redução do íon férrico.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico em linhagens celulares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os extratos foram obtidos, a partir da polpa liofilizada dos frutos de *Eugenia brasiliensis* Lam., obtida comercialmente do Sítio Bello – Frutas Nativas, localizado na Estrada da Roseira, km 11,5 em Paraibuna, Estado de São Paulo (Latitude 23° 23' 10" S e longitude 45° 39'44" O). A polpa da fruta congelada é uma mistura entre duas variedades, composta por 70% da variedade roxa ou vermelha e 30% da variedade amarela.

3.2. Obtenção dos extratos

A extração foi realizada em banho de ultrassom, durante 20 min, a 40° C, realizada em 3 etapas. O extrato aquoso foi obtido a partir da extração com água ultrapura, na proporção de 1:10 (m/v), com 1g de polpa liofilizada e 10ml de solvente. O extrato etanólico foi obtido com etanol absoluto e, na mesma proporção de material

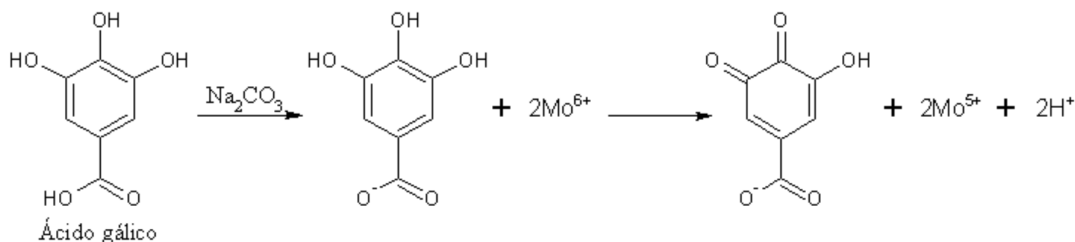
vegetal/solvente, ou seja, na proporção de 1:10 (m/v). O volume total de cada extrato foi filtrado em papel filtro Whatman nº6, a vácuo e armazenados à -18°C. Na sequência os extratos foram liofilizados e armazenados à -18°C.

3.3. Quantificação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos possuem elevada capacidade antioxidante, atribuída à sua habilidade em formar complexos com íons metálicos e/ou inativar espécies reativas como os radicais livres. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton et al. (1999).

O ensaio se baseia na redução do reagente Folin-Ciocalteu (RFC), com formação de um complexo de coloração azul, quantificado fotometricamente, 750 nm. A reação ocorre com a mistura em meio aquoso, dos extratos aquoso e etanólico com o RFC (10% v/v) e carbonato de sódio (7,5% m/v) durante 10 min a 50°C. Os resultados foram expressos em miligramas de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por grama de extrato seco, a partir de uma curva analítica de ácido gálico de 20 a 100 µg/mL. A Figura 2 exemplifica a reação produzida neste método com o ácido gálico em meio básico, gerando ânions fenolatos. Em seguida, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o molibdênio, componente do reagente Folin. O meio reacional passa de amarelo para azul. A intensidade da coloração depende da quantidade e disponibilidade do composto fenólico presente na amostra.

Figura 2. Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente Folin-Ciocalteu (Adaptado de Oliveira et al. (2009).



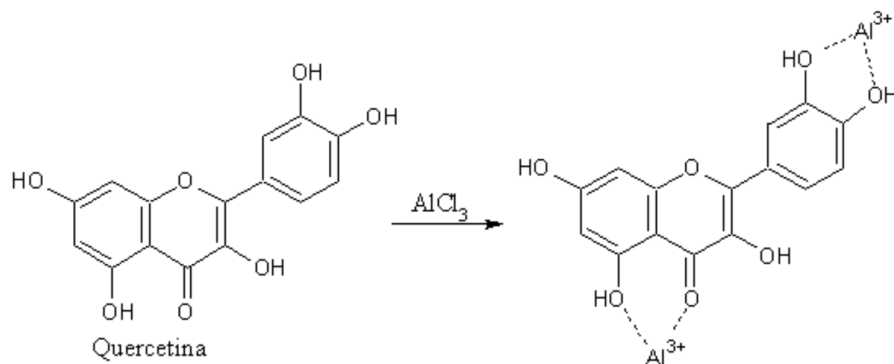
3.4. Quantificação de flavonoides totais

A determinação baseia-se na reação de flavonoides com cloreto de alumínio, como descrito por Chang et al. (2002), com algumas modificações.

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides. O complexo flavonoide- Al^{3+} absorve luz em comprimentos de onda maiores do que aqueles observados para os flavonoides na ausência do cátion alumínio (Figura 3).

O ensaio foi realizado em solução aquosa de nitrito de sódio (5% m/v) e as amostras dos extratos aquoso e etanólico foram incubadas por 6 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado uma solução etanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10% m/v), incubada por 5 min em temperatura ambiente no escuro. Após incubação, solução aquosa de hidróxido de sódio (1M) foi adicionada e a leitura de absorbância foi realizada a 425 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de flavonoides totais equivalentes a quercetina por grama de extrato seco, a partir de uma curva padrão de quercetina de 100 a 400 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 3. Formação do complexo flavonoide- Al^{3+} ($\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ nm}$) (HO, YU, SU, 2012).



3.5. Quantificação de antocianinas totais

A determinação de antocianinas totais nas amostras foi realizada utilizando fotometria pelo método do pH diferencial, conforme descrito por Lee et al (2005).

O método do pH diferencial baseia-se nas alterações de cor das antocianinas monoméricas em solução aquosa, em função do pH do meio, com absorção máxima em pH 1,0 e pouca ou nenhuma absorção em pH 4,5 (forma hemiacetal, incolor). Por outro lado, antocianinas poliméricas intactas ou degradadas apresentam absorção em pH 4,5, o que permite a identificação de antocianinas totais sem a interferência dos resíduos poliméricos ou outros interferentes. As leituras fotométricas das amostras dos extratos aquoso e etanólico foram realizadas em dois comprimentos de onda distintos: 700nm, onde não existe sinal analítico (absorbância de luz) para antocianinas, o que permite a

identificação de interferentes, e 510nm (λ máx da antocianina padrão cianidina-3-glucosídeo), o que permite quantificá-las na amostra, utilizando absorvidade molar da antocianina padrão (LEE et al., 2005).

Para este ensaio, foram preparados duas soluções tampões em meio aquoso, cloreto de potássio (0,025M - pH 1,0) e acetato de sódio (0,4M- pH 4,5) que tiveram o pH ajustado com HCl.

Para a realização da quantificação do teor de antocianinas totais as amostras foram solubilizadas nos tampões pH1,0 e pH4,5, mantendo o mesmo fator de diluição para cada tampão. As leituras das absorbâncias foram realizadas utilizando comprimentos de onda de 510nm (λ_{max} da cianidina-3-glucosídeo, $\epsilon=26.900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; MM=449,2 g/mol) e 700nm (detecção de interferentes).

Os resultados foram expressos em miligramas de antocianinas totais equivalentes a cianidina-3-glucosídeo por grama de extrato seco, usando as equações a seguir:

i) Cálculo para absorbância da amostra:

$$A_{\text{(Absorbância da amostra)}} = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

Onde:

- $(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0}$ = diferença entre as absorbâncias obtidas no comprimento de 510nm e 700nm, para a solução de pH 1,0;
- $(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$ = diferença entre as absorbâncias obtidas no comprimento de 510nm e 700nm, para a solução de pH 4,5.

ii) Após calcular a absorbância da amostra, deve ser realizado o cálculo para encontrar o equivalente de antocianinas totais (AT) em cianidina-3-glucosídeo:

$$AT = \frac{(A \cdot MM \cdot FD \cdot 10^3)}{\epsilon}$$

Onde:

A= absorbância da amostra, encontrada no item i).

MM = 449.2 g/mol para cianidina-3-glucosídeo

FD = fator de diluição

$\epsilon = 26.900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Absorvidade molar da cianidina-3-glucosídeo)

3.6. Quantificação de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados utilizando a propriedade redutora dos açúcares sobre o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959). Para

quantificação dos açúcares não redutores, a mesma metodologia foi empregada após a hidrólise da amostra em meio ácido. Inicialmente, o DNS apresenta coloração amarela, e após ser reduzido pelos açúcares presentes na amostra, forma em meio alcalino um cromóforo estável laranja-avermelhado (3-amino-5-nitrosalicilato) em proporção estequiométrica e com máxima absorção de luz em 535nm (Figura 4).

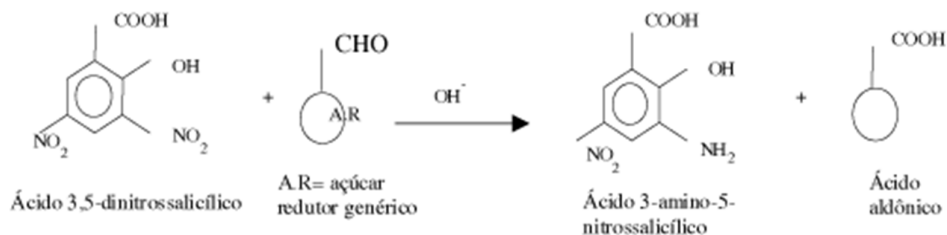
Para o ensaio de redução, a solução de DNS foi preparada em uma concentração 2,19M em 50 mL de tartarato de sódio e potássio 2,12M e com adição de 20 mL de hidróxido de sódio 2M, sob agitação e temperatura ambiente.

As amostras dos extratos aquoso e etanólico foram diluídas em água ultrapura, em diferentes concentrações. Para a reação de hidrólise, onde serão dosados os açúcares não redutores, 1 mL das amostras foram incubadas com HCl (2N), na proporção 1:1 (v/v), a 100°C por 10 min, em tubo vedado. Após a incubação, 1 mL de NaOH (2N) foi adicionado para realização da leitura.

Para reação de quantificação, as amostras foram incubadas com DNS durante 5 min a 100°C. Após o resfriamento, foi adicionada 1000µL água ultrapura e a leitura da absorbância foi realizada a 540nm.

Os resultados foram expressos em miligramas de açúcares totais equivalentes a glicose por grama de extrato seco, a partir da curva analítica de 20 a 160µg/mL.

Figura 4. Reação de oxidação da carbonila pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959).



3.7. Extração e identificação de taninos

A identificação de taninos baseia-se em testes de precipitação e testes colorimétrico, de fácil visualização.

A polpa liofilizada (extrato bruto) foi solubilizada em água (0,05g/mL) e mantida sob fervura por 15 min, filtrados com papel de filtro em funil, deixando esfriar até temperatura ambiente. Em seguida foram realizados testes de identificação.

Para os testes de precipitação, foi realizada a reação com gelatina, na qual se utiliza algumas gotas de ácido clorídrico diluído (1%) e de solução de gelatina (2,5% m/v) na solução teste até que haja formação de precipitado, em caso positivo para taninos. Realizou-se a reação com sulfato de quinina (alcaloide), cujo procedimento utiliza uma gota de ácido clorídrico (10% v/v) e 15 gotas de solução de sulfato de quinina (0,1% m/v) em ácido sulfúrico 0,1 M na solução teste, havendo precipitado branco quando positivo para taninos. Por último a reação com acetato de chumbo (em meio ácido), no qual o procedimento envolve solução de ácido acético (10% v/v) e uma solução de acetato de chumbo a (10% m/v) adicionados a solução teste, onde no resultado positivo para taninos hidrolisáveis há formação de precipitado esbranquiçado (COSTA, 2001).

Para o teste de reação colorimétrica, foi utilizada a reação de sais de ferro segundo Simões (2007), um procedimento em meio aquoso que consiste na adição de cloreto férrico (2% m/v) em metanol na solução teste. Em caso de resultado positivo a reação apresenta coloração azul para taninos hidrolisáveis ou coloração verde para taninos condensados.

3.8. Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

CLAE foi realizada no Laboratório de Multiusuário PADC - FCF, sob supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Os extratos (3 g) aquoso ou etanólico, foram submetidos a uma partição líquido-líquido com n-butanol e água na proporção 1:1 (v/v) e secos em rotaevaporador à 45°C. As frações obtidas na partição supracitada foram dissolvidos em 1 mL de metanol: água (95:05, v/v), e submetidas a pré-tratamento por extração em fase sólida em cartucho SampliQ® (C18, 45µm; 500mg, 6mL) que foi ativada com metanol e condicionada com metanol: água (95:05, v/v). Após sua aplicação, a amostra foi eluída com 4 mL de metanol: água (95:05, v/v). Após recolhimento, os eluatos foram secos em capela e, posteriormente, solubilizados em metanol (5mg/mL) e filtrados em membrana (0,22 µm, PVDF). As análises foram realizadas em cromatógrafo a líquido analítico, HPLC-PDA Shimadzu®, utilizando como fase móvel acetonitrila (B) e água (A) adicionadas de ácido acético (1 %) em modo gradiente: 13-68% B em 50 min, 100% B por 10 min; coluna Shim-pack C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 25µL para o extrato etanólico e 35µL para o extrato aquoso, e detector de arranjo de diodos (DAD) com

faixa de leitura entre 190 e 550 nm. Com finalidade de identificação, foram utilizados como padrões ácido gálico, ácido elágico, rutina e quercetina.

3.9. Determinação da atividade antimicrobiana

3.9.1. Micro-organismos

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas as seguintes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e 10 cepas clínicas (ECC 1, ECC 2, ECC 3, ECC 4, ECC 5, ECC 6, ECC 7, ECC 8, ECC 9, ECC 10); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e cinco cepas clínicas de *Staphylococcus saprophyticus*, SSC1, SSC2, SSC3, SSC4 e SSC5. O emprego das espécies bacterianas clínicas deste estudo deu-se pela sua incidência em casos de infecções urinárias. Todas as cepas clínicas foram isoladas de pacientes adultos que apresentaram quadros de infecções uropatogênicas e identificadas pelo Laboratório Central do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, para a avaliação da atividade antifúngica foram empregadas três cepas de *Candida albicans* ATCC 18804 (sensível ao fluconazol), ATCC 5314 (resistente ao fluconazol) e CAV5 (cepa clínica resistente isolada de região vaginal). O uso destas cepas para fins científicos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP-FAMERP). Todas as cepas clínicas foram doadas para o Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos da UNESP – FCFAr sob coordenação da Profa. Dra. Taís Maria Bauab para a realização deste trabalho.

3.9.2. Estocagem e manutenção das cepas microbianas

As cepas bacterianas foram mantidas em caldo Mueller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foram repicadas em CMH e incubadas a 37°C por 24 horas.

As leveduras foram mantidas em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foi repicada em CSD e incubada a 37°C por 48 horas.

3.9.3. Avaliação da atividade antibacteriana

3.9.3.1. Padronização dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, adicionando-se meio de cultura estéril até atingir turvação igual à

suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

3.9.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) segundo a norma M7-A10 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), com modificações.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH e em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções das amostras vegetais (solução do extrato aquoso e etanólico) e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos previamente padronizados em cada orifício das microplacas, obtendo uma concentração de 2×10^5 UFC/poço. Como controle positivo foi empregado a ampicilina (50 µg/mL). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle de esterilidade dos compostos avaliados e o controle negativo (solvente). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

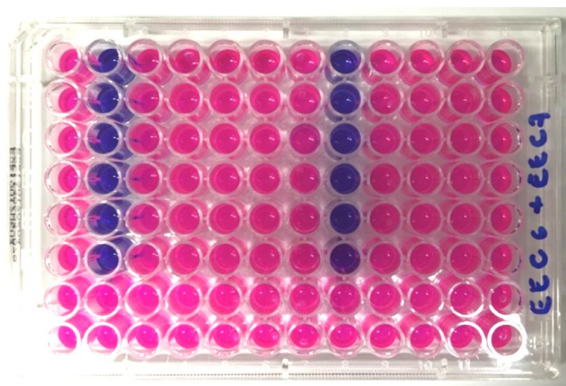
3.9.3.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foram repicadas em placas de AMH e incubadas a 37°C por 24 horas. Após incubação as placas foram avaliadas quanto ao crescimento ou não das bactérias.

3.9.3.4. Leitura com revelador

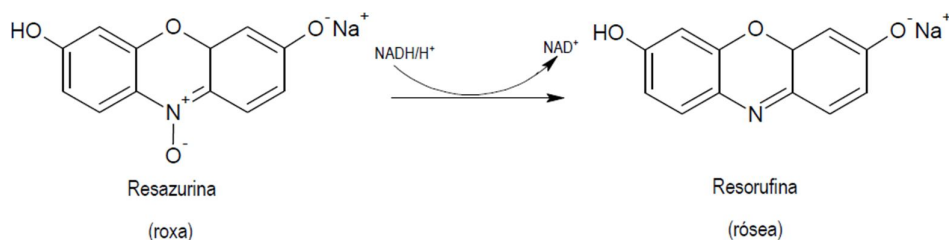
Para os testes com as cepas bacterianas foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100µg/mL) do qual 30µL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002), como apresentado na Figura 5.

Figura 5. Ensaio de determinação da CIM pela técnica de diluição em microplacas revelada com solução de resazurina 0,01%



A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é um indicador utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor azul) em resorufina (cor rósea), como apresentado na Figura 6. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Figura 6. Representação da redução da resazurina em resorufina (UNKRIG et al., 2012).



3.9.4. Avaliação da atividade antifúngica

3.9.4.1. Padronização dos inóculos fúngicos

As suspensões fúngicas foram padronizadas a partir de uma cultura de 48 horas em CSD e diluídas até a escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC/mL). A concentração das células leveduriformes foi confirmada por leitura espectrofotométrica a 530nm. Desta

suspensão foi realizada diluições de 1:100 e 1:20 obtendo-se uma suspensão de 10^3 UFC/mL a qual foi utilizada nos experimentos (CLSI, 2008; ARAÚJO et al., 2013).

3.9.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação da atividade antifúngica e determinação da CIM foram realizadas pela técnica de microdiluição de acordo com o documento M27-A3 da CLSI (2008), com modificações.

Em cada orifício das microplacas (96 poços) foi acrescentado meio de cultura RPMI 1640, ajustado ao pH7,0 com tampão MOPs (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Adicionalmente foram acrescentados 100 µL das soluções das amostras vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Em seguida foram distribuídos 100 µL das suspensões dos micro-organismos previamente padronizados em cada orifício das microplacas, obtendo uma concentração de 10^3 UFC/mL.

Como controle positivo foi utilizado anfotericina B (16,0 a 0,06 µg/mL) e o fluconazol (512 a 1,0 µg/mL). Também foi realizado o controle do meio de cultura, do crescimento leveduriforme, esterilidade das amostras vegetais e solvente. As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica à 37°C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

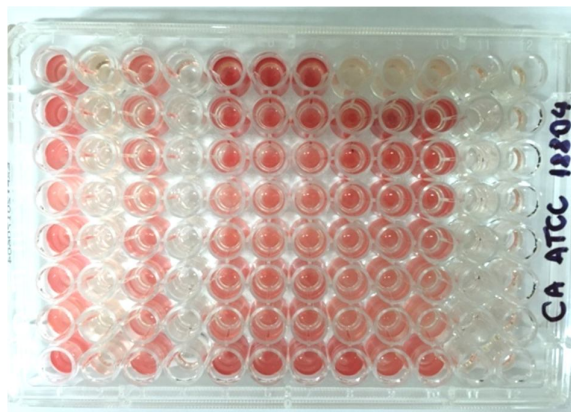
3.9.4.3. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foram replicadas em placas de ASD e incubadas a 37°C por 48 horas. Após incubação as placas foram avaliadas quanto ao crescimento ou não das leveduras.

3.9.4.4. Leitura com revelador

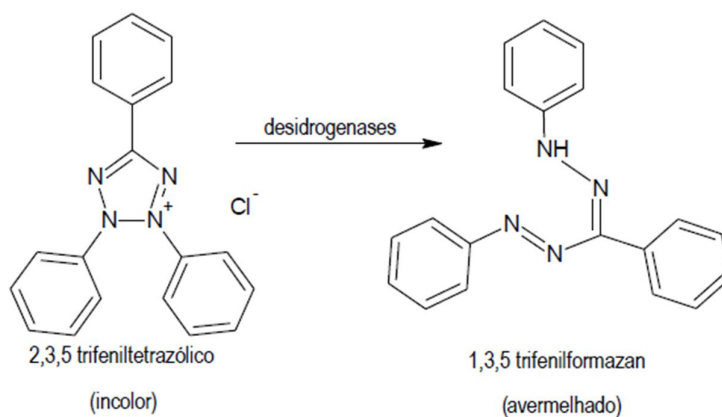
Nos ensaios com as cepas fúngicas foram adicionados 20 µL de solução aquosa de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), e incubação a 37°C por 3 horas. A ausência de crescimento do micro-organismo mantém as soluções dos poços incolores, enquanto a coloração vermelha representa crescimento do mesmo (GABRIELSON et al., 2002; ARAÚJO et al., 2013). A Figura 7 apresenta uma microplaca de teste revelada com TTC.

Figura 7. Ensaio de determinação da CIM por meio de diluição em microplacas revelada com solução aquosa de TTC (2%).



O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos, principalmente relacionado com a viabilidade celular. O mecanismo baseia-se na redução (Figura 8) enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada) em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

Figura 8. Representação da redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada) (THOM et al., 1993; MOUSSA et al., 2013; RAMOS et al., 2015).



3.9.4.5. Leituras espectrofotométricas

Após o período de incubação de ambos os ensaios (bactérias e leveduras), as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2- Biotek®). Os valores obtidos foram considerados para a

realização de cálculos que expressaram a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com GUDIÑA et al. (2010). A CIM foi considerada como a menor concentração da amostra vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% ($\geq$) das cepas (HÖRNER et al., 2008).

A Equação 1 mostra a fórmula utilizada para o cálculo das porcentagens de inibição, onde Abs T representa a absorbância do teste (poço do teste), Abs ST a absorbância da substância teste (poço do controle de extrato) e Abs Cb a absorbância do crescimento bacteriano (poço do controle de crescimento) (GUDIÑA et al., 2010).

Equação 1: Fórmula para determinar a porcentagem de inibição de crescimento bacteriano

$$\% \text{ Inibição} = \left[1 - \frac{(AbsT - AbsST)}{AbsCb} \right] \times 100$$

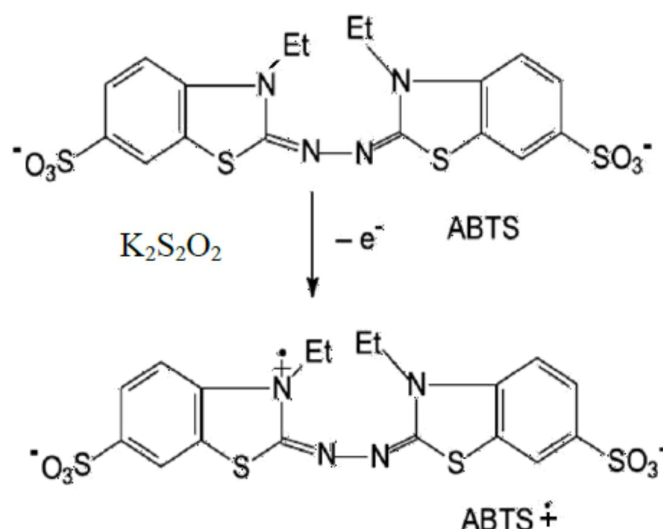
3.10. Avaliação da atividade antioxidante

3.10.1. Ensaio de captura do ABTS^{•+}

O ABTS^{•+} é um cátion radical e um cromóforo quimicamente estável com alta solubilidade em água. Pode ser solubilizado em meio orgânico ou aquoso, nos quais a habilidade dos antioxidantes em capturá-lo pode ser determinada (MILLER et al., 1993; ARNAO, 2000; PÉREZ-JIMÉNEZ, SAURA CALIXTO, 2006).

A atividade antioxidante pelo método do ABTS foi avaliada conforme metodologia descrita por Re et al., 1999, com algumas modificações. O cátion radical ABTS^{•+} foi gerado pela reação de oxidação entre persulfato de potássio (51mmol/L) e o ABTS (7mmol/L) na ausência de luz e temperatura ambiente, por 16 horas (Figura 9). Uma vez formado, o radical foi diluído em tampão fosfato (10mmol/L, - pH 7,0) até a obtenção do valor de absorbância de $\sim 0,750 \pm 0,020$, em 734nm. A captura do ABTS^{•+} foi realizada com a incubação do mesmo, com padrões e amostras. O volume total da reação foi de 300μL, sendo 100μL fixo para o ABTS^{•+}. Os volumes das amostras e do tampão variaram entre si, totalizando um volume de 200μL. O monitoramento da absorbância foi realizado em 734nm e os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) da concentração efetiva para a captura de 50% do radical cátion ou porcentagem de “inibição” (IC₅₀).

Figura 9. Representação da formação do ABTS^{•+}.

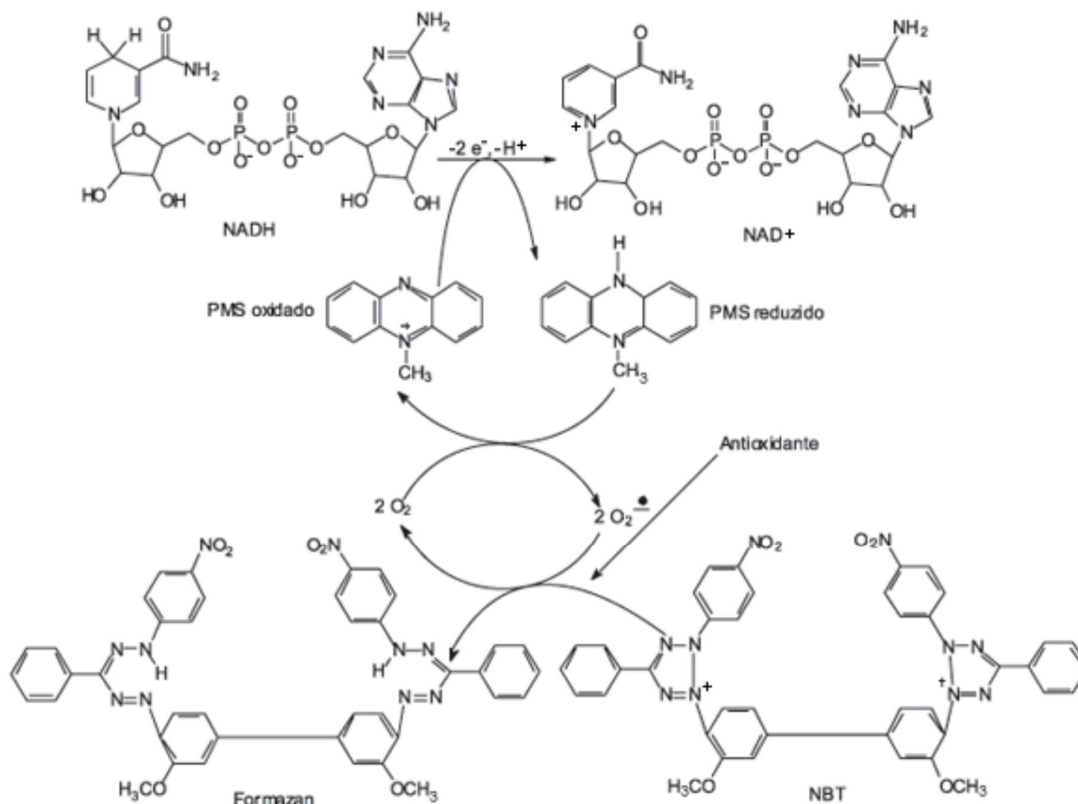


3.10.2. Ensaio de captura do O₂^{•-}

Neste ensaio o O₂^{•-} gerado pela reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), reage com o azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o e gerando formazana, cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do O₂^{•-} (Figura 10) (KAKKAR et al., 1984).

O ensaio foi realizado em tampão pirofosfato de sódio pH 8,3, 25 mmol/L, contendo PMS 372 µmol/L, NBT 600 µmol/L, NADH 1560 µmol/L, diferentes concentrações de amostra, em um volume final de reação de 300 µL. Após incubação de 7 minutos a temperatura ambiente, a leitura da microplaca foi realizada em 560nm, a fim de determinar a quantidade de formazana gerada (HAZRA; BISWAS; MANDAL, 2008). O monitoramento da produção de formazana foi feito espectrofotometricamente em nm, pela mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura da formazana; onde na presença de moléculas que atuam como antioxidantes interagem com o O₂^{•-} e inibem a produção da formazana (ALVES et al., 2010). O ensaio na ausência de padrões ou amostras foi usado como controle (100% da reação) e o meio reacional sem NADH foi usado como branco da reação. Os resultados foram ser expressos em média ± (EPM) das porcentagens de inibição (IC₅₀).

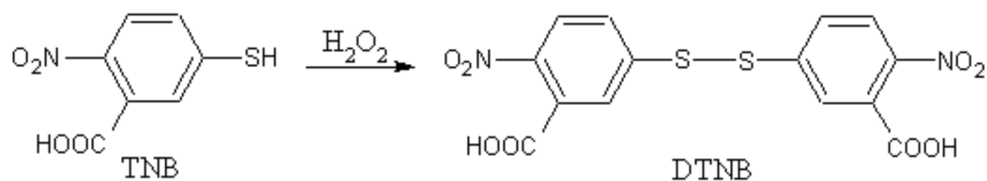
Figura 10. Representação da geração do ânion superóxido e a ação de um antioxidante para inibir a formação de formazana (OLIVEIRA et al., 2009).



3.10.3. Ensaio de captura do H_2O_2

A capacidade de captura do H_2O_2 foi determinada segundo Ching et al. (1994) pelo ensaio em que o H_2O_2 oxida o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) à ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), com diminuição da absorbância em 412nm e aumento em 325nm (Figura 11). A solução de TNB teve sua concentração determinada com o coeficiente de extinção molar (ϵ) em 412nm de $13600M^{-1}cm^{-1}$ (CHING et al., 1994). A concentração do H_2O_2 foi determinada de acordo com Brestel (1985), ($\epsilon=80M^{-1}cm^{-1}$ em 230nm). O ensaio foi realizado em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, com diferentes concentrações de amostras, H_2O_2 e incubação por 30 minutos a 37°C; TNB foi adicionado e outra incubação foi realizada durante 60 minutos a 37°C. A leitura da absorbância foi realizada em 412 nm.

Figura 11. Representação oxidação do TNB à DTNB pelo H₂O₂ (LANDINO et al., 2008).



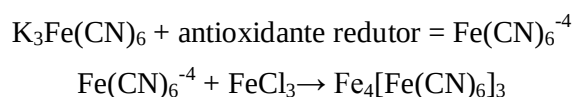
A porcentagem de inibição da oxidação do TNB (% de captura do H₂O₂) foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{1 - (Abs \text{ máx} - Abs \text{ Amostra}) \times 100}{(Abs \text{ máx} - Abs \text{ min.})}$$

Onde: Abs máx., representa a absorbância na ausência do agente oxidante (H₂O₂) e da amostra; Abs Amostra é a absorbância na presença do agente oxidante e da amostra; e Abs Min. é a absorbância na presença do agente oxidante e na ausência da amostra.

3.10.4. Determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP)

A determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP) foi realizada de acordo com Koksall et al. (2011). A redução de Fe³⁺ a Fe²⁺ foi monitorada pela leitura da absorbância do complexo formado denominado azul da Prússia, em 700 nm. Este método baseia-se na redução de Fe³⁺ contido no ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) a Fe²⁺ através do poder antioxidante da amostra, conforme reação abaixo:

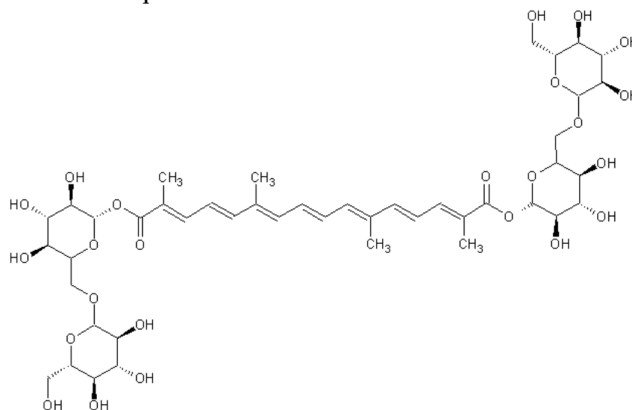


O ensaio foi realizado em tampão fosfato de sódio (pH 6,6 – 0,2 M), ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) a 1%, utilizando diferentes concentrações dos padrões e extratos. Após 20 minutos de incubação a 50°C, o meio reacional foi acidificado com ácido tricloroacético a 10%, e finalmente foi adicionado FeCl₃ a 0,1%. O volume final da reação foi de 1 mL. Para monitorar a geração de azul da Prússia, foi realizada a leitura de absorbância em 700 nm, em microplaca. O aumento de absorbância indica a capacidade antioxidante da amostra em reduzir o Fe³⁺ a Fe²⁺.

3.10.5. Ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina: captura do ROO[•]

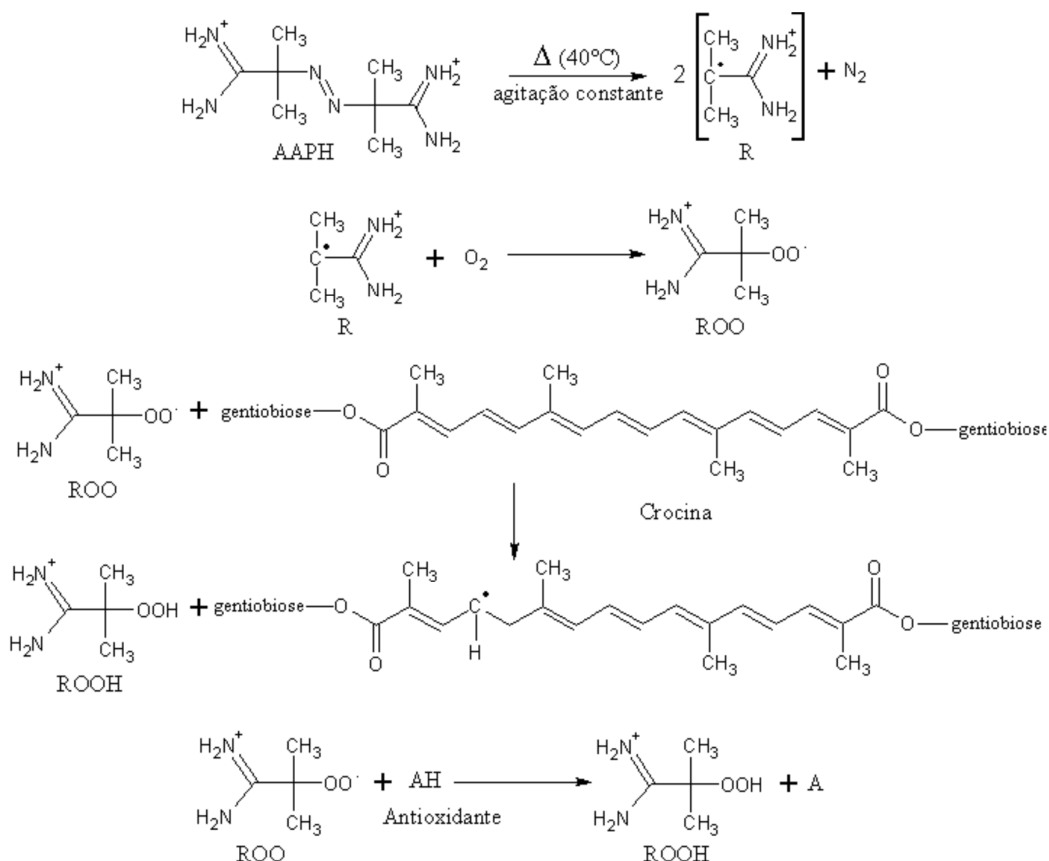
O ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina avalia a atividade antioxidante frente ao processo de lipoperoxidação. Nesse modelo mede-se a habilidade de antioxidantes em proteger a crocina (Figura 12), um carotenoide extraído da planta *Crocus sativus L.*, frente a um composto gerador de radicais livres.

