



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR



Atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos etanólicos de *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia jambolana* Lam.

CELESTINA ELBA SOBRAL DE SOUZA

CRATO – CE,

2014.

CELESTINA ELBA SOBRAL DE SOUZA

Atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos etanólicos de *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia jambolana* Lam.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de mestre (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

CRATO – CE,

2014.

Souza, Celestina Elba Sobral de.
S719a Atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos etanólicos de
Eugenia uniflora L. e *Eugenia jambolana* Lam./ Celestina Elba Sobral
de Souza. – Crato-CE, 2014
134p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA.
Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.
Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. Atividade antioxidante; 2. Efeito quelante; 3. Citoproteção;
4. *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia uniflora* L.

CDD: 615.3

CELESTINA ELBA SOBRAL DE SOUZA

Atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos etanólicos de *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia jambolana* Lam.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA EM: 24 / 02 / 2014.

RESULTADO: _____

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Orientador)
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Felipe Silva Ferreira (Membro Interno)
Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares (Membro Externo)
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes (Suplente)
Departamento de Química Biológica – URCA

CRATO – CE,

2014.

Dedico este trabalho a minha família que sempre acreditou na minha vitória, que eu seria capaz de concluir esta etapa da minha formação acadêmica. E ao meu amor maior, *Maria Sophia*, por ser minha fonte inesgotável de força, me fazendo não desistir dos meus sonhos.

Agradecimentos

Este é o final de apenas uma etapa de minha vida, considerando que muitas outras ainda virão. Durante toda esta caminhada muitos foram os momentos vividos, onde diversas foram as pessoas que estiveram comigo nesta trajetória, cada uma com um papel importante. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu alcançasse o fim deste mestrado, gostaria de agradecer a todos pela amizade, coleguismo, companheirismo, esforço, paciência, dedicação...

À Deus, por ser a minha fonte de inspiração e fé, por se fazer sempre tão presente, dando-me força, coragem e humildade para enfrentar todos os momentos dessa caminhada e chegar até aqui.

Aos Meus pais, Maria Sobral da Silva Souza e João Ribeiro de Souza, por terem me dado à vida, pelos seus ensinamentos, conselhos e amor; por todos os sacrifícios e horas dedicadas a mim, apostando na minha capacidade, sempre presentes com palavras reconfortantes, e entendendo os momentos em que estive ausente.

À minha filha amada, Maria Sophia Sobral Matias (meu denguinho), por existir na minha vida, e ser a principal fonte de força para transpor barreiras e vencer todos os obstáculos que surgiram durante essa trajetória da vida. Por ser minha fonte inspiradora e me fazer seguir adiante quando pensei em desistir. Agradeço todos os dias por sua existência.

Ao meu irmão, Francisco Hugo Sobral de Souza, por ser além de irmão, um grande amigo, onde nos momentos que mais precisei esteve sempre ao meu lado, me incentivando e mostrando que eu iria mais além.

A toda minha família, por sempre estarem participando das minhas conquistas, mesmo distantes.

Ao meu companheiro e amigo, Edinaldo Fagner, por “abrir meus olhos” e me colocar no mundo científico; pelo apoio e paciência durante toda essa jornada. Também a sua família, pelo apoio e amizade em minha vida. Obrigado por tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, que apostou e acreditou no meu potencial desde o início, pelos ensinamentos do dia-a-dia e pelo que sou

hoje. Tornou-se muito mais que meu orientador, um amigo que levarei para sempre. Jamais encontrarei palavras para agradecê-lo.

Ao Prof. Dr. José Galberto Martins Costa, pelo espaço cedido no LPPN para realização dos ensaios. **A Profa. Dra. Maria Imelda Peixoto**, pelo espaço cedido em seu laboratório para execução dos testes. **Ao amigo Erlanio**, pelas dúvidas tiradas e pelo auxílio na execução dos testes. **Ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes**, pelo auxílio nos ensaios e pelas sugestões, sou muito grata!

Aos Amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Nadghia, Liscassia, Rosimeire, Karyzia, Dara, Flaviana, Jacqueline, Katiúcia, Audilene, Gláucia, Saulo, Fernando, Luciene, Cunha, Ivanildo, Joara, João Victor, os meus sinceros agradecimentos a todos vocês, pela colaboração na minha pesquisa científica, fazendo do trabalho diário um ambiente saudável.

As amigas-comadres Vanessa Bitu e Nathália Matos, minhas amigas de fé, anjos colocados por Deus em minha vida. Obrigada por sempre me ouvirem e aconselhar-me nos momentos difíceis vividos ao longo dessa jornada.

As minhas amigas, Nadghia Leite, Rosimeire Sabino e Liscássia Beatriz, que foram meu braço direito nos momentos em que precisei estar ausente. Obrigada por serem mais que colegas, verdadeiras irmãs.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação, por terem transmitido com muita competência seus conhecimentos, sempre prontos a ajudar.

Aos Colegas da Pós-Graduação, pelo apoio, força e amizade, e por todos os momentos que passamos juntos.

Ao Programa de Mestrado em Bioprospecção Molecular, na pessoa do coordenador Dr. Allysson Pontes Pinheiro e vice-coordenador Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, e as secretárias Maria Anderciele Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, que sempre estiveram dispostos a nos ajudar no que fosse preciso.

Aos funcionários, Fernando, Marcos, Silvana e Seu Luís, por estarem sempre disponíveis e pela amizade.

A Universidade Regional do Cariri – URCA, pelo espaço cedido e por ser o local de conclusão de minha graduação em Ciências Biológicas e do mestrado em Bioprospecção Molecular.

A Funcap, Capes e CNPq por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente fazem parte da minha história e contribuíram de alguma forma.

Esperai com paciência no SENHOR, e ele se inclinou para mim, e ouviu o meu clamor.”

(Salmos 40:1)

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ANEXOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Metais pesados	16
3.1.1 Mercúrio	16
3.2 Resistência aos metais pesados	17
3.3 Toxicidade	18
3.3.1 Efeito quelante	19
3.3.2 Atividade antioxidante	18
3.3.3 Compostos fenólicos	20
3.4 Família Myrtaceae e o gênero <i>Eugenia</i>	21
3.4.1 Espécies estudadas	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Área de estudo	26
4.2 Material vegetal	26
4.2.1 Preparação dos extratos etanólicos	27
4.3 Microrganismos	27
4.4 Meios de cultura	28

4.5 Inoculação de bactéria	28
4.6 Concentração Inibitória Mínima(CIM)	28
4.7 Avaliação do potencial citoprotetor em bactéria contra cloreto de mercúrio	29
4.8 TBARs	29
4.9 Fenóis e flavonóides totais	30
4.10 Efeito quelante	30
4.11 Teste de citoproteção em sementes de alface (Germinação)	31
4.12 Análise estatística	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Efeito citoprotetor contra cloreto de mercúrio e atividade bioinseticida de <i>Eugenia jambolana</i> Lam.	36
5.2 Avaliação da a atividade antioxidante e efeito citoprotetor de extratos de <i>Eugenia jambolana</i> L. e <i>Psidium myrsinites</i> DC.A.	49
5.3 Verificação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de <i>Eugenia uniflora</i> L. e <i>Psidium socrateanum</i>	62
5.3 Efeito citoprotetor de <i>Eugenia uniflora</i> L. contra os resíduos de contaminantes de cloreto de mercúrio	75
6 CONCLUSÕES	89
7 REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	
APÊNDICES	

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% – por cento; percentual

± – mais ou menos

µg/mL – microgramas de soluto por mililitro de solvente

µL – microlitro(s)

Ag⁺ – cátion de prata

AlCl₃– cloreto de alumínio

AsO₂⁻– íon arsenato

AsO₄³⁻–íon arseniato

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Breat Heart Infusion

CBM– concentração bactericida mínima

Cd– cádmio

Cd²⁺– cátion de cádmio

CH₄ – metano

CIM – Concentração Inibitória Mínima

cm – centímetro

cm³ – centímetros cúbico

Co²⁺– cátion cobalto (II)

Cr– cromo

CrO₄²⁻ – ânion cromato

Cu– cobre

Cu²⁺– cátion cobre (II)

DIC– delineamento experimental inteiramente casualizado

DNA– Deoxyribonucleic acid

DPPH– difenil-picrilhidrazil

EC – *Escherichia coli*

EDTA– ácido etilenodiamino tetra-acético

EO– estresse oxidativo

ERN– espécies reativas de nitrogênio

EROS– espécies reativas de oxigênio

et al – e outros; e colaboradores (latim)

Fe– ferro

FeSO₄– sulfato de ferro

g – grama(s)

GSH– glutationa

h – hora(s)

Hg– mercúrio

Hg⁰– mercúrio metálico ou elementar, no estado de oxidação zero

Hg²⁺– cátion de mercúrio

HgCl₂– cloreto de mercúrio

HgO– óxido de mercúrio

HIA – Heart Infusion Agar

IVG– índice de velocidade de germinação

km²– quilômetro quadrado

m– metro

MDA– malonaldialdeído

merA– enzimas mercúrio redutase

merB– enzimas organo mercúrio liase

MerP– proteína mercúrio periplasmática

MerT– proteína de membrana interna

MIC – Minima Innibicion

mL – mililitro

mL – mililitro(s)

mm – milímetro(s)

mM– milimolar

Mn– manganês

Ni²⁺– cátion níquel (II)

nm – nanômetro(s)

°C – graus Celsius

Pb– chumbo

RL– radicais livres

RS•– radicais derivados de tióis

RSH– é um grupo thiol de baixo peso molecular

Sb³⁺– cátion antimônio (III)

SRB– bactérias sulfato redutoras

TBA– ácido tiobarbitúrico

TBARS– Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TeO_3^{2-} — oxiânion telúrite

Tl^+ – cátion tálio

UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro

URCA – Universidade Regional do Cariri

v/v– volume/volume

var. – variação

Zn– zinco

Zn^{2+} – cátion zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente.....	08
Figura 2 - Modelo de resistência do operon <i>mer</i>	10
Figura 3 – <i>Eugenia uniflora</i> L.	16
Figura 4 - <i>Eugenia jambolana</i> Lam.....	20
Figura 5 - Mapa ilustrativo da região onde o material vegetal foi coletado.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Famílias botânicas, espécies e exsiccatas das plantas utilizadas neste estudo.....	27
Tabela 2 – Folhas frescas e rendimento dos extratos etanólicos brutos(g).	28

LISTA DE ANEXOS

Efeito citoprotetor contra cloreto de mercúrio e atividade bioinseticida de *Eugenia jambolana* Lam. Comprovante de publicação_____ **II**

Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Psidium socrateanum* contra metais pesados. Comprovante de submissão_____ **III**

Avaliação da atividade antioxidante e efeito citoprotetor de extratos de *Eugenia jambolana* L. e *Psidium myrsinites* DC.A Comprovante de submissão_____ **IV**

Avaliação bioinseticida do óleo essencial e efeito citoprotetor do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. Comprovante de submissão_____ **V**

RESUMO

Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais e apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças, esta atividade pode estar ligada diretamente aos compostos fenólicos, que desempenham um papel na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo na propagação do processo oxidativo. A família Myrtaceae compreende várias espécies, dentre elas estão a *Eugenia jambolana* Lam., é de grande interesse pelas aplicações medicinais, anti-inflamatória, antiulcerogênica, cardioprotetoras, antidiarréica, antimicrobianas, antioxidantes e atividades hepatoprotetora e antidiabéticas. A espécie *Eugenia uniflora* L., apresenta atividade antimicrobiana, antidiarréica, antifebril, hipotensora, diurética, antirreumática, estomáquica, hipoglicemiante e antioxidante. Os extratos etanólicos das folhas das espécies vegetais foram analisados para quantificar fenóis e flavonoides, verificar os potenciais antioxidantes, *in vitro*, por DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), avaliar o efeito quelante e determinar o efeito citoprotetor do extrato contra o mercúrio, utilizando linhagens bacterianas e sementes de *Lactuca sativa* (alface). Os extratos etanólicos de *E. jambolana* Lam. e *E. uniflora* L. apresentaram fenóis e flavonoides, demonstraram atividade antioxidante através dos ensaios de DPPH e TBARS e ação quelantes. Os extratos de *E. jambolana* Lam. e *E. uniflora* L. apresentaram efeito citoprotetor em modelo bacteriano. O extrato de *E. jambolana* Lam., em modelo vegetal apresentou efeito alelopático. Os extratos de *E. jambolana* Lam. e *E. uniflora* L, quando combinados com o cloreto de mercúrio proporcionaram um maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa*. Com os resultados obtidos, *E. jambolana* Lam. e *E. uniflora* L. demonstraram ser uma promissora fonte de pesquisa na área de produtos naturais com ação antioxidante e citoprotetora.

Palavras-Chaves: atividade antioxidante, efeito quelante, citoproteção, peroxidação lipídica, compostos fenólicos, *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia uniflora* L.

ABSTRACT

Recent studies show that the use of plants in the form of juices or teas as sources of natural antioxidants present a low hazard can be used in aiding the treatment of various diseases, this activity can be linked directly to the phenolic compounds that play a role in neutralizing or scavenging free radicals and transition metal chelate, acting on the propagation of the oxidative process. The family Myrtaceae comprises several species, among them are *Eugenia jambolana* Lam., is of great interest for medical applications, anti - inflammatory, antiulcer, cardioprotective, antidiarrheal, antimicrobial, antioxidant and hepatoprotective, and antidiabetic activities. The species *Eugenia uniflora* L., have antimicrobial activity, antidiarrhoeal, antipyretic, hypotensive, diuretic, antirreumática, stomachic, antioxidant and hypoglycemic. The ethanolic extract from the leaves of plants were analyzed to quantify phenols and flavonoids, antioxidants verify potential in vitro by DPPH (diphenyl picrylhydrazyl) and TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), to evaluate and determine the chelating effect of the cytoprotective effect extract against mercury, using bacterial strains and seeds of *Lactuca sativa* (lettuce). Ethanol extracts of *Eugenia jambolana* Lam and *Eugenia uniflora* L. presented phenols and flavonoids, showed antioxidant activity through DPPH and TBARS assays and chelating action. The extracts of *E. jambolana* Lam and *E. uniflora* L. showed cytoprotective effect on bacterial model. The extract of *E. jambolana* Lam in plant model showed allelopathic effect. The extracts of *E. jambolana* Lam and *E. uniflora* L, when combined with mercuric chloride provided the greatest growth in the rootlets and caulículos *Lactuta sativa*. With the results obtained, *E. jambolana* Lam and *E. uniflora* L. shown to be a promising source of research in the area of natural products with antioxidant and cytoprotective action.

Key Words: antioxidant, chelating effect, cytoprotection, lipid peroxidation, phenolic compounds, *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia uniflora* L

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo que pode ser descrito tanto por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como por uma diminuição nas defesas celulares antioxidantes, tem sido implicado na toxicidade de metais (FRANCO et al., 2007). Uma elevada produção de EROS pode resultar em dano oxidativo para lipídeos, proteínas e DNA, causando morte neuronal. O estresse oxidativo tem demonstrado possuir um papel importante nos mecanismos implicados à toxicidade do mercúrio (Hg), neste caso, podendo ser induzido por uma depleção de compostos tióis (principalmente GSH), por inibição de enzimas antioxidantes, ou ambos, causando danos celulares a biomoléculas e peroxidação lipídica (LEONARD et al., 2004; FRANCO et al., 2007).

O mecanismo de defesa antioxidante do organismo humano consiste em antioxidantes endógenos e exógenos, e exercem a função de proteção das membranas celulares, lipoproteínas e DNA contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres e EROS (RUFINO, 2008). Dentre as classes com propriedades antioxidantes estão os compostos fenólicos, onde a atividade antioxidante desses compostos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; SHETTY et al., 2005).

Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças (SILVA et al., 2005).

A família Myrtaceae apresenta ampla distribuição, ocorrendo, preferencialmente, nas zonas tropicais e subtropicais, e é considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira em função da larga ocorrência de espécies comestíveis e/ou usadas na medicina tradicional. A espécie *Eugenia jambolana* Lam., é conhecida no Brasil como oliveira, é de grande interesse pelas aplicações medicinais, especialmente de suas folhas e frutos, no tratamento da diabetes (PEPATO et al., 2004). A espécie *Eugenia uniflora* L., conhecida no Brasil como pitanga é uma planta arbórea presente em todo o país. Além da sua atividade antimicrobiana, é muito pesquisada pelo seu potencial antioxidante (VELAZQUEZ et al., 2003).

Esse trabalho de mestrado trata-se do primeiro estudo a descrever a atividade antioxidante, quelante e citoprotetora para as espécies de *E. uniflora* L. e *E. jabolana* Lam., através de diversas técnicas. Nesse estudo investigamos as propriedades antioxidantes dos extratos no controle a peroxidação lipídica na ausência e presença de Fe^{2+} , bem como as atividades citoprotetoras em modelo bacteriano e vegetal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antioxidante e citoprotetor dos extratos etanólicos de *Eugenia uniflora* L. e *Eugenia jambolana* Lam.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos;
- Verificar os potenciais antioxidantes, *in vitro*, dos extratos por sequestro de radicais livres DPPH (2,2- difenil-1- picrilhidrazil) e TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*);
- Avaliar o efeito quelante dos extratos de *E.uniflora* L. e *E. jambolana* Lam.;
- Determinar o efeito citoprotetor do extrato contra o mercúrio, utilizando a linhagem *Escherichia coli* 11105 e sementes de *Lactuca sativa* (alface).

FUNDAMENTAÇÃO

TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Metais pesados

Os metais são geralmente tóxicos aos organismos vivos, sendo, portanto, considerados poluentes. Alguns metais pesados tóxicos possuem efeito nocivo, ocasionando sérios riscos à saúde humana quando ingeridos em doses inadequadas. Assim, a contaminação por metais pesados tóxicos está associada diretamente à sua biodisponibilidade, podendo ser potencializada por fontes alimentadoras da poluição (GUEDES et al., 2005).

Alguns desses elementos são essenciais para várias funções fisiológicas nos seres vivos, como Ferro, Cobre, Zinco e Manganês, enquanto outros, como Cádmio, Chumbo e Mercúrio, não têm funções biológicas conhecidas. Quando em excesso no solo, esses elementos podem inibir o crescimento das plantas e causar alterações nas comunidades vegetais (BAKER et al., 1994).

3.1.1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal líquido pesado, inodoro e de fácil volatilização. Na atmosfera, o mercúrio pode se apresentar em diferentes formas, onde nem todas são identificadas, pois seu ciclo global é complexo (Figura 1). Pode ser encontrado em três formas: mercúrio metálico, sais inorgânicos de mercúrio e mercúrio orgânico, que se diferem pelos aspectos toxicológicos de absorção, transporte e excreção (do metal) e pelo quadro clínico do paciente (LIMA et al., 2009; WHO, 1990).

O mercúrio é um dos elementos com maior frequência na lista de metais pesados (CETESB, 2001). A toxicidade do mercúrio depende da espécie química, no entanto todas elas provocam mudanças no sistema nervoso dos seres humanos (VERBEL & RESTREPO, 2002).

Os sais inorgânicos de mercúrio são muito corrosivos para o trato gastrointestinal, olhos, pele e mucosa. Como consequência ao seu contato ocorre hematêmese, colite, hematoquesia, ardor, salivação excessiva, diarreia sanguinolenta, necrose da mucosa intestinal, desidratação e colapso cardiovascular (WHO, 1990).

O mercúrio elementar presente na atmosfera pode ser oxidado e originar compostos como óxido de mercúrio (HgO) e o cloreto de mercúrio (HgCl₂). São substâncias menos

volúveis e mais solúveis que o mercúrio metálico (MURTHE et al., 1991). Os sais de cloreto de mercúrio $HgCl_2$ é um sublimado corrosivo muito tóxico (HSDB, 2000).

A propriedade química mais significativa que explica grande parte dos danos biológicos causados pelo mercúrio é a elevada afinidade que esse metal possui pelo grupo sulfidríla das proteínas, causando inativação enzimática e desestruturação proteica (GIOVANELLA;BENTO,2011).

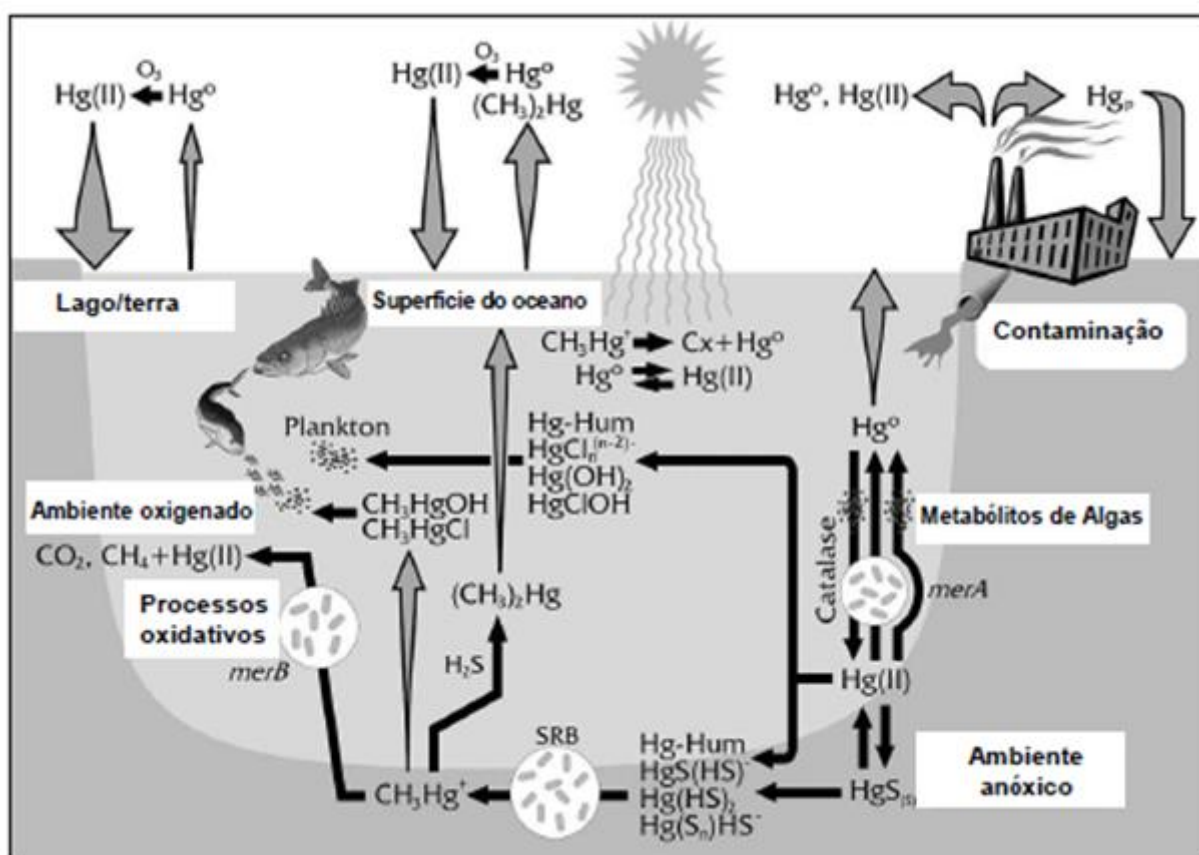


Figura 1- O ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente. Setas sólidas representam transformação ou absorção de mercúrio. Setas ocas indicam fluxo de mercúrio entre diferentes compartimentos no ambiente. A largura das setas indica a importância relativa do fluxo na natureza. A especiação de Hg (II) em águas anóxicas ou em presença de oxigênio é controlada por cloro, hidróxidos e enxofre. Transformações mediadas por microorganismos são representadas por círculos que representam bactérias. SRB para bactérias sulfato redutoras, merB e merA referem-se a atividade dos genes que codificam as enzimas organo mercúrio liase e mercúrio redutase respectivamente. Um grupo de pontos indica o envolvimento de algas unicelulares. (Adaptado de BARKAY et al., 2003).

3.2 Resistência aos metais pesados

Ao contrário dos antibióticos, os metais têm mais dificuldade de sofrer uma degradação natural, aumentando a importância do seu papel como agentes de seleção a longo prazo (STEPANAUSKAS et al., 2005).

Em várias espécies de bactérias, tais como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, entre outros, já foram descritos genes de resistência a metais pesados, tais como Ag^+ , AsO_2^- , AsO_4^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Sb^{3+} , TeO_3^{2-} , Tl^+ e Zn^{2+} (SILVER, 1996).

Os microrganismos apresentam-se como redutores do Hg, além da contribuição dos processos abióticos nas transformações do mercúrio inorgânico. A enzima mercúrio redutase num processo de detoxificação transforma Hg (II) em Hg^0 , a forma menos tóxica de mercúrio. Alguns dos gêneros de bactérias resistentes responsáveis pela demetilação do mercúrio são *Pseudomonas*, *Escherichia* e *Staphylococcus* (VERBEL & RESTREPO, 2002).

Nos microrganismos, a resistência à maioria dos metais normalmente ocorre por efluxo, a fim de remover metais do citoplasma e sequestro extracelular do contaminante. Com o mercúrio, os microrganismos utilizam o sistema *mer*. O operon *mer* é um sistema genético regulado, constituído por quatro a cinco genes estruturais, que codificam proteínas de transporte de mercúrio, transformação e regulação dos genes (SILVER, 2007).

Além dos microrganismos, a vegetação (árvores, arbustos, plantas rasteiras e aquáticas) e sua microbiota, são utilizadas com o fim de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas ao ambiente (PLETSH et al 1999). Nesse sentido, os microrganismos e as plantas, em separado parecem ser relevantes de alguma maneira para o ciclo do mercúrio pelo aprisionamento ou transformação do mercúrio (ALMEIDA 2011). Os metais pesados acabam desencadeando sintomas nas plantas através da toxicidade, o níquel é um deles, acarreta clorose e necrose foliar, inibição do crescimento da parte aérea, redução da área foliar e radicular (SHAW et al; 2004), redução das taxas de fotossíntese e respiração (SCHICKLER & CASPI, 1999), baixa germinação de sementes (RAO & SRESTY, 2000). Nesse contexto, a germinação é um processo fisiológico pelo qual se inicia com a entrada de água na semente, promovendo o alongamento do eixo embrionário, (BORGHETTI & FERREIRA, 2004), mas, quando em contato com agentes tóxicos esse processo sofre alterações ocorrendo um baixo índice germinativo. Sendo necessárias condições controladas, padronizadas e favoráveis para que se obtenha a maior porcentagem de germinação no menor tempo possível (GUEDES et al., 2013).

3.3 Toxicidade

Agentes tóxicos são substâncias químicas capazes de causar danos a quaisquer sistemas biológicos, seja alterando seu funcionamento ou até mesmo causando a morte em certos tipos de exposição (OGA et al., 2008).

A toxicidade dos metais está relacionada à dose ou ao tempo de exposição, da forma física e química do elemento e da via de administração/absorção (TAVARES & CARVALHO, 1992). Nesse sentido, os metais pesados afetam o crescimento, a distribuição e o ciclo biológico das espécies (SOUZA et al., 2011).