Figura 12. Estrutura química da crocina.



Este ensaio foi realizado de acordo com Tubaro et al. (1998) com monitoramento do decréscimo da absorbância da crocina em função do tempo em 443 nm, durante 10 minutos em um procedimento de competição cinética, onde a reação é iniciada pela adição do azocomposto dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina (AAPH), que por termólise à 40°C e com velocidade constante, gera um radical livre, em meio aerado. Rapidamente, o O₂ dissolvido no meio reage com o radical e gera os radicais ROO[•]. OROO[•] é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio e assim gerar um radical na estrutura da crocina, levando ao rompimento do sistema de suas duplas ligações conjugadas, provocando seu clareamento, e redução de sua absorbância na região do visível. Na presença de uma molécula antioxidante, essa redução da absorbância se torna menor e por isso registra-se um novo valor na variação da absorbância em função do tempo, ou seja, na velocidade de clareamento (*bleaching*). Assim, os antioxidantes competem com a crocina pelos radicais ROO[•] e, portanto, a inibição de sua oxidação depende da capacidade das amostras na captura das espécies radicalares (Figura 13).

Figura 13. Reações envolvidas no clareamento da crocina termólise do AAPH e a ação de um antioxidante que inibe este processo (Adaptado de WERBER et al. 2011; ASSIS et al. 2015).



A reação foi realizada em volume final de 2 mL, em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0 com 25 µmol/L de crocina a partir de uma solução estoque de 6 mmol/L em DMSO, cuja concentração é aferida pelo coeficiente de extinção molar da crocina em DMSO ($\epsilon=13.727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, em 443nm) conforme descrito por Assis et al. (2015), e diferentes concentrações de amostras (antioxidantes). A reação teve início com adição de 50 µL (12,5 mmol/L, concentração final) de AAPH (em solução estoque fresca 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0), sob agitação e temperatura de 40°C constantes, com monitoramento em 443 nm.

A velocidade do *bleaching* da crocina torna-se linear em aproximadamente 1 minuto após adição do AAPH, e é monitorada por 10 minutos em espectrofotômetro com controle de temperatura (Peltier) e agitação magnética (OceanOptics USB 4000). Para eliminar possíveis interferências das amostras, foi realizado para cada amostra, um ensaio sem crocina, considerando-o como o branco da reação.

Mediante a competição cinética, o *bleaching* da crocina pela geração do radical peroxila (v_0) diminui na presença de um antioxidante. O antioxidante compete com a crocina pelo radical peroxila e uma nova velocidade de *bleaching* (v) corresponde a:

$$v = v_0 \times \frac{k_c [C]}{k_c [C] + k_a [A]}$$

Onde: $V_0 = k_1 \times [ROO^\bullet] \times [C]$; $k_c = k_1 \times [ROO^\bullet]$; $k_a = k_2 \times [ROO^\bullet]$ e $[ROO^\bullet]$ = concentração do radical peroxila; V_0 = velocidade da reação da crocina com $ROO^\bullet$; k_1 = constante de velocidade para a reação entre $ROO^\bullet$ e crocina; k_2 = constante de velocidade para a reação entre $ROO^\bullet$ e antioxidante; $[C]$ =concentração da crocina; e $[A]$ =concentração do antioxidante (amostra).

A velocidade de *bleaching* da crocina (V_0) diminui na presença de um antioxidante e um novo valor (V) é avaliada através da seguinte relação:

$$\frac{v_0}{v} = \frac{k_c [C] + k_a [A]}{k_c [C]} = 1 + \frac{k_a}{k_c} \times \frac{[A]}{[C]}$$

O valor de k_a/k_c , calculado a partir da inclinação de regressão linear do gráfico V_0/V versus $[A]/[C]$, indica a capacidade relativa de um antioxidante interagir com o radical peroxila.

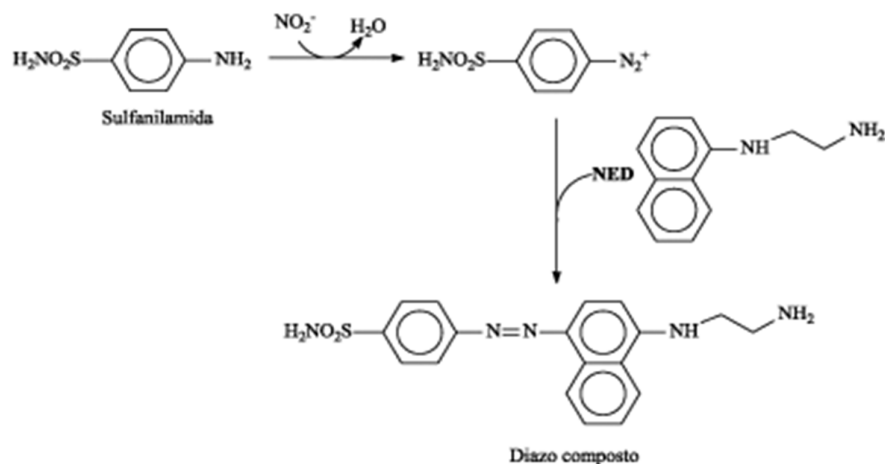
Pela divisão do k_a/k_c das amostras pelo k_a/k_c de um antioxidante padrão como o Trolox, obtém-se a razão entre as constantes e os valores para a capacidade antioxidante dos compostos analisados, podendo-se expressar os resultados em equivalentes ao Trolox.

3.10.6. Ensaio de captura para óxido nítrico ($NO^\bullet$)

O reagente de Griess, composto por solução aquosa de ácido sulfanílico (1%, p/v), N-(1-naftalenodiamina) (0,1%, p/v) e ácido fosfórico (2,5% v/v), é utilizado para determinar a concentração de nitrito por espectrofotometria. Em condições ácidas, o ácido sulfanílico reage com o nitrito formando um sal diazônio, o qual reage com o N-(1-naftalenodiamina) produzindo um composto colorido, detectado por espectrofotometria, em 540 nm (Figura 14).

O nitroprussiato de sódio, em solução aquosa (pH 7,4), produz $NO^\bullet$, um radical lipossolúvel e hidrossolúvel, que reage com o oxigênio formando nitrito e nitrato. O efeito sequestrador das amostras sobre o radical óxido nítrico foi avaliado em tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹, pH 7,4 e nitroprussiato de sódio 4 mmol.L⁻¹ após 150 minutos de incubação (YEN et al., 2001).

Figura 14. Representação do mecanismo de detecção do nitrito usando o reagente de Griess (RAMOS et al., 2006).



3.10.7. Ensaio de captura para o HOCl/OCl⁻ e para a taurina cloramina (TauCl)

A atividade antioxidante da amostra depende de sua capacidade em capturar o HOCl/OCl⁻ ou a taurina cloramina, prevenindo a oxidação do 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB); a oxidação do TMB pelo HOCl/OCl⁻ ou pela TauCl gera um cromóforo azul com absorbância máxima em 655 nm (KETTLE, WINTERBOURN, 1994; DYPBUKT et al., 2005). A solução padrão de OCl⁻ foi obtida diluindo-se a massa adequada de NaOCl em NaOH 10mmol/L, pH 12,0. A concentração de OCl⁻ foi determinada pelo seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 292 nm) (ZGLICZYNSKI et al., 1971). Para o HOCl/OCl⁻ utilizou-se a metodologia descrita por Dypbukt et al.(2005), em temperatura ambiente, com modificações. A reação de captura foi realizada em 240 μL de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4 e HOCl/OCl⁻ 30 $\mu\text{mol/L}$, na ausência e na presença de diferentes concentrações dos padrões ou extratos. Após 10 minutos de incubação, adicionou 60 μL do reagente de revelação com: TMB 2,8 mmol/L, dissolvido em dimetilformamida (DMF) e diluído v/v em ácido acético 0,8 mol/L com subsequente adição de iodeto de potássio 0,01 mol/L, obtendo-se uma solução com 0,005 mol/L de iodeto de potássio, 50% de DMF, 0,4 mol/L de ácido acético e 1,4 mmol/L de TMB. A reação foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e na ausência de luz, e a absorbância foi monitorada em 655 nm.

Para a TauCl, foram utilizadas as mesmas condições do ensaio supracitado, com a adição de taurina 5 mmol/L e incubação por 5 minutos com o HOCl/OCl⁻ antes da

adição dos padrões ou extratos. A presença do iodeto no reagente de revelação catalisa a oxidação do TMB pela TauCl (DYPBBUKT et al., 2005).

3.11. Avaliação do potencial citotóxico

3.11.1. Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais e esplenócitos

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Profa. Dr. Iracilda Zeppone Carlos e a doutoranda Francine Alessandra Manente (Departamento de Análises Clínicas) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Para estes testes foram utilizados camundongos machos (n=5) da linhagem Swiss, pesando entre 25-30g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara. Estes animais foram mantidos em gaiolas, com temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($56 \pm 2\%$) controladas, e ciclos de 12 horas com e sem luz. Os animais receberam água e ração (Purina) esterilizadas, *ad libitum*. Para obtenção e cultura de macrófagos foram inoculados via intraperitoneal com 3mL de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. LTDA) três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO_2 . As células do exsudado peritoneal foram obtidas pela inoculação de 5 mL de PBS gelado. As células foram contadas e ajustadas a uma concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI completo (RPMI-1640C). Após a célula ser mantida por uma hora em estufa a 37°C contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific) para aderência, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical. Co, EUA) a 5 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo, somente meio de cultura RPMI-1640C (controle negativo) e diferentes concentrações de extrato 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90; 1,95; 0,97 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas por 24 h e em seguida realizado o teste de viabilidade através do método de MTT.

Para a obtenção e cultura de esplenócitos totais, foram utilizados os mesmos animais inoculados e, após eutanásia, o peritônio foi exposto e aberto para a extração do baço que foi assepticamente removido e macerado. As hemácias foram lisadas com NH_4Cl a 4% e a suspensão foi lavada 3 vezes com PBS a 300xg por 5 minutos a 4°C . Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI completo e contadas em câmara de Neubauer. As células foram ajustadas para 5×10^6 células/mL e plaqueadas em placa de 96 poços juntamente com os estímulos (mesmas concentrações utilizadas para os macrófagos peritoneais) e incubadas em estufa de CO_2 , por 24 horas para posterior teste de viabilidade.

3.11.2. Avaliação da citotoxicidade contra cultura de células Vero

A célula VERO (ATCC CCL-81TM), linhagem contínua isoladas do epitélio renal de Macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan (Departamento de Ciências Biológicas) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

As células VERO foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células com confluência de 80 a 90 %, após o terceiro repique, foram tripsinizadas e em seguida, plaqueadas em placas de 96 poços com densidade celular 5 x10⁴ células/mL. Após, foram incubadas por 24 h para a completa adesão das células. O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com diferentes concentrações do extrato (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90; 1,95; 0,97µg/mL).

3.11.3. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT

Os ensaios para a determinação da viabilidade celular para os extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* foram realizados *in vitro*, utilizando o método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), que determina a habilidade de células viáveis em reduzir o MTT, formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta (MOSSMAN, 1983). Os ensaios foram realizados em macrófagos peritoneais e esplenócitos de camundongos, e células VERO.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e 100 µL de MTT foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37° C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana por 3 h. A solução de MTT foi retirada da placa e adicionado 100 µL de álcool isopropílico a cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplacas a 540 nm, com filtro de referência 620nm.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata com cada linhagem celular.

3.12. Análise estatística

Para os ensaios de antioxidante e citotoxicidade os dados foram analisados por análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido pelo pós-teste Tukey, utilizando o software GraphPad Prism 6.

A análise estatística da atividade antioxidante foi realizada em relação aos padrões, entre si e padrões vs. extratos da amostra vegetal; e a para a citotoxicidade foi realizada comparação entre os extratos; em ambas considerando um nível de significância estatística, limite de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento dos extratos

Uma quantidade inicial de 8 Kg de polpa dos frutos de *E. brasiliensis*, foi liofilizada em dois equipamentos diferentes: Labconco® - modelo 77500 series, -54°C, 0.0120 Mbar e CHRIST® - modelo ALPHA 2-4LDPLUS, -35°C, 0.220 Mbar, no laboratório multiusuários, PADC - FCF. Durante o processo de liofilização, algumas amostras apresentaram diferenças de coloração (polpa com coloração vinho escuro), quando foram submetidas ao equipamento Labconco®.

Para o cálculo do rendimento as amostras com coloração vinho escuro foram descartadas, contudo a liofilização inicial apresentou rendimento inicial de 4,9%. A partir desta liofilização inicial foi realizada a confecção dos extratos. Uma quantidade de 172,5g desta liofilização (estoque liofilizado) foi reservada para estudos posteriores. O rendimento obtido a partir das extrações da polpa liofilizada está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Obtenção e rendimento dos extratos.

Extrato	Polpa Liofilizada (g)	Extratos liofilizados (g)	Rendimento da extração (%)
Aquoso	99	60	60,6
Etanólico	90	35	38,9

Houve diferença na eficiência de extração em função dos solventes utilizados, com maior quantidade de massa para o meio aquoso. Todos os resultados relacionados aos extratos, no presente estudo, estão expressos com relação à massa de extrato seco, após liofilização.

4.2. Quantificação de fenóis totais

Os compostos fenólicos em plantas podem ser encontrados como ácidos fenólicos, fenilpropanoides, cumarinas, flavonoides, taninos, dentre outros (NACZK;

SHAHIDI, 2004). A quantificação de compostos fenólicos pode ser realizada por uma variedade de métodos, porém o mais utilizado é o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (ROGINSKY et al., 2005)

Para este ensaio a quantidade de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando uma curva analítica do ácido gálico, como padrão externo de quantificação (Figura 15). Os resultados foram obtidos a partir da equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica do ácido gálico e foram expressos em miligramas de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por grama de extratos de *E. brasiliensis*. Os resultados demonstraram maior teor de compostos fenólicos totais no extrato aquoso do que no extrato etanólico (Tabela 2), o que sugere maior potencial antioxidante no extrato aquoso.

Figura 15. Curva analítica do ácido gálico para determinação de compostos fenólicos totais.

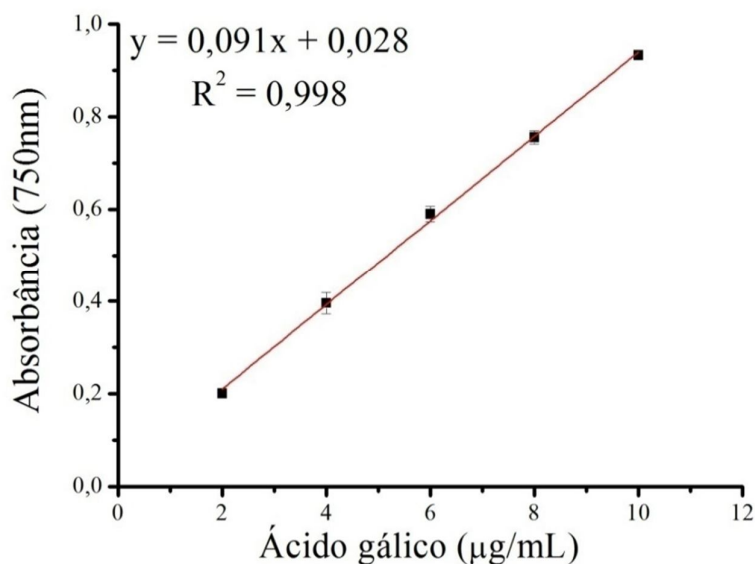


Tabela 2. Concentração de compostos fenólicos totais (expressos em mg de fenóis totais equivalentes ao ácido gálico) por g de extratos de *E. brasiliensis*.

Extrato	Compostos fenólicos totais (mg/g)	% (m/m)
Aquoso	25,145±0,142	2,5
Etanólico	16,400±0,084	1,6

Os valores dos teores de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por g de extrato aquoso ou etanólico, respectivamente, equivalem a 2514,5 e 1640,0 mg de CFEAG por 100 g de extrato seco.

Entre os vários antioxidantes obtidos de produtos naturais, compostos fenólicos contêm atividade sobre as espécies reativas de oxigênio, pois doam um átomo de hidrogênio ou um elétron para o radical livre. Por apresentarem ressonância após atuarem no combate aos radicais livres, os compostos fenólicos na forma de radicais possuem uma determinada estabilidade, que os permite reter o elétron desemparelhado sem causar danos às estruturas celulares (SOARES, 2002; BARREIROS et al., 2006).

Muitos compostos fenólicos apresentam potencial antioxidante, anticancerígeno ou anti-carcinogênico, antimutagênico, antibacteriano, antiviral ou anti-inflamatório, em maior ou menor grau (CAI et al., 2006).

Castro (2012) avaliou os extratos aquoso e etanólico 80% da polpa do fruto de *E. brasiliensis* para obter o teor de compostos fenólicos totais. Os valores obtidos foram aproximadamente de 4,0 mg CFEAG/100mg para o extrato etanólico de 5,0 mg CFEAG/100mg para o extrato aquoso. O mesmo trabalho avaliou os extratos do fruto de *Eugenia pyriformis* apresentando aproximadamente 4,0 mg CFEAG/100g para o extrato da etanólico e 4,5 mg CFEAG/100g para o extrato aquoso, ou seja, os teores observados menores do que os obtidos neste trabalho.

Em estudo realizado por Infante et al. (2016) o extrato etanólico 80 % de *E. brasiliensis* apresentou maior teor de compostos fenólicos totais nas folhas quando comparado a semente e polpa do fruto, 73,25; 42,60; 26,69 mg CFEAG/g respectivamente. Infante et al. (2016) apresentou teor de composto fenólico para a polpa do fruto ao do extrato aquoso obtido neste trabalho. Porém a variação do teor de

compostos fenólicos encontrada para o extrato etanólico pode ser explicada devido a diferenças nas variedades do vegetal, clima, grau de maturação e método de extração.

Guedes (2013) apresentou quantidade similar de compostos fenólicos totais em extrato etanólico 40% dos frutos de *E. brasiliensis* (25,98 mg CFEAG/g). Também, foi evidenciado em extrato etanólico 40 % dos frutos teores de compostos fenólicos menores em jabuticaba e uvaia (*Eugenia pyriformis*), 9,55 e 24,09 mg CFEAG/g respectivamente. Reynertson et al. (2008) encontrou 31,6 mg CFEAG/g em peso seco em fruto de jabuticaba liofilizada, para *E.brasiliensis* encontrou-se 24,8 mg CFEAG/g, para *E. aggregata* 25,3 mg CFEAG/g, para *E. luschnathiana* 22 mg CFEAG/g, e menor valor para *E. reinwardtiana* com 9,25 mg CFEAG/g.

Sun e colaboradores (2002) investigaram os compostos fenólicos totais de frações solúveis de extração realizada com acetona 80% de *V. macrocarpon* e mais 11 frutas diferentes. Este trabalho expressou seus resultados em miligramas de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por 100 gramas em peso fresco. Entre todas as frutas analisadas, a *V. macrocarpon* teve a maior conteúdo de compostos fenólicos solúveis livres 507,0 mg CFEAG/100g, seguido de maçã 272,1, uva vermelha 182,0, morango 147,8, limão 66,3, pêssego 65,3, laranja 56,8, banana 56,1, pêra 53,6, e abacaxi 40,4. Toranja teve o menor teor de fenólicos livres (30,7mg/100 g). Çelik et al. (2008) realizou a avaliação dos compostos fenólicos frente a diferença dos estágios de maturidade de *V. macrocarpon* que teve declínio de 7990 to 4745 mgCFEAG /kg em peso fresco, quando em estágio mais avançado de maturação.

O método de determinação de teor de compostos fenólicos totais pelo reagente Folin-Ciocalteu pode não fornecer valores exatos, já que outros compostos redutores, como o ácido ascórbico, podem reagir com o ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico presente no reagente, formando o complexo azul de molibdênio. Além disso, ele reage com alguns compostos não fenólicos (ex. açúcares redutores) que também apresentam atividade antioxidante, sendo considerado por alguns autores um método para determinar a capacidade antioxidante total, já que apresenta elevada correlação com outros métodos antioxidantes, devido às similaridades químicas presentes nestes ensaios (EVERETTE et al., 2010; HUANG; OU; PRIOR, 2005). Levando em consideração este argumento e o resultado de que, o teor de açúcares redutores foi maior para o extrato aquoso, isto pode ter influenciado o resultado para compostos fenólicos resultando também em maior quantidade para o extrato aquoso.

4.3. Quantificação de flavonoides totais

Flavonoides são metabólitos secundários mais abundantes entre os polifenóis da nossa dieta e incluem subclasses diferentes, isto é, flavonóis, flavonas, flavononas, antocianidinas e isoflavonas, dentre outras (ZAMORA-ROS et al., 2014; SEBASTIAN et al., 2015).

Foi avaliado o teor de flavonoides nos extratos de *E. brasiliensis* e para isso foi obtida uma curva analítica com a quercetina (Figura 16) e o resultado expresso em mg de flavonoides totais equivalentes a quercetina (FLAVEQ) por grama de extrato de *E. brasiliensis*. Neste ensaio a quantidade de flavonoides totais foi semelhante para os dois extratos (Tabela 3).

Figura 16. Curva analítica da quercetina para determinação de flavonoides totais.

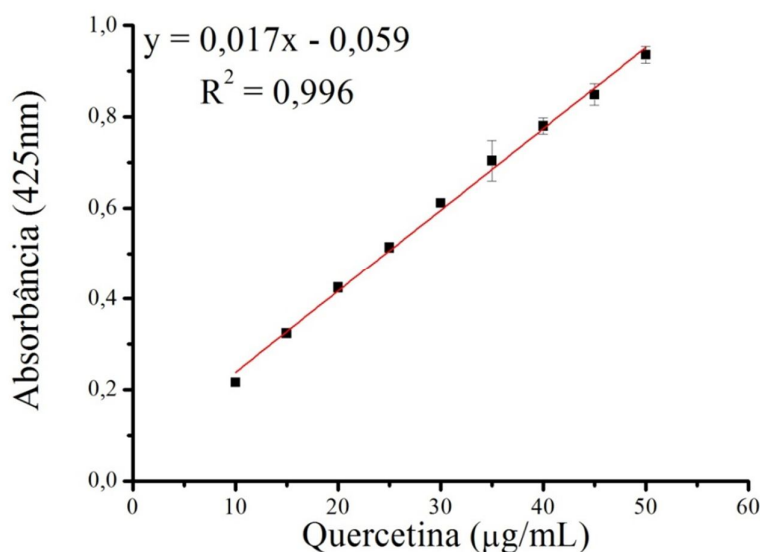


Tabela 3. Concentração de flavonoides totais (expressos em mg de flavonoides totais equivalentes a quercetina) por g de extratos de *E. brasiliensis*.

Extrato	Flavonoides Totais (mg/g)	% (m/m)
Aquoso	10,00±0,006	1,0
Etanólico	15,60±0,025	1,5

Os valores de flavonoides totais equivalentes a quercetina (FLAVEQ) por g de extrato aquoso e etanólico, respectivamente, equivalem a 1004 e 1560 mg de FLAVEQ por 100 g de extrato seco.

Castro (2012) também avaliou o teor de flavonoides totais para os extratos aquoso e etanólico 80% da polpa do fruto de *E. brasiliensis*, obtendo os respectivos valores: 8,0 e 4,0, porém os resultados foram expressos mg de flavonoides totais equivalentes a rutina (RU) por 100 mg de extrato seco de *E. brasiliensis*. Valores relativamente próximos aos encontrados neste trabalho.

Com relação à quantificação de flavonoides totais poucos são os estudos realizados com *E. brasiliensis*.

Em trabalho de revisão, realizado por Pappas e Schaich (2009), além de relacionar os teores de flavonoides encontrados em *V. macrocarpon*, também caracterizou quais classes de flavonoides foram encontrados. Ficou demonstrado neste trabalho uma extensa variedade de flavonoides, bem como de compostos fenólicos, antocianinas e açúcares.

4.4. Quantificação de antocianinas totais

As antocianinas são metabólitos pertencentes à classe dos flavonoides (WALTON et al., 2006). Segundo Rubinskiene et al. (2005) as antocianinas de um modo geral, são susceptíveis às mudanças de pH, temperatura e a ação de enzimas, as quais promovem mudança dos máximos de absorção no espectro, fato que interfere diretamente no doseamento destes metabólitos na amostra vegetal analisada. Sendo assim, para este ensaio foi utilizada a variação de pH.

Para antocianinas o teor determinado no extrato aquoso apresentou-se menor do que o teor extrato etanólico (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração de antocianinas totais (expressos em mg de antocianinas totais equivalentes a cianidina-3-glicosídeo) por g de extratos de *E. brasiliensis*.

Extrato	Antocianinas Totais(mg/g)	% (m/m)
Aquoso	0,300±0,176	0,03
Etanólico	0,800±0,085	0,08

Os valores de antocianinas totais equivalentes a cianidina-3-glicosídeo (C3G) por g de extrato aquoso e etanólico, respectivamente, equivalem a 30 e 80 mg de C3G por 100 g de extrato seco.

Guedes (2013) determinou a quantidade de antocianinas totais em extratos etanólicos 40% de vários frutos, utilizando o método de pH diferencial, foi encontrado o segundo maior valor para *E. brasiliensis* com 266,34 mg C3G/g de fruta fresca, em primeiro lugar para a jabuticaba e por último uvaia (*E. pyriformis*), 342,23 e 4,77mgC3G/g de fruta fresca, respectivamente. Teixeira (2015) também utilizou o método de pH diferencial para determinar a quantidade de antocianinas totais nos extratos metanólicos 70% acidificados com 5% de ácido acético e encontrou para a variedade vermelha de *E. brasiliensis* valor maior de antocianinas variando de 30 a 200 mgC3G/ 100g de fruta fresca, porém não foram encontradas antocianinas em frutos e sementes da variedade amarela. Reynertson et al. (2008) obteve o segundo maior valor, em relação a quantidade de antocianinas totais avaliada em diferentes gêneros de plantas, e o primeiro lugar, para *E. brasiliensis* (8,37 mg C3G/g em peso seco) quando comparada a mais quatro plantas do mesmo gênero. Esse valor representa 27,9 vezes a mais do que a quantia de antocianinas totais encontradas neste estudo.

Quantidades altas de antocianinas são encontradas em *V. macrocarpon* em diversos trabalhos, bem como sua identificação; encontra-se entre as antocianinas desta espécie: cianidina, peonidina, malvidina, pelargonidina, delphinidina e petunidina (WU, PRIOR, 2005). O teor de antocianinas pode variar conforme o amadurecimento, a variedade e tamanho do fruto (VVEDENSKAYA, VORSA, 2004; ÇELIK et al., 2008; BROWN et al., 2012). Pappas e Schaich (2009) em seu trabalho de revisão sobre a *V. macrocarpon* relatam valores de antocianinas que variam de 13,6-171 mg/100 g fruta fresca, bem como a caracterização de diversas classes de antocianinas.

4.5. Quantificação de açúcares totais

Os monossacarídeos, como a glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupo carbonílico ou cetônico livres, passíveis de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Os dissacarídeos que não possuem essa característica sem hidrólise da ligação glicosídica e são denominados de açúcares não redutores (SILVA et al., 2003).

Foi obtida uma curva analítica com a glicose (Figura 17) para expressar os resultados desse ensaio em mg de açúcares totais equivalentes a glicose por grama de

extrato de *E. brasiliensis*. O extrato aquoso apresentou semelhança no teor de açúcares em relação ao extrato etanólico, para açúcares redutores apresentou quantidade menor e para açúcares não redutores apresentou uma maior quantidade em relação ao extrato etanólico (Tabela 5).

Figura 17. Curva analítica da glicose para determinação de açúcares totais.

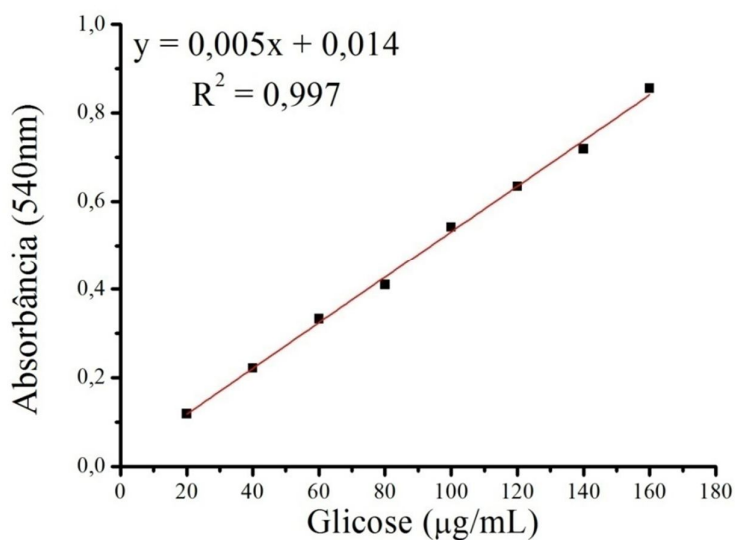


Tabela 5. Açúcares totais em mg de açúcar total ou açúcares não redutores ou açúcares redutores equivalentes a glicose por g de extratos de *E. brasiliensis*.

Extrato	Açúcares Totais (mg/g)	Açúcares Totais %	Açúcares não redutores (mg/g)	Açúcares não redutores %	Açúcares redutores (mg/g)	Açúcares redutores %
Aquoso	774,40±0,277	77,44	136,80±0,865	13,68	637,60±1,082	63,76
Etanólico	735,20±2,009	73,52	251,10±2,422	25,10	484,00±2,009	48,40

Os valores de açúcares totais equivalentes a glicose (GLI) por g de extrato aquoso e etanólico, respectivamente, equivalem a 77.440 e 73.520 mg de GLI por 100 grama de extrato seco.

Para análise cromatográfica (item 4.7) dos extratos foi realizado um pré-tratamento dos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* através de uma partição líquido-líquido que utilizou n-butanol e água na mesma proporção (1:1, v/v), com o objetivo de concentrar os compostos fenólicos e outros metabólitos secundários na fração n-butanol e eliminar os interferentes polares, açúcares, que permaneceriam na fase aquosa (QUEIROZ et al., 2001). Os rendimentos obtidos das frações aquosas do extrato aquoso e etanólico foram de 78,73% e 73,40% (m/m), respectivamente, sendo coerentes com os valores determinados para açúcares totais de 77,44% e 73,52% (m/m), respectivamente.

Teixeira et al. (2015) realizou a quantificação de açúcares totais solúveis em extrato etanólico 80% das variedades de frutos roxos e amarelos de *E. brasiliensis* através de CLAE-DAD, utilizando curvas analíticas com sacarose, glicose e frutose. As variedades dos frutos roxos e amarelos apresentaram similaridade no teor de açúcares totais encontrados com 2,98 e 2,97 g/100g em fruto fresco, respectivamente, os valores de glicose apresentaram-se altos 2,84 e 2,85g/100g e os valores de frutose baixos 0,13 e 0,12g/100g; sacarose não foi detectada.

Com relação à quantificação de açúcar totais, açúcares redutores e não redutores há poucos estudos realizados com o fruto de *E. brasiliensis*. E os resultados obtidos no presente estudo são relevantes para análise e discussão de outros ensaios realizados.

Os valores obtidos para determinação de açúcares totais e açúcares redutores realizados por Pereira et al. (2012) mostraram os maiores valores de açúcares totais e açúcares redutores para *E. pyriformis*, pertencente ao mesmo gênero do fruto estudado neste trabalho, 36,72 e 36,54 g/100g de peso seco de extrato da polpa, respectivamente, quando comparados com *Psidium cattleianum* Sabine e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (22,74; 18,6 g/100g e 34,45; 34,06 g/100g, respectivamente).

Através de estudo de revisão proposto por Pappas e Schaich (2009), há poucos estudos em relação ao teor de açúcares no fruto de *Vaccinium macrocarpon*, mas há alguns estudos em relação ao suco do fruto. Este trabalho relata pouca quantidade do teor de açúcar no suco do fruto, valor próximo a 3,7-5,4%.

4.6. Identificação de taninos

Os taninos representam compostos polifenólicos complexos heterogêneos e hidrossolúveis, de elevado peso molecular. De acordo com suas estruturas químicas, são divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis, formados por um poliol central

estereificado por unidades de ácido gálico (galotaninos) ou ácido hexahidroxidifênico (elagitaninos), e taninos condensados, formados através da condensação de unidades de catequinas ou leucocianidinas (MELO, SANTOS, 2006; CUNHA et al., 2008). Para a identificação de taninos foram empregados 3 testes de precipitação e um teste de reação colorimétrica no extrato bruto. Para os resultados dos testes de precipitação a reação com gelatina e a reação de acetato de chumbo apresentaram-se positivos, indicando a presença de taninos. Porém, os testes podem representar um falso positivo devido à presença de pseudotaninos na reação com gelatina; ou de outros metabólitos secundários na reação com acetato de chumbo. O teste de reação colorimétrica através da reação de sais de ferro também se apresentou positivo e obteve-se uma coloração azul indicando a presença de taninos hidrolisáveis. No entanto, outros compostos fenólicos presentes na solução do extrato podem interferir no resultado produzindo variações na cor exibida. Os resultados obtidos deste teste estão apresentados na Tabela 6 e sugerem a presença de taninos hidrolisáveis (galotaninos ou elagitaninos) ou de ácido gálico, ácido elágico ou seus derivados, devido à precipitação com gelatina e chumbo e especificamente à coloração azul característica para estas substâncias observadas no ensaio com o cloreto férrico.

Tabela 6. Resultados obtidos nos ensaios na identificação de taninos no extrato bruto de *E. brasiliensis*.

Amostra	Reação	Resultados
Extrato Bruto	Reação com Gelatina	+
	Reação com Sulfato de Quinina	-
	Reação com Acetato de Chumbo	+
	Reação de Sais de Ferro	+ (cor azul)

+ Indica resultado positivo para o teste

- Indica resultado negativo para o teste

Em alguns trabalhos relacionando a espécie de *E. brasiliensis* e o gênero *Eugenia* também foram identificados taninos, demonstrando entre os componentes majoritários o ácido gálico (ABE et al., 2012; SILVA et al., 2014; TEIXEIRA et al. 2015; INFANTE et al., 2016).

No trabalho com a *V. macrocarpon* de Pappas e Schaich (2009), em frutos e derivados da espécie também foram identificados taninos, em especial a classe de

catequinas. O ácido elágico representa 51% dos compostos fenólicos totais encontrados na *V. macrocarpon*, apresentando-se de forma livre, constituindo elagitaninos ou na forma de outros glicosídeos (NILE, PARK, 2014).

4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Análises feitas por CLAE-DAD permitem comparar, classificar, identificar e assim fornecer uma caracterização mais ampla do material vegetal. Em associação com uma técnica de separação e um detector eficiente, não é possível apenas quantificar, mas também obter dados que auxiliam na elucidação das estruturas de seus componentes.

Os extratos aquoso e etanólico foram submetidos à análise em modo gradiente para obter um perfil cromatográfico a fim de compará-los quanto a sua complexidade e componentes majoritários. Os cromatogramas apresentados correspondem às análises das frações n-butanólicas de ambos os extratos. Foram obtidos os espectros no UV para todos os cromatogramas dos extratos e padrões.