Quando os organismos são expostos a contaminantes, a produção de EROS pode aumentar e prevalecer sobre sua degradação, levando a situação de estresse oxidativo (LUSCHAK, BAGNYUKOVA, 2006). No entanto, em condições fisiológicas normais, as EROS podem exercer importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando de processo fagócito de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo apoptose (HALLIWELL, 1994; BIESALSKI, 2002).

Em sistemas biológicos, é essencial o equilíbrio entre agente óxido redutor (como as EROS) e o sistema de defesa antioxidante. As proteções conhecidas do organismo contra as EROS abrangem a proteção enzimática ou por micromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta (BARREIROS e DAVID, 2006).

3.3.1 Efeito Quelante

Os agentes quelantes/seqüestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (BAILEY et al., 1996; LABUZA et al., 1971).

Segundo Harris (2001), o efeito quelante é a habilidade de ligantes multidentados de formar complexos metálicos mais estáveis que os formados por ligantes monodentados similares. Este efeito pode estar relacionado com as diferenças na entropia de reação entre complexos quelatos e não-quelatos em soluções. Esta reação resulta em um aumento do número de moléculas independentes nestas soluções (SHRIVER et al., 2008).

3.3.2 Atividade antioxidante

O estresse redox é comumente definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, os radicais derivados de tióis (RS•), as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas (VASCONCELOS et al., 2007).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato, diminuindo a velocidade de reação ou prolongando a sua estabilidade oxidativa (MOURE et al., 2001). Segundo Sousa (2007) os antioxidantes são compostos que estabilizam ou desativam radicais livres antes que estes ataquem alvos biológicos nas células. Eles inibem a oxidação de vários substratos de duas formas, pela inibição da formação dos radicais livres (impossibilitando a etapa de iniciação) ou pela eliminação dos radicais livres (interrompendo a reação de oxidação em cadeia), podendo ser endógenos ou exógenos (SOARES, 2002).

Inúmeros compostos naturais encontrados em frutas, cereais e vegetais apresentam atividade antioxidante. Entre os mais importantes antioxidantes naturais estão os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos), compostos nitrogenados (alcalóides, aminoácidos, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), carotenóides, tocoferóis e ácido ascórbico (AMAROWICZ et al., 2004).

Os antioxidantes fenólicos naturais apresentam-se como uma alternativa para minimizar ou retardar a deterioração oxidativa em alimentos, além de elevar o valor funcional do alimento. São encontrados principalmente em frutas, vegetais, chás, vinhos e em várias ervas. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos nas plantas é devida principalmente às suas propriedades redoxes e à estrutura química, que desempenha um papel importante na neutralização de radicais livres, na ação quelante de metais e na absorção de oxigênio singlete e triplete (SHETTY et al., 2005).

3.3.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK et al., 2004).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; SHETTY et al., 2005).

Além de desempenharem importante papel para a adaptação da planta, muitos dos compostos fenólicos também apresentam variadas atividades farmacológicas como, antitumoral, antimicrobiana e antioxidante, podendo inclusive ser considerados como potenciais marcadores quimiotaxonômicos (WARD et al., 1981; HARBONE, 2000; ZUANAZZI, 2007).

3.4 Família Myrtaceae e gênero *Eugenia*

A família Myrtaceae abriga cerca de 3.800 espécies organizadas em cerca de 130 gêneros, que ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América (LUCAS et al., 2005; WILSON et al., 2001). No Brasil esta representada por 26 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies (SOBRAL et al., 2010). A família Myrtaceae é a oitava maior família de plantas com flores e é reconhecidamente aromática (THORNE, 1992). No Brasil, estima-se que existam cerca de 30% dos representantes da família e as espécies de ocorrência natural pertencem à subfamília Myrtoideae, que é caracterizada por seus frutos carnosos do tipo baga ou drupa e folhas opostas (JOHNSON et al., 1984; KUBITZKI, 2011).

No Brasil, estima-se que existam cerca de 350 espécies distribuídas por todo o país e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais (SOBRAL et al. 2010; LORENZI E MATOS, 2002).

Segundo Auricchio e Bacchi (2003) as plantas do gênero *Eugenia* consistem em árvores ou arbustos verdes durante o ano todo. O fruto é esférico, geralmente comestível, uma baga de até 3 cm de diâmetro, coroado pelo cálice e achatado nas extremidades. Além disso, as plantas do gênero *Eugenia* têm ampla utilização na medicina popular, sendo utilizadas

como recurso terapêutico para o tratamento de diversas enfermidades, por ser um gênero bastante rico em compostos fenólicos, como taninos e flavonóides. Devido ao alto teor de compostos fenólicos, as espécies do gênero *Eugenia* apresentam atividade antioxidante, relacionada a estes compostos (EINBOND et al., 2004). Além de compostos fenólicos, foram descritos para o gênero *Eugenia* compostos derivados do metabolismo dos terpenos, como os triterpenos e esteróides (LUNARDI et al., 2001).

3.4.1 Espécies Estudadas

A *E. uniflora* L., (Figura 2), a pitangueira, tem grande potencial para a produção de fármacos (PEPATO et al., 2001), os frutos contêm óleos com propriedades bacteriostáticas, principalmente contra *Enterococcus faecalis*, bactéria associada à redução do tempo de prateleira de produtos alimentícios (STIEVEN et al., 2009).

E. uniflora L. foi introduzida na medicina empírica pelos índios Guaranis no século XV (ALONSO, 1998) e é utilizada como fármaco anti-hipertensivo, diurético (CONSOLINI e SARUBBIO, 2002), adstringente (BANDONI et al., 1972), antipirético e para o tratamento de distúrbios digestivos (ALICE et al., 1991). Estudos farmacológicos já comprovaram atividades como anti-hipertensiva, citotóxica e antibacteriana mediada pela fototoxicidade para extratos das folhas desta espécie (COUTINHO et al., 2010; CONSOLINI et al., 1999; OGUNWANDE et al., 2005).

De acordo com Einbondet (2004), da espécie *E. uniflora* L. foram isoladas cianidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo e delphinidina-3-*O*- β -glucopiranosídeo, ambas antocianinas, uma subclasse de flavonóides, que apresentaram ação antioxidante. Alguns estudos desenvolvidos utilizando principalmente extratos polares, como aquoso, metanólico e acetato de etila das folhas, demonstraram atividade antioxidante no extrato metanólico das folhas, através da captação do ânion superóxido (VELÁZQUEZ et al., 2003) e captação do radical livre DPPH, atividade atribuída às antocianinas isoladas desta espécie (EINBOND et al., 2004). Através de um *screening* realizado com a infusão de folhas frescas, a espécie demonstrou atividade antiinflamatória em ratos e aumento do tempo de sono induzido por barbitúricos, além de baixa toxicidade aguda (SCHAPOVAL et al., 1994).



Figura 2- Foto de *Eugenia uniflora* L.

Fonte: autora

A espécie *E. jambolana* Lam., (figura 3) comumente conhecida como oliveira, cresce naturalmente em zonas tropicais, bem como subtropical. A população rural do nosso país utiliza a semente, fruto, folha, casca desta planta na medicina popular para combater os diferentes tipos de doenças e distúrbios desde a antiguidade. Estudos científicos demonstraram que os extratos de diferentes partes de *E. jambolana* Lam. possuía uma gama de propriedades farmacológicas, tais como, anti -inflamatória, antiulcerogênico , cardioprotetoras , antidiarréico , antimicrobianos, antioxidantes e atividades hepatoprotetora e antidiabéticas (BALIGA et al.,2011 ; SHAIKH et al ., 1994; BHUIYAN et al., 1996; SHAFI et al., 2002; VENKATESALU & CHANDRASEKARAN , 2004 ; CHATTOPADHYAY et al., 1998; KHARE , 2004 ; MUKHERJEE et al. , 1998).

Os extratos etanólicos e aquosos, de *E. jambolana* Lam., principalmente dos frutos e sementes mostraram ação hipoglicemiante e estimulante da liberação de insulina em coelhos diabéticos (SHARMA et al., 2006; RAVI, RAMACHANDRAN e SUBRAMANIAN, 2004 a,b; SHARMA et al., 2003) além de prevenir a hiperglicemia e hiperinsulinemia em ratos resistentes à insulina (VIKRANT et al., 2001). Outras atividades foram demonstradas para os

extratos metanólico e diclorometano das folhas de *E. jambolana* Lam., como protetora do DNA exposto à radiação gama (JAGETIA e BALIGA, 2002). O extrato etanólico das cascas do caule mostrou ação antidiarréica, através da diminuição dos níveis de prostaglandina E2 e diminuição da motilidade no trato gastrintestinal de ratos (MUKHERJE et al., 1998). O ácido oleanólico isolado das flores mostrou ainda diminuição da espermatogênese em ratos machos (RAJASEKARAN et al., 1988).



Figura 3- Foto de *Eugenia jambolana* Lam.

Fonte: autora

MATERIAIS

E

MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi efetuado na Chapada do Araripe, município do Crato, região do Cariri, sul do Ceará (Fig. 5). A região de estudo possui clima quente semi-árido, com temperaturas médias de 26° a 28°C, período chuvoso que se estende entre os meses janeiro a abril e pluviosidade anual média de 896,5 mm. A vegetação nos pontos de coleta compreende mata úmida de altitude com pontos de intensa interferência humana pelo setor imobiliário, pecuária e agroindústria (IPECE, 2009).



Figura 5 – Localização do município do Crato no Estado do Ceará, nordeste do Brasil. (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/26/Ceara_Municip_Crato.svg/280px-Ceara_Municip_Crato.svg.png)

4.2 Material Vegetal

Os materiais botânicos de *Eugenia jambolana* Lam. e *Eugenia uniflora* L. foram coletados no Horto Botânico de Plantas Medicinais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, da Universidade Regional do Cariri – URCA. Coordenadas: 07° 14' 18,2" de latitude S. e 39° 24' 53" W. de Greenwich. Os materiais vegetais foram identificados e para cada espécie foi depositada uma exsicata no herbário Dárdano Andrade Lima da

Universidade Regional do Cariri- URCA com os respectivos números de identificação nos Herbários listados na Tabela 1.

Família	Espécie	Exsicata	Herbário
Myrtaceae	<i>Eugenia jambolana</i> Lam.	#3107	Dárdano Andrade Lima-URCA
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	#3106	Dárdano Andrade Lima-URCA

Tabela 1. Famílias botânicas, espécies e número do título das plantas utilizadas neste estudo.

4.2.1 Preparação dos extratos etanólicos

Para preparação e obtenção dos extratos foram coletadas folhas que ainda frescas foram cortadas com tesoura manual, tendo assim aumentada a superfície de contato, em seguida foram acondicionadas em recipientes individualizados contendo o etanol como solvente, suficiente para submergir todo material vegetal por 72h, sendo após esse período, filtrado em papel filtro e concentrado em condensador rotativo a vácuo (model Q-344B – Quimis, Brazil) e banho-maria (model Q-214M2 – Quimis, Brazil) (BRASILEIRO et al, 2006), obtendo-se massa de extrato bruto indicado na tabela 2, sendo o procedimento realizado para cada espécie vegetal.

Espécie Biológica	Solvente	Folhas	Extrato Bruto
		Massa(g)	Rendimento(g)
<i>Eugenia jambolana</i> Lam.	Etanol (EEFEJ)*	650	6,97
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Etanol (EEFEU)**	600	6,31

Tabela 2- Folhas frescas e rendimento dos extratos etanólicos brutos(g).

*EEFEJ- Extrato etanólico das folhas de *Eugenia jambolana* Lam; **EEFEU- Extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* L.

4.3 Microrganismos

A bactéria utilizada foi *Escherichia coli* 11105, cedida pela Profa. Edeltrudes de Oliveira Lima, do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

4.4 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante e Meio mínimo M9 TRIS (SAMBROOK et al., 1989, modificado) Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

4.5 Inoculação de bactéria

A bactéria foi inoculada em Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) e incubada a 35 °C, aproximadamente, durante 24 horas.

4.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Para solubilizar o extrato foi utilizado o DMSO até obtenção de sua concentração a 5%, valor que não interfere nos ensaios. O inóculo foi depositado em solução salina para formar uma suspensão de 10^5 UFC/mL as concentrações dos extratos variando de 1024-8 µg/mL. Uma solução contendo 900 µL Meio TRIS M9 e 100 µL do inóculo foi colocada em cada um dos eppendorfs. Em seguida foi distribuído 100 µL desta solução em cada cavidade da placa de microdiluição e logo após adicionou-se 100 µL de extrato na primeira cavidade, sendo passado para as demais, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade. A última cavidade foi reservada para controle (meio+ inóculo). A placa foi colocada na estufa numa temperatura de aproximadamente 35°C, por um período de 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996).

As placas contendo bactérias foram reveladas com corante específico, a resazurina, um indicador calorimétrico de óxido-redução (SALVAT, ANTONNACCI e FORTUNATO, 2001). Foi preparada uma solução de resazurina sódica e água destilada. Adicionou-se 20µL da solução em cada cavidade e as placas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Para revelação da CIM considerada como inibição do crescimento para os poços que permaneceram com a coloração azul e não-inibição os que obtiveram coloração vermelha.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano, nas cavidades da placa de microdiluição conforme detectado macroscopicamente (NCCLS, 2003).

4.7 Avaliação do potencial citoprotetor em bactérias contra cloreto de mercúrio

Para a avaliação do efeito protetor dos extratos ao metal pesado, foram preparados eppendorfs contendo concentrações sub-inibitórias dos extratos e suspensões de 10^5 UFC / ml de *Escherichia coli* ATTC 11105 em meio M9 Tris com 2% de glicose. A solução foi distribuída nas cavidades da placa de 96 poços. Logo em seguida foi adicionado 100µL de cloreto de mercúrio na primeira cavidade seguindo com sucessivas microdiluições até a penúltima cavidade. A concentração do metal variou de 10 mM a 0,004883 mM. As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 37 ° C, em estufa.

Em seguida, a concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. Foi utilizado placas de petri com HIA para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição.

Uma alçada de cada poço da placa de microdiluição foi subcultivada em placas de Agar Heart Infusion – HIA. Após 24 horas de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, realizou-se leitura, com a finalidade de observação do crescimento das colônias. As leituras das CBMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CBM, a menor concentração do extrato que possibilitou crescimento visível do subcultivo (SHADOMY, ESPINELINGROFF e CARTWRIGHT, 1985).

4.8 TBARS

A produção de TBARS de fosfolípido foi determinada utilizando um método modificado de Sabir e Rocha (2008). Foi preparada uma solução de gema de ovo, misturada com uma solução de hexano-isopropanol (3:2). Essa solução foi filtrada e rotaevaporada até a obtenção de resíduo sólido. Para ensaio TBARS solubilizou-se 0,05g do resíduo em 10 mL de água mili-Q. Para pré-incubação foi utilizado 100µl de fosfolipídio, 50µl de extrato nas concentrações de 100, 40, 10 e 4 µg/mL juntamente com um volume adequado de água deionizada. As amostras foram repetidas adicionando 14µl de Fe (60µM) e incubadas a 37°C, durante 1 h. Após a pré incubação foi adicionado 500µL de tampão ácido acético e 500µl de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,6% e incubado por 1h a uma temperatura de 100°C. Os tubos

foram adicionados 2 ml de n-butanol e a mistura centrifugada. O sobrenadante foi retirado e a absorvância foi lida a 532 nm num espectrofotômetro.

Para a curva de MDA (malonaldeído) foi utilizada 500µL de ácido acético, 500µL de TBA (0,6%), MDA nas concentrações de 50, 100, 150, 200µL e volume adequado de água destilada para completar um volume de 1,5mL. Os testes fora feitos em triplicata e repetido duas vezes.

4.9 Fenóis totais e Flavonóides

A quantidade de fenóis totais, foi determinada adicionando-se 200 µL da solução dos extratos (300, 100, 50 e 25 µg/mL em etanol 99,6%) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteau* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 µL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. O teste foi realizado em triplicata. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico / grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300, 100, 75, 25 e 10 µg/mL).

Para quantificação de flavonóides foram preparadas soluções do extrato (300, 200, 100 e 50 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl₃) com concentração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorvância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL) diluída em etanol 99,6%. (WOISKY e SALATINO,1998; SINGLETON et al.,1999)

4.10 Efeito quelante

A metodologia utilizada foi de Benzie e Strain (1996, 1999) com modificações, adaptada para o ensaio. O princípio baseia-se na formação de O-fenantrolina-Fe²⁺ e complexo e a sua ruptura, na presença de agentes quelantes. Adicionou 100 µl de cada extrato, variando de 64 a 2048µg foram adicionados a 50 mL de solução aquosa 2,0 mM de FeSO₄. Os controles continham todos os reagentes de reação, exceto o extrato ou substância de controle positivo. Depois de 10 minutos de incubação, a reação foi iniciada em 200 µl de 6,0 mM O-fenantrolina. Após um período de equilíbrio de 10 min, foi registrada a absorbância a 510 nm. As atividades de quelação de ferro, foram calculados a partir da absorbância do controle (Ac) e da amostra (A) usando uma equação e expressa em equivalentes (Na₂EDTA mg / g extrato). Os valores são apresentados como as médias de análises das triplicatas.

4.11 Teste de citoproteção em sementes de alface (Germinação)

Os experimentos foram conduzidos em placas de petri limpas, secas e estéreis forradas com dois discos de papel filtro, onde foram dispostas as sementes de alface. Em cada placa foi adicionado 3 mL das soluções preparadas (água destilada, cloreto de mercúrio, extrato e extrato associado ao cloreto de mercúrio). A concentração de extrato foi de 256µg/mL, o Cloreto de Mercúrio nas concentrações de 1,25mM, 0,5mM, 0,1mM e 0,05mM e a placa controle foi umedecida com 3mL de água destilada. Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação do tipo BOD a temperatura de aproximadamente 25°C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três repetições de 20 sementes por placa. Os parâmetros analisados ao final dos sete dias foram: contagem do número de sementes germinadas, cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), biometria do caulículo e da radícula, número de necrose radicular e anormalidades das plântulas, seguindo o Manual de regras para análise de sementes (BRASIL, 2009). Foram consideradas germinadas as sementes cujas radículas atingiram 1 mm de comprimento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi avaliado a cada 24 horas, sendo determinado através do somatório da razão entre o número de sementes germinadas no dia i (ni) e o número de dias (i) (FERNANDES et al., 2007, modificado por SOBRAL-SOUZA et al., 2014).

4.12 Análise estatística

Os resultados dos testes foram feitos em triplicata e expressos como média. Para análise estatística foi aplicada a ANOVA seguida do teste de Tukey.

RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como resultado a produção, submissão, aceite e publicação de artigos, onde na tabela abaixo identificamos o nome, situação e ano do artigo produzido.

Artigo	Nome	Situação	Ano
1	Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of <i>Eugenia jambolana</i> Lam.	Publicado	2014
2	Evaluación de antioxidante y el efecto citoprotector de extractos de <i>Eugenia jambolana</i> Lam. y <i>Psidium myrsinites</i> DC. A.	Submetido	2013
3	Verificação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de <i>Eugenia uniflora</i> L. e <i>Psidium sobleianum</i>	Submetido	2014
4	Efeito citoprotetor de <i>Eugenia uniflora</i> L. contra os resíduos de contaminantes de cloreto de mercúrio	Submetido	2014

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caro leitor, os testes de Fenóis totais e Flavonóides, Efeito quelante, Avaliação do potencial citoprotetor contra cloreto de mercúrio e o Teste de citoproteção em sementes de alface, com o extrato da espécie *Eugenia jambolana* Lam., presentes no artigo **Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam.**, refere-se ao meu projeto original de dissertação.

5.1 Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam.

Efeito citoprotetor contra cloreto de mercúrio e atividade bioinseticida de *Eugenia jambolana* Lam.

Celestina E. Sobral-Souza, Nadghia F. Leite, Francisco A.B. Cunha, Antonio I. Pinho, Rosimeire S. Albuquerque, Joara N.P. Carneiro, Irwin R.A. Menezes, José G.M. Costa, Jeferson L. Franco, Henrique D.M. Coutinho

RESUMO

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é um díptero muito utilizado nas pesquisas genéticas e que nas últimas décadas, surgiu como um dos melhores organismos para estudos de doenças humanas e pesquisas toxicológicas. A forma mercúrica, cujo principal representante é o cloreto de mercúrio HgCl_2 , é alvo de inúmeras investigações porque, além de sua toxicidade intrínseca, é atribuída a ela a toxicidade do mercúrio elementar uma vez que, por oxidação é convertido em Hg^{+2} . *Eugenia jambolana* Lam. Myrtaceae, conhecida no Brasil como jambolão, é de grande interesse pelas aplicações medicinais, especialmente de suas folhas e frutos. Este trabalho teve como objetivo foi caracterizar, por CG-MS, os constituintes químicos do óleo essencial de *Eugenia jambolana* Lam. e avaliar a sua ação bioinseticida, em modelo de *Drosophila melanogaster*, bem como verificar o efeito citoprotetor e quelante do extrato de *E. jambolana* Lam. Os resultados obtidos neste experimento apontam para a potencialidade dos óleos essenciais como ferramentas a serem prospectadas biologicamente como bioinseticidas. Pelo fato de serem biodegradáveis, os óleos essenciais podem ser importantes ferramentas no controle biológico de pragas. Os resultados demonstram que o extrato apresenta efeito alelopático sobre as sementes de alface, e sua combinação com o cloreto de mercúrio ofereceu um maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa*, isso mostra que a vegetação pode ser uma alternativa para solucionar o problema com a contaminação por metais pesados, além de apresentar um potencial citoprotetora e uma ação quelante moderada.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinseticida, Geotaxia negativa, Efeito quelante, Citoproteção, *Eugenia jambolana*

Artigo publicado: Janeiro de 2014, Arabian Journal of Chemistry.

**AVALIAÇÃO BIO-INSETICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL E EFEITO CITOPROTETOR
EXTRATO ETANÓLICO DE *Eugenia
jambolana* Lam.**

RESUMO

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é um díptero muito utilizado nas pesquisas genéticas e que nas últimas décadas, surgiu como um dos melhores organismos para estudos de doenças humanas e pesquisas toxicológicas. A forma mercúrica, cujo principal representante é o cloreto de mercúrio $HgCl_2$, é alvo de inúmeras investigações porque, além de sua toxicidade intrínseca, é atribuída a ela a toxicidade do mercúrio elementar uma vez que, por oxidação é convertido em Hg^{+2} . *Eugenia jambolana* Lam. Myrtaceae, conhecida no Brasil como jabolão, é de grande interesse pelas aplicações medicinais, especialmente de suas folhas e frutos. Este trabalho teve como objetivo foi caracterizar, por CG-MS, os constituintes químicos do óleo essencial de *Eugenia jambolana* e avaliar a sua ação bio-inseticida, em modelo de *Drosophila melanogaster*, bem como verificar o efeito citoprotetor e quelante do extrato de *E. jambolana*. Os resultados obtidos neste experimento apontam para a potencialidade dos óleos essenciais como ferramentas a serem prospectadas biologicamente como bioinseticidas. Pelo fato de serem biodegradáveis, os óleos essenciais podem ser importantes ferramentas no controle biológico de pragas. Os resultados demonstram que o extrato apresenta efeito alelopático sobre as sementes de alface, e sua combinação com o cloreto de mercúrio ofereceu um maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa*, isso mostra que a vegetação pode ser uma alternativa para solucionar o problema com a contaminação por metais pesados, além de

apresentar um potencial citoprotetora e uma ação quelante moderada.

PALAVRAS-CHAVE:

Bioinseticida, Geotaxia negativa, Efeito quelante, Citoproteção, *Eugenia jambolana*

1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae apresenta ampla distribuição, ocorrendo, preferencialmente, nas zonas tropicais e subtropicais, e é considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira em função da larga ocorrência de espécies comestíveis e/ou usadas na medicina tradicional. *Eugenia jambolana* Lam., Myrtaceae, conhecida no Brasil como jabolão, é de grande interesse pelas aplicações medicinais, especialmente de suas folhas e frutos, no tratamento da diabetes (Pepato et al., 2005).

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é um díptero muito utilizado nas pesquisas genéticas e que nas últimas décadas, surgiu como um dos melhores organismos para estudos de doenças humanas e pesquisas toxicológicas (Siddique et al., 2005). Outra vantagem é a ausência de mitose celular nas moscas em fase adulta. Desse modo, a mosca na fase adulta tem envelhecimento sincronizado das suas células, exceto as células das gônadas e algumas do intestino (Jimenez-Del-Rio et al., 2009). Isso torna possível a determinação dos danos causados por um xenobiótico ao longo do tempo e a viabilidade celular. Portanto o modelo de atividade bio-inseticida utilizando *Drosófila* pode ser uma alternativa relevante na busca de plantas do bioma Caatinga, com atividade bioinseticida.

De acordo com WHO (1991) o mercúrio é um metal pesado que tem sido considerado como perigoso poluente ambiental. O mercúrio ocorre naturalmente na crosta terrestre (Lee et al., 2009), nas formas orgânica e inorgânica, no estado sólido, dissolvido e na fase gasosa. Em consequência disso, seu ciclo biogeoquímico envolve processos que ocorrem no solo, na água e na atmosfera (Tinôco et al., 2010). A forma mercúrica, cujo principal representante é o cloreto de mercúrio $HgCl_2$, é alvo de inúmeras investigações porque, além de sua toxicidade intrínseca, é atribuída a ela a toxicidade do mercúrio elementar uma vez que, por oxidação é convertido em Hg^{+2} (Patrick et al, 2002). O conhecimento sobre os níveis tóxicos de metais pesados para as plantas ainda é insuficiente. (Kabata-Pendias e Pendias, 1984).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar, por CG-MS, os constituintes químicos do óleo essencial de *Eugenia jambolana* e avaliar a sua ação bio-inseticida, em modelo de *Drosophila melanogaster*, bem como verificar o efeito citoprotetor e quelante do extrato de *E. jambolana*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

O material botânico de *Eugenia jambolana*, foi coletado no Horto Botânico de Plantas Medicinais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, da Universidade Regional do Cariri – URCA. Coordenadas: 07° 14' 18,2" de latitude S. e 39° 24' 53" W. de Greenwich. O material vegetal foi identificado e foi depositada uma exsiccata no herbário Dárdano Andrade Lima-URCA da Universidade Regional do Cariri- URCA, sob o número #3107.

2.1.1. Obtenção de óleo essencial

Folhas de *E. jambolana* foram coletadas as 09:00 horas, \pm 30 minutos, picotadas em pedaços de aproximadamente 1 cm² e acondicionadas em balão de vidro de 5 litros, sendo submetidas a extração com aparelho de Clevenger, conforme metodologia descrita por MATOS (2009), obtendo-se um rendimento de 0,08%.

Os óleos essenciais foram submetidos à Cromatografia gasosa, acoplada a Espectrometria de Massa – CG-MS.

2.1.2 Preparação do extrato etanólico das folhas de *Eugenia jambolana*

Para preparação dos extratos foram coletados 650 g das folhas, que permaneceram submersos em etanol por 72h à temperatura ambiente, sendo após esse período, filtrado e concentrado em condensador rotativo a vácuo (model Q-344B- Quimis, Brazil) e banho maria (model Q214M2- Quimis Brazil), obtendo-se rendimento do extrato bruto de 6,97g.