Os cromatogramas dos extratos aquoso (Figura 18 A) e etanólico (Figura 18 B) demonstraram semelhança dos seus perfis cromatográficos qualitativos (número de picos e tempos de retenção), apresentando um pico majoritário com $t_R = 41,7$ min. A maior intensidade dos picos majoritários foi observada no comprimento de onda de 270 nm. Considerando-se os volumes de injeção utilizados de 35 μ L para o extrato aquoso e de 20 μ L para o extrato etanólico, bem como as áreas dos picos nos cromatogramas, é possível concluir que as substâncias correspondentes aos picos observados estão em maior concentração no extrato etanólico. Os espectros no UV/Vis dos picos principais do extrato aquoso e etanólico estão representados nas Figuras 19 e 20. Os espectros no UV/Vis dos picos correspondentes em termos de t_R em ambos extratos foram idênticos.

Figura 18. Cromatogramas do extrato aquoso (A) e etanólico (B) de *E. brasiliensis* utilizando CLAE-DAD (270 nm). Condições de análise: fase móvel acetone (B) e água (A) adicionadas de ácido acético (1 %) em modo gradiente: 13-68% B em 50 min, 100% B por 10 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 25 µL para o extrato etanólico e 35 µL para o extrato aquoso e detector de arranjo de diodos (DAD) com leitura de 270 nm.

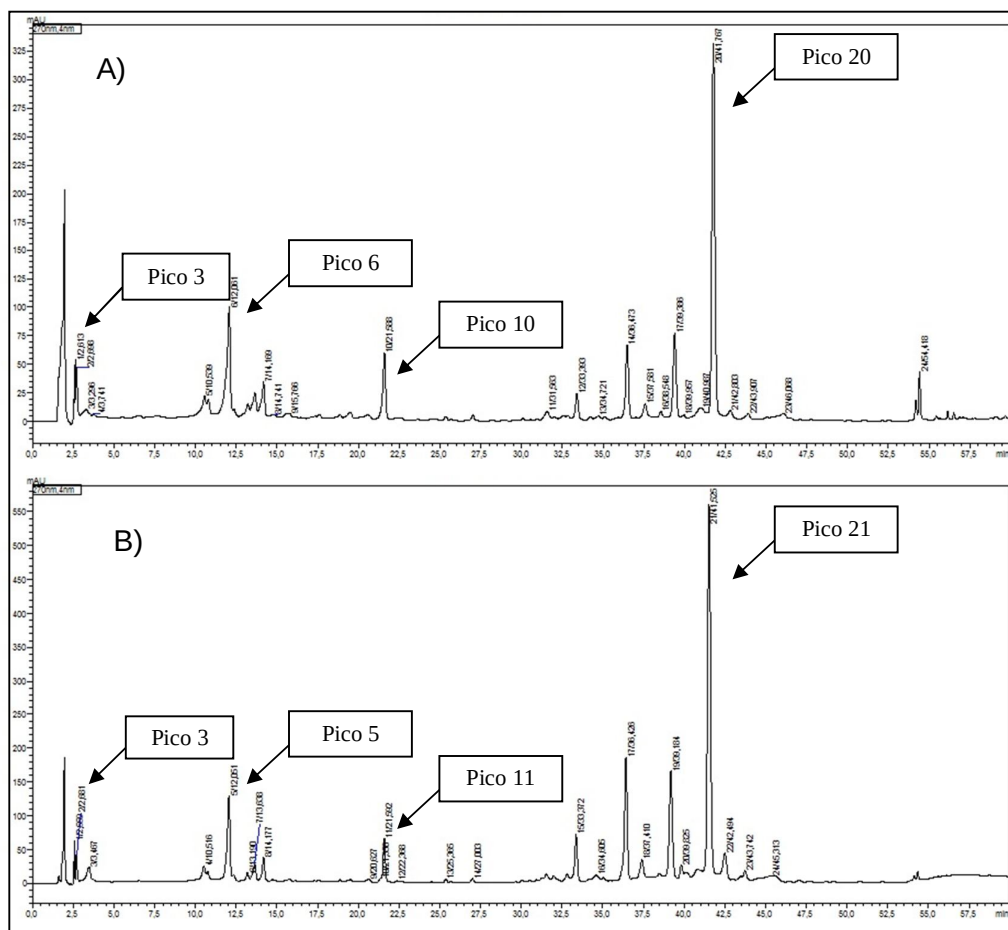


Figura 19. Espectros no UV/Vis dos picos do extrato aquoso referentes ao cromatograma da figura 18(A): 6 (A), 10 (B) e 20 (C).

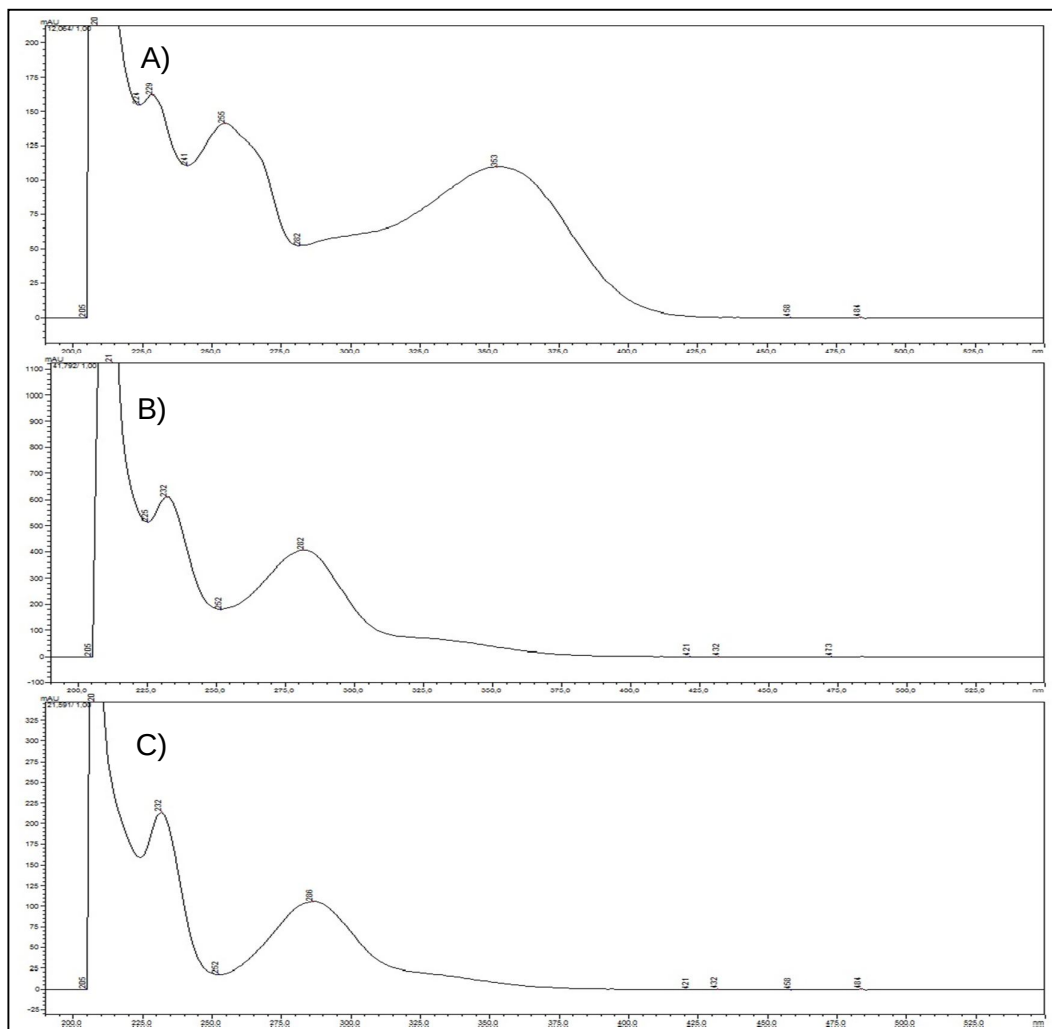
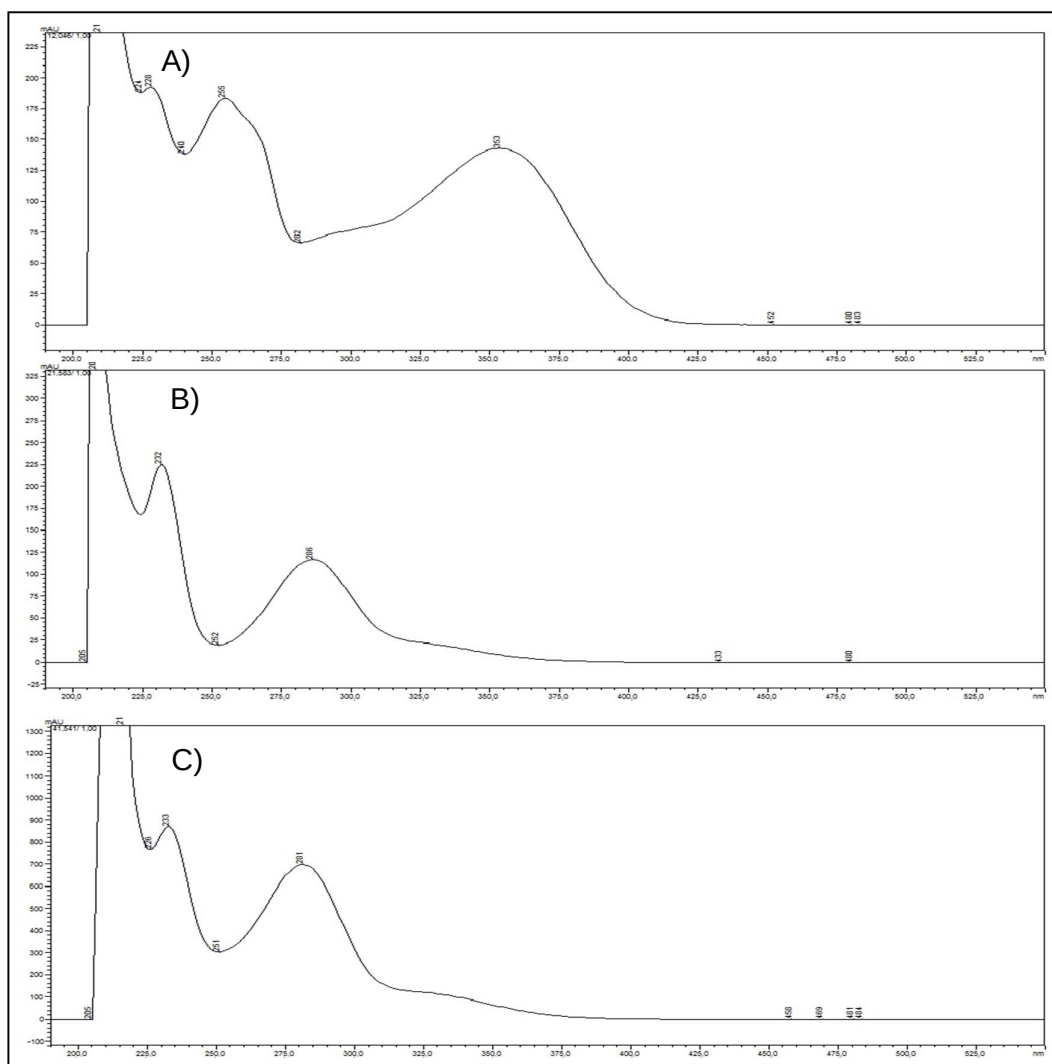


Figura 20. Espectros no UV/Vis dos picos do extrato etanólico referentes ao cromatograma da figura 18 (B): 5 (A), 11 (B) e 21 (C).



Os espectros no UV/Vis das Figuras 19 e 20 apresentaram bandas na região de absorção de compostos fenólicos compreendidas entre cerca de 240 e 350 nm, possível observar nas Figuras 19 (B) e (C) e 20 (B) e (C) dos espectros de UV/Vis dos extratos aquoso e etanólico. Segundo Solovchenko (2011), flavonoides apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ entre 240-285; alguns outros compostos fenólicos apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ entre 250-280 nm e 300-360 nm, como se pode observar nas Figuras 19 (A) e 20 (A); as posições exatas dos seus máximos variam conforme as classes de compostos. Flavan-3-ols, proantocianidinas e dihidrocalconas mostram uma absorção máxima principalmente entre 270-290 nm, enquanto que di-hidroflavonol além de apresentaras mesmas bandas

de absorção apresenta também uma pequena absorção à $\lambda_{\text{máx}}$ 320 nm (SANTOS–BUELGA et al., 2003; MARSTON, HOSTETTMAN, 2006).

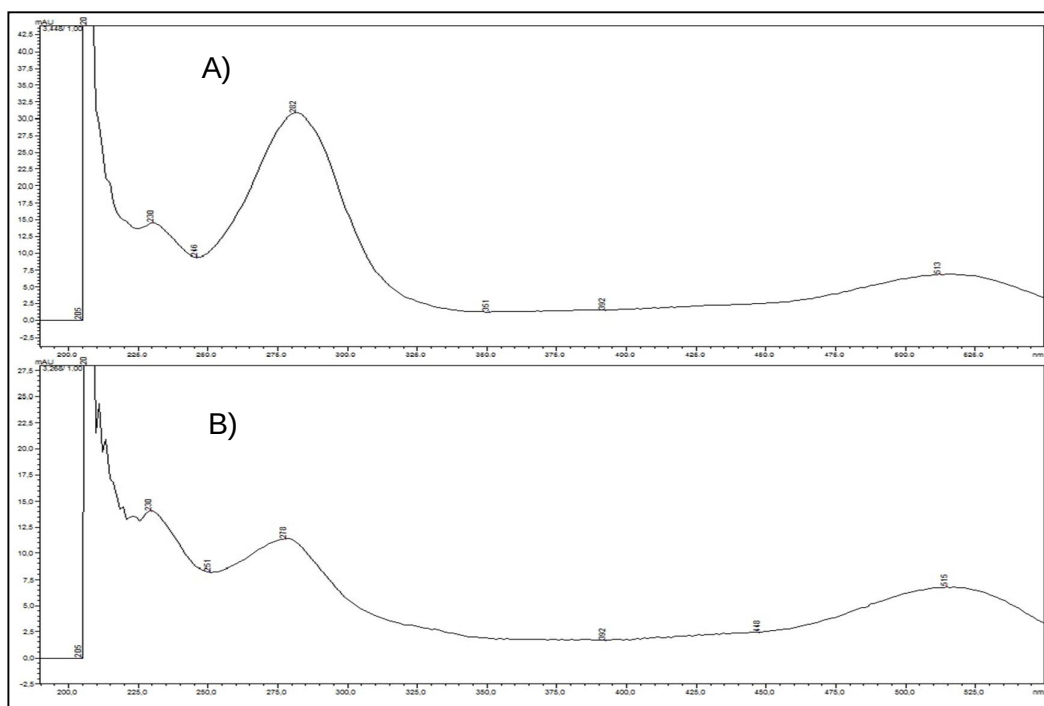
Teixeira et al. (2015) identificou elagitaninos e flavonóides em variedades de *E. brasiliensis* utilizando CLAE-EM em fase reversa acoplado ao espectrofotômetro de massas. Foram encontrados nos frutos de variedade roxa de *E. brasiliensis* duas classes de flavonoides, entre elas cinco tipos de antocianinas e dois tipos de flavonóis, além de outros compostos fenólicos. Nos frutos de variedade amarela foram encontrados duas classes de flavonoides e dois derivados de ácido elágico foram detectados. As antocianinas, como esperado, foram encontrados apenas no fruto de variedade roxa, demonstrando diferença no perfil das duas variedades.

Flores et al. (2012) identificou nove antocianinas, dos quais cinco foram encontradas nos frutos de variedade roxa de *E. brasiliensis*. Adicionalmente, Silva et al. (2014) identificaram quatro tipos de antocianinas na mesma variedade, exibindo em seu trabalho uma forma adicional: cianidina 3-acetil-hexoside. Outros compostos também foram identificados nos frutos de variedade roxa como miricetina, rutina e kaempferol (REYNERTSON et al., 2008). Infante et al. (2016) também identificaram e quantificaram os compostos fenólicos encontrados em *E. brasiliensis*.

Considerando os trabalhos supracitados, apesar de o presente trabalho analisar extratos com misturas dos frutos contendo variedades roxa e amarela da espécie de *E. brasiliensis*, estes confirmam a diversidade de compostos encontrados na espécie vegetal. Conforme podemos observar no espectro do UV/Vis dos picos 3 de ambos os extratos um tipo de antocianina (Figura 23), já que foi observada banda com $\lambda_{\text{máx}} = 520$ nm.

Os padrões quercetina, rutina, ácido gálico e ácido elágico foram utilizados para fins de identificação, porém nenhuma destas substâncias foi identificada nos extratos, o que foi confirmado através de co-injeções dos padrões com os extratos no cromatógrafo.

Figura 21. Espectros no UV/Vis dos picos 3 referentes aos cromatogramas dos extratos aquoso (A) e etanólico (B).



4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.8.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana é uma etapa importante na determinação de potencial biológico dos produtos naturais, a qual pode ser avaliada por diversos métodos laboratoriais tais como difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição. Estes métodos possuem a capacidade de medir a sensibilidade *in vitro* dos micro-organismos em relação às biomoléculas com potencial inibitório; orientar a escolha da terapia antimicrobiana mais adequada e até mesmo representar uma importante ferramenta no monitoramento da evolução da resistência bacteriana. A microdiluição apresenta-se como a mais viável na determinação da CIM, uma vez que se constitui em método eficaz que possibilita a utilização de mais de um composto-teste, bem como de diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio, é possível que seja realizada em microplacas, exigindo pequenos volumes de amostras e reagentes, fato extremamente vantajoso quando se trabalha com produtos naturais, que na grande maioria das vezes

são obtidos em pequenas quantidades (COWAN, 1999; YUNES, CALIXTO, 2001; ALVES et al., 2008; DAS et al., 2010; ANVISA, 2013).

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados de CIM obtidos na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica, com a leitura realizada com resazurina e TTC, das amostras vegetais frente a todas as cepas empregadas no estudo, assim como os resultados dos controles positivos.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima para as cepas bacterianas dos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* e o controle positivo.

Cepa bacteriana	CIM (µg/mL)		
	Extratos		Padrão
	Aquoso	Etanólico	Ampicilina
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1000	500	0,7
SSC 1	>1000	1000	31,2
SSC 2	>1000	1000	0,7
SSC 3	>1000	1000	0,3
SSC 4	>1000	1000	1,4
SSC 5	>1000	1000	0,7
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	3,1
ECC 1	>1000	>1000	R
ECC 2	>1000	>1000	0,7
ECC 3	>1000	>1000	1,5
ECC 4	>1000	>1000	0,7
ECC 5	>1000	>1000	R
ECC 6	>1000	>1000	1,5
ECC 7	>1000	>1000	3,1
ECC 8	>1000	>1000	1,5
ECC 9	>1000	>1000	1,5
ECC 10	>1000	>1000	R

R= resistência

O extrato aquoso e extrato etanólico apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* com CIM/CBM = 1000 µg/mL e CIM = 500 µg/mL, respectivamente.

Para as 5 cepas clínicas SSC1, SSC2, SSC3, SSC4 E SSC5 de *S. saprophyticus* apenas o extrato etanólico apresentou atividade (CIM/CBM = 1000 µg/mL, para todas as 5 cepas). Os extratos da amostra vegetal não apresentaram atividade contra a cepa de *E. coli* ATCC25922 e contra as cepas clínicas ECC1, ECC2, ECC3, ECC4, ECC5, ECC6, ECC7, ECC8, ECC9 e ECC10 de *E. coli*, nas concentrações testadas.

Magina (2009) em seu trabalho sobre óleo essencial das folhas de *E. brasiliensis*, demonstrou atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) com CIM de 156,2 µg/mL, o que demonstra ser um potente inibidor e para *E. coli* (ATCC 25922) com CIM/CBM de 624,9 µg/mL. Em estudo realizado pela mesma autora em 2008 o extrato bruto das folhas apresentou atividade contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, com valores de CIM/CBM de 780 µg/mL. O extrato bruto do caule apresentou os mesmos valores de CIM contra *S. aureus*, (CIM/CBM = 780 µg/mL). Das frações obtidas das folhas e caule, a mais ativa foi acetato de etila, com CIM/CBM = 390 µg/mL para *E. coli*, com os mesmos resultados para ambas as frações.

No trabalho de Magina (2008), supracitado, também foram realizados a determinação inibitória mínima para outros gêneros de *Eugenia*, tais como para *E. beaurepaireana* e a *E. umbelliflora*. Para *E. beaurepaireana*, observou-se que para a cepa de *S. aureus* o extrato bruto do caule, a fração de acetato de etila e as frações aquosa e butanólica demonstraram-se efetivas com CIM de 390, 75, 15, 780 µg/mL, respectivamente. Contra a cepa de *E. coli* as frações de acetato de etila e butanólica foram as mais efetivas, com CIM 780 e 390 µg/mL, respectivamente. Em relação a *E. umbelliflora* os resultados de CIM obtidos com o extrato bruto, as frações hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas desta espécie contra *S. aureus* foram de 15 µg/mL, os melhores resultados observados.

Siebert et al. (2014) determinaram a concentração inibitória mínima contra *S. saprophyticus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* do óleo essencial das folhas de *E. brasiliensis*, obtidas em diferentes estações do ano. Os óleos obtidos durante o outono e inverno apresentaram CIM de 500 µg/mL e CIM = 1000 µg/mL durante as estações de verão e primavera contra *S. saprophyticus*. Em relação à *E. coli*, apenas o óleo obtido no outono demonstrou fraco potencial, CIM = 1000 µg/mL. Também foi observada atividade discreta contra *P. aeruginosa* pelo óleo obtido no inverno, CIM = 1000 µg/mL e moderado com o óleo obtido no outono CIM = 500 µg/mL. Estes resultados demonstraram diferenças na atividade antibacteriana, conforme extração obtida do óleo em diferentes estações do ano.

Estudos de atividade antibacteriana referentes ao fruto de *E. brasiliensis* não foram encontrados até a finalização deste trabalho.

Segundo Caillet et al. (2012) foi avaliada a concentração antimicrobiana mínima diante de diversas frações de *V. macrocarpon*, correlacionando os resultados a quantidade de compostos fenólicos presentes. Foram utilizados sucos e extratos desta espécie vegetal contra espécies de bactérias e fungos, entre elas *E. coli* O157: H7 EDL933, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* ATCC 15442.

Pappas e Schaich (2009) em artigo de revisão sobre a *V. macrocarpon*, apresentou resultados relacionando produção de biofilme e a interferência desta espécie vegetal com adesão bacteriana sobre uma variedade de células e matrizes biológicas, incluindo as células uroepiteliais. Evidenciam também, a efetividade nestes sistemas diferenciados, em diferentes estruturas e componentes moleculares. Ocorrem de forma tão efetiva devido à riqueza de compostos fitoquímicos com atividade antibacteriana, encontrados nesta espécie vegetal.

As Figuras 22 a 25 apresentam as curvas de inibição dos compostos avaliados frente às cepas empregadas nesta investigação.

Os dados apresentados na Figura 22 evidenciam maior atividade do extrato etanólico frente ao extrato aquoso.

A Figura 23 confirma o potencial antimicrobiano apresentado pelo extrato etanólico uma vez que foi o único a apresentar atividade contra as cepas clínicas de *S. saprophyticus*. Duas das cepas empregadas nesta investigação mostram um perfil mais sensível ao derivado vegetal (SSC4 e SSC5). É importante salientar que cepas de origem clínica possuem naturalmente um perfil de resistência maior, uma vez que são isoladas de ambientes que estão propensos a diversos fatores extrínsecos e intrínsecos que conferem as mesmas um maior padrão de resistência a fim de manterem sua sobrevivência (RAMOS et al., 2015).

Figura 22. Curva de inibição dos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* contra a cepas de *S. aureus* ATCC 25923.

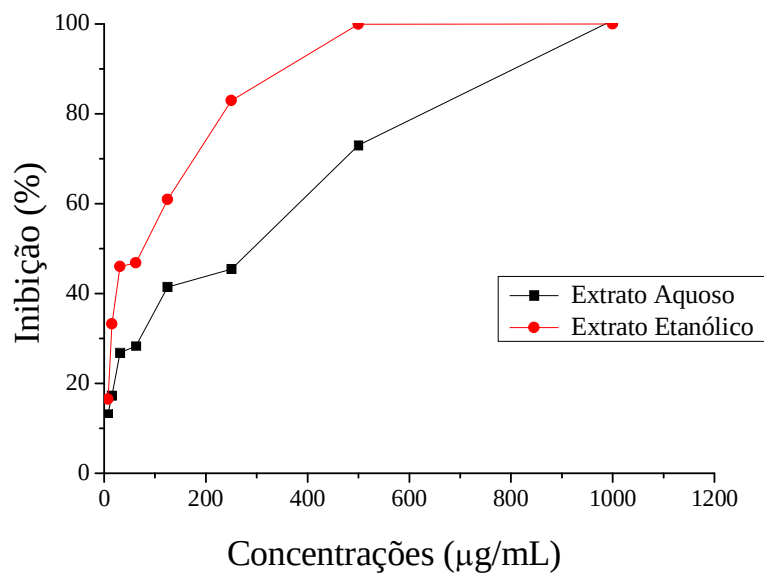
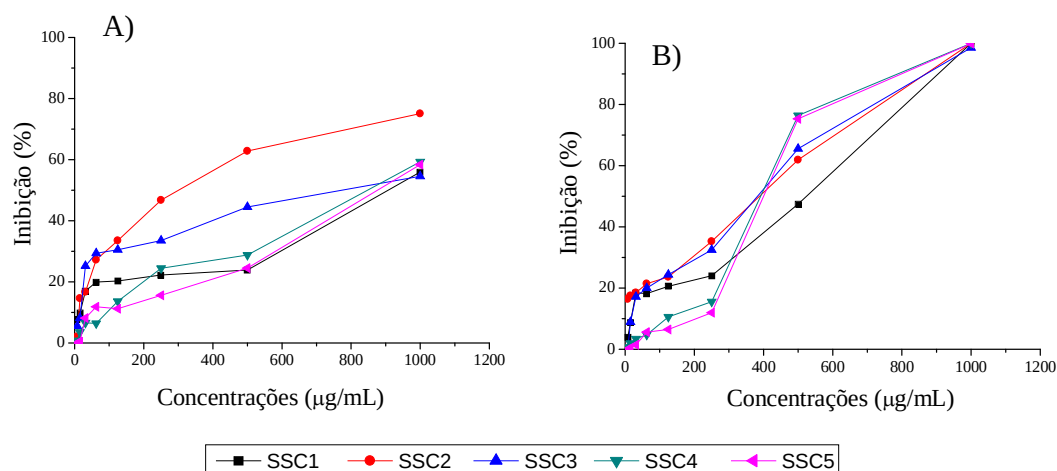
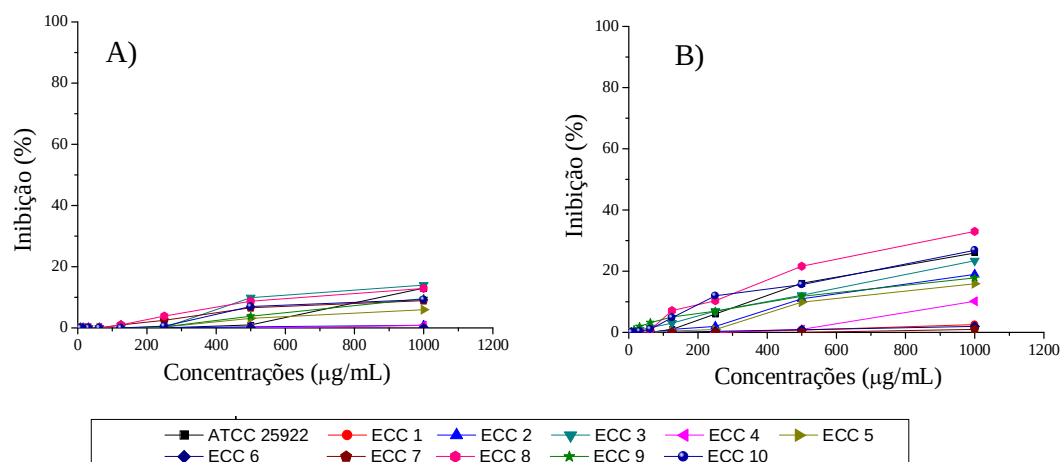


Figura 23. Curvas de inibição dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de *E. brasiliensis* contra as cepas de *S. saprophyticus*.



Na Figuras 24, pode-se observar que não foram encontrados padrões inibitórios contra as cepas de *E. coli*, entretanto comparando-se os resultados obtidos que o extrato etanólico foi discretamente mais ativo.

Figura 24. Curvas de inibição dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de *E. brasiliensis* contra as cepas de *E. coli*.



Para as cepas fúngicas estudadas de *C. albicans* o extrato aquoso não apresentou atividade. O extrato etanólico apresentou atividade contra a *C. albicans* ATCC18804 e CAV5, com CIM/CFM de 1000 µg/mL.

Na Tabela 8, estão apresentadas a concentração inibitória mínima para as cepas fúngicas dos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* e o controle positivo.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima para as cepas fúngicas dos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* e o controle positivo.

Cepa fúngica	CIM (µg/mL)			
	Aquoso	Etanólico	Fluconazol	Anfotericina B
ATCC 5314	>1000	>1000	R	5,0
ATCC 18804	>1000	1000	8,0	2,5
CAV 5	>1000	1000	R	5,0

R= resistência

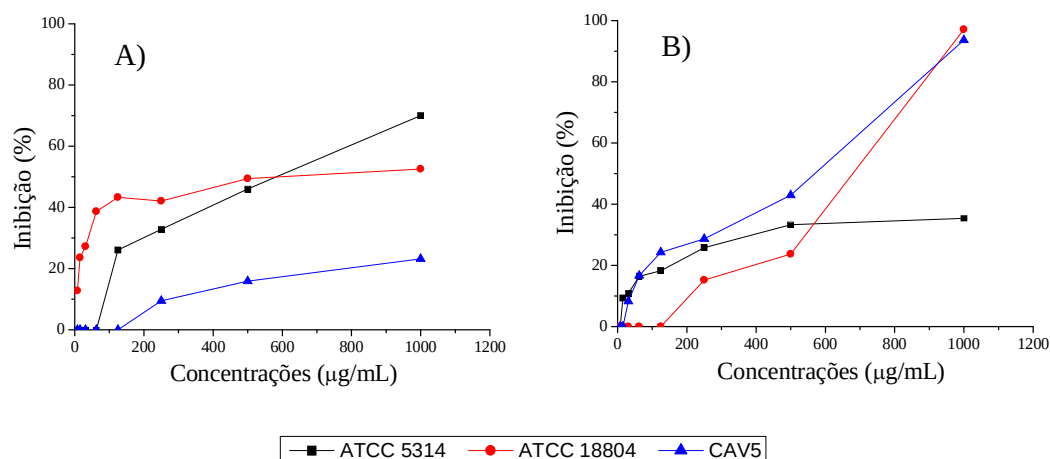
Magina (2008) também determinou a concentração inibitória mínima de cepas fúngicas para *E. brasiliensis*. A maioria das frações utilizadas não apresentou atividade contra as leveduras testadas. Observou-se que o extrato bruto do caule desta espécie foi mais ativo que o extrato das folhas, apresentando valores de CIM= 7,8 µg/mL para *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*, o que corresponde a uma alta atividade contra

estes fungos. Ao analisar as frações obtidas da partição, observa-se que os valores de CIM obtidos foram menores que os obtidos com o extrato bruto total, sugerindo que a ação destes compostos seja sinérgica, ou seja, o conjunto de vários compostos encontrados neste extrato. Para o extrato bruto das folhas, observou-se atividade contra *C. krusei* e *C. tropicalis*, com CIM = 500 µg/mL. Quanto às frações obtidas das folhas, a fração aquosa foi a mais ativa, apresentando valores de CIM = 15,6 µg/mL para *C. neoformans* e 60 µg/mL para *C. krusei*. Em continuação a este trabalho, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas para *E. beaurepaireana* e a *E. umbelliflora*. O fungo mais sensível aos extratos e frações utilizadas no trabalho de *E. beaurepaireana* foi *C. neoformans*. O melhor resultado obtido com o extrato bruto das folhas foi contra *C. glabrata*, com CIM = 92,5µg/mL. Das frações testadas, a mais ativa foi a fração butanólica, que apresentou CIM= 45 µg/mL contra *C. neoformans* e 60 µg/mL contra *C. krusei*, sugerindo que os compostos mais ativos deste extrato sejam de maior polaridade. Para a espécie de *E. umbelliflora* o extrato das folhas foi mais ativo que o do caule, com o melhor resultado de CIM = 125 µg/mL para *C. krusei*. Das frações obtidas na partição, tanto para as folhas como para o caule, a fração mais ativa foi a butanólica, com valores de CIM = 30 µg/mL e 60 µg/mL para *C. krusei*, respectivamente.

Diversos trabalhos e entre eles o de Liebert (2009), conduziram experimentos utilizando a *V. macrocarpon* e avaliaram a atividade antifúngica contra *C. albicans* na urina humana, após ingestão do suco desta espécie. Raros são os trabalhos que realizaram a determinação da concentração mínima de fungos.

A Figura 25 apresenta as curvas de inibição contra as cepas fúngicas e confirmam o potencial antimicrobiano apresentado pelo extrato etanólico uma vez que apresentou atividade contra as cepas *C. albicans* ATCC 18804 e a clinica CAV5.

Figura 25. Curvas de inibição dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de *E. brasiliensis* contra as cepas de *C. albicans*.



De acordo com esses resultados, os extratos da espécie estudada não demonstraram eficácia para as bactérias Gram-negativas utilizadas. Isto pode ter ocorrido devido à composição diferenciada da membrana das bactérias Gram-negativas em relação a Gram-positivas. A parede celular de Gram-negativas possui um componente adicional, uma membrana externa, que corresponde a uma segunda bicamada lipídica. A face externa da membrana é rica em lipopolissacarídeos, o que a torna mais lipofílica em relação a substâncias exógenas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Mendes et al. (2001), Taguri et al., (2004) e McSweeney et al., (2001) também relacionam a quantidade de flavonoides e taninos presentes em extratos aos prováveis mecanismos de ação antimicrobiana, pois estes compostos tem a habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias. A total ruptura de membranas microbianas pode ser dada por flavonoides de caráter lipofílico. Sendo assim, podemos sugerir que extratos vegetais que obtidos com solventes orgânicos tal como o etanol possuem a capacidade de extração de moléculas mais apolares, neste sentido é possível que o extrato etanólico de *E. brasiliensis* possua maior quantidade destes compostos e que eles estão diretamente relacionados com a sua maior atividade antimicrobiana observada neste estudo quando comparado aos resultados do extrato aquoso.

Ao contrário da maioria dos fármacos sintéticos empregados na terapêutica antimicrobiana, a literatura científica não apresenta uma relação consensual dos valores

de CIM obtidos de produtos naturais, neste sentido, alguns autores estabelecem parâmetros individuais para classificar os resultados oriundos de ensaios de determinação de atividade antimicrobiana. Aligiannis et al. (2001) consideram CIM com valores iguais ou menores que 500 µg/mL como inibidores potentes, CIM entre 600 e 1500 µg/mL como inibidores moderados e CIM acima de 1600 µg/mL como inibidores fracos. Webster et al. (2008) já estabelecem como satisfatório outro valor de CIM (igual ou menor que 1000 µg/mL). Ramos et al. (2015) e Bonifácio et al. (2015) consideram satisfatórios valores de inibição que encontraram-se entre 1000 a 7,8 µg/mL quando investigaram a atividade antifúngica de extratos vegetais. Neste sentido os dados reportados nesta investigação mostram-se favoráveis e de aplicabilidade para serem considerados potenciais ativos.

4.8.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).

As CBM e CFM foram realizadas para os extratos que apresentaram atividade frente à pelo menos um dos micro-organismos. Os poços das microplacas que apresentaram ausência de crescimento e, portanto atividade do extrato foram plaqueadas e posteriormente analisadas pelo crescimento de micro-organismos.

Em comparação ao CIM das cepas bacterianas pode-se observar que os valores de CBM encontrados coincidiram com seus respectivos valores de CIM, mostrando dessa maneira que as amostras testadas apresentaram efeito bactericida contra as cepas de *S. aureus*; e bacteriostático contra as cepas de *S. saprophyticus*. Da mesma maneira, as cepas de *Candida* apresentaram comportamento fungistático.

4.9. Avaliação da atividade antioxidante

Para realização dos ensaios antioxidantes (ABTS^{•+}, O₂^{•-}, ROO[•], H₂O₂, HOCl/OCl⁻, Taurina Cloramina e NO[•]) foi utilizada uma proporção de extrato/água de 1mg/mL.

Os ensaios foram realizados para os extratos: aquoso e etanólico. Foram utilizados como padrões, compostos com atividades antioxidantes reconhecidas, como o ácido gálico (derivado do ácido hidroxibenzóico), ácido elágico (derivado de taninos hidrolisáveis), ácido cafeico (derivado do ácido hidroxicinâmico), Trolox (derivado da vitamina E) e quercetina (flavonoide). Ainda para o ensaio de captura do H₂O₂ foi utilizado a catalase.

4.9.1. Ensaio de captura do ABTS^{•+}

O ABTS^{•+} destaca-se em ensaios da interação entre amostras biológicas e radicais livres, para avaliar o potencial desta interação (PRABHU et al., 2011). A utilização do ABTS^{•+} é importante para avaliar *in vitro* o potencial antioxidante de forma simples e rápida, uma vez que sua redução diminui sua absorbância em 734 nm (descolorindo-o); essa diminuição da absorbância é proporcional à concentração e à atividade antioxidante (PELLEGRINI et al., 1999). Apresenta ainda como vantagens, o fato de poder ser utilizado em diferentes pH, possibilitando o estudo da influência da acidez do meio na atividade antioxidante e, a solubilidade em água e solventes orgânicos, permitindo assim avaliar compostos hidro e lipossolúveis. Contudo, existe a limitação de ser um radical modelo, e não uma biomolécula (MAGALHÃES et al., 2008).

Os resultados obtidos foram expressos em concentrações dos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* ou padrões que neutralizaram 50 % do radical (IC₅₀); os valores foram obtidos através das equações da reta e as análises realizadas em triplicata; os resultados apresentados com médias das inibições.

Nas Figuras 26 a 28 estão apresentados os respectivos IC₅₀ para a captura do ABTS^{•+}, para os padrões, cujos valores em ordem crescente do IC₅₀ variaram de ~0,4 até 5 µg/mL: gálico < elágico < quercetina < cafeico < trolox e para os extratos de *E. brasiliensis* que variaram de ~ 30 até 52 µg/mL: etanólico < aquoso, portanto decrescente para o potencial antioxidante frente ao ABTS^{•+}.

Figura 26. Inibição (captura) do ABTS^{++} (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelos padrões, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{++} na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).

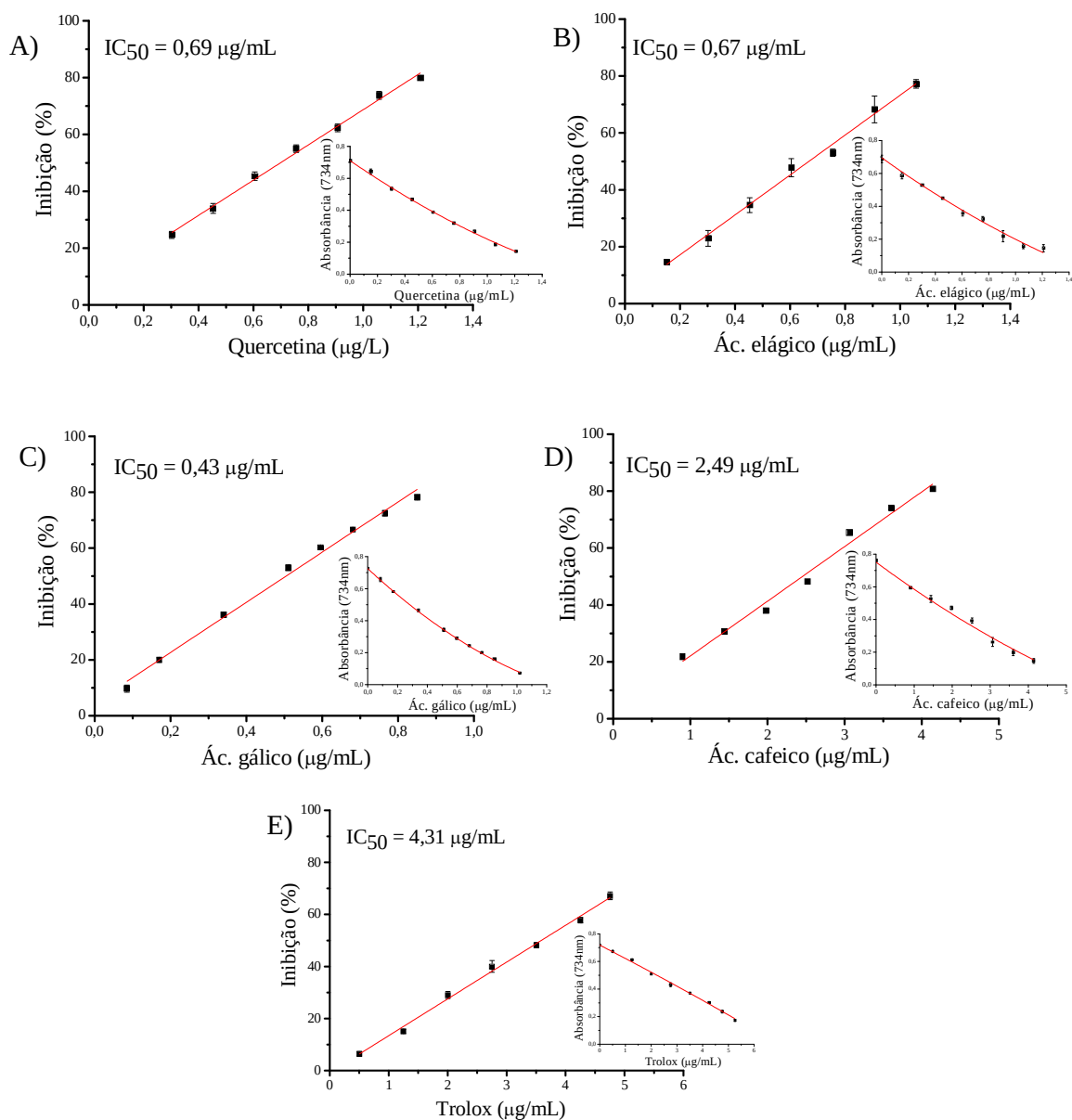


Figura 27. Inibição (captura) do ABTS^{++} (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis*, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorvâncias do ABTS^{++} na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).

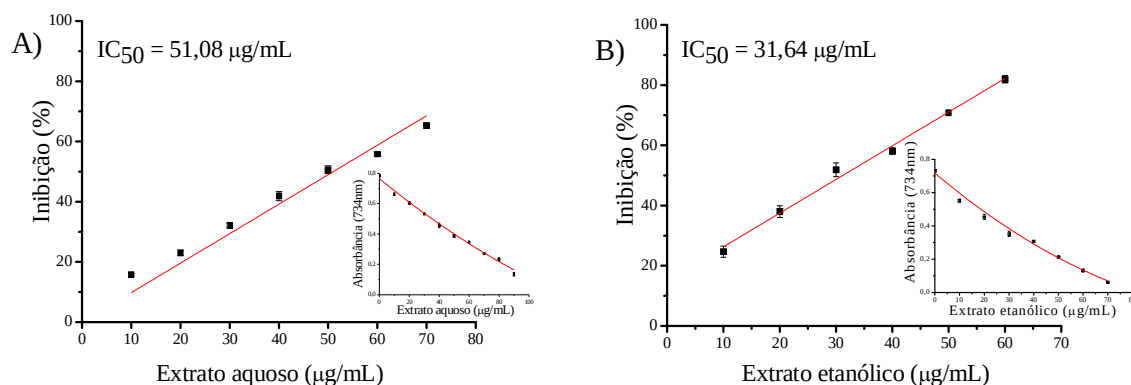
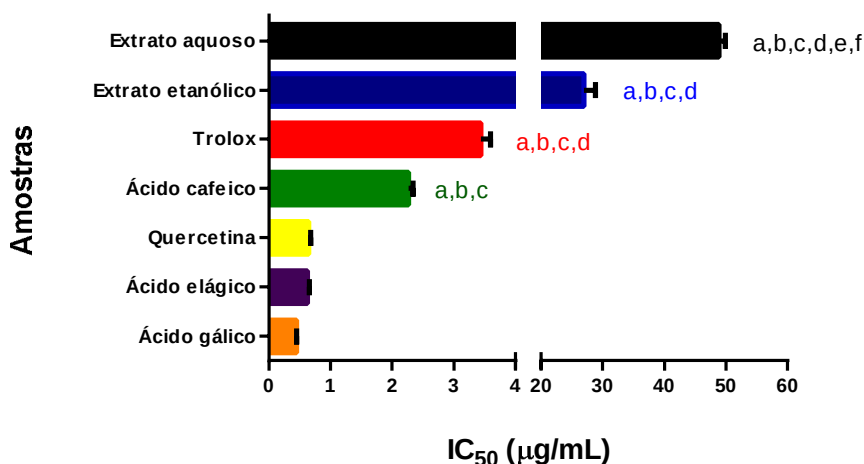


Figura 28. Inibição (Captura) do ABTS^{++} (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelos padrões e extratos. Análise estatística, onde (a) representa a comparação vs gálico, (b) vs ácido elágico, (c) vs quercetina, (d) vs cafeico, (e) vs trolox, (f) vs extrato etanólico, (g) vs extrato aquoso; letras diferentes denotam diferença significativa, com $p < 0,05$.



Foi possível observar para os padrões de ácido gálico, ácido elágico e quercetina valores de IC_{50} baixos e próximos entre si, e que apresentam excelente eficiência na captura do ABTS^{++} . No que diz respeito aos extratos a amostra extraída com etanol demonstrou melhor atividade na captura do radical em relação à amostra vegetal extraída com água, porém apresentou valor de IC_{50} 73,5 vezes maior que o ácido gálico.

Apesar dos extratos de *E. brasiliensis* apresentarem uma concentração efetiva maior que a dos padrões testados, vale ressaltar que os extratos são uma mistura complexa de compostos.

Castro (2012) avaliou a atividade antioxidante frente ao radical ABTS^{•+} dos extratos aquoso e etanólico de diversas amostras vegetais. Entre elas *E. brasiliensis* e *E. pyriformis*, que obteve IC₅₀ aproximadamente entre 0,5 a 2 mg/mL, equivalentes a 500 e 2000 µg/mL, respectivamente. Esses valores de IC₅₀ encontrados são pelo menos 10 vezes maiores do que os valores encontrados neste trabalho.

Não foram encontrados outros relatos na literatura sobre a atividade antioxidante frente ao radical ABTS^{•+} de extratos ou produtos obtidos a partir de frutos de *E. brasiliensis*.

Wojnicz et al. (2012), Grace et al. (2014) e Teleszko e Wojdyło (2015) avaliaram a atividade antioxidante pelo método do ABTS, conforme descrito na metodologia deste trabalho (RE et al., 1999) de diferentes extrações que utilizaram a *Vaccinium macrocarpon*. Os resultados expressos em mM ou µM equivalentes ao trolox (TE) por 1g ou 100 g de extratos de *Vaccinium macrocarpon* foram 97,78 mM (TE)/g de peso seco, 69,3 µM (TE)/g de peso fresco e 14,61 mM (TE)/g de peso seco, respectivamente.

4.9.2. Ensaio de captura para O₂^{•-}

O ânion superóxido formado pela redução monoeletrônica do oxigênio molecular, produzido durante o metabolismo aeróbico celular, em especial na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Sua produção também ocorre a partir da ativação de fagócitos, como os neutrófilos via NADPH oxidase de membrana. O O₂^{•-} pode interagir com biomoléculas; entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre sua produção e desativação (e/ou biotransformação), há o favorecimento do estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; DIKALOV, 2011; DIKALOV; UNGVARI, 2013).

Os extratos e os padrões foram testados em diferentes concentrações e os resultados obtidos foram expressos em termos de IC₅₀ obtidos através das equações das retas dos gráficos de porcentagem de inibição. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados são as médias das inibições.

Nas Figuras 29 a 31 estão apresentados os respectivos IC₅₀(µg/mL) para a captura do O₂^{•-}, para os padrões, cujos valores em ordem crescente do IC₅₀ variaram de

~12,0 até 515 µg/mL: elágico < gálico < quercetina < cafeico < trolox e para os extratos de *E. brasiliensis* que variaram de ~ 660 até 771 µg/mL: etanólico < aquoso, portanto decrescente para o potencial antioxidante frente ao O₂^{•-}.

Figura 29. Inibição (captura) do O₂^{•-} (IC₅₀ µg/mL), pelos padrões, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH8,3. λ = 560 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).

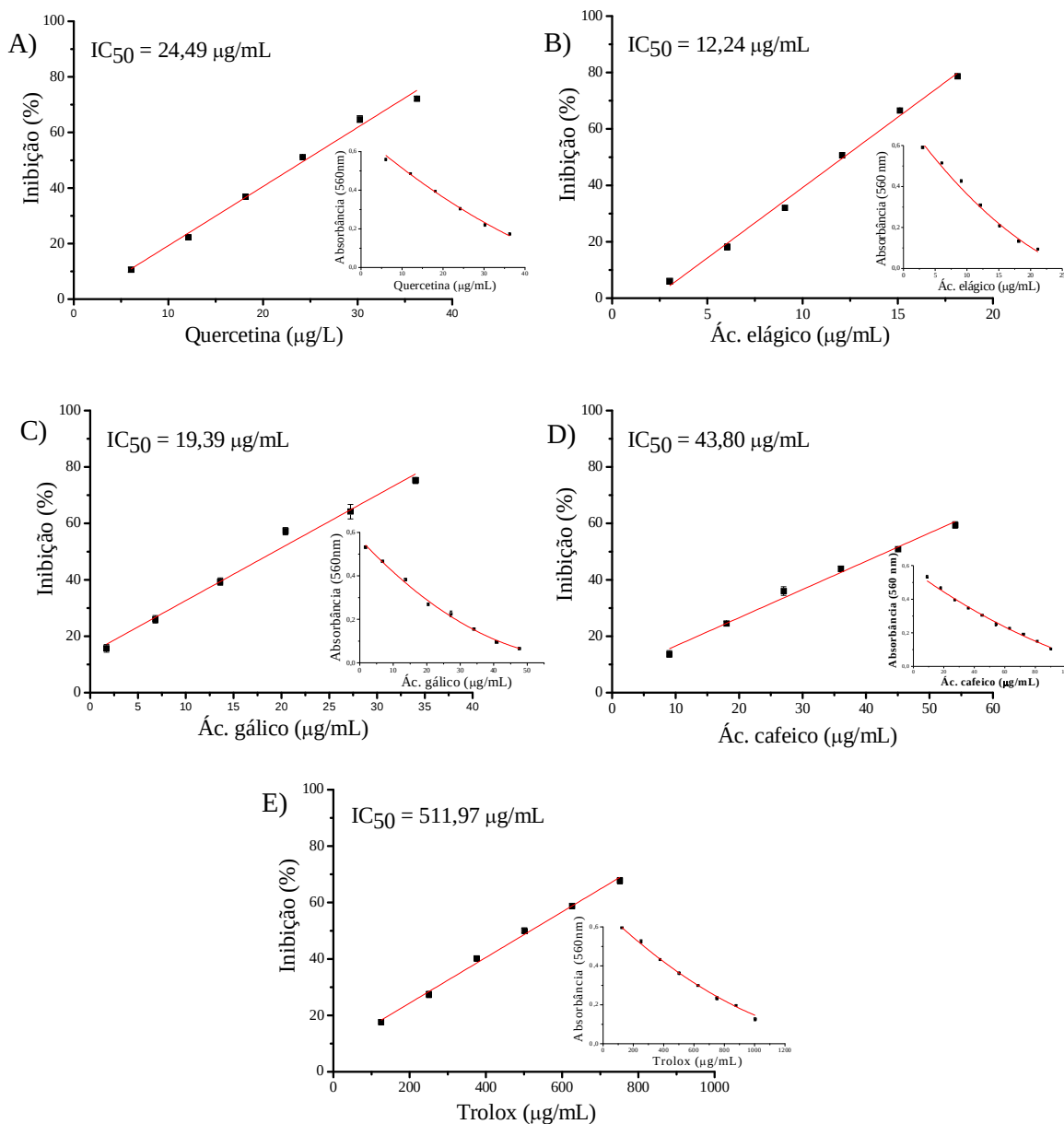
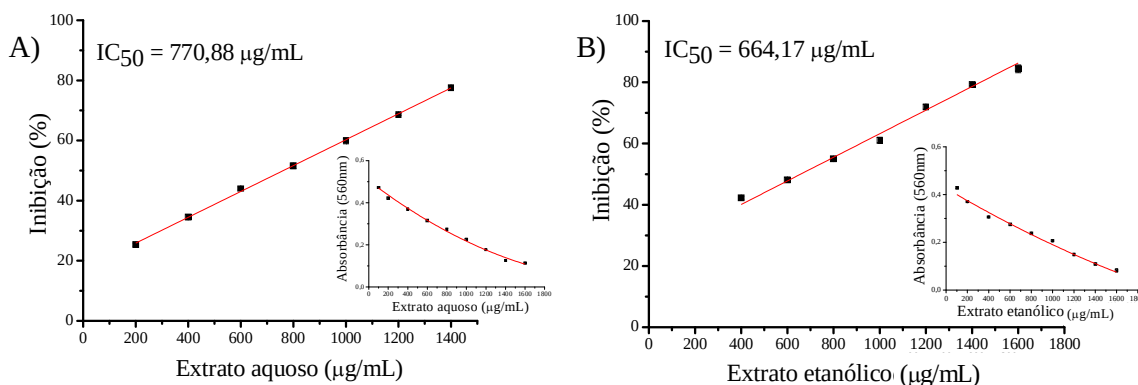
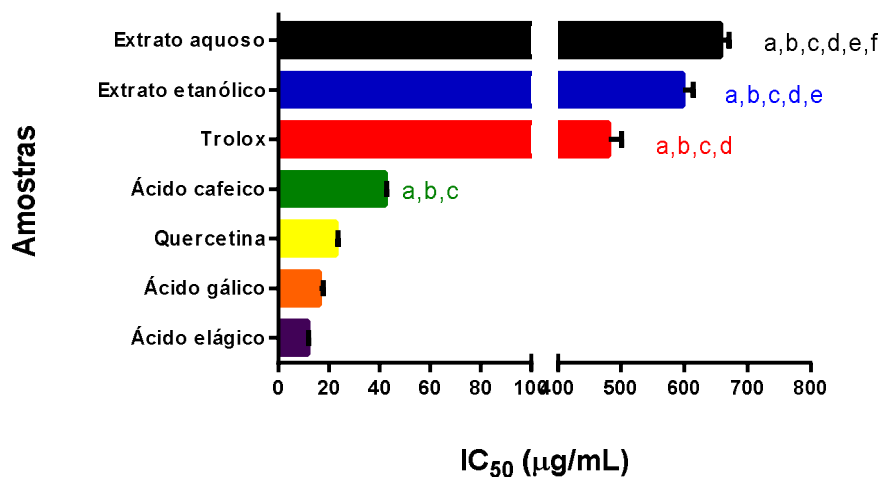


Figura 30. Inibição (captura) do $O_2^{\cdot-}$ (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis*, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH8,3. $\lambda = 560$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS $^{*+}$ na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).



Os padrões ácido elágico e ácido gálico apresentaram valores de IC_{50} menores, em relação aos demais padrões e amostras. Os resultados deste ensaio também demonstraram similaridade em relação à ordem crescente dos valores de IC_{50} do ensaio de captura do ABTS $^{*+}$. Para as amostras, o extrato etanólico também foi o que apresentou melhor atividade para a captura da espécie reativa $O_2^{\cdot-}$. Em relação ao IC_{50} do trolox, o extrato etanólico obteve apenas concentração de 1,3 vezes maior e o extrato aquoso 1,5 vezes maior, sendo este um dado muito importante e promissor, pois evidencia em uma mistura heterogênea e complexa de compostos que tem atividade antioxidante similar à atividade antioxidante de um composto puro, utilizado como padrão. O trolox é um derivado sintético solúvel da vitamina E (contendo o anel cromanol) e não apresentou eficiência na captura de $O_2^{\cdot-}$. As amostras em estudo devem conter misturas de compostos fenólicos e flavonoides, que foram eficazes em capturar o radical, contudo em relação aos demais padrões foi bem menor (Figura 31).

Figura 31. Inibição (Captura) do $O_2^{\cdot-}$ (IC_{50} $\mu g/mL$), pelos padrões e extratos. Análise estatística, onde (a) representa a comparação vs elágico, (b) vs ácido gálico, (c) vs quercetina, (d) vs cafeico, (e) vs trolox, (f) vs extrato etanólico, (g) vs extrato aquoso; letras diferentes denotam diferença significativa, com $p < 0,05$.



Infante et al. (2016) também avaliaram a capacidade de captura do radical $O_2^{\cdot-}$ de diferentes espécies do gênero *Eugenia*, o que inclui o extrato etanólico 80% de folhas, sementes e polpas dos frutos. Entre os dados analisados, nos extratos das polpas dos frutos obtiveram os maiores IC_{50} , o que demonstra baixa atividade para a captura desta ERO. Por ordem decrescente os valores obtidos para os IC_{50} para a captura do $O_2^{\cdot-}$ de cada espécie utilizada no estudo: 4,02 mg/mL para *Eugenia myrcianthes*, 2,67 mg/mL para *Eugenia leitonii* e o menor IC_{50} 2,15 mg/mL para *E. brasiliensis*; um valor 2,78 vezes maior em relação ao IC_{50} obtido pelo extrato aquoso deste estudo.

Em trabalho desenvolvido por Castro (2012), avaliou-se a capacidade de captura do radical $O_2^{\cdot-}$ dos extratos aquoso e etanólico 80 % de *E. brasiliensis* e *E. pyriformis*, sendo que o extrato aquoso de *E. brasiliensis* foi o mais eficiente na captura da espécie reativa.

Wang e Jiao (2000) analisaram diferentes variedades do suco de *V. macrocarpon* para avaliar a capacidade em capturar o $O_2^{\cdot-}$. Em uma quantidade de 0,1 mL de suco desta espécie foram encontrados em porcentagem de inibição valores de aproximadamente 60% para todas as variedades.

Lapshina et al. (2015) também avaliou a capacidade de captura do $O_2^{\cdot-}$ de uma extração para obtenção de um extrato rico em flavonoides a partir de *V. macrocarpon*. Este extrato foi efetivo na capacidade de captura do radical $O_2^{\cdot-}$ e obteve IC_{50} de 2,8

µg/mL, valor 4,37 vezes menor do que o padrão ácido elágico utilizado no presente estudo.

4.9.3. Ensaio de captura do H₂O₂

O H₂O₂ envolvido direta e indiretamente em processos oxidativos contribui no desenvolvimento de diversas patologias. Sua atuação em tais processos se dá principalmente pela sua capacidade de transpor membranas e gerar o HO[•] (ALVES et al. 2010). O H₂O₂ é formado quando o O₂^{•-} recebe mais um elétron e dois prótons (íons hidrogênio), por um processo espontâneo denominado dismutação ou catalisado, pela superóxido dismutase. O H₂O₂ também pode ser produzido pela redução bieletrônica do O₂ molecular, catalisada *in vivo* por diversas oxidases, tais como: xantina, urato, glicose, coproporfirinogênio III, lisil, monoamina e D-aminoácidos, localizadas nos peroxissomas (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012;)..

Neste ensaio, nenhum dos extratos estudados até 30 mg/mL (limite de solubilidade), assim como os padrões, foram capazes de capturar H₂O₂. Para validar o ensaio utilizou-se a catalase, uma enzima eficiente e específica que catalisa a decomposição do H₂O₂ em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Com a finalidade de avaliar a eficiência da enzima (“atividade *scavenging*”) e considerando a concentração do fabricante (expressa em 2950 unidades/mg de sólidos), preparou-se uma solução de 20 unidades/mL de catalase para realização do ensaio. Assumindo ainda que a massa de sólido pesada estivesse pura, ou seja, somente a presença da enzima catalase e considerando a sua massa molecular de 240.000 Da (BUDAVARI et al., 2006), pode-se converter o valor obtido do IC₅₀ de 0,525 U/mL para 0,177 µg/mL ou 73,82 nmol/L (Figura 37).

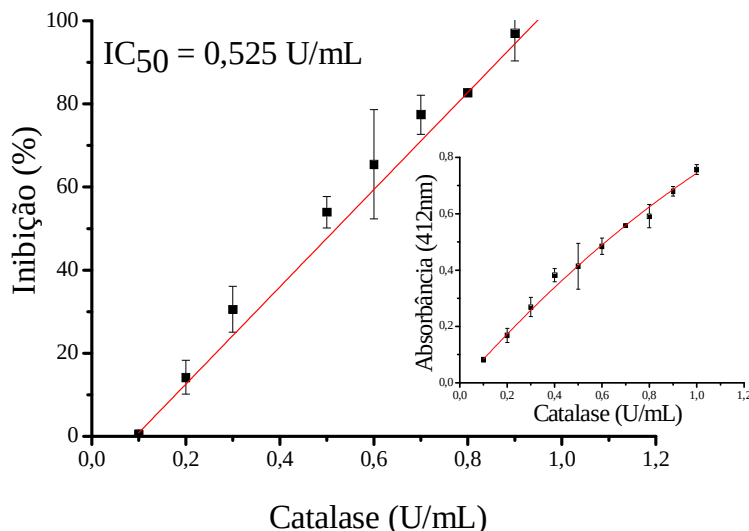
Os achados deste trabalho corroboram com os estudos realizados por Castro (2012) para a espécie vegetal de *E. brasiliensis*.

Vissoto et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante frente ao H₂O₂ do extrato aquoso de diversas amostras vegetais, utilizando método diferente ao deste trabalho. Entre as variedades vegetais, a *Eugenia uniflora* do mesmo gênero da planta deste estudo apresentou capacidade em inibir o H₂O₂ e obteve IC₅₀ de 467 µg/mL

Wang e Jiao (2000) analisaram diferentes variedades do suco de *V. macrocarpon* para avaliar a capacidade em capturar o H₂O₂. Em uma quantidade de 0,1 mL de suco desta espécie foram encontrados em porcentagem de inibição valores de

aproximadamente 60% para todas as variedades, valores similares aos encontrados no ensaio de captura do $O_2^{\bullet -}$.

Figura 32. Inibição (captura) do H_2O_2 pela catalase, em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 6,6. $\lambda = 412nm$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TNB na presença de diferentes concentrações de catalase.



4.9.4. Determinação do poder de redução do íon férrico (FRAP)

Neste ensaio, a presença de um potente antioxidante, causa a redução do complexo de ferricianeto (Fe^{3+}) para a forma Fe^{2+} , ocorrendo modificação da coloração amarela para azul esverdeado, assim ocorrendo o aumento da absorbância; onde quanto maior a absorbância maior o poder de redução do ferro (CHUNG et al., 2002).

Os resultados obtidos foram expressos em absorbância; as concentrações dos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* ou padrões atingiram absorbância máxima de 2,0. As análises foram feitas em triplicata e os resultados são as médias das concentrações.

O poder redutor dos extratos e dos padrões aumentou de forma constante com o aumento das concentrações. Nas Figuras 33 a 36 e na Tabela 9 estão representados os valores das concentrações para o poder redutor do íon férrico, para os padrões, cujos valores em ordem crescente variaram de $\sim 10,0$ a $35 \mu g/mL$: cafeico = gálico < elágico

< quercetina < trolox e para os extratos de *E. brasiliensis* que variaram de ~ 900 a 1800 µg/mL: aquoso < etanólico.

Figura 33. Potencial redutor para o íon férrico pelos padrões (µg/mL), em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6. $\lambda = 700$ nm. As figuras apresentam a média das absorbâncias do complexo azul da Prússia formado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).

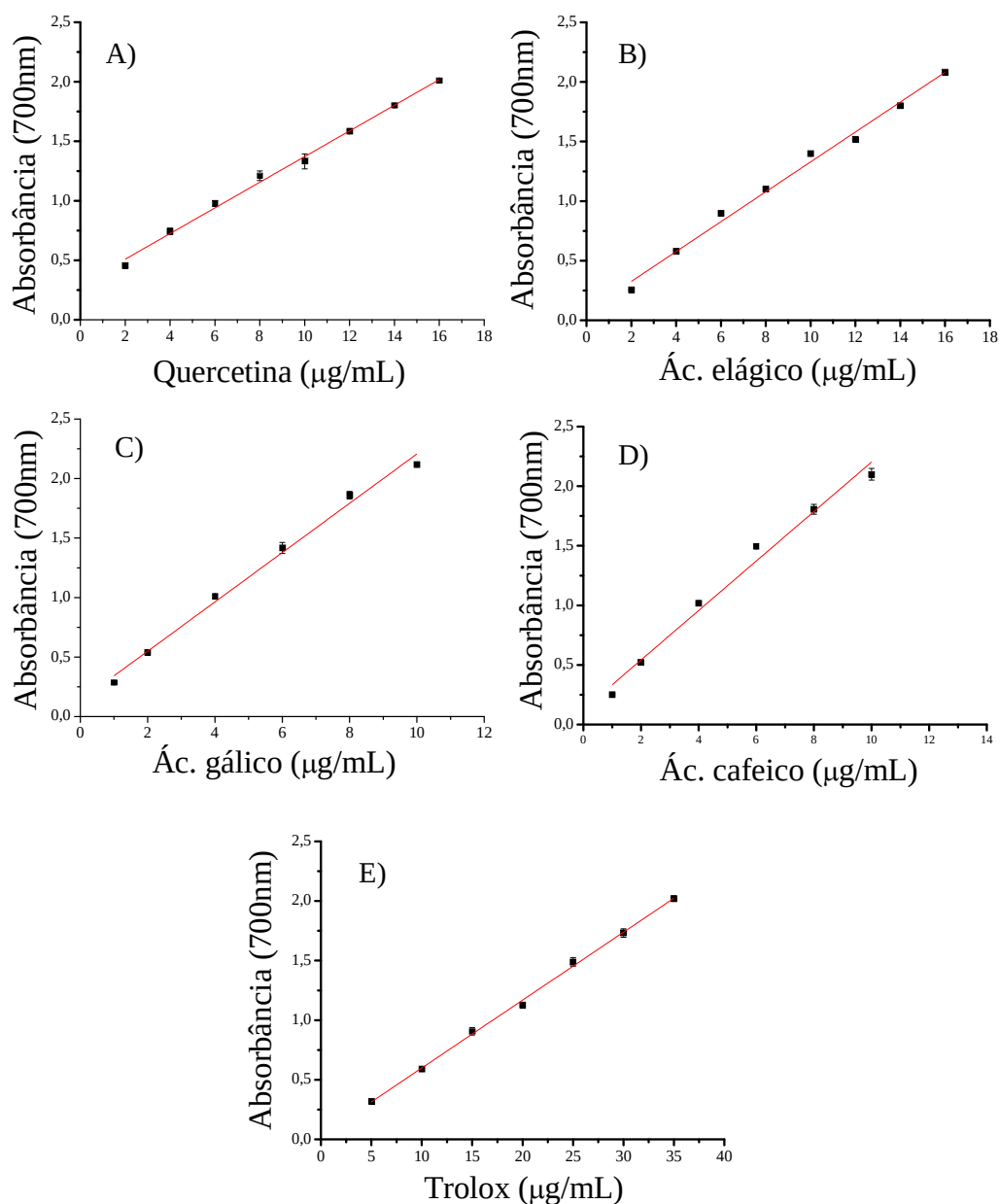


Figura 34. Potencial redutor para o íon férrico pelos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis* ($\mu\text{g/mL}$), em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6. $\lambda = 700 \text{ nm}$. As figuras apresentam a média das absorbâncias do complexo azul da Prússia formado na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).

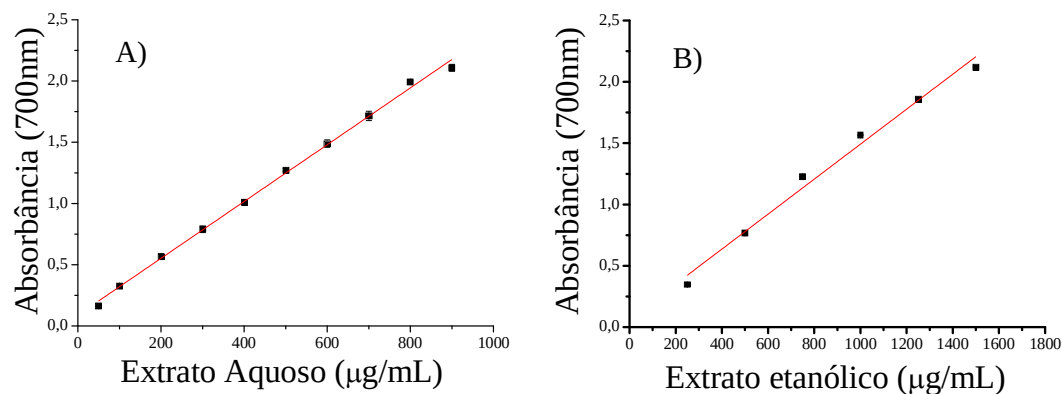
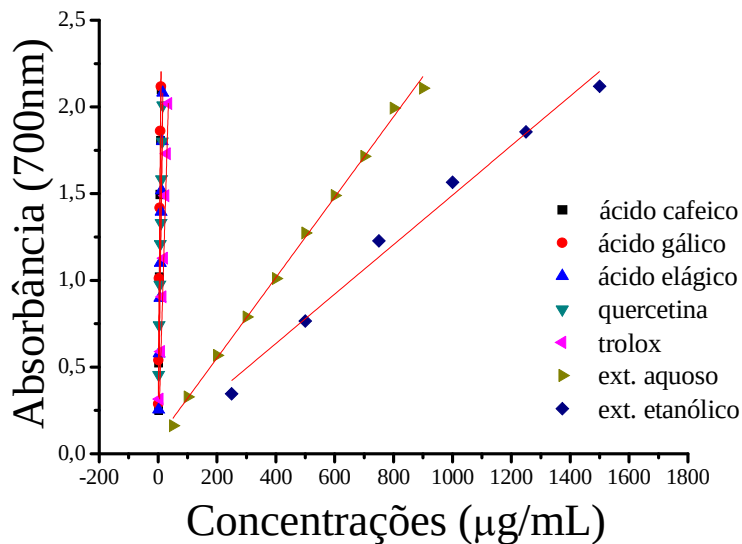


Figura 35. Potencial redutor para o íon férrico pelos padrões e extratos de *E. brasiliensis* ($\mu\text{g/mL}$), em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,6. $\lambda = 700 \text{ nm}$.