2.3. Microrganismos

A bactéria utilizada foi *Escherichia coli* 11105, cedida pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

2.2. Cultivo de *Drosophila melanogaster*

Moscas *Drosophila melanogaster* criadas no Drosofilário do Laboratório de Microbiologia e

Biologia Molecular - LMBM, da Universidade Regional do Cariri –URCA. As moscas foram gentilmente cedidas, para início da criação, do Laboratório do Prof. Dr. Jeferson Franco da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, São Gabriel – RS.

2.4. Fenóis totais e Flavonóides

A quantidade de fenóis totais, foi determinada adicionando-se 200 µL da solução dos extratos (300, 100, 50 e 25 µg/mL em etanol 99,6%) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 µL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. O teste foi realizado em triplicata. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico / grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300, 100, 75, 25 e 10 µg/mL).

Para quantificação de flavonóides foram preparadas soluções do extrato (300, 200, 100 e 50 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl₃) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após

30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorvância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL) diluída em etanol 99,6%.

2.5. Efeito quelante

A metodologia utilizada foi de Benzie e Strain (1996, 1999) com modificações, adaptada para o ensaio. O princípio baseia-se na formação de O-fenantrolina-Fe²⁺ e complexo e a sua ruptura, na presença de agentes quelantes. Adicionou 100 µl de cada extrato, variando de 64 a 2048µg foram adicionados a 50 mL de solução aquosa 2,0 mM de FeSO₄. Os controles continham todos os reagentes de reação, exceto o extrato ou substância de controle positivo. Depois de 10 minutos de incubação, a reação foi iniciada em 200 µl de 6,0 mM O-fenantrolina. Após um período de equilíbrio de 10 min, foi registrada a absorvância a 510 nm. As atividades de quelação de ferro, foram calculados a partir da absorvância do controle (Ac) e da amostra (A) usando uma equação e expressa em equivalentes (Na₂EDTA mg / g extrato). Os valores são apresentados como as médias de análises das triplicatas.

2.6. Avaliação do potencial citoprotetor de EEF EJ contra cloreto de mercúrio

De acordo com Coutinho et al (2008), com modificações, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do EEFEJ foi determinada pelo ensaio de microdiluição usando suspensões de 10^5 UFC / ml em solução salina e extratos na concentração inicial de $1024\mu\text{g/mL}$. A CIM foi definida como a concentração mais baixa à qual não foi observado crescimento. Para a avaliação do efeito protetor EEFEJ ao metal pesado, foi realizada uma modulação utilizando concentrações sub-inibitórias dos extratos, suspensões de 10^5 UFC / ml de *Escherichia coli* ATTC 11105 em meio M9 Tris com 2% de glicose e uma de concentração do cloreto de mercúrio variando de 10 mM a $0,004883$ mM. As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 37°C . A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinadas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, utilizando placas de petri com HIA para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição.

2.7. Teste de citoproteção em sementes de alface (Germinação)

Os experimentos foram conduzidos em placas de petri limpas, secas e estéreis forradas com dois discos de papel filtro, onde foram dispostas as sementes de alface. Em cada placa foi adicionado 3 mL da solução. A concentração de extrato foi de $256\mu\text{g/mL}$, o Cloreto de Mercúrio nas concentrações de 1,25mM, 0,5mM, 0,1mM e 0,05mM e a placa controle foi umedecida com 3mL de água destilada. Os experimentos foram conduzidos em câmara de germinação do tipo BOD a temperatura de aproximadamente 25°C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três repetições de 20 sementes por placa. Os parâmetros analisados ao final dos sete dias foram: contagem do número de sementes germinadas, cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), biometria do caulículo e da radícula, número de necrose radicular e anormalidades das plântulas, seguindo o Manual de regras para análise de sementes (BRASIL, 2009). Foram consideradas germinadas as sementes cujas radículas atingiram 1 mm de comprimento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi avaliado a cada 24 horas, sendo determinado através do somatório da razão entre o número de sementes germinadas no dia i (n_i) e o número de dias (i) (Fernandes et al., 2007).

2.8. Testes de Mortalidade

Moscas adultas (machos e fêmeas) foram dispostas em frascos de 330 mL, previamente preparados com uma solução de sacarose em água destilada, na concentração de 20%, esta solução foi embebida em 1 grama de papel filtro, disposto no fundo do vidro. Na tampa rosqueável do vidro, foi introduzida uma contra-tampa de Poli Tereftalato de Etila – PET, onde foi aderido, por fita adesiva, papel vegetal para receber as diversas concentrações do óleo essencial. Os vidros receberam os seguintes tratamentos: Controle Sacarose a 20%, Tratamento com óleo essencial a 2,5 mg, 5 mg e 7,5 mg, com ciclo de claro, escuro de 12 horas e temperatura controlada a $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$. As leituras do experimento foram feitas a cada: 6, 12, 24 e 48 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Composição Química do Óleo Essencial

A composição química do óleo essencial, em estudo, revelou a presença de 14 fitoconstituintes, a saber: *α-pinene*, *camphene*, *β-pinene*, *myrcene*, *p-cymene*, *L-limonene*, *trans-β-ocimene*, *β-ocimene*, *α-terpinolene*, *fenchol*, *β-fenchyl alcohol*, *bornyl acetate*, *β-caryophyllene*, *α-humulene*. Os fitoconstituintes que se apresentaram com percentual acima de 10%, foram: *α-pinene*, com 30,04 %, *trans-β-ocimene*, com 26,85% e *β-ocimene* com 11,13%. A composição química do óleo essencial encontra-se na Tabela 1 e o Cromatograma na Figura 1.

3.2. Fenóis totais e flavonóides

Os resultados na Tabela 2 mostram a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides do EEFEJ.

Uma atividade alelopática pode ser observada sobre as sementes de *Lactuca sativa* (alface), já que a presença do extrato de *Eugenia jambolana*, em uma concentração baixa, inibiu a germinação das sementes (Figura 3). Os responsáveis pelos efeitos alelopáticos observados nas plantas podem ser os diferentes grupamentos químicos (como ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides, flavonóides, alcalóides, taninos, quinonas complexas) (Einhellig, 1986; Medeiros, 1990).

Por outro lado, um dos principais mecanismos em que elevadas concentrações de metais pesados causam danos no tecido vegetal é o estresse oxidativo que pode ser ocasionado pelo

estímulo na produção de radicais livres (Fernandes, 2006).

Os compostos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolípidios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis. Antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários que agem como terminais para os radicais livres (Xing e White, 2006).

3.3. Efeito Quelante

Os resultados na Tabela 2 mostram a concentração quelante de 50% da concentração do metal, em comparação com o EDTA, 136 µg/mL (IC₅₀), o EEFEJ apresentou uma ação quelante de metal moderada, com uma IC₅₀ no valor de 566,98µg/mL.

Lim et al (1982) estudaram os efeitos dos agentes quelantes 1,10-fenantrolina nas reações de auto-oxidação de S(IV) catalisadas por Fe(II) e Mn(II). O EDTA tem um maior efeito inibidor sobre o catalisador Fe(II). O complexo Fe(II)/EDTA é reativo e em presença de oxigênio é rapidamente oxidado a Fe(III)/EDTA, bastante estável. O efeito inibidor desses agentes quelantes está relacionado com a ocupação dos sítios de coordenação do catalisador e não apenas com a mudança no potencial de oxirredução do íon metálico devido à complexação (Dellert-Ritter, 1992).

3.4. Avaliação do potencial citoprotetor de EEFEJ contra Cloreto de Mercúrio

De acordo com os resultados apresentados na figura 2, é possível afirmar uma pequena ação protetora do extrato em relação ao controle, uma vez que as bactérias conseguiram sobreviver em concentrações mais elevadas do metal. Segundo Silver e Hobmam (2007), os microrganismos, apresentam resistência à maioria dos metais ocorrendo normalmente por efluxo, a fim de remover metais do citoplasma e sequestro extracelular do contaminante. Com o mercúrio os microrganismos utilizam o sistema operon *mer*.

3.5. Teste de citoproteção em sementes de alface (Germinação)

As sementes foram submetidas ao teste de germinação com tratamentos de água, extrato e diferentes concentrações de cloreto de mercúrio, como também a associação do extrato com o metal.

Os efeitos tóxicos, só se manifestam em organismos se o agente tóxico alcançar locais específicos do organismo, em concentrações e tempo suficiente para produzir algum tipo de efeito (Barros, 2008). Na análise do tratamento com o metal observou-se plântulas anormais, com necrose da radícula. Acompanhado a isto, foi observado discrepâncias no crescimento da radícula e do caulículo.

De acordo com a figura 3, podemos perceber que apesar do efeito alelopático do EEF EJ houve crescimento das sementes quanto o extrato foi associado ao cloreto de mercúrio esse efeito pode ser visto em todas as concentrações do metal.

Na figura 4 é possível perceber um aumento no comprimento dos caulículos e radículas

no tratamento onde há a associação do extrato com diferentes concentrações de mercúrio.

A contaminação com metais pesados afetam o crescimento, a distribuição e o ciclo biológico das espécies vegetais (Barceló e Poschenrieder, 1992), contudo, a vegetação pode ser uma alternativa para a recuperação de solos degradados pelo excesso desses elementos (Salt et al, 1995).

3.6. Efeito biocida

De acordo com o a figura 5 a partir do tempo de 12h, nas concentrações acima de 2,5mg/mL a mortalidade tornou-se crescente. Tendo uma concentração de 50% de mortes em aproximadamente 24h nas concentrações de 2,5 mg/mL e 5mg/mL. E mortalidade maior que 50% nas demais concentrações testadas no período de 24h. Portanto, o tempo de exposição também é um fator responsável pelo aumento da mortalidade. Há diversos relatos sobre a atividade inseticida de óleos essenciais (Lima, 2006). Entretanto este é o primeiro relato de atividade inseticida do óleo essencial de *Eugenia jambolana*. Os óleos essenciais podem atuar em enzimas digestivas e neurológicas bem como interagir com o tegumento do inseto (Isman, 2006). O experimento de Kim et al. (2003) demonstraram a importância da relação entre a estrutura química e atividade biológica dos compostos; quanto maior a lipofilicidade, maior a penetração no tegumento do inseto. Os óleos essenciais como os seus fitoconstituintes isolados tem se revelado como potenciais ferramentas para o controle de pragas de forma isolada ou através do manejo integrado de pragas.

O mecanismo de fumigação utilizado neste experimento, escolhido em face da respiração traqueal destes dípteros, associado aos baixos valores, em miligramas, encontrados para a CL₅₀, demonstrando índice de danos ao aparelho locomotor, que pode estar associado a danos nos neurônios dopaminérgicos são alentadores para o teste de novos óleos essenciais, especialmente aqueles que possuem atividade pró-oxidante. De acordo com Ennan et al. (1998), alguns compostos presentes em óleos essenciais (terpenóides e fenilpropanóides) podem bloquear a octopamina, um neurotransmissor de insetos que possui funções similares da adrenalina em vertebrados. Compostos como estes estão presentes no óleo essencial de *Eugenia jambolana*, podendo estes serem os responsáveis pela atividade observada.

Para verificar a diferença na proporção de mortalidades entre os grupos nos quais foi administrado o óleo essencial em relação ao grupo controle (sacarose), foi realizada uma análise de variância (ANOVA), com a utilização do software

GraphPad Prism. A análise de variância (ANOVA) demonstrou haver diferença significativa na quantidade de moscas mortas entre o controle negativo (sacarose) em relação aos grupos nas quais foi administrado o óleo essencial (F=34,1; P< 0,05).

CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Eugenia jambolana* Lam. apresenta-se como alternativa relevante na busca de bioinseticidas, visto que o mesmo, nas concentrações testadas, mostrou resultados relevantes em modelo de *Drosophila melanogaster*, como artrópodo alvo. De acordo com os resultados podemos perceber que o extrato apesar de possuir efeito alelopático sobre as sementes de alface, sua combinação com o cloreto de mercúrio ofereceu um maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa*, mostrando que a vegetação pode ser uma alternativa para solucionar o problema com a contaminação por metais pesados, além de apresentar um potencial citoprotetora e uma ação quelante moderada.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Composição química (%) do óleo essencial em % das folhas de *E. Jambolana*.

TR	Composto	(%)	IK lit.	IK calc.
3.721	α -pinene	30.04	934	930
3.939	Camphene	1.17		780
4.401	β -pinene	8.26		975
4.703	Myrcene	2.78	991	991
5.332	p-cymene	0.38		1024

5.408	L-limonene	6.52		1028
5.644	trans- β -ocimene	26.85		1040
5.857	β – ocimene	11.13		1050
6.707	α -terpinolene	0.56		1087
7.268	Fenchol	0.46		1111
9.178	β - fenchyl alcohol	7.27		1189
11.536	bornyl acetate	1.31		1283
14.737	β -caryophyllene	2.10		1412
15.547	α -humulene	1.17	1454	1447
TOTAL		100		

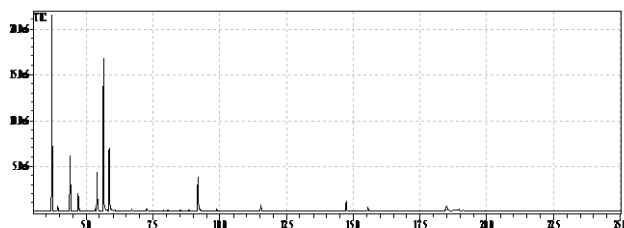


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *E. jambolana*

	ÁCIDO GÁLICO	QUERCETINA	EEFEJ	EDTA
Fenóis totais	1079,06 mg/g	-	322,96 mg/g	-
Flavonóides	-	946,94 mg/g	25,16 mg/g	-
IC ₅₀	-	-	566.98 μ g/ml	-
IC ₅₀	-	-	-	136 μ g/ml

TABELA 2: Total de fenóis, flavonoides e efeito quelante de EEFEJ.

* EEFEJ - Extrato Etanólico das Folhas de *Eugenia jambolana* Lam.; IC₅₀ – concentração quelante de 50% da concentração do metal.

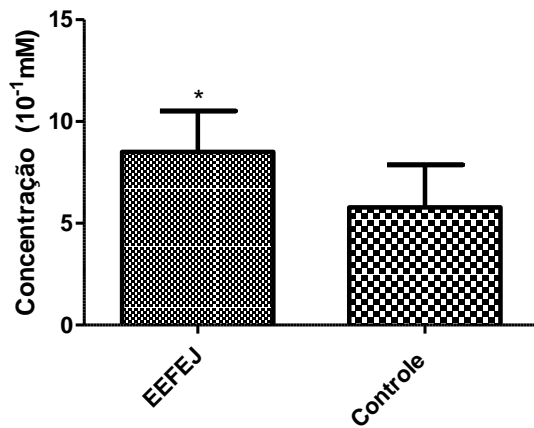


Figura 2: Efeito citoprotetor de *Eugenia jambolana* em *Escherichia coli*. EEFEJ – Extrato Etanólico das Folhas de *Eugenia jambolana*.

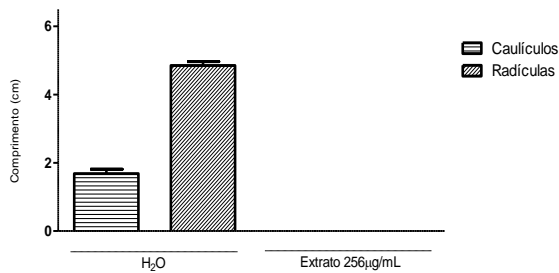


Figura 3. Germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). H₂O - Água

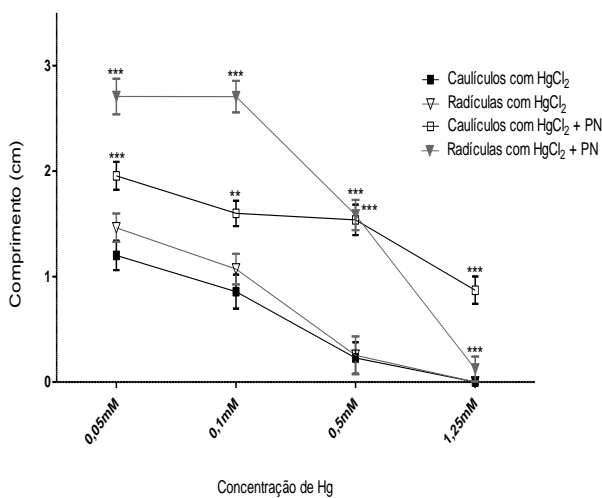


Figura 4. Potencial citoprotetor do extrato de *Eugenia jambolana* em sementes de alface. PN - Produto Natural. HgCl₂ – Cloreto de mercúrio.

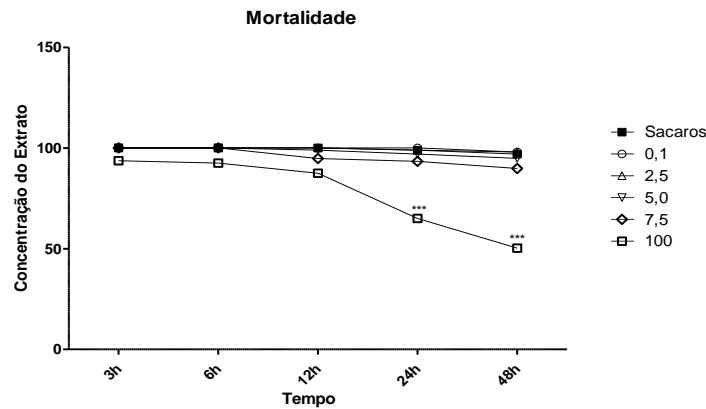


Figura 5. Efeito biocida do EEEJ(mg/mL) contra *D. melanogaster* ***Valor estatisticamente significativo com P< 0.05.

REFERÊNCIAS

- Barceló, J.; Poschenrieder, C., 1992. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. Suelo y Planta. v.2,n.2, p.345-361.
- Barros, S. B. M; Davino, S. C., 2008. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S; Camargo, M.M.A; Batistuzzo, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Ed. Atheneu. p.59-70.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. 2009. Departamento de Produção Vegetal, Divisão de Sementes e Mudanças. Regras para análise de sementes. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 188p.

- Benzie, I. F. F.; Strain, J. T., 1996. The ferric reducing ability of pLASMA (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, *Anal Biochem*, 239 70.
- Benzie, I. F. F.; Szeto, Y. T., 1999. Total antioxidant capacity of Teas by the Ferric Reducing/ antioxidant power assay, *J Agric Food Chem*, 47 633.
- Coutinho, H. D. M. et al., 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis*. And chlorpromazine. *Chemotherapy* 54:328–330.
- Dellert-Ritter, M.; van Eldik, R., 1992. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1037, 1045.
- Ennan, E.; Beigler, M.; Kende, A. 1998. Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches: effects on octopamine receptors. In: International Symposium on Plant Protection. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Gent, Belgium.
- Einhellig, F. A., 1986. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: Putnam, A.R.; TANG, Chung-Shih. *The science of allelopathy*. Toronto: John Wiley & Sons, p. 171-187.
- Fernandes, L. A. V., 2007. Miranda, D. L. C.; Sanquetta, C. R. Potencial alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. *Revista Academica de Curitiba*, v. 5, n. 2, p. 139-146.
- Fernandes, M.S. *Nutrição Mineral de Plantas*, Viçosa SBCS, 2006.
- Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, v.51, p45-66.2006
- Jimenez-Del-Rio, J.M.; Martinez, C.G.; Pardo, C.V.; The Effects of Polyphenols on Survival and Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster* Exposed to Iron and Paraquat, Springer Science+Business Media; 2009.
- Kabata-Pendias, A.; Pendias, H., 1984. Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC, 315 p.
- Kim, E.H.; Kim, H.K.; Choi, D.H.; Ahn, Y.J., 2003. A caricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari:Acaridae). *Applied Entomology and Zoology*, v.38(2),p.261-266.
- Lee, R. et al., 2009. A review of events that expose children to elemental mercury in the United States, *Ciência e Saúde Coletiva*, 15 (2), 585-598.
- Lima, R.K., 2006. Caracterização química e bioatividades do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. p56.
- Lim, P. K.; Huss Jr.; A.; Eckert, C. A., 1982. *J. Phys. Chem.* . 86, 4233.
- Matos, F. J. de A., 2009. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza. p.148.
- Medeiros, A .R. M., 1990. Alelopatia. *Horti Sul*, v. 1, n. 3, p. 27-32.
- Patrick, L., 2002. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione ad alpha-lipoc acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern Med Rev.* v.7, p.456-471.
- Pepato, M.T, Mori, D.M.; Baviera, J.B.; Harami, R.C.; Vendramini, R.; Brunetti, I.L.2004. Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.*, v.96, n.1-2, p.43-48.
- Salt, D.E.; Blaylock, M.; Kumar, N.P.B.A.; Dushenkov, V.; Ensley, B.D.; Chet, I.; Raskin, I., 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, v.13, p.468-474.
- Siddique, H.R.; Gupta, S.C.; Dhawan, A.; Murthy, R.C.; Saxena, D.K.; Chowdhuri, D.K., 2005.

- Genotoxicity of Industrial Solid Waste Leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* v46,p189-197.
- Silver, S.; Hobman, J. L., 2007. Mercury Microbiology: Resistance Systems, Environmental Aspects, Methylation, and Human Health. *Microbiology Monographs*. v 6, p357-370.
- Tinôco, A.A.P.; et al. Avaliação de contaminação por mercúrio em Descoberto, MG, *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 15 (4), 305–314.
- WHO. World Health Organization., 2010. Inorganic Mercury. *Environmental Health Criteria* 118: 168p, Geneva, 1991.
- Xing, Y., White, P. J., 1996. Antioxidants from Cereals and Legumes in *Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications* “in” SHAHIDI, F. AOCS Press: Champaign, Illinois, p. 25-55.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caro leitor, os testes de Fenóis totais e Flavonóides, TBARS, Atividade antioxidante e Avaliação do potencial citoprotetor do produto natural EEF EJ contra metais pesados, com o extrato da espécie *Eugenia jambolana* Lam., presentes no artigo **Evaluación de la actividad antioxidante y citoprotector de extractos de *Eugenia jambolana*. Lam y *Psidium myrsinites* DC. A**, refere-se ao meu projeto original de dissertação.

5.2 Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora de extratos de *Eugenia jambolana* Lam. e *Psidium myrsinites* DC. A.

Nadghia F. Leite, Celestina Elba Sobral-Souza, Edinardo F. F. Matias, Liscássia B. B. Alencar, Rosimeire S. Albuquerque, Maria Flaviana B. M. Braga, Erlanio O. Souza, Henrique D. M. Coutinho.

RESUMO

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças. Neste contexto, avaliaram-se os potenciais antioxidantes, *in vitro*, dos extratos de *Eugenia jambolana* Lam. e *Psidium myrsinites* DC. A., além de quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos. De acordo com os resultados obtidos, observou-se uma melhor atividade antioxidante para o extrato de *P. myrsinites* DC. A., para o teste de TBARs com fosfolipídio de ovo, o extrato reduziu os níveis basais no processo de peroxidação lipídica, a CL50 do EEF EJ mostrou os melhores resultados, com um baixo valor quando comparado com o EHFPM e quando induzidos por Fe²⁺ o extrato de *P. myrsinites* DC. A. mostrou-se mais eficiente. Portanto, através destes ensaios pode-se verificar que os extratos das folhas das espécies, *E. jambolana* Lam. e *P. myrsinite* DC. A., apresentam uma atividade antioxidante, diretamente relacionada com substâncias fenólicas produzidas a partir do seu metabolismo secundário.

PALAVRAS-CHAVE: *Eugenia jambolana* Lam, *Psidium myrsinites* DC. A., metais pesados, antioxidante.

Artigo submetido: Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas, em 2014

Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora de extratos de *Eugenia jambolana* Lam. e *Psidium myrsinites* DC. A. contra metal pesado.

Nadghia FIGUEIREDO-LEITE¹, Celestina Elba SOBRAL-SOUZA¹, Edinaldo Fagner FERREIRA-MATIAS^{1,2}, Liscássia Beatriz BATISTA-ALENCAR¹, Rosimeire SABINO-ALBUQUERQUE¹, Maria Flaviana Bezerra MORAIS-BRAGA¹, Erlanio OLIVEIRA-SOUZA³, Henrique Douglas MELO-COUTINHO¹

^{1*} Universidade Regional do Cariri,URCA, Crato(CE), Brasil.Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000.Fone:+55(88)31021212;*Correo electronico: hdmcoutinho@gmail.com

²Faculdade de Ciências Aplicadas Dr. Leão Sampaio, Juazeiro do Norte(CE), Brasil.

³Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato(CE), Brasil;

RESUMO

Avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante, dada a sua importância para a saúde humana. Estudos recentes mostram que o uso de plantas sob a forma de sucos ou chás como fontes de antioxidantes naturais que têm um risco baixo podem ser usados como um auxiliar no tratamento de várias doenças. Neste contexto, foi avaliado o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos de *Eugenia jambolana* Lam e *Psidium myrsinites* DC. A. e a quantificação de fenóis totais e flavonóides presentes nos extratos. De acordo com os resultados, o extrato de *Psidium myrsinites* DC. A. mostrou melhor atividade antioxidante. Para o teste de TBARS com fosfolipídios de ovos houve uma redução dos níveis basais no processo de peroxidação lipídica, a CE₅₀ de EEF EJ apresentou os melhores resultados em comparação com EHFPM, quando induzida por Fe²⁺ o extrato *Psidium myrsinites* DC. A. provou ser mais eficiente. Portanto, através destes testes pode ser visto que os extratos de folhas das espécies, *Eugenia jambolana* Lam e *Psidium myrsinites* DC. A.,apresentam atividade antioxidante relacionada com as substâncias fenólicas produzidos a partir do metabolismo secundário.

Palavras-chave: *Eugenia jambolana*, *Psidium myrsinites* DC. A., antioxidante, metais pesados .

INTRODUÇÃO

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão relevante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças (Silva et al., 2005).

Para além de doenças crónicas, o estresse oxidativo também pode desempenhar um papel fundamental na hepatotoxicidade aguda de vários fármacos, incluindo o analgésico utilizado mundialmente e antipirético paracetamol (Angela, Richard, Sandra, Robert, & Jack, 2005). Estudos têm mostrado que a utilização de compostos polifenólicos encontrados no chá, frutas e vegetais está associada com um risco baixo de tais doenças (Hertog, Hollman, & Van, 1993). Consequentemente, existe uma grande quantidade de interesse em plantas comestíveis que contêm antioxidantes e como potenciais agentes terapêuticos (Vieira, 1999).

O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 532 nm e fluorescência em 553 nm (Thérond et al 2000).

Plantas medicinais possuem diversos compostos químicos com potencial antioxidante. Dentre as classes com essa propriedade, os compostos fenólicos tem recebido muita atenção, sobretudo por apresentarem comprovada atividade de inibição da peroxidação lipídica e da lipoxigenase *in vitro* (Sousa et al., 2007; Sun et al., 2012).

Os antioxidantes são substâncias químicas que reagem com os radicais livres e, assim, limitam os seus efeitos adversos sobre o corpo. O corpo humano tem a capacidade de produzir certos antioxidantes endógenos, mas a maioria deles vem do alimento ingerido (Borguini & Torres 2009).

Eugenia jambolana Lam. (Myrtaceae), conhecida como oliveira, é utilizado como um alimento e utilizada na medicina tradicional para a atividade antimicrobiana (Hotetz et al, 2002), e que tem sido extensivamente estudada por suas propriedades antioxidantes, e pelo potencial hipoglicémico e hipotensivo (Souza et al, 2004).

Psidium myrsinites DC. A., também conhecida como araçá, tem uso medicinal, melhorando a cicatrização, e uso alimentício, com fabricação de geleias e sucos. Podendo ser encontrada nos estados do Ceará, Bahia, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Piauí e Distrito Federal. Em seu óleo

essencial está presente uma substância usada na composição de perfumes, o linalol (Ambiente Brasil, 2009).

Este trabalho teve como objetivo verificar os potenciais antioxidantes, *in vitro*, de extratos por DPPH (difenil-picrilhidrazil) e TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), e quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais, foi determinada adicionando-se 200 µL da solução dos extratos (300, 100, 50 e 25 µg/mL em etanol 99,6%) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 µL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. O teste foi realizado em triplicata. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico/ grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300, 100, 75, 25 e 10 µg/mL).

Flavonóides

Foram preparadas soluções do extrato (300, 200, 100 e 50 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl_3) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação

da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL) diluída em etanol 99,6%.

Atividade antioxidante

Foram preparadas soluções com diferentes concentrações de cada extrato de *Eugenia jambolana* Lam. e *Psidium myrsinites* DC. A. (250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL) em triplicata. Em um tubo foram misturados 100 µL da solução do extrato e 3,9 mL de solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,06 mM e homogenizado com agitador de tubos, procedimento realizado em ambiente escuro. Para o branco, a amostra foi substituída por 100 µL de metanol. As leituras foram realizadas utilizando um filtro de comprimento de onda de 520 nm e repetidas a cada minuto até que foi observada a estabilização da leitura.

A curva padrão foi determinada realizando leituras no mesmo comprimento de onda (515 nm), porém com soluções de DPPH em diferentes concentrações (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM), sendo o branco determinado por metanol (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; RUFINO et al., 2007)

TBARS

A produção de TBARS de fosfolípido foi determinada usando o método de Ohkawa *et al.* (1979), com modificações. Foi preparada uma solução de gema de ovo, misturada com uma solução de hexano-isopropanol (3:2). Essa solução foi filtrada e rotaevaporada até a obtenção de resíduo sólido. Para ensaio TBARS solubilizou-se 0,05g do resíduo em 10 mL de água mili-Q. Para pré-incubação foi utilizado 100µl de fosfolipídio, 50µl de extrato nas concentrações de 100, 40, 10 e 4 µg/mL juntamente com um volume adequado de água deionizada. As amostras foram repetidas adicionando 14µl de Fe (60µM) e incubadas a 37°C, durante 1 h. Após a pré incubação foi adicionado 500µL de tampão ácido acético e 500µl de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,6% e incubado por 1h a uma

temperatura de 100°C. Os tubos foram adicionados 2 ml de n-butanol e a mistura centrifugada. O sobrenadante foi retirado e a absorbância foi lida a 532 nm num espectrofotômetro. Para a curva de MDA (malonaldeído) foi utilizada 500µL de ácido acético, 500µL de TBA (0,6%), MDA nas concentrações de 50, 100, 150, 200µL e volume adequado de água destilada para completar um volume de 1,5mL. Os testes foram feitos em triplicata e repetido duas vezes.

Avaliação do potencial citoprotetor do produto natural EEFEJ e EHFPM contra metais pesados

De acordo com Coutinho et al., 2008, modificado, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do EEFEJ e EHFPM, foram determinados pelo ensaio de microdiluição usando suspensões de 10⁵ UFC / ml em solução salina e extratos na concentração inicial de 1024µg/mL. A CIM foi definida como a concentração mais baixa à qual não foi observado crescimento. Para a avaliação do efeito protetor EEFEJ e EHFPM ao metal pesado, foi realizada uma modulação utilizando concentrações sub-inibitórias dos extratos, suspensões de 10⁵ UFC / ml de *Escherichia coli* ATTC 11105 e *Candida albicans* 62 em meio M9 Tris com 2% de glicose e uma de concentração do sulfato de ferro II variando de 100 mM a 0,0488 Mm. As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 37 ° C. A concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, utilizando placas de petri com HIA para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fenóis totais e Flavonóides

Os resultados da Tabela 1 mostram que a quantidade de compostos fenólicos totais nos extratos das plantas foi de 322,96 mg/g e 557,16 mg/g, para EEFEJ e EHFPM, respectivamente. A quantidade flavonoides foi maior no extrato de *Eugenia jambolana* Lam.

	ÁC.GÁLICO (padrão) (mg/g)	QUERCETINA (padrão) (mg/g)	EEFEJ (mg/g)	EHFPM (mg/g)
Fenóis Totais	1079,06	-	322,96	557,16
Flavonoides	-	946,94	25,16	17,54

TABELA 1: VALORES DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES DO EEF EJ E EHFPM

*EEFEJ – Extrato etanólico de *Eugenia jambolona* Lam.; EHFPM – Extrato hidroalcolico de *Psidium myrsinites* DC. A.

TBARS

Esse trabalho revelou uma inibição do processo de peroxidação lipídica utilizando fosfolipídio de ovo. Apresentou indício de redução quanto aos níveis basais para os extratos das folhas, esta redução foi considerada significativa para EHFPM quando não induzido o estresse oxidativo com auxílio de Fe^{2+} , com maior significância em concentrações de $4\mu\text{g/mL}$ e $10\mu\text{g/mL}$, e para EEF EJ não foram verificadas ação antioxidante significativa em nenhuma das induções.

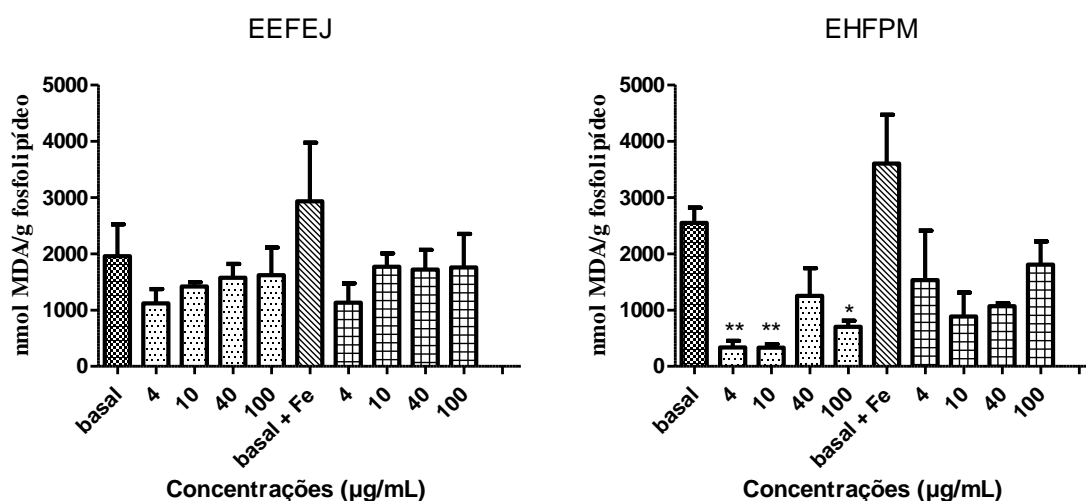


Figura 1: Propriedade antioxidante de EEF EJ E EHFPM. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolipídeos de ovo foi determinada quer na ausência ou na presença de Fe^{2+} (10 mM). Os valores são expressos como média \pm SEM de 2 experimentos independentes efetuadas em triplicata. * $p < 0,05$ vs Fe^{2+} induzido; ** $p < 0,01$ vs Fe^{2+} induzido.

A grande quantidade de compostos fenólicos pode explicar o efeito antioxidante de EHFPM já que a atividade antioxidante dos compostos fenólicos se dá pela inibição da peroxidação lipídica. Esta atividade é dependente da estrutura das moléculas, bem como o número e a posição do grupo hidroxila. Os compostos fenólicos (especialmente flavonoides) são capazes de alterar a cinética da peroxidação por alterar a organização de compostos lipídicos. Eles estabilizam as membranas pela fluidez da mesma por diminuir e impedir a difusão dos radicais livres e restringir a reação de peroxidação (MICHALAK, 2006).

Um estudo feito por Mazzanti (2003) indica que não há efeito antiperoxidativo do extrato da casca da *Syzygium cumini* (*Eugenia jambolana* Lam.).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi mensurada com o método do DPPH e o resultado expresso em um valor de CE₅₀ 96,81 µg/mL e 7,52 µg/mL, para *Eugenia jambolona* Lam. e *Psidium myrsinites* DC. A., respectivamente (Tabela 2). Quanto mais baixo for o valor CE₅₀, maior é a potência antioxidante. Portanto, o EHFPM, mostra-se mais efetivo em relação ao EEFEJ, que pode está relacionada à elevada presença de compostos fenólicos e flavonoides.

A CE₅₀ foi calculada a partir de dados obtidos de testes de peroxidação lipídica (TBARS),o EEFEJ mostrou o melhor resultado com baixo valor de CE50 em comparação com EHFPM.(Tabla 2).

Amostra	CE ₅₀ (mg/mL)		CE ₅₀ (mg/mL)
	TBARS – basal	TBARS – Fe ²⁺	DPPH
EEFEJ	8,16	40,05	96,81
EHFPM	178,58	86,71	7,52

TABELA 2: VALORES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E VALORES DA CE₅₀ E CE₅₀ DE EEFEJ E EHFPM

EEFEJ – Extrato etanólico de *Eugenia jambolana* Lam.; EHFPS – Extrato hidroalcóolico de *Psidium myrsinites* DC. A..

Avaliação do potencial citoprotetor dos extratos EEFEJ e EHFPM contra metais pesados

O ferro é o segundo metal mais abundante, mas apesar disso apresenta baixa solubilidade em ambientes aeróbios e no pH fisiológico da célula (Crichton, 1991). Deste modo, este elemento encontra-se, geralmente, no limite da disponibilidade celular para atender aos diversos processos metabólicos, sendo assim então retirado do ambiente e estocado em proteínas, para evitar carências que podem acarretar à morte celular. Para isso, os microrganismos utilizam mecanismos e reações com

alta afinidade por ferro entre os quais se ligam ao ferro e o uso de agentes quelantes que complexam o ferro solúvel (Brickman & Armstrong, 1995).

A presença dos extratos mostrou-se indiferente nas concentrações analisadas, visto que os microrganismos conseguiram sobreviver nas concentrações utilizadas de sulfato de ferro II e na modulação com EEFEU e EHFPS. Supostamente os microrganismos utilizados nesse trabalho podem ter absorvido o ferro presente no meio e transportado para suas proteínas garantindo assim a manutenção da sua vida.

CONCLUSÃO

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada, juntamente com o seu conteúdo de fenóis e flavonóides. Em testes de captura do radical livre de DPPH atividade antioxidante melhor EHFPM que está relacionado com o elevado conteúdo de compostos fenólicos foi observada. Para testar TBARS com fosfolípidos de ovo, os extratos reduziram os níveis basais no processo de peroxidação lipídica, e quando induzida pelo Fe^{2+} o EHFPM foi mais eficiente. O extrato de *E. jambolana* Lam. mostrou uma CE_{50} com um valor mais baixo. Portanto, através destes testes pode ser visto que os extratos de folhas de *Psidium myrsinites* e *Eugenia jambolana* apresentaram atividade antioxidante, e pode estar relacionado com substâncias fenólicas produzidas a partir do metabolismo secundário. Os extratos também mostraram que não houve potencial citoprotetor contra ferro II.

REFERÊNCIAS

- BORGUINI RG, TORRES EFS. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev. Int.* 2009; 25: 313-325.
- BRICKMAN TJ, ARMSTRONG SK. *Bortella pertussis* fur gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *Bortella bronchiseptica* mutants. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 268-270.
- COUTINHO HDM, COSTA JGM, LIMA EO, FALCÃO-SILVA VS, SIQUEIRA-JÚNIOR JP. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy.* 2008; 54: 328-330.
- CRICHTON RR. Inorganic biochemistry of iron metabolism. Ellis Horwood, West Sussex, England; 1991.
- HERTOG MGL, HOLLMAN PCH, VAN PB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. Agr. Food Chem.* 1993; 41: 1242-1246.

HOLETZ FB, PESSINI GL, SANCHES NR, CORTEZ DA, NAKAMURA CV, FILHO BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1997; 97: 1027–1031.

IHA SM, MIGLIATO KF, VELLOSA JCR, SACRAMENTO LVS, PIETRO RCLR, ISAAC VLB, BRUNETTI IL, CORRÊA MA, SALGADO HRN. 2008. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. Rev. Bras. Farmacogn. 2008;18: 387-393.

MAZZANTI CM, SCHOSSLER DR, FILAPPI A, PRESTES D, BALZ D, MIRON V, MORSCH A, SCHETINGER MRC, MORSCH VM, CECIM M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. Ciênc. Rural 2003; 33: 1061-1065.

MICHALAK A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Pol. J. Environ. Stud. 2006;15: 523-530.

OHKAWA H, OHISHI H, YAGI K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 1979;95: 351-358.

REID AB, KURTEN RC, MCCULLOUGH SS, BROCK RW, HINSON JA. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. J. Pharmacol. Ther. Exp. 2006; 312: 509–516.

RUFINO M, ALVES R, BRITO E, MORAIS S, SAMPAIO C, JIMEZES-PEREZ J, SAURA-CALIXTO F. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza; 2007.

SANCHEZ-MORENO JA, LARRAURI F, SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food. Agr. 1998; 76: 270–276.

SILVA CG, HERDEIRO RS, MATHIAS CJ, PANEK AD, SILVEIRA CS, RODRIGUES VP, RENNÓ MN, FALCÃO DQ, CERQUEIRA DM, MINTO ABM, NOGUEIRA FLP, QUARESMA CH, SILVA JFM, MENEZES FS, ELEUTHERIO ECA. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. Pharm. Res. 2005; 52: 229-233.

SOUSA CMM, SILVA HS, VIEIRA-JR GM, AYRES MCC, COSTA CLS, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, BARROS EDS, ARAÚJO PBM, BRANDÃO MS, CHAVES MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quím. Nova. 2007; 30: 2, 351-355.

SOUZA GC, HAAS APS, VON POSER GL, SCHAPOVAL EES, ELISABETSKY E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J. Ethnopharmacol. 2004; 90: 135-143.

SUN J, SHAO-FANG L, CHU-SHU Z, LI-NA Y, JIE B, FENG Z, QING-LIY. Chemical composition and antioxidant activities of *Brussonetia papyfera* fruits. Plos One. 2012; 7: 1-8.

THÉRON P, BONNEFONT-ROUSSELOT D, DAVIT-SPRAUL A, CONTI M, LEGRAND A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2000; 3: 373-84.

VIEIRA RF. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: Perspective in new crops and new uses. Janick J.(ed). AHS press. Alexandria, USA; 1999.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caro leitor, os testes de Fenóis totais e Flavonóides, TBARS, Atividade antioxidante e Avaliação do potencial citoprotetor do produto natural EEFEU contra metais pesados, com o extrato da espécie *Eugenia uniflora* L., presentes no artigo **Verificação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* L. e *Psidium socrateanum***, refere-se ao meu projeto original de dissertação.

5.3 Verificação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Psidium socraleanum*

Celestina E. Sobral-Souza, Nadghia F. Leite, Liscássia B. B. Alencar, Rosimeire S.

Albuquerque, Francisco A. B. Cunha, Antonio I. Pinho, José G. M. Costa & Henrique

D.M.Coutinho.

RESUMO:

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças. Neste contexto, avaliaram-se os potenciais antioxidantes, *in vitro*, dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Psidium socraleanum*, além de quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos. De acordo com os resultados obtidos, observou-se uma melhor atividade antioxidante para o extrato de *Eugenia uniflora*, para o teste de TBARs com fosfolipídio de ovo, os extratos reduziram os níveis basais no processo de peroxidação lipídica, e quando induzidos por Fe^{2+} o extrato de *Psidium socraleanum* mostrou-se mais eficiente. Portanto, através destes ensaios pode-se verificar que os extratos das folhas das espécies, *Eugenia uniflora* e *Psidium socraleanum*, apresentam uma atividade antioxidante, diretamente relacionada com substâncias fenólicas produzidas a partir do seu metabolismo secundário.

PALAVRAS-CHAVE: peroxidação lipídica, compostos fenólicos, sulfato de ferro, produto natural.

Artigo submetido: Acta Biologica Colombiana, em 2013.

Verificação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* L. e *Psidium socraleanum*

Celestina E. Sobral-Souza¹, Nadghia F. Leite¹, Liscássia B. B. Alencar¹, Rosimeire S. Albuquerque¹, Francisco A. B. Cunha¹, Antonio I. Pinho¹, José G. M. Costa¹ & Henrique D.M.Coutinho¹

Resumo:

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças. Neste contexto, avaliaram-se os potenciais antioxidantes, *in vitro*, dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Psidium socraleanum*, além de quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos. De acordo com os resultados obtidos, observou-se uma melhor atividade antioxidante para o extrato de *Eugenia uniflora*, para o teste de TBARs com fosfolípido de ovo, os extratos reduziram os níveis basais no processo de peroxidação lipídica, e quando induzidos por Fe²⁺ o extrato de *Psidium socraleanum* mostrou-se mais eficiente. Portanto, através destes ensaios pode-se verificar que os extratos das folhas das espécies, *Eugenia uniflora* e *Psidium socraleanum*, apresentam uma atividade antioxidante, diretamente relacionada com substâncias fenólicas produzidas a partir do seu metabolismo secundário.

Palavras-chave: peroxidação lipídica, compostos fenólicos, sulfato de ferro, produto natural.

¹ Universidade Regional do Cariri, URCA, Crato(CE), Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; E-mail: elba.sobral@hotmail.com;

nadghia.fl@gmail.com; liscassia_beatriz@hotmail.com; rosi_sabino87@hotmail.com;

cunha.urca@gmail.com;

ivanildopinho@yahoo.com.br;

galberto.martins@gmail.com;

hdmcoutinho@gmail.com

Verification of cytoprotective and antioxidant activity of the extracts of *Eugenia uniflora* and *Psidium soraLEANUM*

Abstract:

Evaluation of antioxidant activity has been an important issue considering its importance to human health. Recent studies show that the use of plants in the form of juices or teas as sources of natural antioxidants which have a low risk can be used as an aid to the treatment of various diseases. In this context, evaluated the antioxidant potential in vitro, extracts of *Eugenia uniflora* and *Psidium soraLEANUM* and quantifies phenols and flavonoids present in the extracts. According to the results, showed a better antioxidant activity for the extract of *Eugenia uniflora* for testing TBARS with phospholipid, egg extracts reduced basal levels in the process of lipid peroxidation, and when induced by Fe²⁺ + extract *Psidium soraLEANUM* proved to be more efficient. Therefore, through these tests can be seen that the extracts of the leaves of the species, *Eugenia uniflora* and *Psidium soraLEANUM*, exhibit antioxidant activity, directly related phenolic substances produced from its secondary metabolism.

Keywords: lipid peroxidation, phenolic compounds, iron sulphate, natural product

INTRODUÇÃO

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças (Silva et al., 2005).

Para além de doenças crônicas, o estresse oxidativo também pode desempenhar um papel fundamental na hepatotoxicidade aguda de vários fármacos, incluindo o analgésico utilizado mundialmente e antipirético paracetamol (Angela, Richard, Sandra, Robert, & Jack, 2005). Estudos têm mostrado que a utilização de compostos polifenólicos encontrados no chá, frutas e vegetais está associada com um risco baixo de tais doenças (Hertog, Hollman, & Van, 1993). Consequentemente,

existe uma grande quantidade de interesse em plantas comestíveis que contêm antioxidantes e de promoção da saúde fitoquímicos como potenciais agentes terapêuticos (Vieira, 1999).

O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 532 nm e fluorescência em 553 nm (Thérond et al 2000).

Plantas medicinais possuem diversos compostos químicos com potencial antioxidante. Dentre as classes com essa propriedade, os compostos fenólicos tem recebido muita atenção, sobretudo por apresentarem comprovada atividade de inibição da peroxidação lipídica e da lipoxigenase *in vitro* (Sousa et al., 2007; Sun et al., 2012).

A espécie *Eugenia uniflora*, conhecida no Brasil como pitanga é uma planta arbórea da família Myrtaceae presente em todo o país. Além da sua atividade antimicrobiana, é muito pesquisada pelo seu potencial antioxidante (Velazquez et al., 2003) e hipotensor (Consolini & Sarubbio, 2002). Diversos fitoconstituintes de *E. uniflora* já foram isolados como os flavonoides, miricitrina, quercetina e o ramnosídeo 3- quercitrina, além de esteróides, compostos mono e triterpenóides, taninos, antraquinonas, fenóis, cineol e óleos essenciais (Bandoni et al., 1972; Wazlawik et al., 1997).

O gênero *Psidium* se destaca por apresentar espécies com grande potencial terapêutico e diversas atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas: atividade antioxidante, hepatoprotetora, antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, e anticestodea.(ABREU et al., 2006; UBOH, OKON e EKONG, 2010; CHEN et al., 2009; NAIR, KALARIYA e CHANDA, 2007; GONCALVES et al., 2008; ARIMA e DANNO, 2002; TEMGENMOGLA e ARUN, 2006). A espécie *Psidium soblealeanum* Proença Landrum, é conhecida popularmente como araçá de veado e está presente na região da Chapada do Araripe, no estado do Ceará.

Este trabalho teve como objetivo verificar os potenciais antioxidantes, *in vitro*, dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Psidium soblealeanum* por DPPH (difetil-picrilhidrazil) e TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), atividade citoprotetora e quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais, foi determinada adicionando-se 200 μ L da solução dos extratos (300, 100, 50 e 25 μ g/mL em etanol 99,6%) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 μ L de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. O teste foi realizado em triplicata. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico/ grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300, 100, 75, 25 e 10 μ g/mL).

Flavonóides

Foram preparadas soluções do extrato (300, 200, 100 e 50 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl₃) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL) diluída em etanol 99,6%.

Atividade antioxidante

Foram preparadas soluções com diferentes concentrações de cada extrato de *Psidium soubreleanum* e *Eugenia uniflora* (250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL) em triplicata. Em um tubo foram misturados 100 µL da solução do extrato e 3,9 mL de solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,06 mM e homogenizado com agitador de tubos, procedimento realizado em ambiente escuro. Para o branco, a amostra foi substituída por 100 µL de metanol. As leituras foram realizadas utilizando um filtro de comprimento de onda de 520 nm e repetidas a cada minuto até que foi observada a estabilização da leitura.

A curva padrão foi determinada realizando leituras no mesmo comprimento de onda (515 nm), porém com soluções de DPPH em diferentes concentrações (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM), sendo o branco determinado por metanol (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; RUFINO et al., 2007)

TBARS

A produção de TBARS de fosfolípido foi determinada usando o método de Ohkawa *et al.* (1979), com modificações. Foi preparada uma solução de gema de ovo, misturada com uma solução de hexano-isopropanol (3:2). Essa solução foi filtrada e rotaevaporada até a obtenção de resíduo sólido. Para ensaio TBARS solubilizou-se 0,05g do resíduo em 10 mL de água mili-Q. Para pré-incubação foi utilizado 100µl de fosfolipídio, 50µl de extrato nas concentrações de 100, 40, 10 e 4 µg/mL juntamente com um volume adequado de água deionizada. As amostras foram repetidas adicionando 14µl de Fe (60µM) e incubadas a 37°C, durante 1 h. Após a pré incubação foi adicionado 500µL de tampão ácido acético e 500µl de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,6% e incubado por 1h a uma temperatura de 100°C. Os tubos foram adicionados 2 ml de n-butanol e a mistura centrifugada. O sobrenadante foi retirado e a absorbância foi lida a 532 nm num espectrofotômetro.

Para a curva de MDA (malonaldeído) foi utilizada 500µL de ácido acético, 500µL de TBA (0,6%), MDA nas concentrações de 50, 100, 150, 200µL e volume adequado de água destilada para completar um volume de 1,5mL. Os testes fora feitos em triplicata e repetido duas vezes.

Avaliação do potencial citoprotetor do produto natural EEFEU e EHFPS contra metais pesados

De acordo com Coutinho et al (2008), modificado, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do EEFEU e EHFPS, foram determinados pelo ensaio de microdiluição usando suspensões de 10^5 UFC / ml em solução salina e extratos na concentração inicial de $1024\mu\text{g/mL}$. A CIM foi definida como a concentração mais baixa à qual não foi observado crescimento. Para a avaliação do efeito protetor EEFEU e EHFPS ao metal pesado, foi realizada uma modulação utilizando concentrações sub-inibitórias dos extratos, suspensões de 10^5 UFC / ml de *Escherichia coli* ATTC 11105 e *Candida albicans* 62 em meio M9 Tris com 2% de glicose e uma de concentração do sulfato de ferro II variando de 100 mM a 0,0488 Mm. As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 37°C . A concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, utilizando placas de petri com HIA para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fenóis totais e flavonoides

O extrato das folhas *P. sobraleanum* possui alto teor de polifenóis (417,48 mg/g) quando comparado com o extrato das folhas de *E. uniflora* (75,65 mg/g). Já em relação à quantidade de flavonóides o extrato de *E. uniflora* (42,46 mg/g) obteve um maior valor se comparado com *P. sobraleanum* (12,54 mg/g) (Tabela 1)

	ÁC.GÁLICO (padrão) (mg/g)	QUERCETINA (padrão) (mg/g)	EEFEU (mg/g)	EHFPS (mg/g)
Fenóis Totais	1079,06		75,65	417,48
Flavonóides		946,94	42,46	12,54

Tabela 1: Valores de Fenóis totais e Flavonoides do EFEU e EHFPS

* EEFEU – Extrato etanólico de *Eugenia uniflora*; EHFPS – Extrato hidroalcolólico de *Psidium sobraleanum*

A determinação de fenóis totais ou compostos fenólicos é a determinação de flavonóides, tocoferóis e ácidos fenólicos juntos, que são antioxidantes naturais.(Verma e Pratap 2010). Segundo Ratty & Das (1998), já foram relatados em alguns trabalhos os efeitos dos flavonoides sobre os sistemas biológicos e, dentre eles: capacidade antioxidativa; atividades anti-inflamatórias e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra o desenvolvimento de tumores, antihepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais.

TBARS

A inibição do processo de peroxidação lipídica utilizando fosfolipídio de ovo apresentou indício de redução quanto aos níveis basais para os extratos das folhas, esta redução não foi

considerada significativa para EEFEU. Foi observada inibição significativa para o EHFPS em todas as concentrações utilizadas tendo como melhor resultado as concentrações de 40 µg/mL e 10 µg/mL, quando o estresse oxidativo foi induzido com auxílio de Fe²⁺ (Figura 01).