De acordo com os resultados, foi possível observar que os padrões: ácidos cafeico, gálico, elágico e a quercetina apresentaram concentrações baixas e próximas entre si, demonstrando-se assim eficientes potenciais redutores do íon férrico. Em relação aos extratos, a amostra extraída com água demonstrou melhor potencial na

redução do íon férrico em relação à amostra extraída com etanol, porém o extrato aquoso precisou de uma concentração 90 vezes maior e o extrato etanólico 150 vezes maior para apresentar a mesma absorbância dos padrões ácido cafeico e gálico (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação entre as concentrações com absorbâncias igual a 2,0 entre extratos de *E. brasiliensis* e padrões (µg/mL).

Absorbância = 2,0	
Compostos	(µg/mL)
Ácido Cafeico	10,0
Ácido Gálico	10,0
Ácido Elágico	16,0
Quercetina	16,0
Trolox	35,0
Extrato Aquoso	900,0
Extrato Etanólico	1500,0

Magina (2008) avaliou o potencial redutor do íon férrico de *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora*, para extratos e frações de folhas e caules, utilizando método semelhante ao realizado neste trabalho. Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalentes ao ácido ascórbico por grama de amostra, os quais apresentaram-se maiores para os extratos brutos das folhas e caule da espécie de *E. beaurepaireana*, 473,33 e 625,66 mg de ácido ascórbico/g de extrato, respectivamente, a *E. umbelliflora*, apresentou valores menores. Para os extratos brutos das folhas e caule de *E. brasiliensis*, os valores encontrados foram 318,33 e 544,33 mg de ácido ascórbico/g de extrato, respectivamente. Nesta espécie as frações mais ativas foram de acetato de etila, para as folhas, e a fração aquosa, para o caule, com valores de 834,99 e 1595,66 mg de ácido ascórbico/g de extrato das frações, respectivamente.

Não foram encontrados relatos na literatura destas análises para o fruto de *E. brasiliensis*.

Koksai et al. (2011) utilizou o mesmo método deste trabalho para avaliar o potencial redutor do íon férrico dos extratos aquoso e etanólico as folhas da espécie de *Melissa officinalis*. Considerando a absorbância, a 700 nm, versus uma concentração

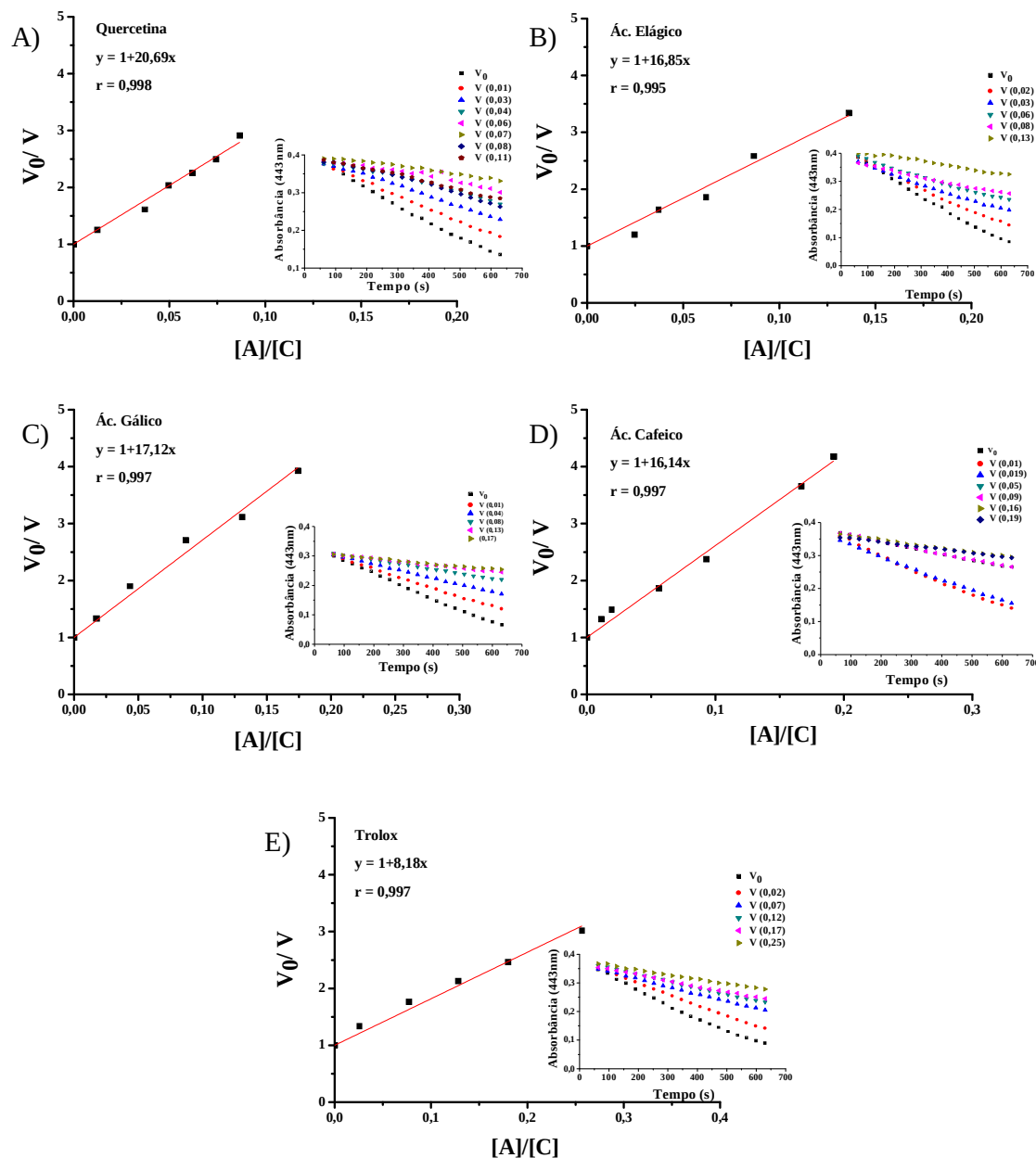
fixa de 30 µg/mL, observaram melhor potencial redutor do íon férrico para o extrato aquoso em relação ao extrato etanólico das folhas. A determinação do poder de redução de Fe^{3+} é frequentemente usado como indicador de atividade de doação de elétrons, uma vez que é um importante mecanismo de ação antioxidante dos compostos fenólicos (BÜYÜKOKUROGLU et al., 2001; DORMAN et al., 2003). Rufino et al. (2010) observaram em *E. pyrifomis*, 38,4 µM $\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de peso fresco, mesmo gênero da espécie vegetal estudada neste trabalho.

4.9.5. Ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina: captura para $\text{ROO}^{\bullet}$

Esse ensaio também é conhecido como ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*). O radical peroxila ($\text{ROO}^{\bullet}$) pode oxidar tanto lipídeos quanto fosfolipídeos das membranas celulares. A lipoperoxidação (LPO), quando ocorre de maneira descontrolada, ocasiona danos na organização das membranas e perda de sua funcionalidade. A participação da LPO tem sido postulada na etiologia de muitas doenças e também na degradação de produtos alimentícios (LÚCIO, et al., 2009; HRÁDKOVÁ, et al., 2013; SHICHIRI, 2014). Este ensaio vem sendo mais utilizado recentemente estudo de estrutura-atividade de flavonoides, compostos fenólicos e derivados (ORDOUNI et al, 2011).

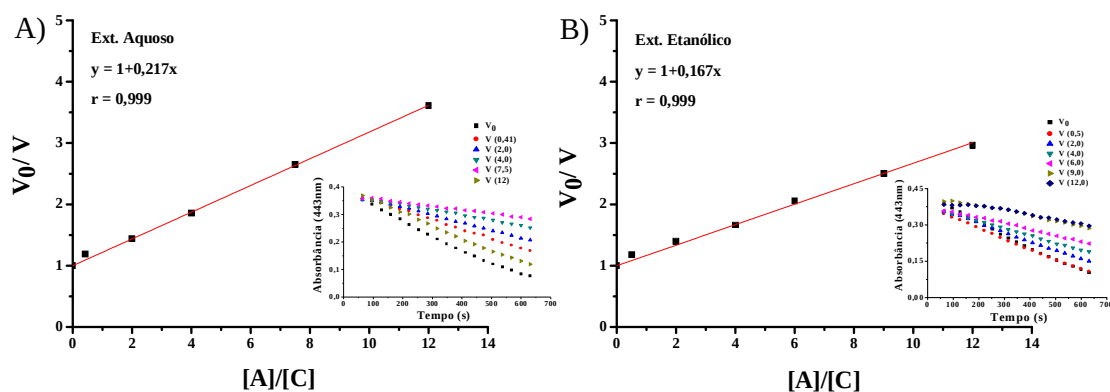
A capacidade de inibir o clareamento da crocina pelos padrões e extratos de *E. brasiliensis* estão apresentadas nas Figuras 36 e 37.

Figura 36. Representação entre as razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de clareamento da crocina com da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).



Nota: V_0 = velocidade na ausência de padrões; V = velocidade na presença de padrões; $[C]$ = concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$ ou $24,4\mu\text{g/mL}$) e $[A]$ = concentração de padrões. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, em função do tempo, na ausência (V_0) e na presença (V) de padrões ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 37. Representação entre as razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de clareamento da crocina com os extrato aquoso (A) e etanólico (B) de *E. brasiliensis*.



Nota: V_0 = velocidade na ausência dos extratos; V = velocidade na presença dos extratos; $[C]$ = concentração de crocina constante ($25\mu\text{mol/L}$ ou $24,4\mu\text{g/mL}$) e $[A]$ = concentração dos extratos. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, em função do tempo, na ausência (V_0) e na presença (V) dos extratos ($\mu\text{g/mL}$).

Foi obtido também para o ensaio de clareamento da crocina os respectivos valores de IC_{50} para os mesmos extratos e padrões, utilizando-se os valores de porcentagem de inibição (IC_{50}) do clareamento da crocina em relação ao ensaio sem amostra (LUSSIGNOLI et al., 1999).

De acordo com a equação de competição cinética, foi calculado o valor de equivalentes de Trolox para cada extrato da amostra vegetal e também para os padrões (Tabela 10).

Tabela 10. Equação de competição cinética, comparação entre valores de IC₅₀ e coeficiente angular, para o ensaio de clareamento da crocina entre os extratos de *E. brasiliensis* e padrões.

Compostos	Equação de Competição Cinética $y=V_0/V; x=[A]/[C]; (r)$	Equivalentes de Trolox*	Inclinação da Regressão Linear	IC ₅₀ (µg/mL)
Quercetina	$y=1+20,69x$ (0,998)	2,52	20,69	1,35
Ácido Gálico	$y=1+17,12x$ (0,997)	2,1	17,12	1,41
Ácido Elágico	$y=1+16,85x$ (0,995)	2,06	16,85	1,68
Ácido Cafeico	$y=1+16,14x$ (0,997)	1,97	16,14	1,7
Trolox	$y=1+8,18x$ (0,997)	1,00	8,18	2,89
Extrato Aquoso	$y=1+0,217x$ (0,999)	0,03	0,217	120,34
Extrato Etanólico	$y=1+0,167x$ (0,999)	0,02	0,167	144,59

*As análises foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos, onde $y=v_0/v$; $x=[A]/[C]$. A inclinação da regressão linear indica a capacidade antioxidante relativa da amostra (ka/ kc).

Naturalmente, os valores de IC₅₀ encontrados para os padrões e extratos seguem a mesma ordem de eficiência dos valores que foram encontrados para o coeficiente angular obtido na análise de competição para cada composto. Portanto, quanto menor o valor do IC₅₀, mais eficiente é a amostra, enquanto que para a inclinação da regressão linear, quanto maior o valor, mais eficiente é a ação antioxidante.

Para o ensaio da captura da espécie reativa ROO[•] os padrões utilizados no estudo apresentaram os valores de IC₅₀ baixos e bem próximos entre si. Entre as amostras, os valores de IC₅₀ aparecem próximos apresentando-se bons antioxidantes, porém a amostra extraída com água demonstrou ser mais eficiente quando comparada a amostra extraída com etanol.

Apesar do extrato aquoso apresentar IC₅₀ cerca 80 vezes maior que a concentração efetiva de quercetina, pode-se considerar que a concentração necessária para capturar 50 % dos radicais ROO[•] foi efetiva, protegendo a crocina e impedindo seu clareamento. Por este método *in vitro* que simula o processo de lipoperoxidação no organismo, foi possível comprovar a eficácia dos extratos em capturar esta espécie reativa radicalar.

Castro (2012) avaliou o ensaio do clareamento da crocina para extratos aquoso etanólico 80% em diversas frutas, entre elas duas do gêneros de *Eugenia*. O extrato

aquoso utilizado em seu estudo apresentou-se mais efetivo do que o extrato etanólico 80%, apresentando-se mais efetivo também do que o extrato aquoso de *E. pyrifomis*

Infante et al. (2016) avaliaram a capacidade de captura do radical peroxila através da capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC). Este ensaio monitorou a ação antioxidante do extrato etanólico através do decaimento da fluorescência da fluoresceína pela sua oxidação com $\text{ROO}^\bullet$. O extrato das folhas de *E. involucrata* apresentou o maior valor (1.393,3 μmol equivalentes a trolox/g) e o menor valor para as sementes de *Eugenia myrcianthes* (96,24 μmol equivalentes a trolox/g). Para *E. brasiliensis* valores em ordem decrescente foram 757,32; 477,45 e 211,84 μmol equivalentes a trolox/g, encontrados nas folhas, polpa e sementes, respectivamente. Para o IC_{50} do extrato etanólico o resultado obtido neste trabalho, este mostrou-se uma equivalência 50 vezes maior que trolox para o mesmo teste

Prieto e Vázquez (2014) avaliaram três tipos de extratos de sementes de *C. arabica*, metanólico e aquoso, quanto à sua capacidade em proteger a crocina para não sofrer o processo de clareamento. Em média, na concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, os extratos aquoso e metanólico foram capazes de proteger a crocina em 50 % dos radicais $\text{ROO}^\bullet$ (IC_{50}). Este resultado é similar ao obtido neste trabalho para os extratos de *E. brasiliensis*.

Zheng e Wang (2000) avaliaram a capacidade de captura do radical peroxila através da capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC) de *V. macrocarpon*. Para esta espécie o valor encontrado foi 18,5 μmol equivalentes a trolox/g, valor esse 11,45 vezes menor do que o encontrado nas sementes de *E. brasiliensis* (211,84 μmol equivalentes a trolox/g) em trabalho supracitado de Infante et al. (2016).

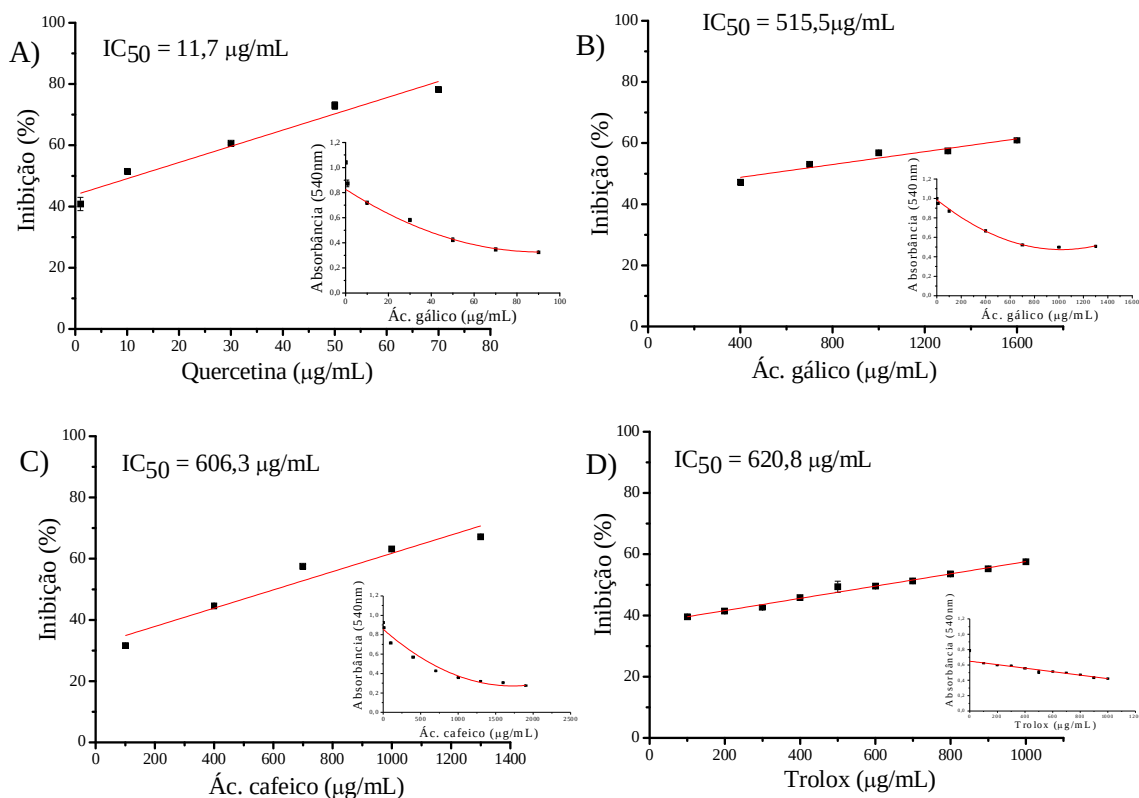
4.9.6. Ensaio de captura para $\text{NO}^\bullet$

As ERN, biologicamente, possuem o óxido nítrico como fonte primária. O $\text{NO}^\bullet$ (óxido nítrico) é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) através da oxidação da L-arginina na presença de oxigênio, em nível endotelial ou ação de fagócitos em processos inflamatórios. São três as principais isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), com diferentes expressões e atividades (MONCADA et al., 1991; KISS, 2000; ESTÉVEZ; JORDÁN, 2002; LEONG et al., 2002; KOHEN, NYSKA, 2002; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

Nenhum dos extratos estudados assim como o ácido elágico foram capazes de capturar $\text{NO}^{\bullet}$ até 30 mg/mL. Os resultados deste ensaio também foram expressos via o IC_{50} .

Na Figura 38, observa-se os respectivos IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para a captura do $\text{NO}^{\bullet}$, para os padrões, cujos valores estão em ordem crescente do IC_{50} : 11,7 quercetina; 515,5 gálico; 606,3 cafeico; 620,8 trolox, portanto decrescente para o potencial antioxidante frente ao $\text{NO}^{\bullet}$.

Figura 38. Inibição (captura) de $\text{NO}^{\bullet}$ (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pela quercetina, ácidos gálico, cafeico e trolox em tampão fosfato de sódio 20 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 540$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorvâncias de nitrito formado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido gálico (B), ácido cafeico (C) e trolox (D).



O padrão quercetina apresentou valor menor de IC_{50} , com eficiência excelente na captura do $NO^{\bullet}$. Os padrões ácido cafeico, trolox e ácido gálico, apresentaram resultados de IC_{50} maiores para este ensaio e demonstraram similaridade entre si.

Castro (2012) avaliou a atividade de captura e comparando com os demais extratos analisou que, o extrato etanólico e o extrato aquoso da fruta de *E. brasiliensis* foram os que apresentaram as maiores capacidades antioxidantes frente ao radical óxido nítrico, obtendo os valores 32 e 30% de porcentagem de inibição, respectivamente.

Não foram encontrados outros relatos na literatura da atividade antioxidante da espécie vegetal *E. brasiliensis* pelo ensaio de captura de óxido nítrico.

Conforti et al. (2011) avaliaram a atividade de captura de óxido nítrico de 18 espécies diferentes de plantas, normalmente consumidas no sul da Itália. Os valores obtidos para a captura deste radical foram IC_{50} entre 51 e 604 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando excelente atividade quando em comparação aos valores dos padrões obtidos neste estudo, lembrando que, os padrões utilizados são substâncias puras.

Lapshina et al. (2015) também avaliou a capacidade de captura de óxido nítrico de um extrato rico em flavonóides a partir de *V. macrocarpon*. Este extrato foi efetivo na capacidade de captura deste radical obteve IC_{50} de 4,4 $\mu\text{g/mL}$, valor 2,65 vezes menos do que o padrão de quercetina utilizado neste estudo.

4.9.7. Ensaio de captura para $HOCl/OCl^-$

O ácido hipocloroso ($HOCl$, $pK_a = 7,6$) ou OCl^- , é um potente agente oxidante gerado em leucócitos polimorfo nucleares neutrófilos, pela reação entre íons cloreto (Cl^-) e peróxido de hidrogênio, catalisada pela mieloperoxidase (MPO). A produção de $HOCl/OCl^-$ nesse sistema constitui um importante mecanismo de defesa celular contra micro-organismos. Entretanto, a produção excessiva dessa ERO pode causar danos tissulares, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como aterosclerose e câncer (WINTERBOURN; VISSERS; KHALIL, 2005; ALVES et al., 2010; KLEBANOFF et al., 2013)

Para esta análise também foram utilizados os mesmos padrões. E tanto os padrões quanto os extratos testados, capturaram o ácido hipocloroso, sendo possível calcular os respectivos valores de IC_{50} .

Nas Figuras 39 a 41 estão apresentados os respectivos IC_{50} para a captura do $HOCl/OCl^-$, para os padrões, cujos valores em ordem crescente do IC_{50} variaram de ~0,3 até 1,92 $\mu\text{g/mL}$: quercetina < elágico < gálico < cafeico < trolox e para os extratos

de *E. brasiliensis* que variaram de ~ 10 até $31 \mu\text{g/mL}$: etanólico < aquoso, portanto decrescente para o potencial antioxidante frente ao HOCl/OCl^-

Figura 39. Inibição (captura) do HOCl/OCl^- ($\text{IC}_{50} \mu\text{g/mL}$), pelos padrões, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L , $\text{pH } 7,4$, $\lambda = 652 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido elágico (B), ácido gálico (C), ácido cafeico (D) e trolox (E).

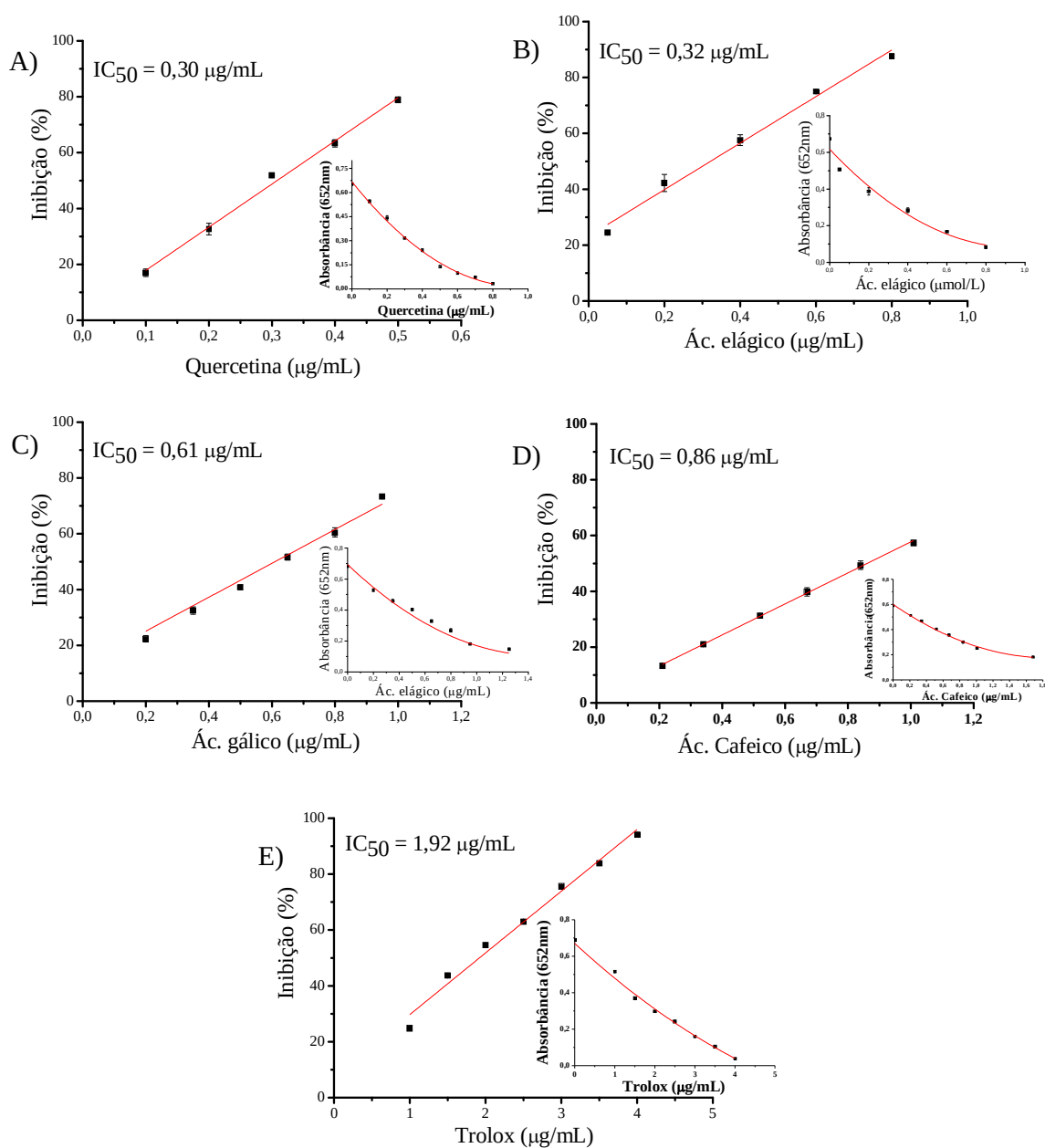


Figura 40. Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ (IC₅₀ µg/mL), pelos extratos aquoso e etanólico de *E. brasiliensis*, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 652 nm. A figura inserida apresenta a média das absorvâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).

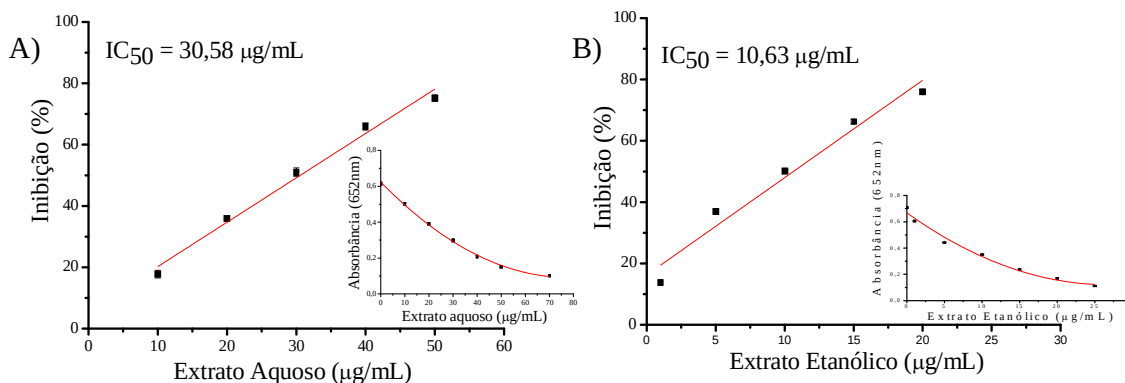
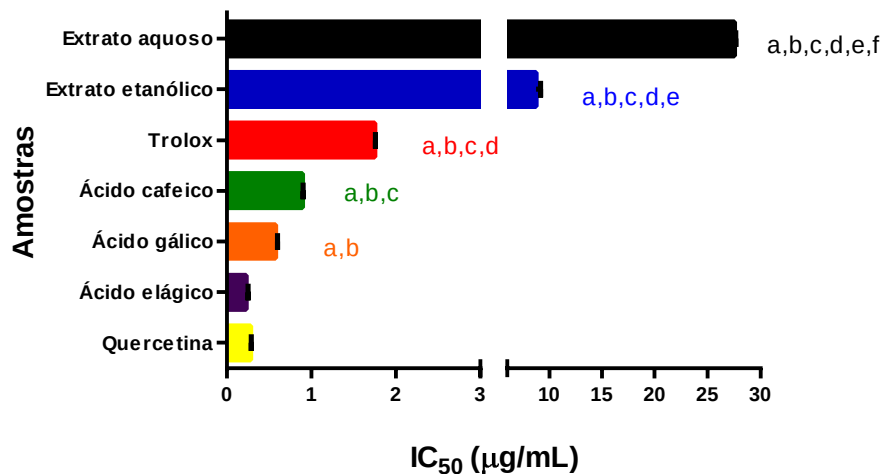


Figura 41. Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ (IC₅₀ µg/mL), pelos extratos e padrões. Análise estatística, onde a representa a comparação vs quercetina, b vs ácido elágico, c vs ácido gálico, d vs cafeico, e vs trolox, f vs extrato etanólico, g vs extrato aquoso, onde letras diferentes denotam diferença significativa, de p<0,05.



Os padrões quercetina, ácido elágico e gálico apresentaram valores de IC₅₀ baixos e próximos entre si, com eficiência excelente na captura do HOCl/OCl⁻. O extrato etanólico demonstrou melhor atividade na captura do HOCl/OCl⁻ em relação à

amostra vegetal extraída com água, em relação à quercetina, o extrato etanólico apresentou valor de IC₅₀ foi 35 vezes maior.

Infante et al. (2016) analisaram os extratos etanólico 80 % de algumas espécies do gênero *Eugenia* para avaliar a atividade antioxidante frente ao HOCl e apresenta que os extratos etanólico de folhas *E. Involucrata* e sementes de *E. leitonii* apresentaram as maiores eficiências na captura do HOCl com IC₅₀ de 13,84 µg/mL e 18,14 µg/mL, respectivamente. E *E. brasiliensis* apresentou IC₅₀ para o extrato da polpa do fruto de 42,67 µg/mL, valor de IC₅₀ similar ao encontrado no extrato da folha (45,81 µg/mL). Valor este, também, próximo ao encontrado no IC₅₀ do extrato aquoso presente neste trabalho (30,58 µg/mL).

Castro (2012) também avaliou a atividade antioxidante de captura do HOCl de *E. brasiliensis* e com relação ao extrato aquoso a *E. pyriformis* apresentou menor quantidade de extrato necessária para inibir 50% da atividade do ácido hipocloroso. Já com relação ao extrato etanólico a *E. brasiliensis* e a *E. pyriformis* mostraram-se mais eficiente, ambas tiveram valores próximos de IC₅₀.

Nenhum outro relato da literatura foi encontrado relacionado à capacidade em capturar o HOCl por extratos de *V. macrocarpon*, que utilizam este ou outro método.

4.9.8. Ensaio de captura para TauCl

A taurina é o aminoácido não-essencial mais abundante em mamíferos e tem muitas funções fisiológicas no sistema nervoso, cardiovascular, renal, endócrino, e nos sistemas imunológicos. Na inflamação, a taurina em fagócitos é halogenada e convertida em TauCl, em neutrófilos ativados, onde é produzida pela reação com hipoclorito (OCl⁻) gerado pelo sistema de H₂O₂/Cl⁻ mieloperoxidase-dependente (KIM, CHA, 2013).

Nas Figuras 42 a 44 estão apresentados os respectivos IC₅₀ para a captura da TauCl, para os padrões, cujos valores em ordem crescente do IC₅₀ variaram de ~1,4 até 2,8 µg/mL: gálico < cafeico < trolox < quercetina e para os extratos de *E. brasiliensis* que variaram de ~ 270 até 637 µg/mL: etanólico < aquoso, portanto decrescente para o potencial antioxidante frente a TauCl.

Figura 42. Inibição (captura) de TauCl (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelos padrões, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 652$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorvâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações da quercetina (A), ácido gálico (B), ácido cafeico (C) e trolox (D).

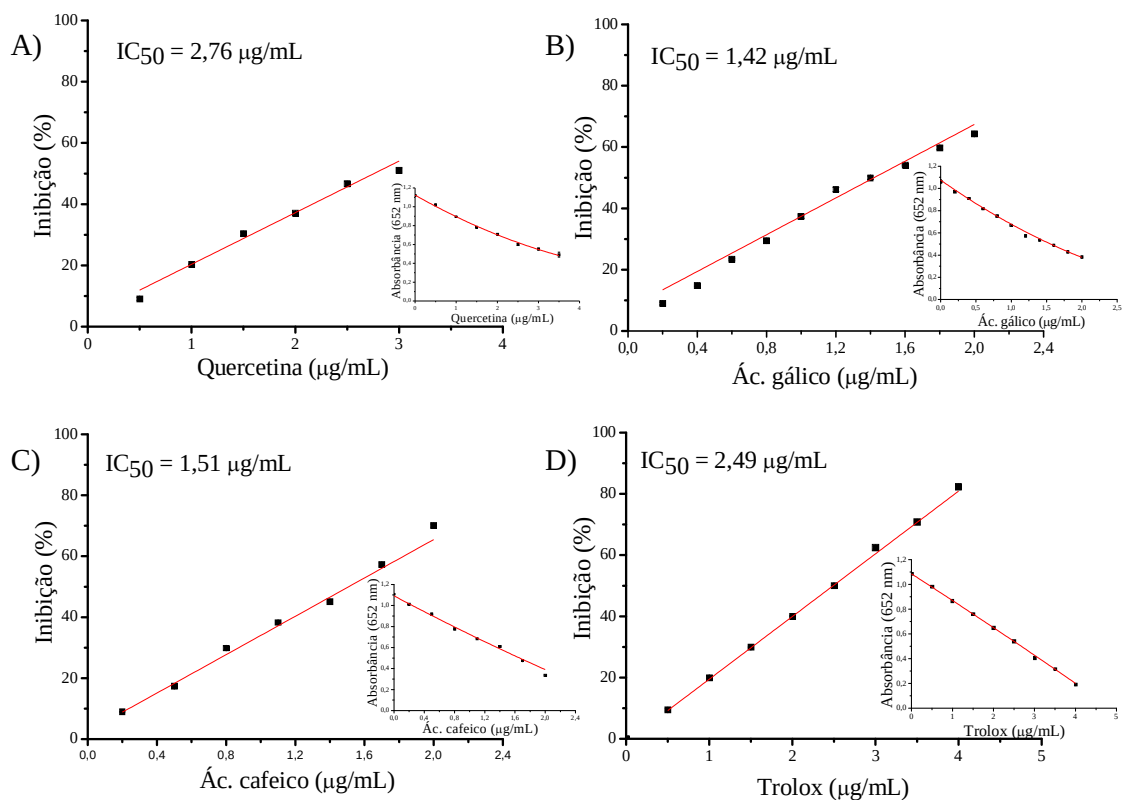


Figura 43. Inibição (captura) de TauCl (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelo extrato aquoso e etanólico de *E. brasiliensis*, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 652$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias de TMB oxidado na presença de diferentes concentrações dos extrato aquoso (A) e etanólico (B).