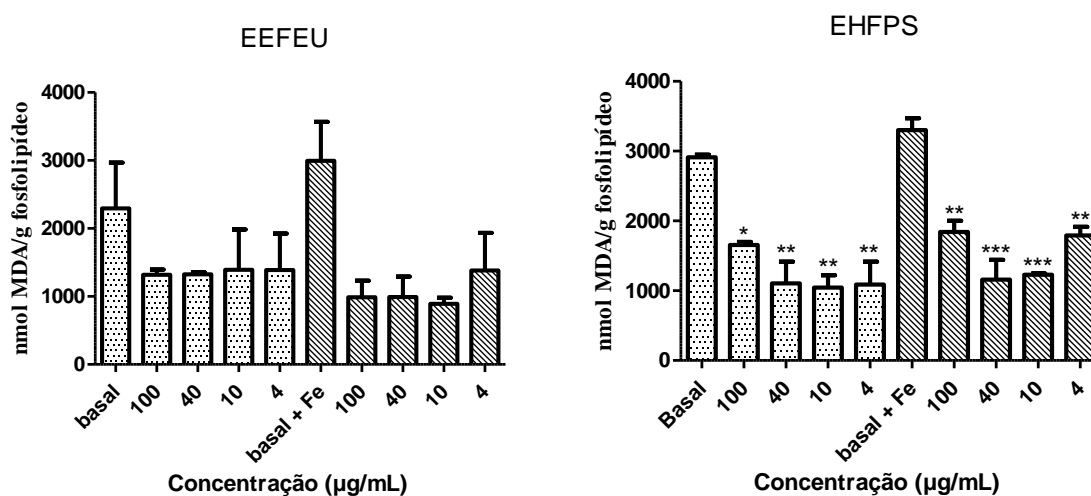


Figura 1: Propriedade antioxidante de EEFEU E EHFPS. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolipídeos de ovo foi determinada na ausência ou na presença de Fe²⁺ (10 mM). Os valores são expressos como média ± SEM de 2 experimentos independentes efetuadas em triplicata. *p<0,05 vs Fe²⁺ induzido; **p<0,01 vs Fe²⁺ induzido

Existe uma forte correlação entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como um marcador de peroxidação lipídica e os produtos que refletem o dano oxidativo ao DNA (Chen *et al.*, 2005). Aumento do stresse oxidativo induzido por sulfato de ferro (II) na formação de TBARS, em comparação com o normal, sugerem um possível dano de tecidos com uma sobrecarga de ferro (Fraga & Oteiza, 2002).

Sabir e Rocha (2008) determinaram a atividade antioxidante de *Phyllanthus niruri* (Euforbiaceae), utilizando diversas metodologias, entre elas, TBARS com fosfolipídio de ovo, nesse estudo foi induzido estresse oxidativo com ferro e nitroprussiato de sódio separadamente. Nas duas situações foram observadas reduções significativas da produção de MDA (p>0,05) na concentração de 100 µg/mL de extratos aquosos e metanólicos, sendo que os melhores resultados foram observados em relação ao ferro.

Atividade antioxidante

O ensaio utilizando DPPH avalia a capacidade sequestrante de radicais livres da amostra analisada. O radical livre DPPH é relativamente estável e sua ação sequestrante deve-se à abstração de um radical hidrogênio de compostos presentes nos extratos e frações, geralmente fenólicos (Lugasi et

al 1998). Magina et al 2010 , demonstraram que extratos e frações, principalmente das folhas, de espécies de *Eugenia* testadas apresentam uma atividade antioxidante bastante eficaz.

A atividade antioxidante foi mensurada com o método do DPPH e o resultado expresso em um valor de CE_{50} 185,47 $\mu\text{g/mL}$ e 305,10 $\mu\text{g/mL}$, para a *E. uniflora* e *P. sobroleanum*, respectivamente (Tabela 2). Com os dados obtidos no teste de TBARS, foi possível determinar a concentração letal média (CL_{50}) de 19,16 mg/mL para EEFEU e de 75,67 mg/mL para EHFPS e de 100,10 mg/mL para EEFEU e de 80,45 mg/mL para EHFPS. Quanto mais baixo for o valor da CL_{50} e da CE_{50} , maior é a potência antioxidante. Nesse contexto, o EEFEU, mostra-se mais efetivo quando comparado ao EHFPS, que pode está relacionada à elevada presença de flavonoides.

Amostra	CL_{50} (mg/mL)		CE_{50} (mg/mL)
	TBARS – basal	TBARS – Fe^{2+}	DPPH
EEFEU	19,16	100,10	185,47
EHFPS	75,67	80,45	305,10

Tabela 2: Atividade antioxidante e valores da CL_{50} e CE_{50} de EEFEU e EHFPS *EEFEU – Extrato etanólico de *Eugenia uniflora*; EHFPS – Extrato hidroalcolólico de *Psidium sobroleanum*

Avaliação do potencial citoprotetor do produto natural EEFEU e EHFPS contra metais pesados

Os resultados demonstraram que a presença dos extratos mostrou indiferente nas concentrações analisadas, visto que os microrganismos conseguiram sobreviver nas concentrações utilizadas de sulfato de ferro II e na modulação com EEFEU e EHFPS.

Nas células eucarióticas e em grande parte de células procarióticas, o ferro é particularmente necessário para a sobrevivência e propagação, tal como um membro de um grupo diverso de hemoproteínas que inclui proteínas envolvidas no transporte de oxigênio e de armazenamento (hemoglobina e mioglobina), a transferência de elétrons (citocromos) e síntese de DNA (ribonucleótido-redutase) (Hentze et al., 2004).

CONCLUSÃO

Observou-se através da captura do radical livre DPPH, uma melhor atividade antioxidante no extrato de *E. uniflora*,. Para o teste de TBARS , os extratos reduziram os níveis basais no processo de peroxidação lipídica, e quando induzidos por Fe^{2+} ,mas o extrato de *P. sobroleanum* mostrou-se mais eficiente. Portanto, através destes ensaios pode-se verificar que os extratos das folhas das espécies, *Eugenia uniflora* e *Psidium sobroleanum*, apresentam uma atividade antioxidante, diretamente relacionada com substâncias fenólicas produzidas.

LITERATURA CITADA

Abreu, P.R.C.; Almeida, M.C.; Bernardo, R.M.; Bernardo, L.C.; Brito, L.C.; GARCIA E.A.C.; Fonseca, A.S.; Bernardo-filho, M. Guava extract (*Psidium guajava*) alters the labelling of blood constituents with technetium-99m. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, vol. 7, p. 429-435, 2006.

Angela, B. R., Richard, C. K., Sandra, S. M., Robert, W. B., & Jack, A. H. (2005). Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312,509–516.

Arima, H.; Danno, G. Isolation of Antimicrobial Compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 66, n. 8, p. 1727 – 1730, 2002.

Bandoni, A.L.; Mendiondo, M.E.; Rondina, R.V.D.; Coussio, J.D. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia*, v. 35, p. 69–80, 1972.

Chen, H. J., Wu, C. F., & Huang, J. L. Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: Correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. *Toxicology Letters*, 155, 403–4102 ,2005.

Chen, H.C.; Sheu, M.J.; Lin, L.Y.; Wu, C.M. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *Journal of Essential Oil Research*, vol. 19, p. 345-347, 2007.

Consolini, A.E.; Sarubbio, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*, v.81, n.1, p. 57-63, 2002.

Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 80, 23–32, 2002.

Goncalves, F.A.; Andrade- neto, M.; Bezerra, J. N. S.; Macrae, A.; Sousa, O. V.; Fonteles-filho, A. A.; Vieira, R. H.S.F. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 50, p.11-15, 2008.

Coutinho, H.D.M.;Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Falcão-Silva, V.S.; Siqueira-Júnior, J.P.

Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008; 54:328–330, 2008.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. ; 117:285–297, 2004. [PubMed: 15109490]

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., & Van, P. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1242–1246, 1993.

Lugasi, A., E. Dworschak, A. Blazovics & A.Kery *Phytother. Res.* 12: 502-06, 1998.

Matos, F. J. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: UFC, 1988.

Magina, M.A.; Gilioli, A.; Moresco, H.H.; Colla , G.; Pizzolatti, M.G & Brighente, I.M.C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat. Am. J. Pharm.* 29 (3): 376-82, 2010.

- Nair, R.; Kalariya, T.; Chanda, S. Antibacterial activity of some plant extracts. *Phytotherapy Research*, vol. 22, p. 1030–1034, 2008.
- Ratty, A., K. and Das, P. N. Effects of Flavonoids on Nonenzymatic Lipid Peroxidation: Structure-Activity Relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 39, 69-79, 1998.
- Sabir, S. M.; Rocha, J. B. T. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. *Food Chemistry*, 111, 845–851, 2008.
- Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, pp. 270–276, 1998.
- Silva, C.G.; Herdeiro, R.S.; Mathias, C.J.; Panek, A.D.; Silveira, C.S.; Rodrigues, V.P.; Rennó, M.N.; Falcão, D.Q.; Cerqueira, D.M.; Minto, A.B.M.; Nogueira, F.L.P.; Quaresma, C.H.; Silva, J.F.M.; Menezes, F.S.; Eleutherio, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*, 52, 229-233, 2005.
- Sousa, C.M.M.; Silva, H.S.; Vieira-jr. G.M.; Ayres, M.C.C; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H.; Fenois totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.
- Sun, J.; Shao-fang, L.; Chu-shu, Z.; Li-na, Y.; Jie, B.; Feng, Z.; QING-LIY.; Chemical composition and antioxidant activities of *Brussonetia papyfera* fruits. *Plos One*, V 7, pg 1-8, 2012.
- Temgenmogla, V. T.; Arun, K.Y. Anticestodal efficacy of *Psidium guajava* against experimental *Hymenolepis diminuta* infection in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 38, n. 1, p. 29-32, 2006.
- Thérond, P.; Bonnefont-Rousselot, D.; Davit-Spraul, A.; Conti, M.; Legrand, A. ; *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 3, 373, 2000.
- Uboh, F. E.; Okon, I. E., Ekong, M. B. Effect of Aqueous Extract of *Psidium guajava* Leaves on Liver Enzymes. *Histological Integrity and Hematological Indices in Rats. Gastroenterology Research*, vol. 3, p. 32-38, 2010.
- Velazquez, E.; Tournier, H.A.; Mordujovich de buschiazzo, P.; Saavedra, G.; Schinella, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, v.74, n. 1-2, p. 91-97, 2003.
- Verma, A. K.; Pratap, R. The biological potential of flavones. *Natural Product Reports*, v. 27, n. 11, p. 1571-1593, 2010
- Vieira, R. F.. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In J. Janick (Ed.), *Perspective in new crops and new uses* (pp. 152–159). Alexandria, VA: AHS press.1999
- Wazlawik, E.; Dasilva, M.A.; Peteres, R.R; Correia, J.F.; Farias, M.R.C.; Ribeiro-do-vale, R.M.J. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 49, p. 433–437, 1997.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caro leitor, os testes de Fenóis totais e Flavonóides, Efeito quelante, Avaliação do potencial citoprotetor contra cloreto de mercúrio e o Teste de citoproteção em sementes de alface, com o extrato da espécie *Eugenia uniflora* L., presentes no artigo **Efeito citoprotetor de *Eugenia uniflora* L. contra os resíduos de contaminantes de cloreto de mercúrio** refere-se ao meu projeto original de dissertação.

5.4 Efeito citoprotetor de *Eugenia uniflora* L. contra os resíduos de contaminantes de cloreto de mercúrio

Francisco A. B. Cunha, Celestina Elba Sobral de Souza, Nadghia F. Leite, Antonio I. Pinho, Edinaldo F. F. Matias, Rosimeire S. Albuquerque, Henrique D. M. Coutinho

RESUMO:

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é um díptero muito utilizado nas pesquisas genéticas e que nas últimas décadas, surgiu como um dos melhores organismos para estudos de doenças humanas e pesquisas toxicológicas. A forma mercúrica, cujo principal representante é o cloreto de mercúrio $HgCl_2$, é alvo de inúmeras investigações porque, além de sua toxicidade intrínseca, é atribuída a ela a toxicidade do mercúrio elementar uma vez que, por oxidação é convertido em Hg^{+2} . *Eugenia uniflora* L. Myrtaceae, conhecida no Brasil como jabolão, é de grande interesse pelas aplicações medicinais, especialmente de suas folhas e frutos. Este trabalho teve como objetivo foi caracterizar, por CG-MS, os constituintes químicos do óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. e avaliar a sua ação bio-inseticida, em modelo de *Drosophila melanogaster*, bem como verificar o efeito citoprotetor e quelante do extrato de *E. uniflora* L. Os resultados obtidos neste experimento apontam para a potencialidade dos óleos essenciais como ferramentas a serem prospectadas biologicamente como bioinseticidas. Pelo fato de serem biodegradáveis, os óleos essenciais podem ser importantes ferramentas no controle biológico de pragas. Os resultados demonstram que o extrato apresenta efeito alelopático sobre as sementes de alface, e sua combinação com o cloreto de mercúrio ofereceu um maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa*, isso mostra que a vegetação pode ser uma alternativa para solucionar o problema com a contaminação por metais pesados, além de apresentar um potencial citoprotetora e uma ação quelante moderada.

PALAVRAS-CHAVE:

Bioinseticida, Geotaxia negativa, Efeito quelante, Citoproteção, *Eugenia uniflora* L.

Artigo submetido: Environmental and Experimental Botany, em 2013.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Eugenia uniflora*, conhecida no Brasil como pitanga é uma planta arbórea da família Myrtaceae presente em todo o país. Além da sua atividade antimicrobiana, é muito pesquisada pelo seu potencial antioxidante (VELAZQUEZ et al., 2003) e hipotensor (CONSOLINI & SARUBBIO, 2002). O óleo essencial de suas folhas contém citronol, geraniol, cineol e sesquiterpenos. Extratos obtidos das folhas da pitangueira vêm sendo utilizados na medicina popular em países como Brasil, Argentina e Paraguai, no tratamento de hipertensão, diabetes, colesterol, dificuldades de digestão, doenças hepáticas, amigdalite, distúrbios intestinais, reumatismo, gripe, além de apresentar princípios antimicrobianos e antifúngicos (OLIVEIRA et al 2006; SIMÕES et al 1989).

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é um díptero muito utilizado nas pesquisas genéticas e que nas últimas décadas, surgiu como um dos melhores organismos para estudos de doenças humanas e pesquisas toxicológicas (Siddique et al., 2005). Outra vantagem é a ausência de mitose celular nas moscas em fase adulta. Desse modo, a mosca na fase adulta tem envelhecimento sincronizado das suas células, exceto as células das gônadas e algumas do intestino (Jimenez-Del-Rio et al., 2009). Isso torna possível a determinação dos danos causados por um xenobiótico ao longo do tempo e a viabilidade celular. Portanto o modelo de atividade bio-inseticida utilizando *Drosófila* pode ser uma alternativa relevante na busca de plantas do bioma Caatinga, com atividade bioinseticida.

Os metais pesados são geralmente tóxicos aos organismos vivos, sendo, portanto, considerados poluentes. Alguns metais pesados tóxicos possuem efeito deletério, ocasionando sérios transtornos à saúde humana quando ingeridos em doses inadequadas (GUEDES et al., 2005). As plantas podem acumular metais pesados em todos os tecidos, podendo transferi-los para a cadeia alimentar (SHWANTZ et al., 2008). O acúmulo de metais pesados nas plantas pode ocorrer sem que haja manifestação de sintomas de toxicidade e prejuízo para a produção de culturas (JEEVAN RAO e SHANTARAN, 1996; CUNHA et al., 2008), interferindo, na qualidade dos alimentos (SOARES et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sua ação bio-inseticida, em modelo de *Drosophila melanogaster*, bem como verificar o efeito citoprotetor e quelante do extrato de *E.uniflora* L.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

O material botânico de *Eugenia uniflora* L., foi coletado no Horto Botânico de Plantas Medicinais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, da Universidade Regional do Cariri – URCA. Coordenadas: 07° 14' 18,2" de latitude S. e 39° 24' 53" W. de Greenwich. O material vegetal foi identificado e foi depositada uma exsicata no herbário Dárdano Andrade Lima- URCA da Universidade Regional do Cariri- URCA, sob o número #3106.

2.1.1. Obtenção de óleo essencial

Folhas de *E. uniflora* L. foram coletadas as 09:00 horas, ± 30 minutos, picotadas em pedaços de aproximadamente 1 cm² e acondicionadas em balão de vidro de 5 litros, sendo submetidas a extração com aparelho de Clevenger, conforme metodologia descrita por MATOS (2009), obtendo-se um rendimento de 0,08%.

2.1.2 Preparação do extrato etanólico das folhas de Eugenia uniflora L.

Para preparação dos extratos foram coletados 650 g das folhas, que permaneceram submersos em etanol por 72h à temperatura ambiente, sendo após esse período, filtrado e concentrado em condensador rotativo a vácuo (model Q-344B- Quimis, Brazil) e banho maria (model Q214M2- Quimis Brazil), obtendo-se rendimento do extrato bruto de 6,97g.

2.3. Microrganismos

A bactéria utilizada foi *Escherichia coli* 11105, cedida pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

2.4. Cultivo de *Drosophila melanogaster*

Moscas *Drosophila melanogaster* criadas no Drosofilário do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM, da Universidade Regional do Cariri –URCA. As moscas foram gentilmente cedidas, para início da criação, do Laboratório do Prof. Dr. Jeferson Franco da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, São Gabriel – RS.

2.5. Fenóis totais e Flavonóides

A quantidade de fenóis totais, foi determinada adicionando-se 200 µL da solução dos extratos (300, 100, 50 e 25 µg/mL em etanol 99,6%) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10% v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 µL de carbonato de sódio 7,5%, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. O teste foi realizado em triplicata. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico / grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico.

A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300, 100, 75, 25 e 10 µg/mL).

Para quantificação de flavonóides foram preparadas soluções do extrato (300, 200, 100 e 50 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl_3) com contração de 2% peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes / grama de extrato.

A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL) diluída em etanol 99,6%.

2.6. Efeito quelantes

A metodologia utilizada foi de Benzie e Strain (1996, 1999) com modificações, adaptada para o ensaio. O princípio baseia-se na formação de O-fenantrolina- Fe^{2+} e complexo e a sua ruptura, na

presença de agentes quelantes. Adicionou 100 µl de cada extrato, variando de 64 a 2048µg foram adicionados a 50 mL de solução aquosa 2,0 mM de FeSO₄. Os controles continham todos os reagentes de reação, exceto o extrato ou substância de controle positivo. Depois de 10 minutos de incubação, a reação foi iniciada em 200 µl de 6,0 mM O-fenantrolina. Após um período de equilíbrio de 10 min, foi registrada a absorbância a 510 nm. As atividades de quelação de ferro, foram calculados a partir da absorbância do controle (Ac) e da amostra (A) usando uma equação e expressa em equivalentes (Na₂EDTA mg / g extrato). Os valores são apresentados como as médias de análises das triplicatas.

2.7. Avaliação do potencial citoprotetor de EEFEU contra cloreto de mercúrio

De acordo com Coutinho et al (2008), com modificações, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do EEFEU foi determinada pelo ensaio de microdiluição usando suspensões de 10⁵ UFC / ml em solução salina e extratos na concentração inicial de 1024µg/mL. A CIM foi definida como a concentração mais baixa à qual não foi observado crescimento. Para a avaliação do efeito protetor EEFEU ao metal pesado, foi realizada uma modulação utilizando concentrações sub-inibitórias dos extratos, suspensões de 105 UFC / ml de *Escherichia coli* ATTC 11105 em meio M9 Tris com 2% de glicose e uma de concentração do cloreto de mercúrio variando de 10 mM a 0,004883 mM. As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 37 ° C. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinadas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, utilizando placas de petri com HIA para transferência das soluções incubadas em placas de microdiluição.

2.7. Teste de citoproteção em sementes de alface (Germinação)

Os experimentos foram conduzidos em placas de petri limpas, secas e estéreis forradas com dois discos de papel filtro, onde foram dispostas as sementes de alface. Em cada placa foi adicionado 3 mL da solução. A concentração de extrato foi de 256µg/mL, o Cloreto de Mercúrio nas concentrações de 1,25mM, 0,5mM, 0,1mM e 0,05mM e a placa controle foi umedecida com 3mL de água destilada. Os experimentos foram conduzidos em câmara de

germinação do tipo BOD a temperatura de aproximadamente 25°C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três repetições de 20 sementes por placa. Os parâmetros analisados ao final dos sete dias foram: contagem do número de sementes germinadas, cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG), biometria do caulículo e da radícula, número de necrose radicular e anormalidades das plântulas, seguindo o Manual de regras para análise de sementes (BRASIL, 2009). Foram consideradas germinadas as sementes cujas radículas atingiram 1 mm de comprimento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi avaliado a cada 24 horas, sendo determinado através do somatório da razão entre o número de sementes germinadas no dia i (n_i) e o número de dias (i) (FERNANDES et al., 2007).

2.8. Testes de Mortalidade

Moscas adultas (machos e fêmeas) foram dispostas em frascos de 330 mL, previamente preparados com uma solução de sacarose em água destilada, na concentração de 20%, esta solução foi embebida em 1 grama de papel filtro, disposto no fundo do vidro. Na tampa rosqueável do vidro, foi introduzida uma contra-tampa de Poli Tereftalato de Etila – PET, onde foi aderido, por fita adesiva, papel vegetal para receber as diversas concentrações do óleo essencial. Os vidros receberam os seguintes tratamentos: Controle Sacarose a 20%, Tratamento com óleo essencial a 2,5 mg, 5 mg e 7,5 mg, com ciclo de claro, escuro de 12 horas e temperatura controlada a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. As leituras do experimento foram feitas a cada: 6, 12, 24 e 48 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Fenóis totais e flavonóides

Os resultados na Tabela 1 mostram a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides do EEFEU. A extração de compostos fenólicos de produtos naturais é altamente influenciada pelo

solvente utilizado. Observa-se que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior a quantidade de compostos fenólicos extraídos (GAMÉZ-MEZA et al., 1999).

A atividade antioxidante está frequentemente relacionada à quantidade de compostos fenólicos nas plantas. Estudos mostraram que classes destes compostos em vegetais, como os taninos, exibem também um potencial redutor sobre íons metálicos. A inibição da peroxidação lipídica também foi colocada como uma das mais importantes atividades exibidas por estes compostos (OKUDA et al., 1992).

3.2. Efeito Quelante

Os resultados na Tabela 1 mostram a concentração quelante de 50% da concentração do metal, em comparação com o EDTA, 136 µg/mL (IC₅₀), o EEFEU apresentou uma ação quelante de metal bastante significativa, com uma IC₅₀ no valor de 2430,86µg/mL.

De acordo com Cobbet et al., 2002, a retenção intracelular de metais é um mecanismo eficaz para minimizar consequentes efeitos tóxicos nas plantas, sendo os agentes quelantes de metais, por exemplo, ácidos orgânicos e aminoácidos, moléculas importantes.

3.3. Avaliação do potencial citoprotetor de EEFEU contra Cloreto de Mercúrio

De acordo com os resultados apresentados na figura 1, é possível afirmar uma relevante ação protetora do extrato em relação ao controle, uma vez que as bactérias sobreviveram nas concentrações mais elevadas do metal. Segundo Brown et al., 2002, em bactérias Gram-negativas, uma MerP (proteína mercúrio periplasmática) utiliza dois resíduos de cisteína para deslocar Hg(II), onde este interage com o par distal de cisteína da MerT e é transportado até o citosol da célula, onde sofrerá redução. Através da membrana interna dos microrganismos Gram-negativos, o mercúrio é submetido à ação da mercúrio redutase (BARKAY et al., 2003).

3.4. Teste de citoproteção em sementes de alface (Germinação)

No teste de citoproteção foram preparados tratamentos de água, extrato e diferentes concentrações de cloreto de mercúrio, como também a associação do extrato com o metal utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*).

De acordo com a figura 2, a presença do extrato de *Eugenia uniflora* reduziu de forma significativa o comprimento dos caulículos e das radículas da alface.

Segundo Simeoni *et al.* (1984) plantas folhosas de crescimento rápido como a alface tendem a acumular mais metais do que cereais, gramíneas, legumes e olerícolas tuberosas.

O acúmulo de metais nas células pode interferir no desenvolvimento da planta, fato que pode ser comprovado na figura 3. Ainda na mesma figura observa-se que a presença do extrato dispôs uma proteção proporcionando um maior crescimento das radículas com metal nas concentrações 0,1 e 0,5mM e nos caulículos na concentração de 0,5mM do cloreto de mercúrio. Esse resultado pode ser devido à presença de antioxidantes fenólicos, tais compostos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992).

CONCLUSÃO

O extrato combinado com o cloreto de mercúrio ofereceu um maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa*, nesse contexto, a vegetação pode ser uma via para solucionar o problema com a contaminação por metais pesados, além de apresentar um potencial citoprotetor e uma ação quelante bastante significativa.

TABELAS E FIGURAS

	Ácido gálico	Quercetina	EEFEU	EDTA
Fenóis totais	1079,06 mg/g	-	75,65 mg/g	-
Flavonoides	-	946,94 mg/g	42,46 mg/g	-
IC ₅₀	-	-	2430,86µg/ml	-
IC ₅₀	-	-	-	136µg/ml

Tabela 1: Fenóis totais, flavonoides e efeito quelante de EEFEU.

EEEU – Extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* L.; IC₅₀ – Concentração quelante de 50% de Fe.

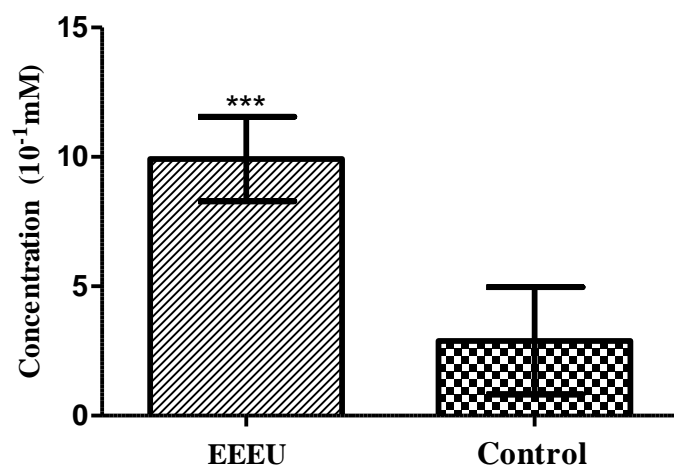


Figura 1 – Efeito citoprotetor de *Eugenia uniflora* contra *Escherichia coli*. EEEU – Extrato etanólico das folhas de *Eugenia uiflora*. *** valor estatisticamente significante com $p < 0.05$.