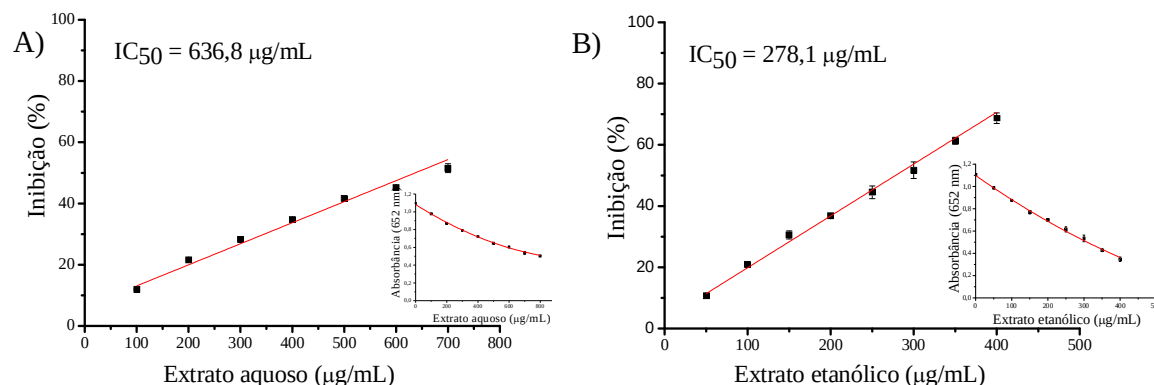
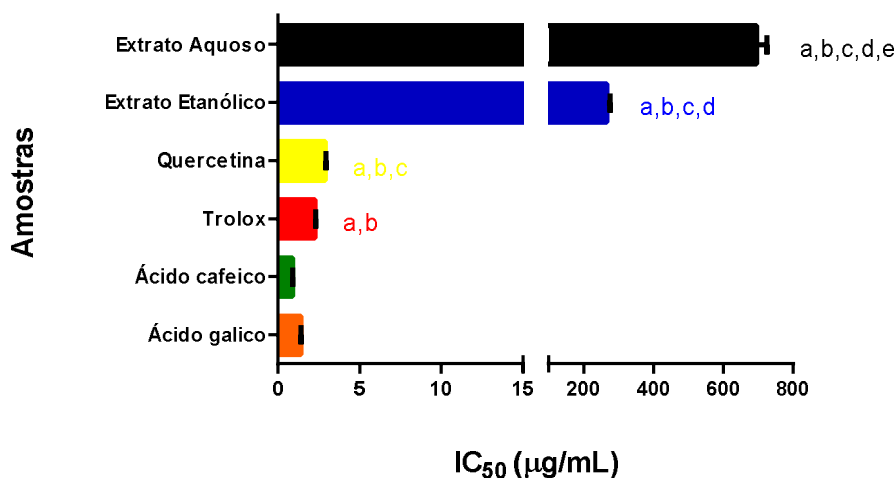


Figura 44. Inibição (captura) da TauCl pelos extratos e padrões. Análise estatística, onde a representa a comparação vs ácido gálico, b vs ácido cafeico, c vs trolox, d vs quercetina, e vs extrato etanólico, f vs extrato aquoso, onde letras diferentes denotam diferença significativa, de $p < 0,05$.



Os padrões de ácido gálico e cafeico apresentaram valores de IC_{50} próximos entre si, seguidos dos padrões trolox e quercetina. A amostra extraída com etanol

também demonstrou maior atividade captura deste radical em relação a amostra vegetal extraída com água.

Neste ensaio, a atividade antioxidante da amostra dependeu de sua capacidade em capturar a TauCl, prevenindo a oxidação do 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o qual, nesta condição, apresenta coloração azul. Porém neste ensaio o ácido elágico apresentou aumento absorbância, tornando a cor azul mais escura, demonstrando assim atividade pró-oxidante. As substâncias pró-oxidantes, podendo ser endobióticas ou xenobióticas, induzem o estresse oxidativo tanto pelo aumento na geração de ERO quanto pela inibição dos sistemas antioxidantes. Podem ser fármacos, metais de transição, pesticidas e vitaminas como o ácido ascórbico. A estrutura dessas moléculas também influencia na atividade pró-oxidante, por exemplo, quanto mais substituições hidroxilas apresentar, maior será a sua atividade (RAHAL et. al, 2014).

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade antioxidante frente a TauCl de extratos ou produtos obtidos a partir da *E. brasiliensis* ou *V. macrocarpon*.

4.10. Avaliação do potencial citotóxico

Durante o processo de inflamação há o recrutamento de células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos. Estas células promovem liberação de mediadores citotóxicos, inflamatórios e quimiotáticos que, em conjunto, agem para conter, destruir e remover os agentes invasores e patógenos (MEDZHITOV, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012).

As células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos, escolhidas baseando-se nas concentrações utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana que variaram até 1mg/mL.

Segundo Dias et al. (2009) é considerado tóxica a concentração que possa obter uma resposta citotóxica $\leq 50\%$. Portanto, para nenhuma das linhagens analisadas neste estudo *E. brasiliensis* apresentou citotoxicidade, ou seja não provocaram morte de 50% das células em nenhuma das concentrações testadas.

A viabilidade celular apresentou-se acima de 100% para linfócitos e macrófagos, assim, considera-se que os extratos de *E. brasiliensis* auxiliaram na proliferação dessas células.

Este auxílio na proliferação de macrófagos é importante, pois macrófagos ativados, a partir do contato com lipopolissacarídeos de parede de bactérias Gram-negativas ou fatores internos como interferon gama, produzidos por linfócitos T;

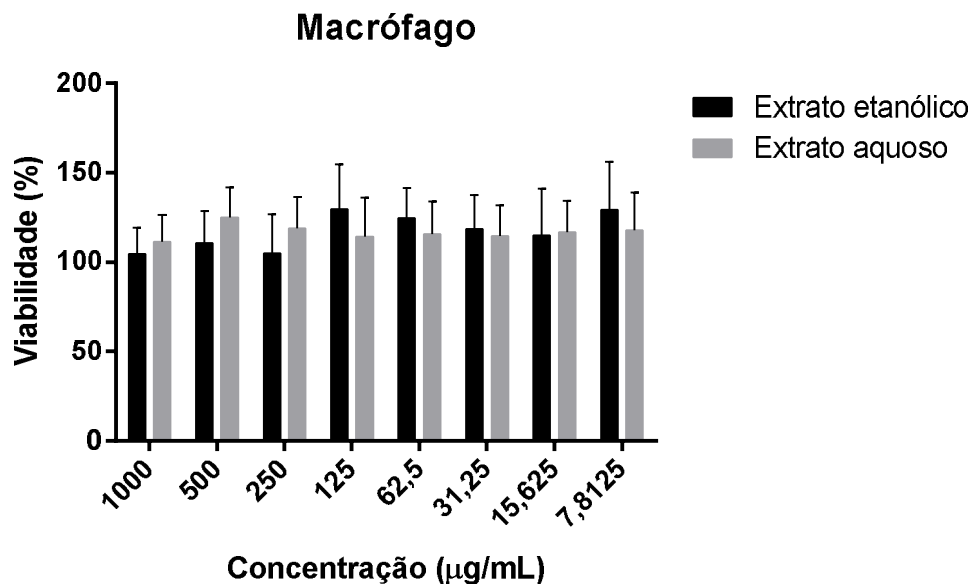
aumentam a capacidade de liberar mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos como intermediários do oxigênio e nitrogênio, enzimas hidrolíticas e citocinas as quais podem agir na destruição de antígenos (MONCADA et. al., 1991). Estes dados são importantes, pois fornecem informações de segurança quanto à aplicação desses extratos como possíveis agentes terapêuticos promissores no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, tal como a ITU.

A linhagem celular VERO consiste em células originárias de rim de macaco verde africano (RHIM et al., 1962; . SASAKI et al., 1964). Essa célula é umas das poucas, na atualidade, aprovadas para uso em produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que a torna um excelente modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas (KENNY, SCHELL, 1975, MENDES et al., 1990).

As linhagens de célula VERO foram submetidas às mesmas condições de teste e foi observado que não houve morte celular em nenhuma das concentrações testadas, pois apresentaram viabilidade $\geq 50\%$.

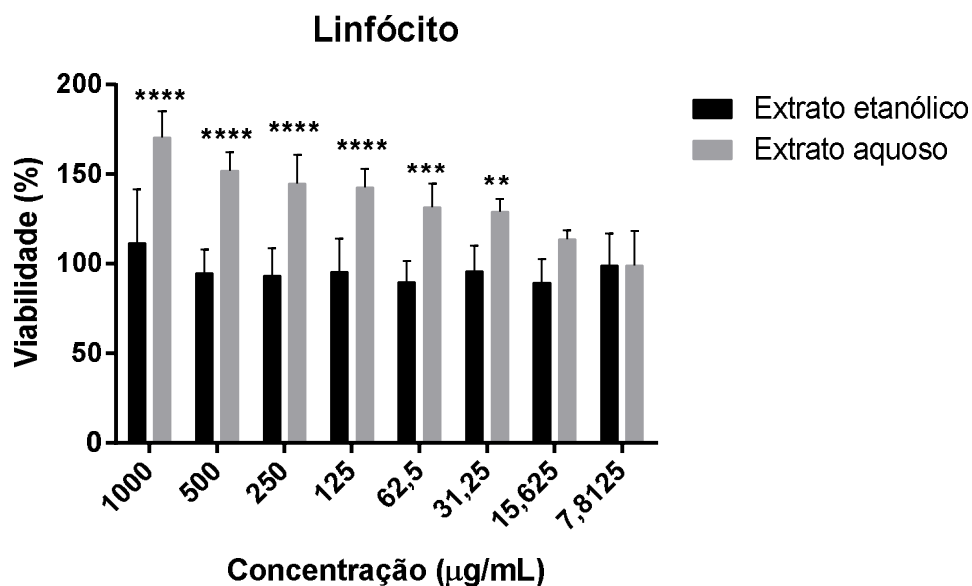
Nas Figuras 50 a 52 estão representados os perfis concentração-resposta para as linhagens de Macrófagos e Linfócitos obtidos de camundongos, e linhagem de célula VERO.

Figura 45. Determinação da viabilidade celular em Macrófago dada em porcentagem.



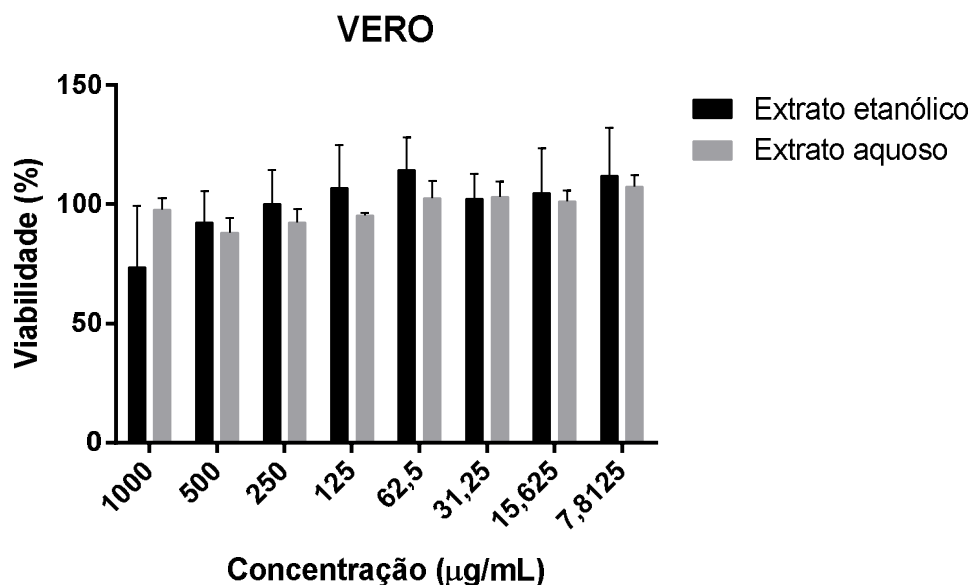
Nota: Todos os resultados estão expressos como média de cinco experimentos independentes em triplicata $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$), analisados por Two-Way ANOVA com pós-teste de múltiplas comparações de Sidak. Não houveram diferenças significativas.

Figura 46. Determinação da viabilidade celular em Linfócito dada em porcentagem.



Nota: Todos os resultados estão expressos como média de cinco experimentos independentes em triplicata $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$), analisados por Two-Way ANOVA com pós-teste de múltiplas comparações de Sidak (**: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$, diferença apresentada entre os extratos).

Figura 47. Determinação da viabilidade celular em VERO dada em porcentagem.



Nota: Todos os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes em triplicata $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$), analisados por Two-Way ANOVA com pós-teste de múltiplas comparações de Sidak. Não houveram diferenças significativas.

Não foram encontrados outros relatos na literatura sobre a avaliação de citotoxicidade de extratos ou produtos obtidos a partir de *E. brasiliensis*.

Raheel et al. (2013) avaliou a citotoxicidade de extratos aquoso de diferentes partes de *Acacia nilotica* (Linn) Delile em linhagem de célula VERO, também pelo método de MTT. Os extratos aquosos da vagem, folha e casca foram testados nas concentrações de 1,56; 3; 125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL. A análise citotóxica revelou que as concentrações para as vagens e folhas não se apresentaram tóxicas para as células entre as concentrações de 1,56 a 100 µg/mL. Para os extratos aquosos da casca as concentrações que não apresentaram citotoxicidade foram menores (1,56 a 25 µg/mL).

Lazarini et al. (2016) utilizou o método de MTT em extrato hidroetanólico 80% de semente de *Eugenia leitonii* para avaliação de citotoxicidade em linhagem de células de macrófagos RAW 264.7. O extrato foi testado nas concentrações 0,02; 0,2; 2; 20; 200 µg/mL, e pode-se observar ausência de citotoxicidade para os macrófagos nas concentrações utilizadas.

Tipton et al. (2013) avaliou a citotoxicidade em linhagem celular de epitélios da gengiva (Smulow–Glickman) e para a realização do trabalho utilizou concentrações 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL do suco de *Vaccinium macrocarpon* liofilizado de alto peso molecular, durante os tempos de 24, 48, 72, 144 horas. O liofilizado promoveu a morte celular nas concentrações mais altas testadas (250 e 500 µg/mL), após todos os tempos utilizados no estudo.

5. CONCLUSÕES

Foi avaliado dois extratos de *Eugenia brasiliensis* Lam. em relação as atividades antimicrobiana, antioxidante, aos seus parâmetros do perfil fitoquímico e citotoxicidade em células não tumorais.

Nestes extratos foi observado a presença de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, açúcares em testes fitoquímicos qualitativos e identificação de taninos.

Os cromatogramas obtidos utilizando CLAE-DAD, para obtenção de *fingerprint* dos extratos apresentaram semelhanças em seus perfis, tanto no tempo de retenção como nos espectros no UV. Nesta análise constatou-se características de compostos fenólicos e flavonóides, confirmando o que foi encontrado nas determinações fitoquímicas e em trabalhos anteriores com a *E. brasiliensis*. Contudo, os padrões utilizados não foram encontrados nos extratos, mesmo após co-injeção.

As análises antimicrobianas demonstraram que os extratos aquoso e etanólico não apresentaram atividade frente *E. coli*. O extrato aquoso apresentou atividade apenas contra *S. aureus* e o extrato etanólico mostrou-se efetivo ao apresentar atividade contra *S. aureus* e para as 5 cepas clínicas de *S. saprophyticus*. Para as cepas fúngicas estudadas de *C. albicans* apenas o extrato etanólico apresentou atividade antifúngica.

Para os ensaios antioxidantes sobre as espécies reativas de oxigênio: $O_2^{\bullet-}$, $ROO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$, $HOCl/OCl^-$, $TauCl$ e para o $ABTS^{\bullet+}$ e o potencial redutor para o íon férrico, observou-se que os padrões, como esperado, foram mais eficientes que os extratos, pois comparou-se compostos puros com extratos constituídos de misturas heterogêneas. Nos ensaios realizados os padrões mais eficientes foram o ácido elágico, ácido gálico, ácido cafeico e quercetina. Porém para o ensaio de captura da $TauCl$ o padrão ácido elágico apresentou-se como pró-oxidante e para o ensaio de captura do $NO^{\bullet}$ o mesmo padrão não foi capaz da captura desta espécie. Para o ensaio de captura do H_2O_2 , os extratos e padrões utilizados não apresentaram atividade.

De maneira geral, os extratos aquoso e etanólico apresentaram boa atividade antioxidante sobre as espécies reativas avaliadas, com exceção do NO[•] e H₂O₂, capturado apenas pela enzima responsável pela sua neutralização.

Quanto ao potencial citotóxico, os extratos de *E. brasiliensis* não apresentaram citotoxicidade diante das linhagens celulares de macrófagos, linfócitos e VERO, pois não foi observado morte celular em nenhuma das concentrações testadas.

Considerando os efeitos antioxidantes e antimicrobianos, e ausência de citotoxicidade dos extratos do fruto de *E. brasiliensis* observados neste trabalho torna-se importante estudos ulteriores para isolamento e identificação dos compostos responsáveis por tais efeitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L.T.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **J Sci Food Agric.**, v.92, p.1679–1687, 2011.

ALBINGER, B.; DAHLBERG, S.; HENRIQUE-NORMARK, B.; NORMARK, S. Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J Int Med**, v. 261, p. 511-528, 2007.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem.**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.V. Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos **Quim Nova**. v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Quim Nova**. v.31, n. 5, p.1224-1229, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar, Caderno B, **Principais Síndromes Infecciosas Hospitalares**. Brasília, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Interpretação de Dados Microbiológicos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm>. 2013.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food Sci. Tech.**, v.11, n. 11, p.419-421, 2000.

ARAÚJO, M.G.F.; HILÁRIO, F.; NOGUEIRA, L. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C.; BRUNETTI, I.L.; SOTOMAYOR, C.H.; BAUAB, T.M. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. **Int J Mol Sci.** v.13, p.9260-9277, 2012.

ARAÚJO, J.C.L.V; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev Patol Trop.**, v.33, p.55-64, 2004.

ARAÚJO, M.G.F.; PACÍFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C.; ICELY, P.A.; MIRÓ, M.S.; SCARPA, M.V.C.; BAUAB, T.M.; SOTOMAYOR, C.E. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Med Mycol.** v.51, p. 673-682, 2013.

APEL, M.A.M.; SOBRAL, C.; MENUT, J.-M.; BESSIERE, E.E.S.; SCHAPOVAL, A.T. Essential oils from *Eugenia* species. Part VII. Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. **J Essent Oil Res.**, v.16, p.135-138, 2004.

ASSIS, R.P; CASTRO, J.F.A.; GUTIERRES, V.O.; ARCARO, C.A.; BROTTTO, R.S.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.G. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species *in vitro* model systems as a possibility of support the renal function management. **BMC Nephrology**, v.16, 2015

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J Clin Invest.** v.52, n.3, p.741-744, 1973.

BABIOR, B.M.; COHEN, H.J. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med.** v.109, n.1, p. 3-44, 2000.

BAIERLE, M.; NASCIMENTO, S.N.; MORO, A.M.; BRUCKER, N.; FREITAS, F.; GAUER, B.; DURGANTE, J.; BRODIGNON, S.; ZIBETTI, M.; TRENTINI, C.M.; DUARTE, M.M.M.F.; GRUNE, T.; BREUSING, N.; GARCIA, S.C. Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:804198. doi: 10.1155/2015/804198. Epub 2015 Mar 19.

BAIL, L.; ITO, C.A.S.; ESMERINO, L.A. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. **RBAC**, v. 38, n.1, p. 51-56, 2006.

BAGETTI, M; FACCO, E.M.P.; RODRIGUES, D.B.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. **Ciênc Rural**, v.39, n.8, p.2504-2510, 2009.

BANDYOPADHYAY, S.S.; GHOSH, D.; MICARD, V.; SINHA, S.; CHATTERJEE, U.R.; RAY, B. Structure, fluorescence quenching and antioxidant activity of a carbohydrate polymer from *Eugenia jambolana*. **Int J Biol Macromol**, v.51, p.158–164, 2012.

BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.C., ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev Bras Farmacogn**, v.15, p.392-413, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**. v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BATISTA, M. R.; BORGES, M.; CARVALHO, O.; RODRIGUES, A.; SANTOS, J. Infecção bacteriana hospitalar em pacientes submetidos a transplante hepático em 2008. **Rev Pesq Cuid. Fundam.**, p. 9- 11, 2010.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. Infectious diseases: a global challenge. **Int J Med Microbiol.**, v. 296, n. 4-5, p. 179-185, 2006.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**, v. 78, p. 547-581, 1998.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase in the cardiovascular system: molecular mechanisms and pathophysiologic implications. **J Physiol**, Cambridge, v. 55, p. 589-606, 2004.

BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, F. M.; ZIA, M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complement Altern Med.**, v. 11, p. 52-58, 2011.

BLACK, J. G. **Microbiologia**: fundamentos e perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BLATHERWICK, N.R.; LONG, M.L. Studies of urinary tract acidity. II. The increased acidity produced by eating prunes and cranberries. **J Biol Chem.**, v. 57, p. 815-818, 1923.

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2014.

BONIFÁCIO, B.V.; RAMOS, M.A.S.; SILVA, P.B.; NEGRI, K.M.S.; LOPES, E.O.; SOUZA, L.P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F.R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T.M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **Int J Nanomed.** v.10, p.5081–5092, 2015

BRADLEY, D. G.; MIN, D. B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Food Sci Nutr.**, v. 31, n. 3, p. 211-236, 1992.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BROWN, D.I.; GRIENDLING, K.K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radic Biol Med.**, v. 47, n. 9, p. 1239-1253, 2009.

BROWN, P.N.; MURCH, S.J.; SHIPLEY, P. Phytochemical Diversity of Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) Cultivars by Anthocyanin Determination and Metabolomic Profiling with Chemometric Analysis. **J Agric Food Chem.**v.60, p.261–71, 2012.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. **The Merck Index:** an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.14th. ed. Whitehouse Station, NJ: MERCK, 2006.

BÜYÜKOKUROGLU, M.E.; GÜLÇİN, I.; OKTAY, M.; KÜFREVIÖGLU, ÖI. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. **Pharmacol. Res.** v.44, p.491-495, 2001.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sci.** v.78, p.2872–2888, 2006.

CAILLET, S.; CÔTÉ, J.; SYLVAIN, J.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. **Food Control.** v.23, p.419-428, 2012.

CAMPOS, M. P. **Análise do potencial antimicrobiano de extrato, frações e substâncias puras obtidas de *Piper solmsianum* C.D.C. VAR. *solmsianum* (PIPERACEAE).** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vale do Itajaí, Itajaí-SC, 2006.

CASTRO, J.F.A. **Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2012.

CAVAGNARO, F. S.M. Infección urinaria en la infancia. **Rev Chil Infect,** v. 22, n. 2, p. 161-168, 2005.

ÇELİK, H.; ÖZGEN, M.; SERÇEC, S.; KAYAD, C. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. **Sci. Hortic.** v.117, p.345–348, 2008

CHANG, R.L.; CHO, I.H.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Strategies to minimize antibiotic resistance. **Int J Environ. Res Public Health.** v.10, p.4274-305, 2013

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

CHATTERJEE, M. Augmented nitric oxide generation in neutrophils: oxidative and proinflammatory implications in hypertension. **Free Radic Res.**, New York, v. 43, n. 12, p. 1195-1204, 2009.

CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 7, p. 841-852, 2005.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to antiasthmatic drugs. **Anal Biochem.**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CHUNG, Y.C.; CHANG, C.T.; CHAO, W.W.; LIN, C.F.; CHOU, S.T. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. **J Agric Food Chem.** v.50, p.2454–2458, 2002.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standards- Document M7-A10 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 10th. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts**; approved standards, CLSI document M27-A3. Wayne, PA., 2008.

COLLA, A.R.S.; MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; COLLA, G.; MAGINA, M.D.A.; BRIGHENTE, I.M.C.; RODRIGUES, A.L. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **J Ethnopharmacol.**, v.143, p.720–731, 2012.

CONFORT, F.; MARRELLI, M.; CARMELA, C.; MENICHINI, F.; VALENTINA, P.; UZUNOV, D.; STATTI, G.A.; DUEZ, P.; MENICHINI, F. Bioactive phytonutrients (Omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), *in vitro* inhibition of nitric oxide production and free radicals scavenging of non-cultivated Mediterranean vegetables. **Food chem.**, v.129, p.1413-1419, 2011.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J Ethnopharmacol.**, v.66, p.33-39, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia:** farmacognosia experimental. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001. 992p.

COUTINHO, H.D.M. Infecções urinárias por enterobactérias. **Rev Méd Hosp Ana Maria Costa**. v. 10, n.1, p.147-158, 2005.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev.**, v.12, n.4, p. 564–582, 1999.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Quím Nova.**, v.16, n.3, p. 224-228, 1993.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **J Med Plants Res.**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DAVIS, N. F; FLOOD, H. D. The Pathogenesis of Urinary Tract Infections. In: NIKIBAKHSH, Ahmad, (Ed). **Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection**. Rijeka, Croatia: In Tech, 2011. Cap.7, p.101-120. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/clinical-management-of-complicated-urinary-tractinfection/the-pathogenesis-of-urinary-tract-infections>

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J.P.; RABELINK, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation.**, v.115, p.1285-1295, 2007.

DEHBANIPOUR, R.; RASTAGHI, S.; SEDIGHI, M.; MALEKI, N.; FAGHRI, J. High prevalence of multidrug-resistance uropathogenic *Escherichia coli* strains, Isfahan, Iran. **J Nat Sci, Biol Med.**, v. 7, p. 22-26, 2016.

DEL RÉ, P.V; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Rev Bras Plantas Med.**, Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DE OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M.; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, p.39-43, 2005.

DIAS, E.; ANDRADE, M.; ALVERCA, E.; PEREIRA, P.; BATORÉU, M.C.C.; JORDAN, P.; SILVA, M.J. Comparative study of the cytotoxic effect of microcistin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. **Toxicon**. v.53, p.487–495, 2009.

DIAZ, J. et al. References intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidase stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clin Chem**, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.

DIKALOV, S.I. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radical Biol Med.** v. 51, p.1289-1301, 2011.

DIKALOV, S.I.; UNGVARI, Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. **AJP-Heart Circ Physiol**, v. 305, n. 10, p. H1417-1427, 2013.

DI MARTINO, P.; AGNIEL, R.; DAVID, K.; TEMPLER, C.; GAILLARD, J.L.; DENYS, P.; BOTTO, H. Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. **World J. Urol.** v.24, n.1, p.21-27, 2006.

DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. **Food Chem.** v.83, p.255-262, 2003.

DOUGHARI J.H., NDAKIDEMI P.A., HUMAN I.S., BENADE S. Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentata*. **J Ethnopharmacol.** v.141, n.3, p. 1041-1050, 2012.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v.82, p.47-95, 2002.

DURACKOVÁ, Z. Oxidants, antioxidants and redox stress. In: DURACKOVÁ, Z.; KNASMÜLLER, S. **The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy**. Bratislava: SAP, 2007. p. 11-59.

DYPBUKT, J.M.; BISHOP, C.; BROOKS, W.M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A.J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Rad Biol Med.** v.39, p. 1468-1477, 2005.

EBERHARDT, M.K. **Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences**. Boca Raton: CRC Press, 2000. cap. 4, p.101-115.

EL-BENNA, J.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp.** (Warsz), v.53, n. 3, p.199-206; 2005.

EL-BENNA, J.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin Immunopathol.** v.30, n.3, p.279-89, 2008.

ESTÉVEZ, A.G.; JORDÁN, J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. **Ann New York Acad Sci.**, v.962, p.207-211, 2002.

EVELSON, P.A. Estrés Oxidativo y Apoptosis. In: MARRONI, N.P. et al. **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Porto Alegre: Ultra, 2002. p.153-162.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **J Agric Food Chem**, v.58, p.8139-8144, 2010.

EZZATZADEH E., FARJAM M.H., RUSTAIYAN A. Comparative evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of crude extract and secondary metabolites isolated from *Artemisia kulbadica*. **Asian Pac J Trop Dis**. Volume 2012, S431-S434, 2012.

FERRARI, C. K. B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. **Biologia**, v.55, p.581-590, 2000.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, diseases, defense system and oxidative stress. **Rev Assoc Méd Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.

FISCHER, D.C.H.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R.H. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. **J Essent Oil Res**; v.17, p.499-500. 2005.

FLANNAGAN, R.S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nat Rev Microbiol.**, v.7, n.5, p.355-66, 2009.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K.; PAULINO, S.; WHALEN, K.; DABO, A.J.; REYNERTSON, K.A.; FORONJY, R.F.; ARMIENTO, J.M.D.; KENNELLY, E.J. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chem**. p.1256-1262, 2012.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R.M.; SILVA, A.M.P.; NAKAMURA, M.J.; SIANI, A.C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contracorrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 15, n.4, p.338-343, 2005

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Braz J Microbiol**, v.34, n.1, p. 22-26, 2003.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **J Microbiol Methods**, v.50, p.63-73, 2002.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A.Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**. volume 2012, Article ID 428010, 11 pages. doi:10.1155/2012/4280102012.

GAO, M.; FENG, L.; JIANG, T. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. **Food Chem.**, v. 149, p. 107-113, 2013.

GORTZI O., LALAS S., CHINOI I., TSAKNIS J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. **Eur Food Res Technol.** v.226, n.3, p.583-590, 2008.

GRACE, M.H.; ESPOSITO, D.; DUNLAP, K.L.; LILA, M.A. Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial Vaccinium Berries. **J Agric Food Chem.** v.62, p. 4007–4017, 2014.

GRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

GROVER, J.K.; VATS, V.; RATHI, S.S.; DAWAR, R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **J Ethnopharmacol.** 2001

GUEDES, A.R. Levantamento do potencial antioxidante e antimicrobiano de frutas nativas da mata atlântica no estado do Paraná. Trabalho de conclusão de curso de graduação, dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus* Campo Mourão. 2013.

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. Paracasei A20. **Lett Appl Microbiol.**, v.50, n.4, p.419-424, 2010.

GUTTERIDGE, J.M.C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, **Chem Biol Interact.**, v.91, p.133-140, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4th. ed. New York: Oxford University Press, 2010.

HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. **J Hosp Infect.**, v. 64, n. 3, p. 217 - 223, 2006.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p.3007-3017, 1998.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complement Altern Med.**, v.8, n.63, p.1-10, 2008.

HEMALATHA, R.; NIVETHA, P.; MOHANAPRIYA, C.; SHARMILA, G.; MUTHUKUMARAN, C.; GOPINATH, M. Phytochemical composition, GC-MS analysis, *in vitro* antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. **J Food Sci Technol.**, 2015.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta. Farm. Bonaer.**, v.23, n.3, p.418-24, 2004.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V.F.; SANTOS, A.J.R.W.A.; WESTPHALEN, A.B.; INGLESIAS, B.A.; MARTINS, P.R.; AMARAL, C.H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C.M.; PARAGINSKI, G.L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Rev Bras Ciênc Farm.**, v.44, n.3, p.441-449, 2008.

HO, Y.; YU, H.; SU, N. Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content. **J Agric Food Chem.**, v.60, p.2674-2681, 2012.

HOWELL, A.B.; REED, J.D.; KRUEGER, C.G.; WINTERBOTTOM, R.; CUNNINGHAM, D.G.; LEAHY, M.A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. **Phytochemistry**, v.66, p.2281-2291, 2005.

HRÁDKOVÁ, I.; MERKL, R.; SMIDRKAL, J.S.; KYSELKA, J.; FILIP, V. Antioxidant effect of mono- and dihydroxyphenols in sunflower oil with different levels of naturally present tocopherols. **Eur J Lipid Sci Technol.**, v.115, p.747-755, 2013.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric Food Chem**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUSSEIN, S.A.M.; HASHEM, A.N.M.; SELIEM, M.A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M.A.M. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v.64, p.883-889, 2003.

INFANTE, J.; ROSALEN, P.L.; LAZARINI, J.G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S.M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **PLoS ONE**. v.11, n.4, e0152974. doi:10.1371/journal.pone.0152974 2016.

IPPOUSHI, K. Prevention of peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions by ellagic acid. **Food Chem.**, v.112, p.185-188, 2009.

JASNA, I.; SUZANA, D-B.; DUSAN, M.; MIHAÏLO, R.; IRENA, Z. Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds. **J Funct Food**, v.5, p.416-423, 2013.

JIN-MING K., NGOH-KHANG G., LIAN-SAI C., TET-FATT C. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacol Sin.** v.24, n.1, p.7-21, 2003.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N.A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **J Biochem Biophys.**, v.21, p.130-132, 1984.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol.**, v.11, p. 373-384, 2010.

KENNY, M.T.; SCHELL, K. Microassay of measles and mumps virus and antibody in Vero cells. **J Biol Standard**. v.3, p.291-303, 1975.

KETTLE A.J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the Chlorination Activity of 624 Myeloperoxidase. **Methods Enzymol.**, v.233, p.502-512, 1994.

KHALIL, N.M. **Interação das aminas terciárias nicotina, quinina, ranitidina e trimetilamina com o ácido hipocloroso: efeitos em biomoléculas e sistemas enzimáticos**. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2005.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biol Res.**, v.41, p.165-171, 2008.

KIM, C.; CHA, Y.N. Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. **J Amino Acids**, v.46, n.1, p.89-100, 2013.

KISS, J. P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. **Brain Res Bull.**, v.52, p.459-466, 2000.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; HOCEVAR, B.A. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicol Pathol.**, v.38, p.96-109, 2010.

KLEBANOFF, S.J.; KETTLE, A.J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C.C.; NAUSEEF, W.M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **J Leukoc Biol.**, v.93, p.185-198, 2013.

KNIGHT, J.A. Free radicals: their history and current status in aging and disease. **Ann Clin Lab Sci.**, v.28, p.331-346, 1998.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, **Toxicol Pathol.**, v.30, p.620-650, 2002.

KOKSAL, E.; BURSA, E.; DIKICI, E.; TOZOGLU, F.; GULCIN, I. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. **J Med Plants Res.** v. 5, p. 217-222, 2011.

KUSKOSKI, E.M.; VEJA, J.M.; RIOS, J.J.; FETT, R.; TRONCOSO, A.M.; ASUERO, A.G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **J Agric Food Chem**, v.51, p.5450-5454, 2003.

LAI, K.N.; TANG, S.C.W. Diabetes and the kidney. **Contrib Nephrol.**, v.170, p.228-234, 2011.

LANDINO, L.M.; MALL, C.B.; NICKLAY, J.J.; DUTCHER, S.K.; MOYNIHAN, K.L. Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, by the biologically-relevant oxidants peroxynitrite anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. **Nitric Oxide**, v.18, p.11-18, 2008.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, p.508-536, 1997.

LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its Pharmacological Antagonism: An update pictures. **Gen Pharmacol.**, v.27, n.7, p.1145-1147, 1996.

LAPSHINA, E.A.; ZAMARAIEVA, M.; CHESHCHIEVIK, V.T.; OLSHOWIK-GRABAREK, E.; SEKOWSKI, S.; ZUKOWSKA, I.; GOLOVACH, N.G.; BURD, V.N.; ZAVODNIK, I.B. Cranberry flavonoids prevent toxic rat liver mitochondrial damage in vivo and scavenge free radicals in vitro. **Cell Biochem Function.**, v.33, p. 202–210, 2015.

LAURINDO, F.R.M.; PEDRO, M.A.; DA LUZ, P.L. Oxygen-derived free radicals as signaling mediators in the vascular system. **Ciênc Cult.**, v.48, n. 1/2, p.18-27, 1996.

LAZARINI, J.G.; FRANCHIN, M.; INFANTE, J.; PASCHOAL, J.A.R.; FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. **J Funct Foods.**, v.26, p.249–257, 2016.

LEE J.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **J AOAC Int.**, v.88, p.1269-1278, 2005.

LEE, Y.L.; OWENS, J.; THRUPP, L.; BARRON, S.; SHANBROM, E.; CESARIO, T.; NAJM, W.I. The antifungal activity of urine after ingestion of cranberry products. **J Altern Complement Med.**, v.15, p.957-8, 2009.

LEONG, S. K.; RUAN, R.S.; ZHANG, Z. A critical assessment of the neurodestructive and neuroprotective effects of nitric oxide. **Annals New York Acad Sci.**, v.962, p.161-181, 2002.

LI, Y.; XU, C.; ZHANG, Q; LIU, J.; TAN, R. *In vitro* anti-Helicobacter pylori action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. **J Ethnopharmacol.**, v.98, n.3, p.329-333, 2005.

LICHTENDERGER P.; HOOTON T.M. Antimicrobial prophylaxis in women with recurrent urinary tract infections. In: NABER, K.G.; SCAEFFER, A.J.; HEYNS, C.F.; MATSUMOTO, T.; SHOSKES, D.A.; JOHANSEN, T.E.B. Urogenital Infections – International Consultation of Urological Diseases. 2010. p.240-251.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Braz. **J Pharm Sci.**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; FARIAS, N.P.; NAVARRO, D.F. Inhibitory action of some phytochemicals on yeasts potentially causing of opportunistic infections. **Rev Bras Ciênc Farm.**, São Paulo, v.41, p.199-203, 2005.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Cândida*. **Rev Bras Farmacogn.**, v.16, p.197-201, 2006.

LIMBERGER R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J.M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quim Nova**, v.27, p.916-919, 2004.

LIN, B.H.; MORRISON, R.M. Higher fruit consumption linked with lower body mass index. **Food Rev.**, v.25, p.28-32, 2002.

LIU, Y.; BLACK, M.A.; CARON, L.; CAMESANO, T.A. Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v.93, n.2, p.297-305, 2006

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Anal. Chim Acta*, v.763, p.1-10, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v.1, p.368.

LÚCIO, M.; NUNES, C.; GASPAR, D.; FERREIRA, H.; LIME, J.L.F.C.; REIS, S. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern lipid Peroxidation Studies *In Vitro*. **Food Biophys.**, v.4, p.312-320, 2009.

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; SILVA, C.C.; SCHUQUEL, I.T.A.; BASSO, E.A.; VIDOTTI, G.J. Triripenic acids from *Eugenia moraviana*. **J Braz Chem Soc.**, v.12, n.2, p.180-183, 2001

MACHADO, K.E.; CECHINEL, FILHO. V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, C.; MEYRE-SILVA. C.; BELLA, C. A. Potent Antibacterial activity of *Eugenia umbellifera*. **Pharm Biol.**, v. 43, n.7, p. 636-639, 2005.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Anal Chim Acta**, v.613, p.1-19, 2008

MAGINA, M.D.A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia***. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

MAGINA, M.D.A.; DALMARCO, E.M.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E.L.; DALMARCO, J.B.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **J Nat Med.**, v.63, p.345-350, 2009.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G.; KAZEMPOUR, N.; HATEMI, A.R. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Blepharis edulis* extracts. **Songklanakarin J Sci Technol.**, v. 35, n.1, p. 11-16, 2013.

MAHMOUD , I.I.; MARZOUK, M.S.A.; MOHARRAM, F.A.; EL-GINDI, M.R.; HASSAN, A.M.K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v.58, p.1239-1244, 2001.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and quantification of flavonoids. In: ANDERSEN, Ø.; MARKHAM, K.R.. eds. **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton, USA: CRC Press; Taylor & Francis Group, 2006. p. 1–36.

MATTILA, H. et al. Reactive oxygen species: reactions and detection from photosynthetic tissues. **Photochem Photobiol.**, v.152, Part B, p. 176-214, 2015.

MCMURDO, M.E.T., BISSET, L.Y., PRICE, R.J.G., PHILLIPS, G., CROMBIE, I.K. Does ingestion of cranberry juice reduce symptomatic urinary tract infections in older people in hospital? A double-blind, placebo-controlled Trial. **Age Ageing**, v.34, p.256–261, 2005.

MCSWEENEY, C.S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D.O. Effect of the tropical forage Calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **J Appl Microbiol.** v.90, n.1, p.78-88, 2001.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v.140, n.6, p.771-776, 2010.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6. ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2006.

MENDES, I.F.; TAKATA, C.S.; KUBRUSLY, F.S.; MIYAKI, C.; TENORIO, E.C.N.; FANG, F.L.W; CHAVES,M.M.G.; RIZZO, E. Statistical comparison of the micro and macro techniques in the assessment of the measles vaccines potency testing. In: 5º ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA. **Resumos**, p. 253. São Lourenço, MG, 1990.

MENDES, L.P.M.;MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM-NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev Ciên Farm Básica Apl.**, v.32, p.121-5, 2011.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem.** v.31, p. 426, 1959.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A.; DAVIES, M.J.; GOPINATHANN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci., (Lond)**, v.84, n. 4, p.407-412, 1993.

MIYATA, T. ECKARDT, K. NANGAKU, M. (Eds). **Studies on renal disorders: Oxidative stress in applied basic research and clinical practice. Oxidative Stress in the Kidney: Proximal Tubule Disorders**. Frankfurt: Springer, 2010. v.1., p.176-203.

MOHAMED, A.A.; KHALIL, A.A.; EL-BELTAGI, H. Antioxidant and antimicrobial properties of kaff Maryam (*Anastatica hierochuntica*) and doum palm (*Hyphaene thebaica*) **Grasas Aceites.**, v.61, n.1, p. 67-75, 2010.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MORENO, P.R.H.; LIMA, M.E.L.; SOBRAL, M.; YOUNG, M.C.M.; CORDEIRO, I.; APE, M.A.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Essential Oil Composition of Fruit Colour Varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Sci Agric**, v.64, n.4, p.428-432. 2007.

MORGAN, J.F.; KLUCAS, R.V.; GRAYER, R.J.; ABIAN, J.; BECANA, M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med.**, v.22, n.5, p.861-870, 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v.65, p.55-63. 1983.

MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; AL-HASSAN, A. A.; FAROUK, A. Tetrazolium/Formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. **J Mycol.**, volume 2013, Article ID 753692, 7 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/753692>

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL; K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr. A**, Amsterdam, v.1054, n.1/2, p.95-111, 2004.

NCUBE, B.; FINNIE, J.F.; STADEN, J.V. *In vitro* antimicrobial synergism within plant extracts combinations from there South African medicinal *bulbs*. **J Ethnopharmacol**. v.139, n.1, p. 81-89, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, cap.19 e 22, p.707-721, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radic Biol Med**. v.49, p.503–515, 2010.

NILE, S.H.; PARK, S.W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**. v.30, p.134–144, 2014.

NOGUTI, J.; ANDERSEN, M. L.; CIRELLI, C.; RIBEIRO, D. A. Oxidative stress, cancer, and sleep deprivation: is there a logical link in this association? **Sleep Breath.**, v.17, n.3, p. 905-910, 2013.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem.**, v.267, n.17, p.5421-5426, 2000.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J.M.; SETZER, W.N. Studies on the essential oils composition antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **Int J Aromather.**, v.15, p. 147-152, 2005.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím Nova**, v.32, n.3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, A.L.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; LAFOSSE, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) **Food Chem.**, v.145, p.522-529, 2014.

OLIVEIRA, R.N.; DIAS, I.J.M.; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, n. 1, p. 39 – 43. 2005.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Curr Biol.**, v.2, n.17, p.733-740, 2012.

ORDOUDI, S. A.; TSIMIDOU, M. Z. Crocin bleaching assay (CBA) in structure-radical scavenging activity studies of selected phenolic compounds. **J Agric Food Chem.**, v.54, p.9347-9356, 2006.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-420, 2007.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **J Nutrit.**, v.44, p.307-315, 1986.

PAGONAS, N.; HÖRSTRUP, J.; SCHMIDT, D.; BENZ, P.; SCHINDLER, R.; REINKE, P.; VAN DER GIET, M.; ZIDEK, W.; WESTHOFF, T.H. Prophylaxis of recurrent urinary tract infection after renal transplantation by cranberry juice and L-methionine. **Transplant Proc.** v.4, n. 10, p.3017-21, 2012.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAPPAS, E.; SCHAICH, K. M. Phytochemicals of Cranberries and Cranberry Products: Characterization, Potential Health Effects, and Processing Stability, Critical Reviews in **Food Sci Nutrit.** v.49, n.9, p.741-781, 2009.

PATEL, K.D.; SCARANO, F.J.; KONDO, M.; HURTA, R.A.R.; NETO, C.C. Proanthocyanidin-rich Extracts from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) Selectively Inhibit the Growth of Human Pathogenic Fungi *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **J Agric Food Chem.** v. 59, n. 24, p.12864-12873, 2011.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol.**, v.299, p.379-389, 1999.

PELUFFO, G.; RADI, R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovasc Res.**, v.75, p.291-302, 2007.

PEPATO, M.T.; MORI, D.M.; BAVIERA, A.M.; HARAMI, J.B.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. **J Ethnopharmacol.**, v.96, p.43-48, 2005.

PEREIRA, M.C.; STEFFENS, R.S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P.F.; RIOS, A.O.; VIZZOTTO M.; FLÔRES, S.H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **J Agric. Food Chem.**, v.60, p.3061-3067. 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res Int.**, v.39, p.791-800, 2006.

PIETROVSKI, E.F.; MAGINA, M.D.A.; GOMING, F.; PIETROVSKI, C.F.; MICKE, G.A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M.G.; CABRINI, D.A.; BRIGHENTE, I.M.C.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **J Pharm Pharmacol.**, v.60, p.479-487, 2008.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **Eur J Med Chem**, v.97, p.55-74, 2015.

POURGHOLAMI, M.H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M.; MAJZOUB, S.; SAYYAH, M. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. **J Ethnopharmacol.**, v.64, n. 2, p. 167-171, 1999.

PRABHU P, R.; HEGDE, K.; SHABARAYA, A.R.; RAO, M. N. A. Scavenging potential of reactive oxygen species by Tetra-hydrocurcumin. **J Appl Pharma Sci.**, v.1, n.5, p.114-118, 2011.

PRADO, L.C.S; SILVA, D.B.; OLIVEIRA-SILVA, G.L.; HIRAKI, K.R.N.; CANABRAVA, H.A.N.; BISPO-DA-SILVA, L.B. The Gastroprotective Effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) Leaf Extract: The Possible Role of Condensed Tannins. **Biol Pharm Bull.** v.37, n.5, p. 722-730, 2014.

PRASANNABALAJI, N.; MURALITHARAN, G.; SIVANANDAN, R.N.; KUMARAN, S.; PUGAZHVENDAN, S.R. Antibacterial activities of some Indian traditional plant extracts. **Asian Pac J Trop Dis.**, v.2, Suppl. 1, p. S291-S295, 2012.

- PREISER, J-C. Oxidative stress. **J Parent Enteral Nutr.**, v.36, p.147-154, 2012.
- PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense.** 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Vale do Itajaí, SC. Itajaí, 2005.
- PRIETO, M. A; VÁZQUEZ, J. A. *In vitro* determination of the lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their synergistic and antagonistic effects. **Food Res Int.**, v.62, p.1183-1196, 2014.
- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quím Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
- RADA, B.; HABLY, C.; MECZNER, A.; TIMÁR, C.; LAKATOS, G.; ENYEDI, P.; LIGETI, E. Role of Nox2 in elimination of microorganisms. **Semin Immunopathol.**, v.30, n.3, p.237-253, 2008.
- RAHAL, A. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Res Int.**, Volume 2014, Article ID 761264, 19 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/761264>.
- RAHEEL, R.; ASHRAF, M.; EJAZ, S.; JAVEEDA, A.; ALTAF, I. Assessment of the cytotoxic and anti-viral potential of aqueous extracts from different parts of *Acacia nilotica* (Linn) Delile against Peste des petits ruminants vírus. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v.35, p.72–81, 2013.
- RAMA, G.; CHHINA, D.K.; CHHINA, R.S.; SHARMA, S. Urinary tract infections microbial virulence determinants and reactive oxygen species. **Comp Immun Microbiol Infect Dis.** v.28, p.339–349, 2005.
- RAMOS, C.L.; POU, S.; BRITIGAN, B.E.; COHEN, M.S.; ROSEN, G.M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **J Biol Chem.**, v.267, n.1, p.8307-12, 1992.
- RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; CAVALHEIRO, É.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Quím Nova**, v.29, n.5, p.1114-1120, 2006.
- RAMOS, M.A.S. ***Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: Caracterização biológica e prospecção terapêutica do extrato metanólico incorporado ou não em sistema nanoestruturado para aplicação no tratamento da candidíase vulvovaginal.** 169p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2015.
- RAMOS, M.A.S.; CALIXTO, G.; TOLEDO, L.G.; BONIFÁCIO, B.V.; SANTOS, L.C.; ALMEIDA, M.T.G.; CHORILLI, M.; BAUAB, T.M. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **Int J Nanomed.** v.10, p.7455–7466, 2015

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food Chem Toxicol.**, v.43, p.1433-1439, 2005.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life Sci.**, v.75, n.22, p.2717-2731, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med**, v.26, n. 9/10, p.1231–1237, 1999.

REMONATTO, G. **Correlação entre concentração inibitória mínima e níveis urinários de antimicrobianos para o tratamento de infecções no trato urinário.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PortoAlegre-RS, 2006.

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica.** Rio de Janeiro: INPA, 2002. p. 44.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food chem.**, v.109, n.4, p.883–890, 2008.

RHIM, J.S.; SCHELL, K.; CREASY, B.; CASE, W. Biological characteristics and viral susceptibility of an African Green Monkey Kidney cell line (Vero). **Proc Soc Exp Biol Med.**, v.132, p.670-8, 1962.

ROBINSON, V.K. Peroxynitrite inhibits inducible (Type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells *in vitro*. **Free Radic Biol Med.**, v.30, p.986-91, 2001.

RODRIGUES, A. P. **Oxidação de compostos β -dicarbonílicos por peroxidase.** Dissertação (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chem.**, v.92, p.235-254, 2005.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO PELFREY C: **Membrane lipid oxidation.** Boca Raton: CRC Press, 1991. v.54, p.151-170.

ROSSO, V.V. Bioactivities of Brazilian Fruits and the Antioxidant Potential of Tropical Biomes. **Food and Public Health.**, v.3, n. 1, p.37-51, 2013.

RUBINSKIENE, M.; VISKELIS, P.; JASUTIENE, I.; VISKELIENE, R.; BOBINAS, C. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. **Food Res Int.**, Ontario, v.38, n.8-9, p.867-871, 2005.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem.** v.121, p.996–1002, 2010.

SAHA, R.N. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. **Neurochem Int.**, v.49, p.154-163, 2006.

SALGANIK, R. I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **J Am Coll Nutr.**, v.20, Suppl.5, p. 464S-472S, 2001.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnol Ciênc Desenvolv.**, n.13, p.28-32, 2000.

SANTOS-BUELGA, C.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. In: SANTOS-BUELGA, C., WILLIAMSON, G. eds. **Methods in polyphenol analysis**. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2003. p. 92–127.

SANTOS FILHO, L.S. **Manual de Microbiologia Clínica**. 4. ed. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2006.

SASAKI, K.; MAKINO, S.; KASAHARA, S. Studies on measles virus. II. Propagation in two established simian renal cell lines and development of a plaque assay. **Kitasato Arch Exp Med**. v.37, p 27-42, 1964.

SATO, A.F; SVIDZINSKI, A.E; CONSOLARO, M.E.L; BOER, C.G. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. **J Bras Patol Méd Lab.**, v.41, p.397-404, 2005.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v.10, n.4, p. 314-318, 2004.

SEBASTIAN, R.S.; WILKINSON, E.C.; GOLDMAN, J.D. A new database facilitates characterization of flavonoid intake, sources, and positive associations with diet quality among US adults. **J Nutr.**,v.145, p.1239–1248, 2015.

SEIDIL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **An Acad Bras Cienc.** São Paulo, v.74, p.145-150, 2000.

SERAFIN, C. **Estudo da Composição Química e das Propriedades Biológicas das Partes Aéreas de *Pliniaglomerata***. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Educação de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

SHARMA, P.; MONGAN, P.D. Ascorbate reduces superoxide production and improves mitochondrial respiratory chain function in human fibroblasts with electron transport chain deficiencies. **Mitochondrion**, v.1, n.2, p.191-198, 2001.

SHICHIRI, M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **J Clin Biochem Nutr.** v.54, n.3 p.151–160, 2014.

SIEBERT, D.A.; TENFEN, A.; YAMANAKA, C.N.; CORDOVA, C.M.M.; SCHARF, D.R.; SIMIONATTO, E.L.; ALBERTON, M.D. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. **Nat Product Res**, v. 29, n. 3, p. 289-292, 2014.

SNYDER, S.H.; BREDT, D.S. Biological role of nitric oxide. **Sci. Am**, v.266, p. 68-77, 1992.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. **Methods Enzymol.** v.299, p.152-178, 1999.

SILVA, C.H.P.M.; LINS, A.P.; SOUZA, D.R.; CRUZ, C.S.O.; BERGAMASCHI, G.C. Desenvolvimento e utilização de conservante químico em amostras de urina para análises microbiológicas e rotina. **RBAC**, v.37, p.137-147, 2005.

SILVA, C.H.P.M., NEUFELD, P.M. **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Revinter. 2006.

SILVA, N.A; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A.Z.; ROSSO, V.V. Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest. **J Agric Food Chem.**, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciênc Tecnol Aliment.**, Campinas, v.23, n.3, p.337-341, 2003 .

SILVA, S.O. **Oxidação de melatonina catalisada por mieloperoxidase em neutrófilos ativados**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

SIMÕES, M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007.

SIMÕES, SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 7ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010.

SOARES, L.A, NISHI, C.Y.M, WAGNER, H.L. Isolamento das bactérias causadoras de infecções urinárias e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. **Rev Bras Med Fam Comunidade**. v. 2, p.84-92, 2006.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr.**, v.15, p.71-81, 2002.

SOLOVCHENKO, A. Photoprotection of plantas via optical screening, on photobiological sciences online (KC Smitc, Ed.). McLean, VA: American society for photobiology. 2011.

- STRASINGER, S. K. **Uroanálise e fluidos biológicos**. 3. ed. São Paulo: Premier, 2000.
- SU, B.L.; ZENG, R.; CHEN, J.Y.; CHEN, C.Y.; GUO, J.H.; HUANG, C.G. Antioxidant and antimicrobial properties of various solvent extracts from *Impatiens balsamina* L. stems. **J Food Sci.**, v. 77, n.6, p. C614-C619, 2012.
- SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J Agric Food Chem.** v.50, p.7449–7454, 2002.
- SUZUKI, T.; CHOW, C.; DOWNEY, G. P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.40, n.6, p.1348-1361, 2008.
- TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biol Pharm Bull.**, v.27, n.12, p.1965-1969, 2004.
- TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J.. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Braz J Biol.**, São Carlos, v.75, n.4, p.948-952, 2015 .
- TEIXEIRA, L.L; BERTOLDI, F.C; LAJOLO, F.M.;HASSIMOTTO, N.M.A. Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasilienses* Lam.(Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. **J Agric Food chem.**,v. 63, n. 22, p. 5417-5427, 2015.
- TELESZKO, M.; WOJDYŁO, A. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. **J Funct Foods.** v.14, p.736–746, 2015.
- TIPTON, D.A.; CHO, S.; ZACHARIA, N.; DABBOUS, M.K. Inhibition of interleukin-17-stimulated interleukin-6 and 8 production by cranberry components in human gingival fibroblasts and epithelial cells. **J Periodont Res**, v. 48, n. 5, p. 638-46, 2013.
- THOM, S.M.; HOROBIN, R.W.; SEIDLER, E.; BARER, M.R. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salt as cytochemical indicators of microbial viability and activity. **J Appl Bacteriol.**, v.74, p.433-443, 1993.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10º ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.934.
- TUBARO, F.;GHISELLI, A.; RAPUZZI, P.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Radic Biol. Med.**, v.24, n.7/8, p. 1228–1234, 1998.
- UNKRIG, U.; NORTMEYER, C.; HORN, C; MARQUANT, M.; ONORIULUNGUIM; HOENES, J.; KOTZAN, DREBHOLZ, J. On-board control for analytical elements. United States Patent, v.137, p.980, 2012.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZACOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.**, v.160, p.1-40, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. **Infect Immun.**, v.70, n. 3, p.1033-1041, 2002.

VASILEIOU, I; KATSARGYRIS, A.; THEOCHARIS, S; GIAGINIS C. Current clinical status on the preventive effects of cranberryconsumption against urinary tract infections, **Nutr Res.**, v.33, n.8, p.595-607, 2013.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; BUSCHIAZZO, P.M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, p.91-97, 2003.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, p.361-372, 2005.

VÉRIN, P. **Etude Chimiquedes Constitutants Volatilsde Plantes Aromatiques du Brasil**. Ph. D. Thesis: Universitd de Montpellier II, Montpellier. 1996.

VERMA, P.S.; SREEVIDYA, N.; VERMA, R.S. Antibacterial and antioxidant activity of methanol extract of *Evolvulus nummularius*. **Indian J Pharmacol.**, v.41, n.5, p.233-236, 2009.

VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A.; PAULA, V.F.; NASCIMENTO, E.A. Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Quim Nova**, v.27, p.536-539, 2004.

VIEIRA NETO, O.M. Simpósio: Urgências e emergências infecciosas. Capítulo IV: Infecção do trato urinário. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 365-369, abr./dez., 2003. http://revista.fmrp.usp.br/2003/36n2e4/22%20infeccao_trato_urinario.pdf

VIRÁG, L.E. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanismand opportunities for intervention. **Toxicol Lett.**, v.140, p.113-124, 2003.

VVEDENSKAYA, I.O.; VORSA, N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. **Plant Sci.** v.167, p.1043-54, 2004.

ZAFRIRI, D., OFEK, I., ADAR, R., POCINO, M., SHARON, N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P-fimbriated *Escherichia coli* to eukaryotic cells. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.33, p.92-98, 1989.

ZAMORA-ROS, R.; FOROUHI, N.G.; SHARP, S.J. Dietary intakes of individual flavanols and flavonols are inversely associated with incident type 2 diabetes in European populations. **J Nutr.** v.144, p.335–343, 2014.

ZGLICZYNSKI, J.M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWSKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochem Biophys Acta.**, v.235, p.419-424, 1971.

WALTON, M.C.; LENTLE, R.G.; REYNOLDS, G.W.; KRUGER, M.C.; MCGHIE, T.K. Anthocyanins absorption and antioxidant status in pigs. **J Agric Food Chem**, Los Angeles, v.54, n.20, p.7940-7946, 2006.

WANG, S.Y.; JIAO, H. Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. **J Agric Food Chem.** v.48, p.5677–5684, 2000.

WECKWERTH, P. H.; CARNIETTO, C.; WECKWERTH, A. C.; DUARTE, M. A.; KUGA, M. C.; VIVAN, R. R. *In vitro* susceptibility of oral *Candida albicans* strains to different pH levels and calcium hydroxide saturated aqueous solution. **Braz Dent J.**, v.23, n.3, p.192-198, 2012.

WERBER, J. et al. Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. **J Pharm Sci.**, v.100, n.8, p.3307-3315, 2011.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med.**, v.320, n.6, p.365-376, 1989.

WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respir Physiol.**, v.128, n.3, p.79-391, 2001.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p. 401-409, 2001.

WINTERBOURN, C.C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods Enzimol.**, v.186, p.265-272, 1990.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.; KETTLE, A. Myeloperoxidase. **Curr Opin Hematol.**, v.7, p.53-58, 2000.

WHO. World Health Organization. 10 facts on patient safety. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/patient.safety/en/>. Acesso em: 14 mar. 2016.

WOJNICZ, D.; SYCZ, Z.; WALKOWSKI, S.; GABRIELSKA, J.; ALEKSANDRA, W.; ALICJA, K.; ANNA, S.L.; HENDRICH, A.B. Study on the influence of cranberry extract Z` uravit S·O·S® on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. **Phytomedicine**, v.19, p.506–514, 2012.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v.49, n.9, p.1618-1631, 2010.

WU, X.; PRIOR, R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **J Agric Food Chem.**, v.53, p.2589–99, 2005.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Lett.**, v.157, n.1, p. 65-75, 2000.

YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chem.**, v. 74, p.471-478, 2001.

YUAN, Z. MAPK and ERK promote nitric oxide production in cultured human retinal pigmented epithelial cells induced by high concentration glucose. **Nitric Oxide**, v.20, p.9-15, 2009.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais**: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. p500.

Capítulo 2

Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities and cytotoxicity of the fruit pulp of *Eugenia brasiliensis* Lam.

Karine Custódio Garcia¹, Renata Pires Assis¹, Matheus Ramos², Francine Alessandra Manente¹, Iracilda Zeppone Carlos¹, Taís Maria Bauab², Amanda Martins Baviera¹, André Gonzaga dos Santos³, Iguatemy Lourenço Brunetti^{1*}

Institutional address:

School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical Analysis¹, Department of Biological Sciences² and Department of Natural Active Principles and Toxicology³, São Paulo State University - UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil.

*** Corresponding author**

IguatemyLourenço Brunetti

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University

Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 – s/n, Campos Ville, Araraquara, São Paulo, Brazil

CEP 14800-903

Phone: +55 16 3301 5703 Fax: +55 16 3322 0073

E-mail: brunetti@fcfar.unesp.br

ABSTRACT

Eugenia brasiliensis is known as “Brazilian berry”; literature has few reports demonstrating its biologic activity. The aim of this study was to evaluate the phytochemical composition, the antimicrobial and antioxidant activities, as well as the cytotoxicity potential of the aqueous and ethanolic extracts of the fruit pulps of *Eugenia brasiliensis*. Both extracts showed high concentrations of phenolic compounds and sugar. The ethanolic extract had antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Candida albicans* ATCC18804, while the aqueous extract only against *Staphylococcus aureus*. About the antioxidant activity, the ethanolic extract showed greater efficiency for the capture of $O_2^{\bullet-}$, $ABTS^{\bullet+}$, $HOCl/OCl^-$ and $TauCl$, while the aqueous extract was more efficient in scavenging $ROO^{\bullet}$ and -potential reducing of ferric ion. *E. brasiliensis* extracts showed no cytotoxicity against macrophages, lymphocytes and VERO cells. The results suggest that *Eugenia brasiliensis* fruits can be useful as supplement or functional food with beneficial effects for health.

Keywords: *Eugenia brasiliensis*, phenolics, flavonoids, antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxicity potential.

1. INTRODUCTION

The excess of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the body is counteracted by both endogenous and exogenous antioxidants. Consumption of antioxidants found in vegetables is associated with decreased cell damage, therefore preventing oxidative stress. The metabolic disorders frequently observed in association with oxidative stress are often related with cardiovascular diseases, cancer and chronic neurodegenerative diseases (Baynes, Dominiczak, 2015).

There is a growing interest in investigating the biological activities of vegetables components and derivatives. In addition to the nutritional properties, fruits consumption has been recommended due to of the beneficial effects of their components, including antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties (Ezzatzadeh et al., 2012). Alkaloids, terpenes, phenolics, cyanogenic glycosides are examples of natural compounds responsible for the biological properties of vegetables, while vitamins C and E, tannins, flavonoids and other phenolic compounds account for the antioxidant activity of vegetables (Simões et al., 2010).

In this context, it is an emergent trend the discovery of new antimicrobial agents derived from natural products, acting against a range of infectious agents. Several plants have shown remarkable in vitro and in vivo antimicrobial activities, thus justifying the intense search in traditional medicine focused on antimicrobial characterization of plants (Diaz et al., 2010).

Eugenia brasiliensis Lam. belonging to *Eugenia*, one of the largest genus of the Myrtaceae family, is commonly known as “grumixama” or “Brazilian berry”, possessing antioxidant potential and antimicrobial uses. Previous studies found in *E. brasiliensis* several phenolic compounds (Silva et al., 2014); in fruits it were identified carotenoids, oxygenated sesquiterpene, anthocyanins (delphinidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside), ursolic acid, flavonoids (myricetin, rutin, quercetin and kaempferol) and hydrolysable tannins (Reynertson et al., 2008; Silva et al., 2014; Teixeira et al.; 2015). In the essential oils of *E. brasiliensis* leaves it were found α - and β -pinene, α - and β -selinene, β -caryophyllene, spathulenol and T-cadinol (Moreno et al., 2007). It has been demonstrated that the ethanolic extract of *E. brasiliensis* fruit pulp has antioxidant activity, scavenging some reactive species (Siebert et al., 2014; Infante et al., 2016). In addition, *E. brasiliensis* preparations have anti-cholinesterase, anti-

inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities (Pietrovski et al., 2008; Magima, et al., 2009; Siebert et al., 2014; Infante et al., 2016).

Although there are some studies describing the pharmacological properties of *Eugenia* genus, studies are missing about the pharmacological potential of the fruit of the Brazilian species of *Eugenia brasiliensis*.

The objective of this study was to determine the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potentials of the aqueous and ethanolic extracts obtained from the freeze-dried fruit pulps of *E. brasiliensis*.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Freeze-dried fruit pulps of *Eugenia brasiliensis* Lam. were commercially obtained from Bello - Native Fruits, Paraibuna, São Paulo (Latitude 23 ° 23'10 "S and Longitude 45 ° 39'44 "O). The frozen fruit pulps are a blend of two varieties composed of 70% purple or red variety and 30% yellow variety.

2.2. Preparation of the extracts

The lyophilized pulp (1.0 g) was added to 10 mL ultrapure water and ethanol. Extractions were realized in an ultrasonic bath for 20 min at 40° C, this procedure was repeated three times. Aqueous and ethanolic extractive solutions were filtered through Whatman filter paper nº 6 under vacuum and stored at -18° C. The extractive solutions were lyophilized yielding the aqueous and ethanolic dried extracts that were stored at -18 ° C.

2.3. Determination of total phenolic and total flavonoid content

Total phenolic contents (TPC) were measured according to Singleton et al. (1999), absorbance was measured at 750 nm, and the results were expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE) per g of dry extract.

Total flavonoid content (TFC) was measured using Chang et al. (2002) assay, with slight modifications. The solutions of the extracts were added to an aqueous solution of sodium nitrite (5% w/v). After 6 min kept at room temperature and protected

from light, an ethanolic solution of $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10% w/v) was added and the mixtures were kept for 5 min at room temperature in the dark. After, an aqueous solution of sodium hydroxide (1 mol/L) was added and the absorbance was measured at 425 nm. Results were expressed in mg of quercetin equivalents per g of dry extract.

2.4. Determination of total anthocyanin content

Total anthocyanin content was determined by the pH-differential method of Lee et al. (2005). The pigment concentration was calculated using the molar absorptivity of cyaniding-3-glucoside ($\epsilon = 26.900 \text{ mol/L}$) and expressed as milligrams of cyaniding-3-glucoside (C3G) equivalents per g of dry extract.

2.5. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar

The total sugars were determined using the reducing property of sugars on the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) according to Miller (1959). For quantification of non-reducing sugars, the same methodology was used after hydrolysis of the sample in an acid medium. The results were expressed as mg of total sugars glucose equivalents per 100 g of dry extract.

2.6. Identification of tannins

The tannins identification is based on precipitation and colorimetric tests. The freeze-dried pulp (crude extract) were solubilized in water (0.05 g/mL), and kept under boiling for 15 min, and further submitted to identification tests.

For the precipitation tests, the first reaction was performed adding a few drops of dilute hydrochloric acid and gelatin test solution (2.5% w/v) to the crude extract.

The second reaction was realized adding a drop of hydrochloric acid (10% v/v) and 15 drops of quinine sulfate solution (0.1% w/v) in sulfuric acid (0.1 mol/L) to the crude extract. Finally, the reaction with lead acetate was performed by adding solutions of acetic acid (10% v/v) and lead acetate (10% w/v) to the to the extract solutions (Costa, 2001).

The colorimetric reaction test was performed using the reaction with iron salts. A ferric chloride solution (methanol, 2% w/v) was added to the extract solutions.

Positive reactions: blue color for hydrolysable tannins or green color for condensed tannins (Costa, 2001).

2.7. Evaluation of antimicrobial potencial

2.7.1. Microorganisms

The microorganisms were provided by the Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine of Sao Jose do Rio Preto (FAMERP). We employed the following strains: one strain from the American Type Culture Collection for *Escherichia coli* ATCC 25922 and ten clinical isolates (ECC 1, ECC 2, ECC 3, ECC 4, ECC 5, ECC 6, ECC 7, ECC 8, ECC 9, ECC 10); *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; five clinical isolates from *Staphylococcus saprophyticus* (SSC1, SSC2, SSC3, SSC4 e SSC5); and three strains from *Candida albicans* ATCC 18804 (sensitive to fluconazole), ATCC 5314 (resistant to fluconazole) and CAV5 (resistant clinical isolated strain of vaginal region), which made a donation of these strains to the Laboratory of Physiology of Microorganisms, FCFAr/UNESP, under the coordination of Prof. Dr. Maria Taís Bauab. The use of these strains was approved by the Human Research Ethics Committee CEP-FAMERP.

The bacteria was maintained on Mueller Hinton broth plus 20% glycerol and frozen at -20°C. For use, they were subcultured on Mueller Hinton broth and incubated at 37°C for 24 hours. The yeast were maintained on Sabouraud dextrose broth plus 20% glycerol and frozen at -20°C. For use, they were subcultured in 2 mL of Sabouraud dextrose broth and incubated at 37°C for 48 hours.

2.7.2. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC determination was performed by the dilution in microplate technique with modifications to bacterial strains (CLSI, 2006) and fungi strains (CLSI, 2008). The aqueous solutions of the extracts (100 µL) were added at concentrations ranging from 1000 to 7.8 µg/mL (serial dilution).

In the antibacterial assays, cultures incubated for 24 hours were adjusted to 10^6 cells/mL, and for antifungal assays, yeast cultures incubated for 48 hours were adjusted to 10^3 cells/mL. After standardization of the microorganisms, each was deposited in the microplate containing the respective compounds evaluated.

The ampicillin (antibacterial assays), amphotericin B and fluconazole (antifungal assays) were used as the positive controls. Additional controls also included the culture medium, yeast and bacteria growth, extract solutions, solvent. The microplates were incubated at 37 °C for 24 hours to antibacterial assays and for 48 hours to antifungal assays.

At the end of incubation period an aliquot from each well was plated in Petri dishes containing Mueller Hinton agar (MHA) incubated at 37 °C for 24 hours, to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). Sabouraud dextrose agar (SDA) incubated at 37 °C for 48 hours, to determine the minimum fungicidal concentration (MFC) and after incubation, were evaluated for growth of microorganism or not.

30 µL of resazurin was added in the antibacterial experiments, and the microplates were incubated at 37°C for 2 hours (Palomino et al., 2002). For antifungal assays. For antifungal experiments, 20 µL of an aqueous 2% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) was used as developer (Araújo et al., 2013) and the microplates were incubated at 37 °C for 2 hours. The assays were carried out in triplicate.

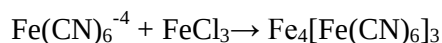
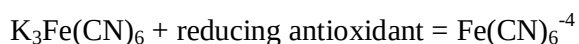
2.8. Evaluation of the antioxidant activity

2.8.1. ABTS radical cation decolorization assay and superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging assay

The antioxidant activity was assessed by the ABTS method and anion radical scavenging assay, as described by Assis et al. (2015). The results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of the 50% inhibitory concentration (IC_{50}).

2.8.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) was determined according to the method of Koksall et al. (2011). The reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} was determined by measuring the absorbance of the complex formed called Perl's Prussian blue, at 700 nm. This method is based on the reduction of Fe^{3+} contained in ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) to Fe^{2+} by the antioxidant power of the sample, as the following equation:



The assay was performed in 0.2 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.6), 1% (m/v) potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), and using different concentrations of samples to be tested. After 20 min incubation at 50°C, the medium was further acidified with 10% trichloroacetic acid, and added 0.1% FeCl_3 . To measure the amount of Prussian blue generated, the absorbance was monitored at 700 nm in a microplate. Increased absorbance indicates the antioxidant capacity of the sample to reduce the Fe^{3+} to Fe^{2+} .