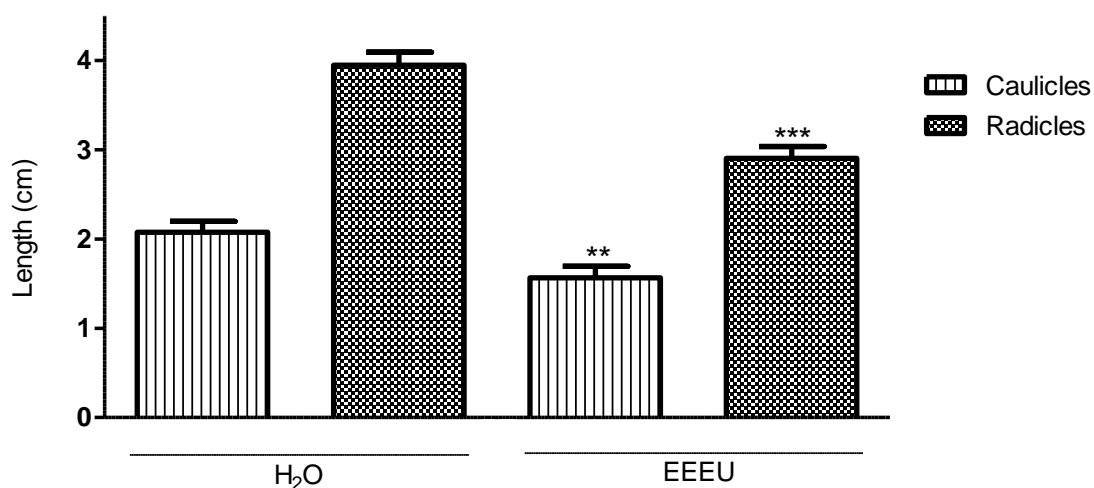


Figura 2. Germinação e extensão de caulículos and radículas de *Lactuca sativa*. Concentração do produto natural usado foi 256ug/ml. EEEU Extrato etanólicos das folhas de *Eugenia uiflora*.*** valor estatisticamente significante com $P < 0.05$.

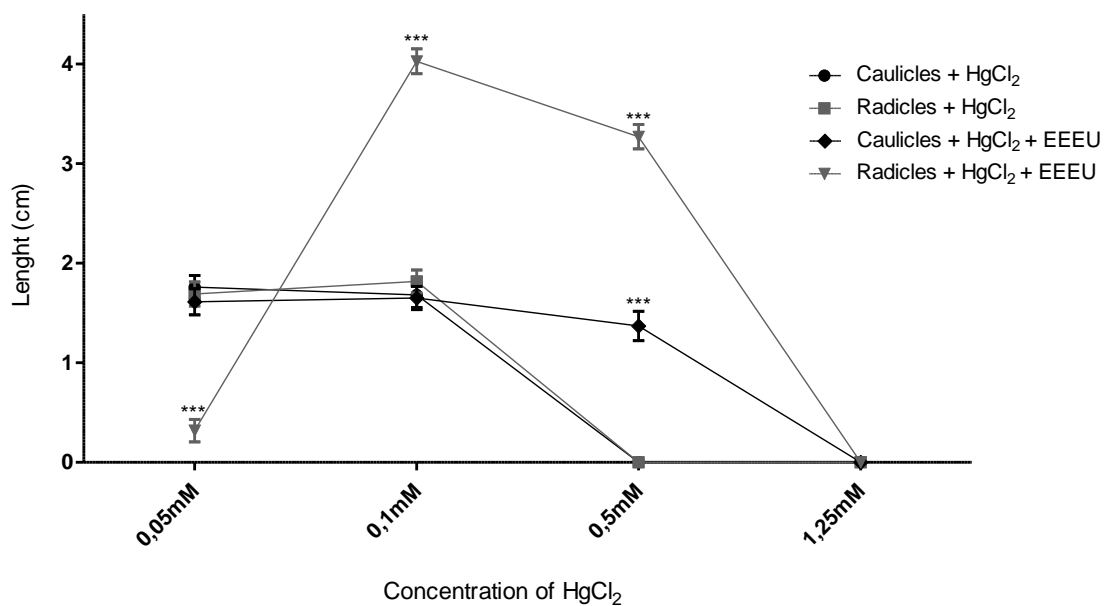


Figura 3. Efeito citoprotetor de *Eugenia uniflora* associado com HgCl₂. *** valor estatisticamente significativo com $P < 0.05$.

REFERÊNCIAS

1. BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiology Reviews, v. 27, 355-384, 2003.
2. BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. T., 1996. The ferric reducing ability of pLASMA (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, Anal Biochem, 239 70.
3. BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T., 1999. Total antioxidant capacity of Teas by the Ferric Reducing/ antioxidant power assay, J Agric Food Chem, 47 633.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura. 2009. Departamento de Produção Vegetal, Divisão de Sementes e Mudás. Regras para análise de sementes. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 188p.
5. BROWN, N. L. et al. Mercury transport and resistance. Biochemical Society, v. 30, 715- 718, 2002.

6. COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P., Phytochelatins and metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 2002, 53 (1), 159-182.
7. CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, n.1, p. 57-63, 2002.
8. COUTINHO, H. D. M. et al., 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis*. And chlorpromazine. *Chemotherapy* 54:328–330.
9. CUNHA,K.P.V.; NASCIMENTO,C.W.A.; PIMENTEL,R.M.M.; ACCIOLY,A.M.A.; SILVA,L.A. Disponibilidade,acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa,v.32,p.1319-1328,2008**
10. FERNANDES, L. A. V., MIRANDA, D. L. C.; SANQUETTA, C. R. Potencial alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. *Revista Academica de Curitiba*, v. 5, n. 2, p. 139-146, 2007.
11. GAMÉZ-MEZA, N. et al. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 12, p. 1445- 1447, 1999.
12. GUEDES,J.A.; LIMA,R.F.S.; SOUZA,L.C. Metais pesados em água do rio Jundiáí-Macaíba/RN. **Revista de Geologia,v.18,n.2,2005.**
13. JEEVAN RAO,K. & SHANTARAM,M.V. Effect of urban solid wastes on dry matter yield, uptake of micronutrients and heavy metals by maize plants. **Journal of Environmental Biology,v.17,p.25-32,1996.**
14. MATOS, F. J. de A., 2009. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza. p.148.
15. OKUDA, T., T. YOSHIDA, T. HATANO, K. YAKAZI & M. ASHIDA (1982) *Phytochemistry* 21: 2871-74.
16. OLIVEIRA AL, LOPES RB, CABRAL FA, EBERLIN MN. Volatile com-18. pounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry* 2006;99(1):1-5.

17. SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
18. SHWANTZ,M.; FERREIRA,J.J.; FRÖEHLICH,P.; ZUANAZZI, J.A.S.;HENRIQUES,A.T. Análise de metais pesados em amostras de *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae). **Brazilian journal of Pharmacognosy, n.18,v.1,Jan/Mar.2008.**
19. SIMEONI, L.A.; BRABARICK, K.A.; SABEY, B.R. Effect of a small-scale composting of sewage sludge on heavy metal availability to plants. Journal Environmental Quality, v. 13, p. 264-268, 1984.
20. SIMÕES CMO. Plantas de medicina popular do Rio Grande do Sul. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS; 1989.
21. SOARES,CL.R.F.S.; ACCIOLY,A.M.A.; MARQUES,T.C.C.L.S.M.; SIQUEIRA,J.O.; MOREIRA,F.M.S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes,caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,v.13,n.3,pp.302-315,2001.**
22. VELAZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia, v.74, n. 1-2, p. 91-97, 2003.**

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos de *Eugenia jambolana* Lam. e *Eugenia uniflora* L. apresentaram fenóis e flavonoides;

Os extratos de *Eugenia jambolana* Lam. e *Eugenia uniflora* L. demonstraram atividade antioxidante através dos ensaios de DPPH e TBARs;

Os extratos de *Eugenia jambolana* Lam. e *Eugenia uniflora* L demonstraram ação quelantes;

Os extratos de *E. jambolana* Lam. e *Eugenia uniflora* L. apresentaram efeito citoprotetor em modelo bacteriano;

O extrato de *Eugenia jambolana* Lam., em modelo vegetal apresentou efeito alelopático;

Os extratos de *E. jambolana* Lam. e *E. uniflora* L, quando combinados com o cloreto de mercúrio proporcionaram um maior crescimento nas radículas e nos caulículos da *Lactuca sativa*.

REFERÊNCIAS

7. REFERENCIAS

ALICE, C.B.; VARGAS, V.M.; SILVA, G.A.; DE SIQUEIRA, N.C.; SCHAPOVAL, E.E.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J.A.; HENRIQUES, A.T. **Screening of plants used in south Brazilian folk medicine.** Journal Ethnopharmacology, v.35, pp. 165-171, 1991.

ALMEIDA, E.M.M.de. **Efeito do mercúrio em comunidades bacterianas associadas a plantas.** Dissertação de Mestrado da Universidade de Aveiro, 2011. 122p

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina.** Bases Clínicas y Farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones S.R.L.,1998.

AMAROWICZ, R. et al. **Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.** Food Chemistry, v. 84, n. 04, p. 551-562, 2004.

AURICCHIO, M.; BACCHI, E.M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 62, n. 1, p. 55 – 61, 2003.

BAILEY, A. E.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3.

BAKER, A. J. M.; McGRATH, S. P.; SODOLI, C. M. D.; REEVES, R. D. **The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metalaccumulating plants.** Resources, Conservation and Recycling, Amsterdam, v. 11, p. 41-49, 1994.

BALIGA, M.S.; BHAT, H.P.; BALIGA, B.R.V.; WILSON, R.; PALATY, P.L. **Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review.** Food Research International, v.44, pp. 1776–1789, 2011.

BANDONI, A.L.; MENDIONDO, M.E.; RONDINA, M.E.; COUSSIO, J.D. **Survey of Argentine medicinal plants. Folklore and phytochemical screening.** Lloydia, v.35, pp.69-80, 1972.

BARKAY, T.; MILLER, S.M.; SUMMERS, A.O **Bacterial mercury resistance from atoms ecosystems.** FEMS Microbiology Reviews, v.27, 355-384, 2003.

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

BENZIE, I.F.F.; SZETO, Y.T. **Total antioxidant capacity of Teas by the Ferric Reducing/antioxidant power assay,** J Agric Food Chem, v.47, p.633, 1999.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. T. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay.** Analytical Biochemistry, v.239, p.70. 1996.

BHUIYAN, M.S.A.; MIA, M.Y.; RASHID, M.A. **Antibacterial principles of the seeds of *Eugenia jambolana*.** Bangladesh Journal Botany, v.25, n.2, pp. 239–241, 1996.

BIESALSKI, H.K. Free radical theory of aging. **Curr. Opin. In Clin. Nutrition and Metabolic Care,** v.5, n.1, p.5-10, 2002.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A.G. Interpretação de resultado de germinação. *In:* Ferreira, A.G.; Borghetti, F. **Germinação: do básico ao aplicado.** Artmed, Porto Alegre, p.209-224, 2004.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZILOLO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. **Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district,** Revista brasileira ciências farmacêutica, v.42, p.195-202, 2006.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas. São Paulo. CETESB, 2001.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. **Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds.** Journal Ethnopharmacology, v.91, pp. 105–108, 2004.

CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B.K.; VAID, L.K. **Antibacterial activity of *Syzygium* species.** Fitoterapia, v.69, pp. 356–367, 1998.

CHUN, S-S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y-T.; SHETTY, K. **Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against Helicobacter pylori** . Process Biochemistry, v.40, pp. 809-816, 2005.

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

COUTINHO, H.D.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JR, J.P.; LIMA, E.O. **In vitro screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L.** Revista Brasileira de Biociências, v.8, n.3, pp. 299-301, 2010.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. **Anthocyanin antioxidants from edible fruits**. Food chemistry, v.84, p.23-28, 2004.

FERNANDES, L. A. V., MIRANDA, D. L. C.; SANQUETTA, C. R. **Potencial alelopático de *Merostachys multiramea* Hackel sobre a germinação de *Araucaria angustifolia* (Bert.)Kuntze**. Revista Academica de Curitiba, v.5, p.139-146, 2007.

FRANCO, J.L.; BRAGA, H.C.; STRINGARI, J.; MISSAU, F.C.; POSSER, T.; MENDES, BG.; LEAL, R.B.; SANTOS, A.R.; DAFRE, A.L.; PIZZOLATTI, M.G AND OTHERS. **Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quecertin**. Chemical Research Toxicology, v.20, n.12, pp.1919-1926, 2007.

GIOVANELLA, P.; BENTO, F. **Isolamento e seleção de microorganismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio**. Química Nova, v.34, n.2, p.232- 236, 2011.

GUEDES, J. A.; LIMA, R. F. S.; SOUZA, L. C. **Metais pesados em água do rio Jundiá-Macaíba/RN**. Revista de Geologia, v.18, n.2, 2005.

GUEDES, R.S.; ALVES, E.U.; COSTA, E.M.T.; SANTOS-MOURA, S.S.; SILVA, R.S.; CRUZ, F.R.S. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith**. Bioscience Journal, v. 29, n. 4, p. 859-866, 2013.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence. **The lancet**, v.344, p.721-724, 1994.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. **Advances in flavonoid research since 1992**. *Phytochemistry*, v.55, n.6, pp.481-504, 2000.

HASLAM, E. **Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action**. *Journal Natural Products*, v.59, n. 2, pp 205–215, 1996.

HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB). Mercury. In: TOMES CPS SYSTEM. **Toxicology, occupational medicine and environmental series**. Englewood: Micromedex. CD-ROM.200.

JAGETIA, G.C.; BALIGA, M.S. ***Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiationinduced DNA damage inthe cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study**. *Toxicology Letters*, v.132, n.1, p.19 – 25, 2002.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, S.L.; MCLAUGHLIN, M.L. **De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity**. *Journal of medicinal chemistry*, v.39, pp.3107-3113, 1996.

JOHNSON, L.A.S.; BRIGGS, B.G. **Myrtales and Myrtaceae: a phylogenetic analysis**. *Annals of the Missouri Botanic Garden*, v.71, pp. 700-56, 1984.

KHARE, C.P. **Encyclopedia of indian medicinal plants Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg/New York, p. 207–208, 2004.

KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. 1^a ed., v. 10. Berlin (Alemanha): Springer; 2011.

LABUZA, T. P. **Kinetics oflipid oxidation in foods** *Critical Reviews Food Technology*, v.3, p.355, 1971.

LEONARD, S.S.; HARRIS, G.K.; SHI, X. **Metal-induced oxidative stress and signal transduction**. *Free Radic Biol Med*, v.37, n.12, pp. 1921-42, 2004.

- LIMA, E.R.Z.; COLON, J.C.; SOUZA, M.T. **Alterações auditivas em trabalhadores expostos ao mercúrio.** Revista CEFAC, v.11, n.1, pp.62-67, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda; 2002.
- LUCAS, E.J.; BELSHAM, S.R.; NIC LUGHADHA, E.M.; ORLOVICH, D.A.; SAKURAGUI, C.M.; CHASE, M.W.; WILSON, P.G. **Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited Myrtaceae – preliminary molecular evidence.** Plant Systematics and Evolution, v. 251, pp.35-45, 2005.
- LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; SILVA, C.C.; SHUQUEL, I.T. A., BASSO, E. A.; VIDOTTI, G. J. **Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*.** Journal of Brazilian. Chemical Society, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2001.
- LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. Comp Biochem Physiol B, v.144, p. 283-289,2006.
- MOURE, A. et al. **Natural antioxidants from residual sources.** Food Chemistry, v. 72, n. 02, p. 145-171, 2001.
- MUKHERJE, P.H.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S.C.; PAL, M.; SAHA, P. **Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India.** Journal of Ethnopharmacology, v.60, n.1, p. 85-89, 1998.
- MURTHE, J.; XIAO, Z.F.; LINDQVIST, O. **The aqueous reduction of divalent Mercury by sulfe.** Water, Air, & Soil Pollution. v.56, n.1, p.621-630, 1991.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food.** Journal of Chromatography A, v.1054, n.1-2, pp.95-111, 2004.
- NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Sixth Edition.** NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, 2008.

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.** International Journal Aromatherapy, v.15, pp.147-52, 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** Analytical Biochemistry, v.95, p.351, 1979.

PEPATO, M.T, MORI, D.M.; BAVIERA, J.B.; HARAMI, R.C.; VENDRAMINI, R.; BRUNETTI, I.L. **Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes.** Journal Ethnopharmacol, v.96, n.1-2, p.43-48, 2004

PEPATO, M.T.; FOLGADO, V.B.B.; KETTELHUT, I.C.; BRUNETTI, I.L. **Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.34, p.389-395, 2001.

PLETSH, M.; CHARLWOOD, V.; ARAÚJO, B. S. Fitorremediação de águas e solos poluídos. Biotecnologia, ciência e desenvolvimento, II, p26-29. 1999.

RAJASEKARAN, M.; BAPNA, J.S.; LAKSHMANAN, S.; RAMACHANDRAN NAIR, A.G.; VELIATH, A.J.; PANCHANADAM, M. **Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers.** Journal of Ethnopharmacology, v.24, n. 1, p. 115-121, 1988.

RAO, K.V.M.; SRESTY, T.V.S. Antioxidant parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science, Amsterdam, v. 157, p. 113-128, 2000.

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

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. **Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense.** Life Science, v. 75, p. 2717–31, 2004b.

RUFINO, M. do S. M. **Propriedades Funcionais de Frutas Tropicais Brasileiras não Tradicionais**. Mossoró, 2008. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitotecnia, Área de Concentração: Agricultura Tropical, Linha de pesquisa: Bioquímica, Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita). Universidade Federal Rural do Semi-Árido em Mossoró-RN.

SALVAT, A., ANTONNACCI, L., FORTUNATO, R. H., SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. **Screening of some plants from North Argentin for their antimicrobial activity**. Letters in Applied Microbiology, v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, C.B.A.; HENRIQUES, A.T. **Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L.** Journal of Ethnopharmacology, v.44, n.3, p. 137-142, 1994.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidant enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v. 105, p. 39-44, 1999.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. **Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility test and bioassay** In: LENNETTE, E. H.; BALLOWS, A.; HAUSLERS JR. V.; SHADOMY, H. J. (Eds). *Manual of clinical microbiology*. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, p.991-999. 1985.

SHAFI, P.M.; ROSAMMA, M.K.; JAMIL, K.; REDDY, P.S. **Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoriceum* leaf essential oils**. *Fitoterapia*, v.73, n.5, pp. 414-416, 2002.

SHAIKH, M.R.; BAQIR-MALEKA, F.A.; NAQVI, S. **Partial purification and antibacterial studies of extracts from *Eugenia jambolana* Linn and *Vinca rosea* Linn. Pak.** *Journal Scientific and Industrial Research*, v.37, n.6-7, pp. 279-280, 1994.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S. **Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, n. 3, p. 367 – 373, 2006.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S.; DEV, G. **Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxaninduced diabetic rabbits.** Journal of Ethnopharmacology, v.85, n.2-3, p.201-206, 2003.

SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. IN: PRASAD, M.N.V. (ed.) Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 84-126, 2004.

SHETTY, K.; CHUN, S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. **Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*.** Process Biochemistry, v. 40, p. 809-816, 2005.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**, 4ªEd, Porto Alegre: Bookman, 2008.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-Ciocalteu reagent. In Methods in Enzymology; Packer, L., Ed.; Academic Press: Orlando, FL, 1999; Vol. 299, pp 152-178

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B. M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. **Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants.** Pharmacological Research, v.52, 229-233, 2005.

SILVER, S. **Bacterial resistances to toxic metal ions- a review.** Gene, v.179, pp. 9-19, 1996.

SILVER, S.; HOBMAN, J.L. **Mercury Microbiology: Resistance Systems, Environmental Aspects, Methylation, and Human Health.** Microbiology Monographs. v 6, p.357-370, 2007.

SOARES, S.E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** Revista de Nutrição, v.15, n.1, pp.71-81, 2002.

SOBRAL-SOUZA, C.E.; LEITE, N.F.; CUNHA, F.A.B.; PINHO, A.I.; ALBUQUERQUE, R. S.; CARNEIRO, J. N.; MENEZES, I.R.; COSTA, J.G.M.; FRANCO, J. L.; COUTINHO, H.D.M. **Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam.**. *Arabian Journal Chemistry*, v. 7, p. 165-170, 2014.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2010. Myrtaceae. In: Forzza, R.C. et al. (eds.). **Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB010262>>. Acesso em 10 Out 2013

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

SOUZA, E.P.; SILVA, I.F.; FERREIRA, L.E. **Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas**. *R. Bras. Agrocência, Pelotas*, v.17, n.2-4, p.167-173, 2011.

STEPANAUSKAS, R., GLENN, T.C.; JAGOE, C.H.; TUCKFIELD, R.C.; LINDELL, A.H.; KING, C.J.; MCARTHUR, J.V. **Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments**. *Environment Science Technology*, v.39, pp. 3671-3678, 2005.

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

TAVARES, T.M., CARVALHO, F.M. **Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano**. *Química Nova*, v.15, n.2, p.147-53, 1992.

THORNE, R.F. **Classification and Geography of Flowering Plants**. *Botanical Review*, v.58, pp. 225-348, 1992.

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**. *Química Nova, São Paulo*, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VELAZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. **Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts.** *Fitoterapia*, v.74, n. 1-2, p. 91-97, 2003.

VERBEL, J.O.; RESTREPO, B.J. **El lado gris de la minera del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia.** Colombia, p.123, 2002.

VIKRANT, V.; GROVER, J.K.; TANDON, N.; RATHI, S.S.; GUPTA, N. **Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, n. 2, p. 139-143, 2001.

WARD, F.E.; GARLING, D.L.; BUCKLER, R.T.; LAWLER, D.M.; CUMMINGS, D.P. **Antimicrobial 3-methylene flavanones.** *Journal Medicinal Chemistry*, v.24, n.9, pp.1073-7, 1981.

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.M.; GADEK, P.A.; QUINN, C.J. **Myrtaceae Revisited: A Reassessment of Intrafamilial Groups.** *American Journal of Botany*, v. 88, n.11, pp 2013-2025, 2001.

WOISKY, R. AND SALATINO, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37: 99-105.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Methylmercury.** *Environmental Health Criteria*, pp.118:144, Geneva, 1990.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In: SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC; 2007

ANEXOS



King Saud University
Arabian Journal of Chemistry

www.ksu.edu.sa
www.sciencedirect.com



SPECIAL ISSUE: ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam.

Celestina E. Sobral-Souza ^a, Nadghia F. Leite ^a, Francisco A.B. Cunha ^a,
Antonio I. Pinho ^a, Rosimeire S. Albuquerque ^a, Joara N.P. Carneiro ^a,
Irwin R.A. Menezes ^b, José G.M. Costa ^c, Jeferson L. Franco ^d,
Henrique D.M. Coutinho ^{a,*}

^a Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, 63105-000 Crato, CE, Brazil

^b Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, 63105-000 Crato, CE, Brazil

^c Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, 63105-000 Crato, CE, Brazil

^d Universidade Federal dos Pampas, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

Received 11 July 2013; accepted 5 October 2013

KEYWORDS

Bioinsecticide;
Negative geotaxis;
Chelating effect;
Cytoprotection;
Eugenia jambolana

Abstract The fruit fly *Drosophila melanogaster* is often utilized in genetic research, and in the last decades, it has become one of best organisms for studies of human diseases and toxicological research. Mercury chloride (HgCl₂), the main representative of mercury compounds, is the target of numerous investigations, not only because of its intrinsic toxicity but also because it accounts for the toxicity of elemental mercury since the latter is converted to Hg²⁺ by oxidation. *Eugenia jambolana* Lam. Myrtaceae, known in Brazil as “jambolão”, is of great interest because of its medicinal applications, especially its leaves and fruits. The aim of this work was to characterize, by CG–MS, the chemical constituents of the essential oil of *Eugenia jambolana* and to evaluate its bioinsecticidal action in the *Drosophila melanogaster* model, as well as to determine the cytoprotective and chelating effect of the extract of *E. jambolana*. The results obtained here point to the

* Corresponding author. Address: Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000 Crato, CE, Brazil. Tel.: +55 (88) 3102 1212; fax: +55 (88) 3102 1291.

E-mail addresses: hdmcoutinho@gmail.com, hdo.uglas@zipmail.com.br (H.D.M. Coutinho).

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

1878-5352 © 2013 King Saud University. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.003>

Please cite this article in press as: Sobral-Souza, C.E. et al., Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. Arabian Journal of Chemistry (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.003>



9 de Marzo de 2014

BLACPMA

Dr.
Henrique DM COUTINHO
Universidade Regional do Cariri
Brasil

Estimado Dr. Coutinho:

En referencia a su artículo titulado: **“EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EL EFECTO CITOPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *Eugenia jambolana* Y *Psidium myrsinites* DC. A”**, de los autores Nadghia F Leite, Celestina E Sobral-Souza, Edinaldo FF Matías, Liscássia BB Alencar, Rosimeire S Albuquerque, Maria FB Morais-Braga, Erlanio O Souza & Henrique DM Coutinho, ha sido recibido el día 6 de Marzo de 2014 y ha sido asignado como **BLACPMA N° 916**.

Le saluda

José L. Martínez
Editor Jefe
BLACPMA



Henrique Douglas Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

Submissão de artigo

Henrique Douglas Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

3 de outubro de 2013 18:26

Para: rev.cienc.salud@urosario.edu.co

Crato, 02 de outubro de 2013.

Carta de Apresentação de artigo

De: Henrique Douglas Melo Coutinho

Autor Correspondente

Para: Editor da Revista de Ciências de La Salud

Caro editor, venho por meio desta apresentar para avaliação junto a Revista de Ciências de La Salud o ARTIGO intitulado *Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de Eugenia uniflora e Psidium soraleanum contra metais pesados*, do qual sou autor correspondente. Informo que todos os autores participaram ativamente do trabalho e que não há nenhum conflito de interesse na submissão destes dados. Além disso, todos os autores concordaram com a submissão deste artigo com a certeza de que este trabalho não só se encaixa no escopo como pode ser muito bem avaliado pelos revisores desta prestigiosa revista. Este artigo não se encontra e nem será submetido a outra revista antes da decisão da revista. Declaro ainda que, uma vez aceito, os autores concordam em outorgar os direitos autorais deste artigo a Revista de Ciências de La Salud.

Sem mais para o momento, agradeço e assino em nome de todos os demais autores, os quais concordam com a submissão.

--

HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO, PhD

link to CV Lattes:

<http://lattes.cnpq.br/3199766197573928>

LABORATORY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY
DEPART. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
UNIVERSITY OF REGION OF CARIRI - URCA
AV. CEL ANTONIO LUIZ, 1161.
CRATO (CE), BRAZIL.
CEP:63000-000.

3 anexos

 AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN (1).doc

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=7f078cb137&view=pt&q=revista%20ciencias%20rev.cienc.salud%40urosario.edu.co&q&s=true&search=query&msg=141...> 1/2

From: EEB <eeb@jussieu.org>

To: hdmcoutinho@gmail.com, hdouglas@zipmail.com.br

Title: **Cytoprotective effect of Eugenia uniflora L. against the waste contaminat Mercury chloride**

Environmental and Experimental Botany

Dear Prof. Coutinho,

Thank you for submitting your work to Environmental and Experimental Botany. Before we pass on manuscripts to the Journal Editor, who is responsible for the scientific assessment, we perform an initial check against formal technical criteria (structure of submission, adherence to the Guide for Authors and English language usage). We regret to inform you that your manuscript does not meet the Journal's required standard. Please make changes/corrections as detailed in the comments below. Your manuscript is now located in your main menu under "Submissions Sent Back to Authors". To resubmit your manuscript, please follow the below steps (Please do not submit this paper as a New Submission.):

- * Press "submissions sent back to author" link in your main menu
- * Press "edit submission" and then "attach files".
- * In the "attach file" step please upload the corrected files.