2.8.3. Nitric oxide scavenging

The nitric oxide scavenging was evaluated in 20 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4) and 4 mmol/L sodium nitroprusside after 150 minutes of incubation (Yen et al., 2001). Sodium nitroprusside in aqueous solution (pH 7.4), produces the radical NO^* , which reacts with oxygen to form nitrite and nitrate. To determine the nitrite concentration, it was used the Griess reagent, consisting of aqueous solution of 1% sulfanilic acid (w/v), 0.1% N-(1-naphthalenediamine) (w/v) and 2.5% phosphoric acid (v/v). Under acidic conditions, sulfanilic acid reacts with nitrite to form a diazonium salt, which reacts with N-(1-naphthalenediamine), producing a colored compound measured at 540 nm.

2.8.4. Scavenging assay to HOCl/OCl^- and taurine chloramine (TauCl)

The assay determined the capacity of the sample to capture HOCl/OCl^- or TauCl, preventing them from oxidizing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). TMB oxidation by HOCl/OCl^- or TauCl generates a blue compound with maximum absorbance at 655 nm (Kettle, Winterbourn, 1994; Dypbukt et al., 2005). To produce a standard solution of OCl^- , NaOCl was diluted in 10 mmol/L NaOH and its concentration was determined by its molar extinction coefficient ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 292 nm) (Zgliczynski et al., 1971).

For HOCl/OCl^- , it was used the method described by Dypbukt et al. (2005), at room temperature, with modifications. The reaction was carried out in 50 mmol/L

sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 30 mmol/L HOCl/OCl⁻ in the absence or presence of different sample concentrations. After 10 minutes of incubation, it was added a revelation reagent with 2.8 mmol/L TMB, dissolved in dimethylformamide (DMF) and diluted (v/v) in 0.8 mol/L acetic acid and subsequent addition of 0.01 mol/L potassium iodide, 50% DMF, 4 mol/L acetic acid and 14 mmol/L TMB. The reaction was incubated for 5 min at room temperature in the dark and the absorbance was monitored at 655 nm.

For TauCl, the same conditions were repeated, with the addition of 5 mmol/L taurine and incubation for 5 minutes with HOCl/OCl⁻ before the addition of samples. The presence of iodide in the revelation reagent catalyzes the oxidation of TMB by TauCl (Dybbukt et al., 2005). The results were expressed as mean IC₅₀ ± SEM.

2.8.5. Peroxyl radical (ROO[•]) scavenging assay

The crocin bleaching assay was performed as described by Assis et al. (2015), by monitoring the decrease in the crocin absorbance at 443 nm for 10 min, in a competitive kinetics procedure. The reaction was initiated by the addition of the azo-compound 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), which generates peroxyl radicals by thermolysis at 40°C at a constant rate. Thus, the antioxidants compete with the crocin for ROO[•]; therefore, the inhibition of its oxidation depends on the capacity of samples in capture the radical species.

The coefficient k_a/k_c , calculated as the slope of the regression line for the v_0/v versus $[A]/[C]$ plot, indicates the relative capacity of an antioxidant to interact with the peroxyl radicals. By dividing this slope for an extract sample by the slope for a standard antioxidant such as Trolox, the ratio of rate constants, and thus the relative antioxidant capacity, of the analyzed compound can be estimated, being expressed in Trolox equivalents.

2.9. Evaluation of the cytotoxic potential

2.9.1. Acquisition and culture of peritoneal macrophages and splenocytes

It were used male Swiss mice (25-30 g; n=5) provided from the Central Animal Laboratory of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP. Animals were kept in cages with environment of stable conditions (23 ± 2°C temperature, 56 ± 2% relative

humidity) and 12-hour cycles with and without light. The animals received water and sterilized food (Purina) *ad libitum*. All animal procedures were performed according to the guidelines of SBCAL/COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório)

For obtaining and culturing macrophages, mice were intraperitoneally inoculated with 3 mL of 3% sodium thioglycollate (Difco Lab. LTD), three days before being euthanized in a CO₂ chamber. The peritoneal exudates cells were obtained by inoculation of 5 mL cold PBS. Cells were counted and adjusted to a concentration of 5×10^6 cells/mL in RPMI complete culture medium (RPMI-1640C).

Cells were maintained for one hour at 37°C at constant tension of 5% CO₂ (Forma Scientific). The supernatants were discarded and added 100 µL LPS (5µg/mL - positive control), only the culture medium RPMI-1640C (negative control) and different extract concentrations (1000 to 0.97 µg/mL). The plates were incubated for 24 h and then held the viability test using bromide of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT) method.

To obtain and culture of total splenocytes, the same animals inoculated were used, after euthanasia the peritoneum was exposed and open to the extraction of the spleen, which was removed aseptically and macerated. The cells were lysed with NH₄Cl and the suspension was washed 3 times with PBS for 5 minutes at 300xg at 4°C. After the last wash, cells were resuspended in 1 mL of complete RPMI and counted in a Neubauer chamber. Cells were adjusted to 5×10^6 cells/mL and plated in 96 wells with stimuli (same extract concentrations used in the peritoneal macrophages) and incubated in CO₂ incubator for 24 hours for subsequent viability test.

2.9.2. Evaluation of the cytotoxicity on Vero cell culture

Vero cells (ATCC CCL-81TM), isolated line of the kidney of African green monkey epithelium (*Cercopithecus aethiops*) were grown in DMEM culture medium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 0.1 mg/mL) and incubated at 37 ° C in atmosphere of 5% CO₂. The confluent cells 80 to 90% after the third subculture were trypsinized and then plated in 96 well plates with cell density of 5×10^4 cells/mL. After, they were incubated for 24 h for complete cell adhesion. The supernatant was

discarded and the cells treated with different concentrations of the extract (1000 to 0.97 µg /mL).

2.9.3. Evaluation of the cell viability

Assays for determining the cell viability in the presence of *E. brasiliensis* extracts were performed in vitro using the method of the MTT, which determines the ability of viable cells to reduce MTT to form an insoluble crystal violet staining of formazan (Mossman, 1983). The tests were performed with peritoneal macrophages, spleen cells (from mice) and VERO cells.

After the treatment, the culture medium was removed and 100 uL of MTT were added to each well. The plates were incubated at 37°C, protected from light, until the observation of the presence of formazan crystal violet for 3 h. The MTT solution was removed from the plate and added 100 mL of isopropyl alcohol. The absorbance was measured at 540 nm with reference filter 620 nm; three independent experiments were performed in triplicate with each cell line.

2.10. Statistical analysis

For the antioxidant and cytotoxicity assays the data were analyzed by *one-way* analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post test using GraphPad Prism software 6. Statistical analysis of the antioxidant activity and cytotoxicity was performed comparing the extracts; both considering a statistical significance level of 5% threshold ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical characterization of the *E. brasiliensis* extracts

Aqueous extracts of *E. brasiliensis* presented higher level of total phenolics equivalents to gallic acid (AG) (2.5 %), when compared with the ethanol extract (1.6 %), suggesting a greater antioxidant potential in the aqueous *E. brasiliensis* extract (Table 1).

In a study of Infante et al. (2016), the ethanol extract of *E. brasiliensis* showed a higher content of phenolic compounds in the leaf extract (73.25 mgAG/g), when

compared with seed (42.60 mg AG/g) and pulp (26.69 mg AG/g) extracts. With respect to the pulp extract, the content of total phenolics found in this study was very similar to that found by Infante and colleagues.

The determination of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu reagent cannot provide exact values, since other reducing compounds, such as ascorbic acid, can react with phosphotungstic and phosphomolybdic acids present in the reagent, also generating the blue complex of molybdenum. In addition, Folin-Ciocalteu reagent reacts with certain non phenolic compounds (eg. reducing sugars), and it is considered by some authors a method for determining the total antioxidant capacity, since they have high correlation with other antioxidants methods due to the chemical similarities present in these trials (EVERETTE et al., 2010). Therefore, the higher reducing sugar content of the aqueous extract of *E. brasiliensis* may have influenced the result for phenolic compounds (Table 1).

The contents of total flavonoids equivalents to quercetin were 1.0 and 1.5 % for the aqueous and the ethanolic extracts, respectively (Table 1). Regarding the quantification of total flavonoids, there are no data in the literature performed for fruits of *E. brasiliensis*.

The content of total anthocyanins equivalents to cyanidin-3-glucoside (C3G) determined in the aqueous extract (0.03 %) was lower than in the ethanolic extract (0.08 %) (Table 1). Teixeira et al. (2015) also used the pH differential method to determine the amount of anthocyanins in methanolic extracts of the red fruits variety of *E. brasiliensis*, and they found high anthocyanin contents, ranging from 30 to 200 mg C3G/100g of fresh fruits. However anthocyanins were not found in fruits and seeds of the yellow variety. Reynertson et al. (2008) also observed high anthocyanin contents for *E. brasiliensis* extract of the fruit when compared with four plants of the same genus (8.37 mg C3G/g in weight dry), values 27.9 times higher than the amount of anthocyanins found in this study.

The aqueous and the ethanolic extracts showed similar values of total sugars (774.40 and 735.20 mg GLU/g, respectively), and for reducing sugars the aqueous extract had lower quantity (136.80 mg GLU/g) when compared with the ethanolic extract (251.10 mg GLU/g). For non-reducing sugars, aqueous extract had greater amounts (637.60 mg GLI/g) in comparison with the ethanol extract (484.00 mg GLU/g) (Table 1).

Teixeira et al. (2015) quantified the total soluble sugars in an ethanol extract of purple and yellow fruit varieties of *E. brasiliensis* by HPLC. The varieties of purple and yellow fruits showed similarity in the total sugar contents (2.98 and 2.97 g/100 g, respectively), glucose values were similar between purple (2.84 g/100 g) and yellow (2.85 g/100 g) varieties and the fructose values were low (0.13 and 0.12 g/100 g, respectively). Sucrose was not detected in both extracts of *E. brasiliensis* fruits.

The precipitation tests reaction with gelatin and the reaction of lead acetate were positive for *E. brasiliensis* extracts, indicating the presence of tannins (Table 2). The colorimetric reaction test using iron salts also was positive, generating a blue color, suggesting the presence of hydrolysable tannins (Table 2). Taken together, the results of these tests suggest the presence in *E. brasiliensis* extracts of hydrolysable tannins (gallotannins or ellagitannins) or gallic acid, ellagic acid or its derivatives, due to precipitation with gelatin and lead and specifically the blue color characteristic for these compounds observed in the test with ferric chloride.

Some studies with *E. brasiliensis* and other *Eugenia* genus also identify some tannins and showed high amounts of gallic acid derivatives (Abe et al., 2011; Silva et al., 2014; Teixeira et al. 2015; Infante et al., 2016).

3.2. Evaluation of antimicrobial potential

The aqueous and the ethanol extracts of *E. brasiliensis* exhibit antibacterial activity against *S. aureus*. For the five clinical strains of *S. saprophyticus*, only the ethanolic extract showed activity. The two extracts were inactive against *E. coli* strains. For the strains of *C. albicans*, the aqueous extract was inactive, but the ethanolic extract showed activity against *C. albicans* ATCC18804 and CAV5.

Magina (2009) studied the antimicrobial activity of essential oils of leaves of *E. brasiliensis*, obtaining activity against strains of *S. aureus* (ATCC 25923) with MIC = 156.2 mg/mL, and for *E. coli* (ATCC 25922) with MIC/MBC of 624.9 mg/mL.

Siebert et al. (2014) determined the minimum inhibitory concentration against *S. saprophyticus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from the essential oils of the leaves of *E. brasiliensis*, obtained in different seasons of the year. Oils obtained during the fall and winter presented a MIC of 500 µg/mL against *S. saprophyticus*, and during the summer and spring seasons had a MIC = 1000 µg/mL. Against *E. coli*, only the oils obtained in the fall had little potential, MIC = 1000 mg/mL. It was also observed

activity with low potential against *Pseudomonas aeruginosa* using the oil obtained in winter, MIC = 1000 mg/mL and moderate with the oil obtained in the fall, with MIC = 500 mg/mL. These findings allow observing the differences in the antibacterial activity of *E. brasiliensis* leaves, according to the season of the extraction of oils.

The MBC and MFC were performed for the aqueous and ethanolic *E. brasiliensis* extracts that had activity toward at least one of the microorganisms.

Compared with the MIC of the bacterial strains, it can be observed that the MBC values coincided with their respective MICs, thus showing that the tested samples presented a possible bactericidal effect against *S. aureus* strains, eliminating the bacterial growth; and bacteriostatic effect against strains of *S. saprophyticus*. Likewise, the *Candida* strains showed a fungistatic behavior.

There were no data of *E. brasiliensis* antifungal activity against strains of *Candida* sp.

According to our results, the *E. brasiliensis* fruits extracts had no efficacy for Gram-negative bacteria. This may be due to the different composition of the Gram-negative bacteria membranes in comparison with Gram-positive. The cell wall of Gram-negative bacteria has an outer membrane that corresponds to a second lipid bilayer, which firmly adheres to the peptidoglycan layer, providing greater stiffness. The outer face of this membrane is rich in lipopolysaccharides, which makes it more lipophilic to exogenous substances (Bylka et al., 2004).

Taguri et al. (2004) also suggested that the amount of flavonoids and tannins present in extracts may have the ability to inactivate enzymes and to complex with extracellular proteins, soluble proteins and the cell wall of bacteria, explaining the probable antimicrobial mechanisms of action. The total rupture of the microbial membranes can be given by flavonoids with lipophilic character. Therefore, we suggest that plant preparations extracted with organic solvents, such as ethanol, have the ability to extract nonpolar molecules; in this sense it is possible that the ethanolic extract of *E. brasiliensis* has a greater amount of these compounds that are directly related with the antimicrobial activity found in this study, when compared with the activity of the aqueous extract.

Unlike most of the synthetic drugs used in the antimicrobial therapy, the scientific literature does not have a consensus regarding the MIC values obtained from natural products. In this way, some authors establish individual parameters to sort the results from the determination of the antimicrobial activity assays. Aligiannis et al.

(2001) consider MICs with values equal to or less than 500 µg/mL as potent inhibitors; MICs between 600 and 1500 µg/mL as moderate inhibitors, and MICs above 1600 µg/mL as weak inhibitors.

3.3. ABTS radical cation decolorization assay and superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging assay

In the ABTS^{•+} assay, gallic acid (standard) showed an IC₅₀ value of 0.43 ± 0.756 µg/mL. *E. brasiliensis* aqueous extract had an IC₅₀ of 51.08 ± 0.980 µg/mL, and the ethanolic extract had an IC₅₀ of 31.64 ± 1.408 µg/mL (Table 4). Ethanolic extract of *E. brasiliensis* fruits was more effective, however its IC₅₀ value was 73.5 times higher than gallic acid (Table 4). There were no other reports in the literature about the antioxidant activity against ABTS^{•+} for extracts or products obtained from *E. brasiliensis* fruits.

The ethanol extract of *E. brasiliensis* showed great effectiveness for $O_2^{\cdot-}$ capture, with IC₅₀ of 664.17 µg/mL, in comparison with the aqueous extract that showed IC₅₀ of 770.88 µg/mL (Table 4). Ellagic acid, used as standard, showed IC₅₀ of 12.24 µg/mL, a value 54 times lower than values of the ethanol extract. It was also used Trolox as standard, with IC₅₀ of 511.97 µg/mL, a value only 1.3 times lower than the IC₅₀ of the ethanolic extract and 1.5 times lower than the IC₅₀ of the aqueous extract, indicating that the extracts, despite being a complex heterogeneous mixture of substances, they have similar antioxidant activities in comparison with a pure substance. The extracts of *E. brasiliensis* must contain mixtures of phenolic and flavonoid compounds that can be more effective in capturing $O_2^{\cdot-}$.

Infante et al. (2016) also evaluated the $O_2^{\cdot-}$ radical capture ability of extracts from different parts of *Eugenia* genus (ethanolic extract of leaves, seeds and pulp). The extracts of pulps had the highest IC₅₀, so having low activity to capture $O_2^{\cdot-}$. In descending order, the IC₅₀ values obtained by each plant extract was 4.02 mg/mL (*Eugenia myrcianthes*), 2.67 mg/mL (*Eugenia leitonii*) and the lowest IC₅₀ (2.15 mg/mL), for *E. brasiliensis*, which value was greater than 2.78 times when compared with the IC₅₀ obtained with the *E. brasiliensis* aqueous extract in this study.

3.4. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

For this assay, it were considered the concentrations of the aqueous or ethanolic extracts of *E. brasiliensis* or standards that reached maximum absorbance of 2.0. The assays were done in triplicate and results are the average of concentrations.

The aqueous extract of *E. brasiliensis* showed a better potential for reduction of ferric ion ($900 \pm 0.023 \mu\text{g/mL}$) when compared with the ethanolic extract ($1.500 \pm 0.003 \mu\text{g/mL}$), but the ethanolic extract had a concentration 90 times greater than the standard gallic acid ($10 \pm 0.020 \mu\text{g/mL}$) (Table 4). There were no reports in the literature on the analysis of the ferric ion reducing potential of the fruits extracts of *E. brasiliensis*.

Koksal et al. (2011) used the same method to evaluate the potential of reducing ferric ion of the aqueous and ethanolic extracts of leaves of *Melissa officinalis*. Admitting the absorbance at 700 nm versus a fixed concentration of $30 \mu\text{g/mL}$, it was obtained a better potential in reducing ferric ion with the aqueous extract, similarly with the findings in the present study for the aqueous extract of *E. brasiliensis*. These data confirm the results obtained in the determination of the phenolic compounds, which was greater in the aqueous extract. The determination of ferric reduction is often used as an indicator of the electron donating activity, an important antioxidant mechanism related to the phenolic compounds (Dorman et al., 2003).

3.5. Nitric oxide scavenging

None of the extracts of *E. brasiliensis* were able to capture $\text{NO}^{\bullet}$ up to $30 \mu\text{g/mL}$ (Table 4). Therefore, for the standard quercetin, it was obtained an IC_{50} of $11.7 \pm 0.543 \mu\text{g/mL}$, demonstrating its excellent efficiency in the $\text{NO}^{\bullet}$ capture. There were no reports in the literature for the nitric oxide scavenging capacity of *E. brasiliensis* extracts.

3.6. HOCl/OCl⁻ and taurine chloramine (TauCl)scavenging assay

For the scavenging capacity of HOCl/OCl⁻, the standard quercetin had IC_{50} of $0.3 \pm 0.040 \mu\text{g/mL}$. The IC_{50} of *E. brasiliensis* ethanolic extract was $10.63 \pm 0.651 \mu\text{g/mL}$, which represents a better activity for HOCl/OCl⁻ capture in comparison with the IC_{50} of the aqueous extract, $30.58 \pm 0.979 \mu\text{g/mL}$ (Table 4). In comparison with quercetin, the *E. brasiliensis* ethanolic extract showed an IC_{50} value 35 times higher,

which probably is related with the extract composition, representing a complex mixture of substances.

Infante et al. (2016) observed that ethanolic extracts of some species of *Eugenia* genus had antioxidant activity against HOCl; ethanolic extracts of *E. involucrata* leaves and of *E. leitonii* seeds had greater efficiency in the HOCl/OCl⁻ capture, with IC₅₀ of 1,313.84 µg/mL and 18.14 µg/mL, respectively. *E. brasiliensis* pulp extract showed IC₅₀ of 42.67 µg/mL, similarly to the IC₅₀ of leaf extract (45.81 µg/mL); these values were very similar to the IC₅₀ of the *E. brasiliensis* aqueous extract in this present study (30.58 µg/mL).

The *E. brasiliensis* ethanolic extract had a better capacity to capture TauCl (IC₅₀ 278.10 ± 1.204 µg/mL) in comparison with the aqueous extract (IC₅₀ 636.87 ± 0.651 µg/mL) (Table 4). The standard gallic acid had an IC₅₀ of 1.42 ± 0.109 µg/mL. The standard ellagic acid showed pro-oxidant activity. There are no reports in the literature about the antioxidant activity against the TauCl radical of extracts or products obtained from *E. brasiliensis*.

3.7. Peroxyl radical (ROO[•]) scavenging assay

The ROO[•] scavenging abilities of the standards quercetin and Trolox were with IC₅₀ values of 1.35 and 2.89µg/mL, respectively. The aqueous extract of *E. brasiliensis* had lower IC₅₀ value for ROO[•] capture (120.34 µg/mL), similar to the IC₅₀ value for the ethanolic extract (144.59µg/mL) (Table 5). According to the kinetic competition equation, it was calculated the Trolox equivalent value for each extract of *E. brasiliensis* and also to the standard quercetin.

Naturally, the respective IC₅₀ values found for the standard and for the *E. brasiliensis* extracts had the same order of efficiency, found for the slope obtained in the analysis for each compound. Therefore, as lower the IC₅₀, the more efficient the sample for ROO[•] capture, while for the slope of the regression line, as higher the value, the more effective for ROO[•] capture.

Despite the aqueous extract of *E. brasiliensis* had an IC₅₀ about 80 times higher in comparison with quercetin, the extract can be considered effective in capture ROO[•], protecting and preventing the crocin bleaching. This in vitro assay simulates the in vivo lipid peroxidation process, so it was possible to demonstrate the efficacy of *E. brasiliensis* extracts to protect against lipoperoxidation.

Infante et al. (2016) evaluated the ROO[•] capture ability via absorbing capacity of oxygen radicals (ORAC), monitoring the antioxidant activity of the ethanolic extracts through the fluorescence decay relative to the oxidation of ROO[•]. The extract of *E. involucrata* leaves showed the highest value (1,393.3 µmol equivalent of Trolox/g) and the lowest value for the seeds of *Eugenia myrcianthes* (96.24 µmol Trolox/g). For *E. brasiliensis*, the ORAC values for leaves, pulp and seeds were, in descending order, 757.32, 477.45 and 211.84 µmol Trolox/g, respectively.

3.8. Cytotoxic potential

Cells were treated with different concentrations of the extracts, based on the concentrations used in the antimicrobial assay that ranged 1 mg/mL. In Figure 1 are shown the concentration-response profiles of macrophages (A), lymphocytes (B) and VERO cells (C).

According to Dias et al. (2009), it is considered a toxic concentration that can induce a cytotoxic response of the cell viability $\leq 50\%$. Therefore, for any cell type examined in this study, the extracts of *E. brasiliensis* did not show cytotoxicity, because none of the extracts caused death in 50% of cells in any of the tested concentrations. Cell viability is presented above 100% for lymphocytes and macrophages, thus, it can be considered that *E. brasiliensis* extracts aided on the proliferation of these cells.

Activated macrophages from the contact with the lipopolysaccharide wall of gram negative bacteria or other internal factors (interferon-gamma produced by T lymphocytes) increased the ability to release proinflammatory mediators and cytotoxic oxygen and nitrogen intermediates, hydrolytic enzymes and cytokines, which may be helpful in destroying antigens (Moncada et. al., 1991). Therefore, the *E. brasiliensis* extracts ability in aid the macrophages proliferation is important, providing safety information on the application of these extracts as possible promising agents in the treatment of chronic inflammatory diseases. There were no reports in the literature on the assessment of the cytotoxicity of *E. brasiliensis* extracts or products.

Raheel et al. (2013) assessed the cytotoxicity of aqueous extracts of different parts of *Acacia nilotica* (Linn) in VERO cell line, via MTT method. Aqueous extracts of the pod, leaf and bark were tested at concentrations of 1.56, 3, 125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/mL. The pods and leaves extracts had no toxic effects on cells in concentrations from 1.56 to 100 mg/mL. The bark extract had no cytotoxicity from 1.56

to 25 mg/mL. Recently, Lazarini et al. (2016) used the MTT method for the evaluation of macrophages cytotoxicity in cell line RAW 264.7 for hydroethanolic extract of *Eugenia leitonii* seeds (concentrations of 0.02, 0.2, 2, 20, 200 µg/mL). No cytotoxicity for the cell macrophages was found, at any of the tested concentration.

4. CONCLUSION

According our data, it can be suggested that the aqueous or ethanolic extracts of the fruit pulps of *Eugenia brasiliensis* have interesting biological activities. The antimicrobial analysis showed that the extracts were inactive against *E. coli* strains. However, was observed activity to *S. aureus* (aqueous and ethanolic extracts), *S. saprophyticus* (ethanolic extract) and *C. albicans* (ethanolic extract). The *Eugenia brasiliensis* fruit pulp extracts had also potent antioxidant activities, probably due to the high concentrations of phenolic compounds. The ethanolic extract was able to scavenge ABTS radical, $O_2^{\bullet-}$, $HOCl/OCl^-$ and $TauCl$; aqueous extract was more effective in capturing $ROO^{\bullet}$ and had potential to reduce ferric ion. Finally, both aqueous and ethanolic extracts of *Eugenia brasiliensis* showed no cytotoxicity against macrophages, lymphocytes or VERO cells. Fruits of *Eugenia brasiliensis* have appearing as an interesting supplementation with potential beneficial effects to the health.

Acknowledgements

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support.

Author Contributions and Conflict of Interest

Conceived and designed the experiments: KCG, AGS, TMB, ILB. Performed the experiments: KCG, RPA, MR, FAM.r Analyzed the data: KCG, TMB, AGS, AMB, ILB. Contributed with reagents/materials/analysis tools: TMB, IZC, AGS, AMB, ILB. Wrote the paper: KCG, RPA, MR, TMB, AGS, AMB, ILB.

The authors declare have no conflict of interest.

5. REFERENCES

- Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4168-4170.
- Araújo, M. G. F., Pacífico, M., Vilegas, W., Santos, L. C., Icely, P. A., Miró, M. S., Scarpa, M. V. C., Bauab, T. M., Sotomayor, C. E. (2013). Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*, 51, p. 673-682.
- Assis, R. P., Castro, J. F. A., Gutierrez, V. O., Arcaro, C. A., Brotto, R. S., Oliveira, O. M. M. F., Baviera, A. M., Brunetti, I. G. (2015). Effects of uremic solutes on reactive oxygen species *in vitro* model systems as a possibility of support the renal function management. *BMC Nephrology*, 16.
- Baynes, J. W., Dominiczak, M. H. (2015). *Bioquímica médica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Bylka, W., Matlawska, I., Pilewski, N. A. (2004). Natural flavonoids as antimicrobial agents. *Jana*, 7, 24-31.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
- CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015.). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 10^a ed. Document M7-A10 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA.
- Confort, F., Marrelli, M., Carmela, C., Menichini, F., Valentina, P., Uzunov, D., Statti, G. A., Duez, P., Menechini, F. (2011). Bioactive phytonutrients (Omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), *in vitro* inhibition of nitric oxide production and free radicals scavenging of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food Chemistry*. 129, 1413-1419.
- Consolini, A. E., Baldini, O. A. N., Aamat, A. G. (1999). Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 33-39.
- Costa, A. F. (2001). *Farmacognosia*. 3^a ed. Vol. 3. Fundação Calouste Gulbekian: Lisboa. 992 p.

- Dias, E., Andrade, M., Alverca, E., Pereira, P., Batoréu, M. C. C. , Jordan, P., Silva, M. J. (2009). Comparative study of the cytotoxic effect of *microcystin*-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon*, 53, 487–495.
- Diaz, M. A. N., Rossi, C. C., Mendonça, V. R., Silva, D. M., Ribon, A. O. B., Agilar, A. P. Muñoz, G. D. (2010). Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 724-728.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry*, 83, 255-262.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- Dypbukt, J. M., Bishop, C., Brooks, W. M., Thong, B., Eriksson, H., Kettle, A. J. (2005) A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1468-1477.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey. Y. A., Wangila, G. W., Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteou reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139-8144.
- Ezzatzadeh, E., Farjam, M. H., Rustaiyan, A. (2012). Comparative evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of crude extract and secondary metabolites isolated from *Artemisia kulbadica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, s431-s434.
- Infante, J., Rosalen, P. L., Lazarini, J. G., Franchin, M., Alencar, S.M. (2016). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. *Plos One*, 1-13.
- Kettle, A. J., Winterbourn, C. C. (1994). Assays for the Chlorination Activity of 624 Myeloperoxidase. *Methods in Enzymology*, 233, 502-512,
- Koksal, E., Bursa, E., Dikici, E., Tozoglu, F., Gulcin, I. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 217-222.
- Lazarini, J. G., Franchin, M., Infante, J., Paschoal, J. A. R., Freires, I. A., Alencar, S. M., Rosalen, P. L. (2016). Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. *Journal of Functional Foods*, 26, 249–257.
- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-1278.

- Magina, M. D. A.; Dalmarco, E. M., Wisniewski, A., Simionatto, E. L., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., Brighente, I. M. C. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *Journal of Natural Medicines*, 63, 345-350.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Review*, 43, 109-142.
- Moreno, P. R. H., Lima, M. E. L., Sobral, M., Young, M. C. M., Cordeiro, I., Ape, M. A., Limberger, R. P., Henriques, A.T. (2007). Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Scientia Agricola*, 64, 428-432.
- Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, 65, 55-63.
- Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F. (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 46, p. 2720-2722.
- Petrovski, E. F., Magina, M. D. A., Goming, F., Petrovski, C. F., Micke, G. A., Barcellos, M., Pizzolatti, M. G., Cabrini, D. A.; Brighente, I. M. C.; Otuki, M. F. (2008). Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 479-487.
- Rahal, A. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*. 19pages.
- Raheel, R., Ashraf, M., Ejaz, S., Javeeda, A., Altaf, I. (2013). Assessment of the cytotoxic and anti-viral potential of aqueous extracts from different parts of *Acacia nilotica* (Linn) Delile against Peste des petits ruminants virus. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35, 72-81.
- Reynertson, K. A., Yang, H., Jiang, B., Basile, M. J., Kennelly, E. J. (2008). Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109, 883-890.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.
- Siebert, D. A., Tenfen, A., Yamanaka, C. N., Cordova, C. M. M., Scharf, D. R., Simionatto, E. L., Alberton, M. D. (2014). Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. *Natural Product Research*.

- Silva, N. A., Rodrigues, E., Mercadante, A. Z., Rosso, V. V. (2014). Phenolic Compounds and Carotenoids from Four Fruits Native from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27, 1965-1969.
- Teixeira, L. L., Bertoldi, F.C., Lajolo, F. M., Hassimotto, N. M. A. (2015). Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasilienses* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Zgliczynski, J. M., Stelmaszynska, T., Domanska, J., Ostrowski, W. (1971). Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochemica et Biophysica Acta*, 235, 419-424.
- Yen, G. C., Lai, H. H., Chou, H. Y. (2001). Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chemistry*, 74, 471-478.

Table and Figure captions

Table 1. Total phenolics and flavonoids, total anthocyanins and sugar of *E. brasiliensis* fruit pulps extracts.

Table 2. Identification of tannins in *E. brasiliensis* fruit pulps extracts.

Table 3. Minimum inhibitory concentration for bacterial and fungal strains of *E. brasiliensis* fruit pulps extracts and the positive control.

^avalues in µg/mL; AMP= ampicillin; AMB= amphotericin B; FLU= fluconazole

Table 4. ROS scavenging activities and potential of ferric ion reduction of *E. brasiliensis* fruit pulps extracts.

Values in µmol/L of IC₅₀ of solutes; *SEM (standard error of the mean); **No effect at the concentration used.

Table 5. Peroxyl radical scavenging ability of *E. brasiliensis* fruit pulps extracts and standards.

*The analyzes were performed as described in Materials and Methods, where $y=v_0/v$; $x=[A]/[C]$. The slope of regression line indicates relative antioxidant capacity of the sample (ka/ kc).

Figure 1. Determination of cell viability in macrophages (A), lymphocytes (B) and VERO cells (C) in the presence of *E. brasiliensis* fruit pulps extracts.

All results are expressed as mean of five independent experiments in triplicate $\pm$ standard deviation (M $\pm$ SD), analyzed by two-way ANOVA with post-test for multiple comparisons Sidak (**: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$, presented difference between extracts).

Table 1

Extracts	Total phenolics (mgAG /g)	Total flavonoids (mgFLAVEQ /g)	Total anthocyanins (mgC3G /g)	Total Sugar (mgGLI /g)	Not reducing sugar (mgGLI /g)	Reducing sugar (mgGLI /g)
Aqueous	25.145±0.142	10.000±0.006	0.300±0.176	774.400±0.277	136.800±0.865	637.600±1.082
Ethanolic	16.400±0.084	15.600±0.025	0.800±0.085	735.200±2.009	251.100±2.422	484.000±2.009

Table 2

Sample	Reaction	Results
Crude Extract	Reaction with Gelatin	+
	Reaction with Quinine Sulfate	-
	Reaction with Lead acetate	+
	Reaction of iron salts	+ (blue color)

+ Indicates a positive result to the test

- Indicates a negative result to the test

Table 3

Microorganisms	<u>MIC^a</u>		<u>MBC/MFC^a</u>		<u>Positive controls</u>		
	<i>Aqueous</i>	<i>Ethanollic</i>	<i>Aqueous</i>	<i>Ethanollic</i>	AMP	AMB	FLU
<i>S. aureus</i>	1000	500	1000	500	0,7	-	-
ATCC 25923							
SSC 1	>1000	1000	>1000	>1000	31,2	-	-
SSC 2	>1000	1000	>1000	>1000	0,7	-	-
SSC 3	>1000	1000	>1000	>1000	0,3	-	-
SSC 4	>1000	1000	>1000	>1000	1,4	-	-
SSC 5	>1000	1000	>1000	>1000	0,7	-	-
<i>E. coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	3,1	-	-
ATCC 25922							
ECC 1	>1000	>1000	>1000	>1000	R	-	-
ECC 2	>1000	>1000	>1000	>1000	0,7	-	-
ECC 3	>1000	>1000	>1000	>1000	1,5	-	-
ECC 4	>1000	>1000	>1000	>1000	0,7	-	-
ECC 5	>1000	>1000	>1000	>1000	R	-	-
ECC 6	>1000	>1000	>1000	>1000	1,5	-	-
ECC 7	>1000	>1000	>1000	>1000	3,1	-	-
ECC 8	>1000	>1000	>1000	>1000	1,5	-	-
ECC 9	>1000	>1000	>1000	>1000	1,5	-	-
ECC 10	>1000	>1000	>1000	>1000	R	-	-
<i>C.albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	-	5,0	R
ATCC 5314							
<i>C. albicans</i>	>1000	1000	>1000	>1000	-	2,5	8,0
ATCC 18804							
CAV 5	>1000	1000	>1000	>1000	-	5,0	R

Table 4

Extracts	ABTS	O ₂ ^{•-}	HOCl/OCl ⁻	TauCl	FRAP	NO [•]
	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	Absorbance = 2,0(µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Aqueous	51.08±0.980	770.88±0.614	30.58±0.979	636.87±0.458	900.00±0.023	**
Ethanolic	31.64±1.408	664.17±0.643	10.63±0.651	278.10±1.204	1500.00±0.003	**

Table 5

Compounds	Equation of Kinetic Competition $y=V_0/V$; $x=[A]/[C]$; (r)	Trolox* equivalents	Slope of regression line	IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Quercetin	$y=1+20.69x$ (0.998)	2.52	20.69	1.35
Trolox	$y=1+8.18x$ (0.997)	1.00	8.18	2.89
Aqueous Extract	$y=1+0.217x$ (0.999)	0.03	0.217	120.34
Ethanollic Extract	$y=1+0.167x$ (0.999)	0.02	0.167	144.59

Figure 1