NOTE: Please ensure you have also uploaded the "Response to Technical Check Results" which is a reply to each of the comments mentioned below under the dropdown menu "Response to Technical Check Results". Without this completed your manuscript cannot be further processed. Please visit the following site for more information on Responses to Technical Check

Results: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/258/

- * Build your pdf and approve your submission so that it will be sent to the journal.

PLEASE NOTE: Resubmission is not a guarantee that your submission will subsequently proceed to the peer review process, which is a decision to be made at the sole discretion of the journal editor.

Yours sincerely,

Administrative Support Agent/ Administrative Support Agent [16-Mar-11]/ Environmental and Experimental Botany

Comments:

Language:

In its current state, the level of English throughout your manuscript does not meet the journal's desired standard. Please check the manuscript and refine the language carefully.

Technical:

1. All pages should be numbered sequentially.

With ever-increasing standards of excellence in both research and publishing, it is in an author's best interest to make sure his/her paper is in its best possible form when submitted for publication - that includes the quality of the written English, accurate illustrations, adherence to the Guide for Authors, and the presentation of factual, accurate data.

If you have difficulty with the English language or your illustrations, you may consult a professional editing service. There are numerous services available throughout the world.

To find out about Elsevier Language Editing Services please visit; <http://webshop.elsevier.com/languageediting/>

For Elsevier Illustration Services please visit; <http://webshop.elsevier.com/illustrationservices/>

Use of these or any other Language Editing or Illustration Services is not mandatory, and will not guarantee selection for peer review or acceptance for publication in an Elsevier journal or any other publication. For more information please refer to our Terms & Conditions at the link below: http://elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions--

APÊNDICES

BIOSCIENCE JOURNAL

CAPA SOBRE PÁGINA DO USUÁRIO PESQUISA ATUAL ANTERIORES NOTÍCIAS SUBMISSÕES QUALIS CAPES
SCOPUS ISI JCR CAB AGRIS TUTORIAL (REVISOR) TUTORIAL (AUTOR)

Capa > Usuário > Autor > Submissões > #23116 > Avaliação

#23116 AVALIAÇÃO

RESUMO AVALIAÇÃO EDIÇÃO

SUBMISSÃO

Autores Henrique Coutinho
Título Verificação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Psidium guajava* L. e *Psidium guajava* L. var. *pomifera*
Seção Ciências Biológicas
Editor Ana Bonetti

AVALIAÇÃO

RODADA 1

Versão para avaliação 23116-88721-2-RV.DOC 2013-07-12
Iniciado 2013-11-04
Última alteração 2013-11-06
Arquivo enviado Nenhum(a)

DECISÃO EDITORIAL

Decisão —
Notificar editor Comunicação entre editor/autor Sem comentários
Versão do editor 23116-88739-1-ED.DOC 2013-07-12
Versão do autor Nenhum(a)
Transferir Versão do Autor Nenhum arquivo selecionado Transferir

IDIOMA

Português (Brasil) ▼

USUÁRIO

Logado como:
hdmcoutinho
Meus periódicos
Perfil
Sair do sistema

Ajuda do sistema

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Todos ▼
Pesquisar

Procurar

Por Edição
Por Autor
Por título
Outras revistas

AUTOR

Submissões
Ativo (1)
Arquivo (2)
Nova submissão

OPEN JOURNAL SYSTEMS

TAMANHO DE FONTE

ASOCIACION
TOXICOLOGICA
ARGENTINA

ASOCIACIÓN CIVIL
(Adherida a la IUTOX)
ASOCIACIÓN
TOXICOLOGICA
ARGENTINA
PRESIDENTE

ASOCIACIÓN CIVIL
(Adherida a la IUTOX)
VICE-PRESIDENTE

Adriana Ridolfi
SECRETARIO

Gerardo D. Castro
TESORERO

Maria L. Oneto
VOCALES

Marcela M. López Nigro
Patricia Quiroga
Mónica C. Napoli

VOCALES SUPLENTE

Maria C. Travella
Gabriela Fiorenza
María D. Mundry

COMITÉ CIENTIFICO

Nelson Albiano
José A. Castro
Lucrecia Ferrari
Mirtha Nassetta
María M. Salsedue

TRIBUNAL DE HONOR

Susana I. Garcia
Irma Giolito
Augusto Piazza

ORGANO DE FISCALIZACIÓN

Mirta E. Ryzel
Claudia V. Vassena
Viviana V. Crapanzano

DIRECCIÓN POSTAL

A. ALSINA 1441 - Of. 302
C1088AAK BUENOS AIRES
REPÚBLICA ARGENTINA

TEL/FAX
(54 11) 4381-6919

e-mail: ata@dd.com.ar

Internet
www.ataonline.org.ar

Buenos Aires, 9 de noviembre de 2013.

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular,
Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA,
Crato-CE, Brasil.
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000.
Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291.
E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Estimado Dr. Henrique Coutinho

A presente carta tem por objetivo comunicar que o manuscrito "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E POTENCIAL ANTIPARASITÁRIO IN VITRO DO a-PINENO E CARVACROL.**" foi aceito para publicação como artigo na Acta Toxicológica Argentina.

Agradecemos por haver confiado seus resultados à revista.



Dr. Adolfo Rafael de Roodt
Diretor
Acta Toxicológica Argentina

30/10/13

Gmail - Your Submission



Henrique Douglas Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

Your Submission

Editorial Office EUJIM <avalorenc@hotmail.com>
Para: hdmcoutinho@gmail.com

4 de junho de 2013 06:58

Ms. Ref. No.: EUJIM-D-12-00135R2
Title: Trypanocide, Cytotoxic, and anti-Candida activities of natural products: Hyptis martiusii Benth.
European Journal of Integrative Medicine

Dear Prof. Henrique Coutinho,

I am pleased to inform you that your paper "Trypanocide, Cytotoxic, and anti-Candida activities of natural products: Hyptis martiusii Benth." has been accepted for publication in European Journal of Integrative Medicine.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to European Journal of Integrative Medicine.

Yours sincerely,

Prof. Nicola Robinson, PhD
Editor-in-Chief
European Journal of Integrative Medicine

Comments from the editors and reviewers:

IF 2010 = 1.200 ranking 13/20 in category Complementary and Integrative Medicine
(c) Thomson Reuters Journal Citation Reports Science Edition (2010)



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 26 de junho de 2013.

Ref. RCFBA-2938-094/2013

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo intitulado:

**AVALIAÇÃO DAS POTENCIAIS ATIVIDADES TRIPANOCIDA E ANTILEISHMANIA
DO EXTRATO DE FOLHAS DE *PIPER ARBOREUM* (PIPERACEAE) E DE SUAS
FRAÇÕES,**

De autoria de Fernando Gomes Figueredo, Saulo Relison Tintino, Dara Isabel Vieira de Brito, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga, Nadghia Figueiredo Leite, Bruno Feitosa Furtado Lucena, Celestina Elba Sobral-Souza, Maria Celeste Vega Gomez, Henrique Douglas Melo Coutinho, foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,
Eliana Aparecida Varanda
Editora Chefe

Ilmo. Sr.
Fernando Gomes Figueredo

Article entitled (“Work” or “article”):

Modulatory antimicrobial activity of *Piper arboretum* extracts

Author/s: (also referred to as “Licensor/s”)

Saulo R. Tintino, Celestina E.S. Souza, Gláucia M.M. Guedes, Jaqueline I.V. Costa, Francisco M. Duarte, Maria Célia O. Chaves, Viviane A. Silva, Hilzeth L.F. Pessôa, Micheline A. Lima, Carlos A. Garcia, Henrique D.M. Coutinho

----- Forwarded message -----

From: **Branka Salopek Sondi** <salopek@irb.hr>

Date: 2013/9/27

Subject: [ABC] Man. no. 922 Editor Decision

To: Professor Henrique Coutinho

<hdmcoutinho@gmail.com>

Cc: mirnaperica@yahoo.com

ACTA BOTANICA CROATICA

Branka Salopek Sondi, Editor-in-Chief

Ruđer Bošković Institute, Department of Molecular Biology,
Bijenička

cesta 54, 10000 ZAGREB, Croatia. e-mail: salopek@irb.hr

Phone: (385) 1 4561 143, Fax: (385) 1 4561 177

Dear dr. Henrique D. M. Coutinho

Revista Cubana de		EDITORIAL CIENCIAS MEDICAS Plantas Medicinales			Versión electrónica ISSN-1028-4796	
Inicio	Acerca de...	Ingresar	Registro	Anuncios	Números anteriores	Envío de artículos

Inicio > Vol 18, No 4 (2013) > Leite

Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*.

Nadghia F. Leite, Celestina E. Sobral-Souza, Rosimeire S. Albuquerque, Dara I. V. Brito, Anne K. L. S. Lavor, Liscássia B. B. Alencar, Saulo R. Tintino, João V. A. Ferreira, Fernando G. Figueredo, Luciene F. Lima, Francisco A. B. Cunha, Antônio I. Pinho, Henrique Coutinho Henrique

RESUMEN

Introdução: As doenças negligenciadas persistem por conta de falhas da ciência e acometem principalmente países em desenvolvimento, como exemplos podemos citar a doença de Chagas e a leishmaniose.

Objetivo: este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antiparasitário *in vitro* de um terpenóide componente de óleo essencial, o cariofileno e o eugenol, contra as formas epimastigota e promastigota de *T. cruzi* e *L. brasiliensis*, respectivamente, bem como verificar sua citotoxicidade em células de mamíferos.

Métodos: Para os estudos *in vitro* de *T. cruzi*, foi usado o clone B5-CL, estavelmente transfectadas com o gene de *Escherichia coli* β -galactosidase (lacZ). Os ensaios de inibição de promastigotas foram realizadas utilizando a estirpe de *L. brasiliensis*, cultivadas a 22 °C em meio de Schneider de *Drosophila* suplementado com FBS a 20%. Para os testes de atividade antiepipimastigota, antipromastigota foram utilizados placas de 96 poços com culturas que não tinham atingido a fase estacionária. Os ensaios de citotoxicidade utilizado estirpe de fibroblastos NCTC929 cultivadas em Meio Essencial Mínimo (Sigma). A viabilidade dessas linhagens através da utilização de resazurina como um método colorimétrico.

Resultados: As substâncias cariofileno e eugenol foram testadas quanto à atividade antiepipimastigota, antipromastigota e quanto à citotoxicidade. Foi visto um efeito clinicamente relevante do cariofileno contra os parasitas *T. cruzi* e *L. brasiliensi*.

Conclusões: Os resultados mostram que o cariofileno obteve um melhor resultado quando comparado ao eugenol, sendo capaz de inibir o crescimento dos parasitas testados mostrando uma alternativa contra *T. cruzi* e *L. brasiliensi*. Em relação à citotoxicidade novos testes deverão ser realizados para futuros testes *in vivo*.

Español

Usuario/a

Nombre usuario/a

Contraseña

Recordar mis datos

Login

Ítems relacionados

Mostrar todos

Información

- Para lectoras/es
- Para autoras/es
- Para bibliotecarias/os

Contenido de la Revista

Buscar

Todos

Buscar

Navegar

- Por número
- Por autor

Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes

Edson C Morais¹, Lavouisier F B Nogueira¹, Jéssica L A Leite, Larissa S M Alencar Bruno F F Lucena¹, Fernando G Figueredo¹, Glaucia M M Guedes², Saulo R Tintino², Celestina E S de Souza², Maria F B M Braga², Micheline A Lima³, Fábio H T Souza³, Celidarque da Silva Dias³ & *Henrique D M Coutinho²

¹Faculdade de Ciências Aplicadas Doutor Leão Sampaio, Juazeiro do Norte-CE, Brasil; ²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, Brasil; ³Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil

E-mail: *hdmcoutinho@gmail.com

Received 24.06.13, revised 06.08.2013

The emergence of resistant microorganisms and also the toxicity associated with antimicrobial drugs increase the need of research for new active principles. *Richardia brasiliensis*, a weed used popularly as an expectorant, antiemetic, and diaphoretic. The extracts have coumarins, flavonoids, steroids, triterpenoids, alkaloids and resin, as secondary metabolites. The present study aimed to test the potential antimicrobial and modulator of the ethanolic and hexanic extracts of *R. brasiliensis*. The ethanolic and hexanic extracts were tested for their antimicrobial effect and in combination with aminoglycosides and antifungal against standard and multi-resistant microorganisms by the broth microdilution method with culture medium Brain Heart Infusion (BHI). It was observed that the association between antibiotics and ethanolic and hexanic extracts showed clinically relevant results on the tests with multi-resistant bacteria. The natural products from *R. brasiliensis* demonstrated a modulating action against the microorganisms used. These results can represent a new effort to combat antibiotic resistant bacteria.

Keywords: *Richardia brasiliensis*, Antimicrobial activity, Modulatory effect, Multi-resistant microorganisms.

IPC Int. Cl.: A61K 36/00, C12N, C12M, H03K 7/00

Medicinal plants have been used by man since antiquity as a means to alleviate or even cure diseases, this knowledge was passed from generation to generation, especially after the creation of writing. With the development of new technologies could further study of these plants, isolating substances responsible for its pharmacological effect and thus creating drugs with the active principle purified and improved¹. *Richardia brasiliensis* is a plant belonging to the Rubiaceae family which includes about 637 genera and nearly 10,700 species. It is one of the largest families between the dicotyledons, being abundant in subtropical regions worldwide². Popularly is known as the white *poaia*, *poaia*-of-the-field or *poaia*. It is an annual plant, herbaceous, prostrate, branched, stem densely hirsute, measuring 20-50 cm in length. It has marked presence in the agricultural regions of the Midwest, South and Southeast of Brazil³⁻⁵. *R. brasiliensis* is popularly used in Brazil as

infusion or decoction of the root as an expectorant, antiemetic, and diaphoretic while plants of the same family are also used as anti-inflammatory and to treat hemorrhoids, coughs, bronchitis, and headache⁶.

In the phytochemical prospection of the aerial parts (stalk fragments, petiole and leaf), was observed the presence of coumarins, flavonoids, steroids, terpenoids, alkaloids and resins. In the underground part were found the same substances from the top except for flavonoids and alkaloids⁷. Pinto *et al.*⁸ isolated phytochemicals from *R. brasiliensis* as Isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, Oleanolic acid, acid *p*-Hydroxy-benzoic, *m*-Methoxy-*p*-hydroxy-benzoic acid and Scopoletin. All classes of phytochemicals indicated by the literature presented several biological activities, demonstrating the necessity of more pharmacognostic and ethnobiological studies.

The aim of this study was to evaluate the potential antimicrobial and modulator of ethanolic and hexanic extracts of the leaves of *R. brasiliensis* against pathogenic microorganisms.

*Corresponding author



Research Brief

Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L.

Karla K.A. Santos^a, Edinaldo F.F. Matias^a, Saulo R. Tintino^a, Celestina E.S. Souza^a, Maria F.B.M. Braga^a, Gláucia M.M. Guedes^a, Miriam Rolón^b, Celeste Vega^b, Antonieta Rojas de Arias^b, José G.M. Costa^c, Irwin R.A. Menezes^d, Henrique D.M. Coutinho^{a,*}

^a Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brazil

^b Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorio Díaz Gil, Asunción, Paraguay

^c Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brazil

^d Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2011

Received in revised form 20 February 2012

Accepted 21 February 2012

Available online 7 March 2012

Keywords:

Chagas disease

Eugenia uniflora

Antiepi-mastigote activity

Cytotoxicity

Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, being considered a public health problem. An alternative to combat this pathogen is the use of natural products isolated from fruits such as *Eugenia uniflora*, a plant used by traditional communities as food and medicine due to its antimicrobial and biological activities. Ethanolic extract from *E. uniflora* was used to evaluate *in vitro* anti-epimastigote and cytotoxic activity. This is the first record of anti-*Trypanosoma* activity of *E. uniflora*, demonstrating that a concentration presenting 50% of activity (EC₅₀) was 62.76 µg/mL. Minimum inhibitory concentration (MIC) was < 1024 µg/mL. Our results indicate that *E. uniflora* could be a source of plant-derived natural products with anti-epimastigote activity with low toxicity.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Developing countries with traditional use of the biodiversity as medicine, including Brazil, still suffer with the so-called "neglected diseases" (Funari and Ferro, 2005), which are treated by traditional communities with plant natural products. Brazil features the largest biodiversity in the world (Elisabetsky and Costa-Campos, 1996); however only 8% have been studied in search for bioactive compounds (Garcia et al., 1996).

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects about 18 million people in the Americas (Reyes-Chilpa et al., 2008). This parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods, blood and organs from infected donors, or by transplacental contamination (WHO, 2010). Currently, the chemotherapy of this disease consists mainly of nifurtimox and benznidazole (WHO, 2010), which show a cure rate of 70–50% in the acute phase and less than 20% in the chronic phase (Dias and Dessoy, 2009). Several studies involving the analysis of natural plant products have

recommended them as alternative sources of drugs against *T. cruzi*, including *Arrabidaea triplinervia* (Leite et al., 2006), *Dracocephalum kotschyi* (Saeidnia et al., 2004) and *Azorella compacta* (Araya et al., 2003).

The effects of all natural products can be limited by their toxicity. Evaluating the toxicity of active substances is one of the most important steps for the utilization of these compounds in animal models. The drugs currently utilized against Chagas disease feature high toxicity, affecting host tissues (Dias and Dessoy, 2009).

Eugenia uniflora is often used as food and medicine in folk medicine due to antimicrobial (Holetz et al., 2002) and other biological activities (Sharma et al., 2006). Known in Brazil as *pitanga*, this plant has been studied due to its antioxidant (Velazquez et al., 2003) hypotensive (Consolini and Sarubbio, 2002), photosensitizing and antibiotic modulatory (Coutinho et al., 2010a,b) activities. Several phytoconstituents of *E. uniflora* have been isolated, such as flavonoids myricitrin, quercetin and quercitrin 3-ramnoside, as well as steroids, mono- and triterpenoid compounds, tannins, anthraquinones, phenols, cineol and essential oils (Bandoni et al., 1972; Wazlawik et al., 1997).

Thus, due to the social and economic importance of Chagas disease as neglected diseases and the medicinal use of this fruit in ethnomedicine, this work evaluated the anti-*Trypanosoma* and cytotoxic activities of *E. uniflora*.

* Corresponding author. Address: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM, Departamento de Química Biológica – DQB, Universidade Regional do Cariri – URCA, Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta 63105-000, Crato (CE), Brazil. Fax: +55 (88) 31021291.
E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

Anti-*Candida* activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*

Karla K.A. Santos,¹ Edinaldo F.F. Matias,¹ Celestina E.S. Souza,¹ Saulo R. Tintino,¹
Maria F.B.M. Braga,¹ Glaucia M.M. Guedes,¹ Lavouisier F.B. Nogueira,¹
Edson C. Morais,¹ José G.M. Costa,² Irwin R.A. Menezes,³ and Henrique D.M. Coutinho¹

Laboratories of ¹Microbiology and Molecular Biology, ²Research in Natural Products, and ³Pharmacology and Medicinal Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil.

ABSTRACT Candidiasis is the most frequent infection by opportunistic fungi, frequently caused by *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Mentha arvensis* L. is a herbaceous plant that occurs throughout South America and is used as a tea and in the folk medicine. *Turnera ulmifolia* L. is already known to be of medicinal value. Ethanol extracts from *M. arvensis* and *T. ulmifolia* were assayed for antifungal activity against strains of *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. No clinically relevant antifungal activity was demonstrated by the extracts; however, a potentiation effect was observed when the extracts were applied with metronidazole against *C. tropicalis*. *M. arvensis* and *T. ulmifolia* could represent a source of natural products with modifying antifungal activity.

KEY WORDS: • antifungal activity • *Mentha arvensis* • metronidazole • potentiation activity • *Turnera ulmifolia*

INTRODUCTION

CANDIDIASIS OR CANDIDOSIS is the most frequent infection by opportunistic fungi, where the species commonly implicated in the clinical picture are *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. The spectrum of candidiasis is very extensive, going from mild manifestations, such as a colonization of mucosal tissues, up to systemic pictures, with the invasion of various organs.¹

Mentha arvensis (Family Labiatae) is a herbaceous plant that occurs throughout South America. This plant and in particular its essential oils are commonly used in folk medicine, exploiting a wide range of biological and pharmacological activities. Several compounds have been isolated from these oils, mainly menthol, *p*-menthone, menthol acetate, and other phytochemicals.^{2,3} *M. arvensis* (called *hortelã-japonesa* and *menta* in Brazil) is used in traditional medicine for the treatment of worm diseases and digestive problems. The main component of the essential oil is menthol, which is widely utilized in the food and pharmaceutical industries.⁴

Turnera ulmifolia L. (Family Turneraceae), a small annual herb, can be found in the north and northeast Brazilian regions, where it is considered a weed.⁵ It grows preferentially in sandy soils and on hill slopes. *T. ulmifolia* L. is already known to be of medicinal value, being used popu-

larly as an anti-inflammatory, as an expectorant, and in the treatment of several problems.^{5–7} Researchers have detected flavonoids, alkaloids, tannins, and phenolic compounds in preparations from this plant.^{8–10}

Therefore, because of the social and economic importance of candidiasis and the increase in the number of individuals with immunodeficiency, such as in the case of those who are seropositives, we evaluated here the antifungal activity of *M. arvensis* and *T. ulmifolia*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Leaves of *M. arvensis* and *T. ulmifolia* were collected in the rainy season (April 2008) in the county of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Arlene Pessoa, and voucher specimens were deposited in the “Herbário Caririense d’Andrade Lima” with the numbers 2886 and 1618, respectively.

Preparation of ethanol extracts of *M. arvensis* and *T. ulmifolia*

Two hundred grams of leaves was dried and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as the solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 hours at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator at a temperature of 60°C under a pressure of 760 mm Hg.¹¹ Each 200 g of aerial parts yielded 5–6 g of extract. The ethanolic

Manuscript received 5 May 2011. Revision accepted 26 July 2011.

Address correspondence to: Henrique D.M. Coutinho, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 62105-000, Crato, CE, Brazil. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Citotoxicidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW

Cytotoxic and antiparasitic activity of *Lygodium venustum* SW

Morais-Braga, Maria Flaviana B.; Souza, Teógenes .M.; Santos, Karla K.A.; Andrade, Jacqueline C.; Guedes, Gláucia M.M.; Tintino, Saulo R.; Souza, Celestina E.S.; Costa, José G.M.; Saraiva, Antônio A.F.; Coutinho, Henrique D.M.*

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, ²Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, ³Laboratório de Paleontologia da Universidade Regional do Cariri, Crato, Brasil.

*hdmcoutinho@gmail.com

Recibido: 2 de agosto de 2012
Aceptado: 12 de marzo de 2013

Abstract. Infectious and parasitic diseases like leishmaniasis and Chagas disease have spreading recent decades to places not observed before. They are considered neglected by desolating poor countries and marginalized pharmacologically. There are not many options for the treatment and these drugs have shown significant toxicity contributing to the appearance of several side effects. Research on natural products has been shown to be an interesting alternative to the search for new drugs. *Lygodium venustum* is a cosmopolitan fern with latescence habit found on the Chapada do Araripe, considered by some American populations as a medicinal plant for the treatment of skin diseases, infections, fungal infections and trichomoniasis. This study evaluated its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*, as well as its cytotoxicity through trials *in vitro*. We tested the ethanolic extract and hexane fraction obtained from the leaves of *L. venustum* at different concentrations. For *in vitro* tests of *T. cruzi*, we used the clone CL-B5 and for *L. brasiliensis* we used promastigotes. The cytotoxicity assay was performed with strains of fibroblasts. *L. venustum* showed no antiparasitic activity clinically relevant in the form of crude ethanolic extractor as the hexane fraction against *Leishmania*. The hexane fraction showed an intermediate activity against *T. cruzi*, but the concentration of moderate effect has maximum cytotoxicity becoming unfeasible for clinical application. However, the cytotoxicity presented may be useful in research on antineoplastic activity in tumor cells.

Keywords: Fern; Leishmanicidal activity, Trypanocidal activity, Hexane fraction.

Resumo. Doenças parasitárias infecciosas como leishmaniose e doença de Chagas tem se difundido nas últimas décadas a locais onde antes não se observava sua ocorrência. São consideradas negligenciadas por assolarem países pobres e serem marginalizadas farmacologicamente. O tratamento não apresenta muitas opções de fármacos e estes demonstram relevante toxicidade contribuindo para o aparecimento de diversos efeitos colaterais. A pesquisa com produtos naturais tem se mostrado uma interessante alternativa para a procura por novos fármacos. *Lygodium venustum* é uma samambaia cosmopolita de hábito lianescente encontrada na encosta na Chapada do Araripe, considerada por algumas populações americanas como planta medicinal para o tratamento de dermatoses, infecções, micoses e tricomoníases. Neste estudo foi avaliada sua atividade antiparasitária contra *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma cruzi*, bem como sua citotoxicidade através de ensaios *in vitro*. Foram testadas a fração hexânica e o extrato etanólico obtido das folhas de *Lygodium venustum* em diferentes concentrações. Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 e para *Leishmania brasiliensis* foram utilizadas formas promastigotas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com linhagens de fibroblastos. *L. venustum* não apresentou atividade antiparasitária clinicamente relevante na forma de extrato etanólico bruto nem como fração hexânica contra *Leishmania*. A fração hexânica apresentou uma atividade intermediária contra *T. cruzi*, porém a concentração de efeito moderado possui citotoxicidade máxima tornando-se inviável para aplicação clínica. Entretanto, a citotoxicidade apresentada poderá ser útil em pesquisas sobre atividade antineoplásica em células tumorais.

Palavras-chave: Samambaia; Atividade leishmanicida; Atividade tripanocida. Fração hexânica.

INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas que acometem primordialmente os países em desenvolvimento tem sido a causa de morte de milhões de pessoas em todo o mundo. Estas doenças são negli-

genciadas e têm afligido a humanidade desde tempos imemoráveis e afetam principalmente comunidades marginalizadas, sem influência política, em áreas remotas, zonas de conflitos ou favelas urbanas onde há pouco ou ne-

Chapter 3

**USE OF NATURAL PRODUCTS TO ENHANCE
THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF GENTAMICIN
AND OTHER AMINOGLYCOSIDES:
THE FUTURE OF ANTIBIOTIC THERAPY**

*Cícera Natalia Figueirêdo Leite Gondim¹,
Nadghia Figueiredo Leite¹, Jacqueline Cosmo Andrade¹,
Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga¹,
Gláucia Morgana de Melo Guedes¹,
Saulo Relison Tintino¹, Cícera Cislânia Araújo Tavares¹,
Maria Audilene de Freitas¹,
Liscássia Beatriz Batista Alencar¹,
Celestina Elba Sobral de Souza¹,
Rosimeire Sabino Albuquerque¹,
Edinardo Fagner Ferreira Matias¹,
Francisco Assis Bezerra da Cunha¹,
Dara Isabel Vieira de Brito¹,
Anne Karyzia Lima Santos de Lavor¹,
João Victor de Alencar Ferreira¹,
Fernando Gomes Figueredo¹, Luciene Ferreira de Lima¹
and Henrique Douglas Melo Coutinho²*

¹Departamento de Ciências Biológicas, ²Departamento de Química
Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

Complimentary Contributor Copy

Research Article

Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage

Edinardo Fagner Ferreira Matias,^{1,2,3} Erivânia Ferreira Alves,³
Beatriz Sousa Santos,³ Celestina Elba Sobral de Souza,⁴
João Victor de Alencar Ferreira,⁴ Anne Karyzia Lima Santos de Lavor,⁴
Fernando Gomes Figueredo,⁴ Luciene Ferreira de Lima,⁴
Francisco Antônio Vieira dos Santos,³ Florido Sampaio das Neves Peixoto,³
Aracélio Viana Colares,^{2,3,5} Aline Augusti Boligon,⁶ Rogério de Aquino Saraiva,⁶
Margareth Linde Athayde,⁶ João Batista Teixeira da Rocha,⁶ Irwin Rose Alencar Menezes,⁴
Henrique Douglas Melo Coutinho,⁷ and José Galberto Martins da Costa^{2,3,4}

¹ Universidade Estadual do Ceará-UECE-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

² Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

³ Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

⁴ Universidade Regional do Cariri-URCA-63.100-000, Crato, CE, Brazil

⁵ Universidade Federal do Maranhão-UFMA-65085-580, São Luís, MA, Brazil

⁶ Universidade Federal de Santa Maria-UFSM-97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

⁷ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato-CE, Brasil, Rua Cel. Antonio Luís 1161, Pimenta 63105-000, Brazil

Correspondence should be addressed to Henrique Douglas Melo Coutinho; hdmcoutinho@gmail.com

Received 5 April 2013; Revised 1 May 2013; Accepted 4 May 2013

Academic Editor: Ulysses Paulino de Albuquerque

Copyright © 2013 Edinardo Fagner Ferreira Matias et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Knowledge of medicinal plants is often the only therapeutic resource of many communities and ethnic groups. "Erva-baleeira," *Cordia verbenacea* DC., is one of the species of plants currently exploited for the purpose of producing a phytotherapeutic product extracted from its leaves. In Brazil, its major distribution is in the region of the Atlantic Forest and similar vegetation. The crude extract is utilized in popular cultures in the form of hydroalcoholic, decoctions, and infusions, mainly as antimicrobial, anti-inflammatory, and analgesic agents. The aim of the present study was to establish a chemical and comparative profile of the experimental antibacterial activity and resistance modifying activity with ethnopharmacological reports. Phytochemical prospecting and HPLC analysis of the extract and fractions were in agreement with the literature with regard to the presence of secondary metabolites (tannins and flavonoids). The extract and fraction tested did not show clinically relevant antibacterial activity, but a synergistic effect was observed when combined with antibiotic, potentiating the antibacterial effect of aminoglycosides. We conclude that tests of antibacterial activity and modulating the resistance presented in this work results confirm the ethnobotanical and ethnopharmacological information, serving as a parameter in the search for new alternatives for the treatment of diseases.

1. Introduction

In many developing countries, various communities do not have sufficient resources to meet their needs with regard to obtaining medicine to treat various diseases [1]. Thus, these

communities often depend on natural resources, including native plant species to fulfill or complement their therapeutic resources [2–4].

Popular observations on the use of medicinal plants contribute in a relevant way to spread awareness of the

Enhancement of the Antifungal Activity of Antimicrobial Drugs by *Eugenia uniflora* L.

Karla K.A. Santos,¹ Edinaldo F.F. Matias,¹ Saulo R. Tintino,¹ Celestina E.S. Souza,¹ Maria F.B.M. Braga,¹ Gláucia M.M. Guedes,¹ José G.M. Costa,² Irwin R.A. Menezes,³ and Henrique Douglas Melo Coutinho¹

Laboratories of ¹Microbiology and Molecular Biology, ²Research in Natural Products, and ³Pharmacology and Medicinal Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Brazil.

ABSTRACT Candidiasis is the most frequent infection by opportunistic fungi such as *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. Ethanol extract from *Eugenia uniflora* was assayed, for its antifungal activity, either alone or combined with four selected chemotherapeutic antimicrobial agents, including amphotericin B, mebendazole, nistatin, and metronidazole against these strains. The obtained results indicated that the association of the extract of *E. uniflora* to metronidazole showed a potential antifungal activity against *C. tropicalis*. However, no synergistic activity against the other strains was observed, as observed when the extract was associated with the other, not enhancing their antifungal activity.

KEY WORDS: • antifungal activity • *Candida* sp. • cytotoxicity • *Eugenia uniflora* • modifying activity

DEVELOPING COUNTRIES WITH TRADITIONAL use of the biodiversity as medicine, including Brazil, still suffer with the so-called “neglected diseases”,¹ which are treated by traditional communities with plant natural products. Brazil features the largest biodiversity in the world.² However, only 8% have been studied in search for bioactive compounds.³

Candidiasis is the most frequent infection caused by opportunistic fungi. The main species associated with this disease are *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. The clinical features of candidiasis are quite diverse, varying between mucosal colonization to the invasion of several internal organs.⁴ These yeasts remain in the microbiota, becoming pathogenic in cases such as congenital or acquired immunodeficiency and immunosuppression.⁵ Several natural products have been studied extensively in the search for alternative treatments for these fungi, including *Himantanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris*, and *Psidium guajava*.^{6–8}

The effects of all natural products can be limited by their toxicity. Evaluating the toxicity of active substances is one of the most important steps for the utilization of these compounds in animal models. The drugs currently utilized

against Chagas disease and candidiasis feature high toxicity, affecting host tissues.⁹

Eugenia uniflora is often used as food and medicine in folk medicine due to antimicrobial and other biological activities.^{10,11} Known in Brazil as *pitanga*, this plant has been studied due its antioxidant, hypotensive, photosensitizing, and antibiotic modulatory activities.^{12–15} Several phytoconstituents of *E. uniflora* have been isolated, such as flavonoids myricitrin, quercetin and quercitrin 3-ramnoside, as well as steroids, mono- and triterpenoid compounds, tannins, anthraquinones, phenols, cineol, and essential oils.^{16,17}

Thus, due to the social and economic importance of candidiasis as neglected diseases and the medicinal use of this fruit in ethnomedicine, this work evaluated the antifungal and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora*.

Leaves of *E. uniflora* were collected during the rainy season (April, 2008) in the municipality of Crato, Ceará State, Brazil. The plant material was identified by Dr. Arlene Pessoa, and a voucher specimen was deposited with identification number #3106 at the “Dárdano de Andrade Lima” Herbarium of the Regional University of Cariri (URCA).

A total of 200 g of leaves were dried and powdered at room temperature. The powdered material was extracted by maceration using 1 L of 95% ethanol as solvent at room temperature. The mixture was allowed to stand for 72 h at room temperature. The extract was then filtered and concentrated under vacuum in a rotary evaporator (60°C and 760 mm/Hg of temperature and pressure).¹⁸ Each 200 g of aerial parts yield 5.6 g of extract. The *E. uniflora* ethanol extract (EEEU) was diluted using DMSO.

Manuscript received 24 September 2012. Revision accepted 8 April 2013.

Address correspondence to: Henrique Douglas Melo Coutinho, PhD, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular—LMBM, Universidade Regional do Cariri—URCA, Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, Crato 63105-000, Brazil. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Antimicrobial and Modulatory Activity of Ethanol Extract of the Leaves from *Lygodium venustum* SW.

MARIA F. B. MORAIS-BRAGA*, TEÓGENES M. SOUZA, KARLA K. A. SANTOS, JACQUELINE C. ANDRADE, GLÁUCIA M. M. GUEDES, SAULO R. TINTINO, CELESTINA E. SOBRAL-SOUZA, JOSÉ G. M. COSTA, IRWIN R. A. MENEZES, ANTONIO A. F. SARAIVA, and HENRIQUE D. M. COUTINHO

Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000

ABSTRACT.—The evolution of microorganism defense systems has led to intensive searches for new drugs extracted from various natural products to fight microbial infections. This study evaluated the antibacterial and antifungal activity of *Lygodium venustum*, a climbing fern. A phytochemical screening was performed using ethanol extract from leaves of *L. venustum* (EELV), detecting the presence of phenols, tannins, flavonoids and alkaloids. The test of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis* was evaluated using the microdilution method, resulting in inhibitory concentrations ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Using a subinhibitory concentration of 128 $\mu\text{g/mL}$ of EELV, the modulatory potential of the extract was tested against multidrug-resistant clinical isolates, resulting in synergism when combined with Gentamicin and actually altering the phenotype of *S. aureus* from sensitive to resistant. The extract also increased the effect of the kanamycin against *S. aureus*. This was the first report of modulatory antibiotic activity by a member of *Lygodium*.

KEY WORDS.—*Lygodium venustum*, microdilution, antimicrobial, modulator

Microbial infectious diseases have prompted the development of studies to understand their drug resistance mechanisms and the creation of drugs to avoid these defenses. Infection by *Staphylococcus aureus* is among the most common problems in hospitals due to its resistance against several antibiotics. *Pseudomonas aeruginosa* is the cause of nosocomial infections, particularly in people with cystic fibrosis. *Escherichia coli* is commonly found in the intestinal tract, but certain strains have been closely linked to serious urinary tract infections and diarrhea (Tortora *et al.*, 2008). *Klebsiella pneumoniae*, although confined to the normal flora, has emerged as an important hospital pathogen capable of causing severe morbidity and mortality in pediatric patients (Pfaller *et al.*, 1998). Strains of *Candida* have concerned the medical community due to their role in high-morbidity and mortality infections.

* Corresponding author: Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Phone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: flavianamoraib@yahoo.com.br



ARTIGO

Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas

Saulo Relison Tintino^{1*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha¹, Karla Katiúcia Alves dos Santos¹, Glaucia Morgana de Melo Guedes¹, Celestina Elba Sobral Souza¹, Edinardo Fagner Ferreira Matias¹, Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga¹, Jacqueline Cosme Andrade¹, José Galberto Martins da Costa², Maria Aulilene de Freitas¹ e Henrique Douglas Melo Coutinho¹

Recebido: 6 de agosto de 2012 Recebido após revisão: 23 de março de 2013 Aceito: 7 de abril de 2013
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/serbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2316>

RESUMO: (Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas). A bactéria *Escherichia coli* é conhecida por produzir enterotoxinas capazes de causar diarreia. Algumas espécies de *Staphylococcus* são agentes etiológicos de muitas infecções oportunistas em animais e humanos. *Pseudomonas aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. Candidíase é a micose oportunista mais comum, muitas vezes causada por *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. As plantas medicinais têm sido a fonte de muitos remédios tradicionais aplicados na prática clínica. Neste trabalho, os extratos hexânico e etanólico de *Costus cf. arabicus* foram testados quanto a sua atividade antibacteriana de forma isolada e em combinação com aminoglicosídeos e antifúngicos. O sinergismo dos extratos etanólico e hexânico foi verificado pelo método de microdiluição. Foi observado um efeito sinérgico de ambos os extratos quando combinados com os aminoglicosídeos e antifúngicos. Sugere-se, portanto, que os extratos de *Costus cf. arabicus* poderiam ser usados como uma fonte de produtos naturais com atividade modificadora de resistência a drogas antimicrobianas, fornecendo um novo mecanismo contra o problema da resistência bacteriana e fúngica a drogas.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, *Costus cf. arabicus*, modulação de antimicrobianos.

ABSTRACT: (Modulatory activity of ethanol and hexane extracts of *Costus cf. arabicus* roots on antimicrobial drugs). The bacterium *Escherichia coli* is known to produce enterotoxins causing diarrheal diseases. Some species of *Staphylococcus* are recognized as etiological agents of many animal and human opportunistic infections. *Pseudomonas aeruginosa* is the main cause of nosocomial infections, mainly affecting immunocompromised patients. Candidiasis is the most frequent opportunistic mycosis, frequently caused by *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, and *C. krusei*. Medicinal plants have been the source of many remedies used in the clinical practice. In this study, the hexane and methanol extracts of *Costus cf. arabicus* were assayed to the antibacterial activity alone or associated with aminoglycosides and antifungal drugs. Synergism of the ethanol and hexane were verified by the microdilution method. A synergistic effect of the two extracts combined with the aminoglycosides and antifungal agents was demonstrated. It is therefore suggested that the extracts from *Costus cf. arabicus* could be used as a source of natural products with resistance-modifying antimicrobial activity, providing a new mechanism against the problem of bacterial and fungal resistance to drugs.

Key words: *Costus cf. arabicus*, antimicrobial activity, antimicrobial agents modulation.

INTRODUÇÃO

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é uma das principais causas de doenças infecciosas em humanos. São conhecidas por produzir enterotoxinas cujas propriedades e papel nas doenças diarreicas têm sido amplamente investigados. A atividade das citotoxinas e seu papel na infecção humana já foi identificado (Konowalchuk *et al.* 1977, Scotland *et al.* 1980), principalmente em infecções do trato urinário (Hughes *et al.* 1982, Matias *et al.* 2010). Outra bactéria Gram-negativa, responsável por doenças infecciosas, é a *Pseudomonas aeruginosa*. Esta é um importante patógeno humano que está frequentemente associado a infecções hospitalares acometendo, principalmente, pacientes imunossuprimidos (Ferreira *et al.* 2010). Esta espécie bacteriana tem sido

considerada um patógeno oportunista, uma vez que, raramente, está associada a infecções em indivíduos imunocompetentes (Ferreira *et al.* 2010). A composição física e química (polianiónica) da membrana externa deste micro-organismo demonstra poder de barreira à passagem de substâncias, como antibióticos e antissépticos, que precisam saturar toda a sua superfície antes da penetração, conferindo maior resistência a essas cepas (Ferreira *et al.* 2010).

Já as bactérias Gram-positivas, como as do gênero *Staphylococcus*, são distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da pele e na mucosa dos pássaros. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em muitos animais e humanos (Nostro *et al.* 2004, Coutinho *et al.* 2009). *Staphylococ-*

1. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri (URCA), Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brasil.
2. Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri (URCA), Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: santorelison@gmail.com

Full Length Research Paper

Screening the *in vitro* modulation of antibiotic activity of the extracts and fractions of *Ocimum gratissimum* L.

Edinardo F. F. Matias^{1,4*}, Francisco A. V. Santos^{4,5}, João Marcos F. L. Silva^{4,5},
Celestina E. S. Souza¹, Saulo Relison Tintino¹, Gláucia M. M. Guedes¹, Cassio R. Medeiros⁴,
Maria Flaviana B. M. Braga¹, Thiago S. Almeida², José G. M. Costa^{2,4}, Irwin R. A. Menezes³
and Henrique D. M. Coutinho¹

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

²Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

³Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), Brasil.

⁴Faculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte (CE), Brasil.

⁵Faculdade de Medicina de Juazeiro, (CE), Brasil.

Accepted 9 September, 2011

Escherichia coli is known to produce enterotoxins whose properties and roles in diarrheal disease have been extensively investigated. Some species of *Staphylococcus* are often recognized as etiological agents of many animal and human opportunistic infections. This study is the first test of change in the resistance of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L. against multi-resistant strains of *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. In this study, the hexane and methanol extracts of *O. gratissimum* L. were tested for antibacterial activity alone and in combination with aminoglycosides against bacterial strains. The synergy of the methanolic extracts was verified by micro dilution method. A synergistic effect of both extracts and fractions combined with the aminoglycosides was demonstrated. It is therefore suggested that the extracts from *O. gratissimum* L. could be used as a source of natural products derived from this plant with resistance-modifying antibacterial activity, providing a new weapon against the problem of bacterial resistance to antibiotics.

Key words: *Ocimum gratissimum* L., methanol extract, fractions, antibacterial activity, modification of resistance, antibiotics, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

INTRODUCTION

Bacteria of the genus *Staphylococcus* are distributed in nature, as well as being part of the normal microbiota of the skin and of the mucosa of animals including birds. Some specimens of *Staphylococcus* are frequently recognized as etiologic agents of opportunistic infections in many animals and humans (Coutinho et al., 2009a). *S.*

aureus, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* and *S. haemolyticus* are the most important causative species of human and hospital infections. Besides causing different types of intoxications, *S. aureus* represents the most common etiologic agent of purulent infections (for example, furuncle, carbuncle, abscess, myocarditis, endocarditis, pneumonia, meningitis, bacterial arthritis) (Verhoeff et al., 1999).

E. coli is one of the principal causes of infectious diseases in humans. These bacteria are known to produce enterotoxins whose properties and role in

*Corresponding author. E-mail: efm_biolgia@hotmail.com.
Tel: +55 88 31021212. Fax: +55 88 31021231.

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DE BULBO DE *Costus arabicus*

In vitro *EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND MODULATING THE ETHANOL AND HEXANE EXTRACTS OF Costus arabicus BULB*

Saulo Relison TINTINO¹; Glaucia Morgana de Melo GUEDES¹; Francisco Assis Bezerra CUNHA¹; Karla Katiúcia Alves dos SANTOS¹; Edinaldo Fagner Ferreira MATIAS¹; Maria Flaviana Bezerra MORAIS-BRAGA¹; Jaqueline Cosmo ANDRADE¹; Elba S. SOUZA¹; Maria Audilene FREITAS¹; Liscássia Beatriz Batista ALENCAR¹; José Galberto Martins COSTA²; Henrique Douglas Melo COUTINHO¹

1. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, CE, Brasil. saulorelison@gmail.com; 2. Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais - URCA, Crato, CE, Brasil.

RESUMO: Neste estudo, extratos etanólicos e hexânicos de bulbo de *Costus arabicus* foram utilizados com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da resistência de antibacterianos e antifúngicos contra cepas bacterianas de *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e cepas fúngicas de *Candida Albicans*, *Candida Krusei*, *Candida Tropicalis*. A atividade antibacteriana e modulatória foi determinada por microdiluição. A inibição do crescimento das bactérias e fungos testados com extrato foi ≥ 1024 . A atividade de alguns antibióticos e antifúngicos foi reforçada sinergicamente quando estes extratos foram associados em concentrações sub-inibitórias com antimicrobianos. Portanto, sugerimos que os extratos etanólicos e hexânicos de bulbo de *Costus arabicus* podem ser utilizados como fonte de produtos naturais com o objetivo de modificar a resistência desses microorganismos aos antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: *Costus arabicus*. Produtos naturais. Atividade antibacteriana. Atividade antifúngica. Modulação.

INTRODUÇÃO

Muitas plantas têm sido objeto de intensas pesquisas devido ao seu potencial como fontes de drogas comerciais ou como compostos guia no desenvolvimento das drogas (CORDELL et al., 1991). Há um crescente interesse na influência de compostos biologicamente ativos isolados de plantas no tratamento de doenças causadas por microorganismos (AUSTIN; KRISTINSSON; ANDERSON, 1999).

Escherichia coli é uma das principais causas de doenças infecciosas humanas. São conhecidas por produzir enterotoxinas cujas propriedades e seu papel nas doenças diarreicas tem sido amplamente investigado. A atividade das citotoxinas na infecção humana já foi identificado (KONOWALCHUK et al., 1997, 1978; SCOTLAND et al., 1980), principalmente em infecções do trato urinário (HUNGES et al., 1982). Uma explicação para a cronicidade de algumas infecções oportunistas envolvendo o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* é que este organismo é perito em formar biofilmes em que as bactérias estão protegidas contra as defesas do hospedeiro e antibióticos (COSTERTON et al., 1999). Bactérias do gênero *Staphylococcus* são

distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da mucosa da pele dos pássaros. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em muitos animais e humanos (NOSTRO et al., 2004; COUTINHO et al., 2009).

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO et al., 2004). Candidíase ou candidose é a infecção frequentemente causada por fungos oportunistas, onde as espécies comumente implicados no quadro clínico desta patologia são: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. O espectro da candidíase é muito extenso, indo desde manifestações leves, como a colonização de mucosas até quadros sistêmicos, com a invasão de vários órgãos (COUTINHO, 2009).

Com a utilização inadequada alguns antimicrobianos estão perdendo muito rapidamente sua eficácia, o que torna necessário o desenvolvimento de novos medicamentos e técnicas eficazes de manejo. Assim as perspectivas para uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta.

Cytotoxic, Trypanocidal, and Antifungal Activities of *Eugenia jambolana* L.

Karla K.A. dos Santos,¹ Edinaldo F.F. Matias,¹ Saulo R. Tintino,¹ Celestina E.S. Souza,¹
Maria F.B.M. Braga,¹ Gláucia M.M. Guedes,¹ Miriam Rolón,² Celeste Vega,²
Antonieta Rojas de Arias,² José G.M. Costa,³ Irwin A. Menezes,⁴ and Henrique D.M. Coutinho¹

Laboratories of ¹Microbiology and Molecular Biology, ²Natural Products Research,
and ⁴Pharmacology and Medicinal Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceara, Brazil.
³Center for the Development of Scientific Research, Moisés Bertoni Foundation/Díaz Gill Laboratories, Asunción, Paraguay.

ABSTRACT Chagas' disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered a public health problem. Nowadays, chemotherapy is the only available treatment for this disease, and the drugs currently used, nifurtimox and benznidazole, present high toxicity levels. Alternatives for replacing these drugs are natural extracts from *Eugenia jambolana*, a plant used in traditional medicine because of its antimicrobial and biological activities. An ethanol extract from *E. jambolana* was prepared. To research *in vitro* anti-epimastigote activity, *T. cruzi* CL-B5 clone was used. Epimastigotes were inoculated at a concentration of 1×10^5 mL in 200 μ L of tryptose-liver infusion. For the cytotoxicity assay J774 macrophages were used. To examine antifungal activity, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* were used. This is the first record of trypanocidal activity for *E. jambolana*. The effective concentration capable of killing 50% of the parasites was 56.42 μ g/mL. The minimum inhibitory concentration was ≤ 1.024 μ g/mL. Metronidazole showed a potentiation of its antifungal effect when combined with the ethanol extract of *E. jambolana*. Thus our results indicate that *E. jambolana* could be a source of plant-derived natural products with anti-epimastigote and antifungal modifying activity with moderate toxicity.

KEY WORDS: • antifungal activity • anti-epimastigote activity • Chagas' disease • cytotoxicity • *Eugenia jambolana* • modifying activity

INTRODUCTION

DEVELOPING COUNTRIES with traditional medicinal use of the biodiverse flora, including Brazil, still suffer from the so-called "neglected diseases," such as tuberculosis, malaria, and Chagas' disease,¹ which are treated by traditional communities with natural plant products. Brazil features the largest biodiversity in the world;² however, only 8% have been studied in the search for bioactive compounds.³

Chagas' disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects about 18 million people in the Americas.⁴ This parasite can be transmitted to humans by triatomine insects, foods, blood, and organs from infected donors or by transplacental contamination.⁵ Currently, the chemotherapy of this disease consists mainly of nifurtimox and benznidazole,⁵ which show a cure rate of 70-50% in the acute phase and less than 20% in the chronic phase.⁶ Several studies involving the analysis of natural plant products have recommended them as alternative sources of drugs against *T. cruzi*, including

Arrabidaea triplinervia, *Dracocephalum kotschyi*, and *Azorella compacta*.⁷⁻⁹

The evaluation of the toxicity of active substances is one of the first steps for the use of these compounds in animal models. The drugs currently used for Chagas' disease show a high toxicity because the metabolites produced affect host tissues owing to their high reactivity.⁶

Candidiasis is the most frequent infection caused by opportunistic fungi. The main species associated with this disease are *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. The clinical features of candidiasis are quite diverse, varying between mucosal colonization to the invasion of several internal organs.¹⁰ These yeasts remain in the microbiota, becoming pathogenic in cases such as congenital or acquired immunodeficiency and immunosuppression.¹¹ Several natural products have been studied extensively in the search for alternative treatments for these fungi, including *Himantanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris*, and *Psidium guajava*.¹²⁻¹⁴

Eugenia jambolana (Family Myrtaceae), known in Brazil as *jambolão* and *oliva*, has several scientific synonyms such as *Syzygium cumini* and *Syzygium jambolanum*.¹⁵ This plant is used as a food and in traditional medicine because of its biological properties.^{16,17} Natural products of *E. jambolana*

Manuscript received 25 October 2010. Revision accepted 1 June 2011.

Address correspondence to: Karla K.A. dos Santos, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antonio Luis 1361, Pimenta, 63105-000 Crato, CE, Brazil. E-mail: karla_santos@hotmail.com

Phenolic Compounds and Interaction between Aminoglycosides and Natural Products of *Lygodium venustum* SW against Multiresistant Bacteria

M.F.B. Morais-Braga^a T.M. Souza^a K.K.A. Santos^a G.M.M. Guedes^a
J.C. Andrade^a S.R. Tintino^a C.E. Sobral-Souza^a J.G.M. Costa^b A.A.F. Saraiva^c
H.D.M. Coutinho^a

Laboratories of ^aMicrobiology and Molecular Biology, ^bNatural Products Research, and ^cPaleontology, Regional University of Cariri, Crato, Brazil

© Free Author Copy – for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

Key Words

Lygodium venustum · Ethyl-acetate fraction · Checkerboard method · Aminoglycosides

Abstract

Background: The aim of this work was to evaluate the interactions between aminoglycosides and the ethyl-acetate fraction of the fern *Lygodium venustum* SW (EAFLV). **Methods:** The ethyl-acetate fraction was obtained from the ethanol extract of *L. venustum* and was assayed via the checkerboard method associated with aminoglycosides against two bacterial strains multiresistant to antibiotics. **Results:** The antibiotic activity of all drugs, when associated with the ethyl-acetate fraction, was enhanced in an additive manner, except for the association between EAFLV and amikacin, which showed a synergistic interaction against the *Escherichia coli* strain. **Conclusions:** The results indicated that *L. venustum* can be a source of secondary metabolites to be used in association with antibiotics like aminoglycosides in antibiotic chemotherapy against resistant bacteria.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

Lygodium venustum SW (Lygodiaceae) is a fern commonly found in Latin America. This fern is used in traditional medicine for the treatment of dermatosis, infections, mycosis, trichomoniasis, and other diseases [1–4], and there are reports of its gastroprotective and antibacterial activities in the literature [5–7].

Recently, many natural products have been assayed to verify not only the antibacterial activity of *L. venustum* but also its modulatory antibiotic activity as a strategy to combat bacterial pathogens with resistance to multiple drugs [8–12], due to the enhancement of resistant microorganisms and the successive loss of the drugs activities because of the bacterial mechanisms of resistance [13–16].

The aim of this work was to evaluate the interactions between the ethyl-acetate fraction of *L. venustum* (EAFLV) with aminoglycosides by the checkerboard method.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel
0009–3157/12/0585–0337\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/che

Henrique Douglas Melo Coutinho, PhD
Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, Crato, CE 63105-000 (Brazil)
E-Mail hdmcoutinho@gmail.com



ARTIGO

Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas

Saulo Relison Tintino^{1*}, Francisco Assis Bezerra da Cunha¹, Karla Katiúcia Alves dos Santos¹, Glaucia Morgana de Melo Guedes¹, Celestina Elba Sobral Souza¹, Edinardo Fagner Ferreira Matias¹, Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga¹, Jacqueline Cosme Andrade¹, José Galberto Martins da Costa², Maria Aulilene de Freitas¹ e Henrique Douglas Melo Coutinho¹

Recebido: 6 de agosto de 2012 Recebido após revisão: 23 de março de 2013 Aceito: 7 de abril de 2013
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/serbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2316>

RESUMO: (Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas). A bactéria *Escherichia coli* é conhecida por produzir enterotoxinas capazes de causar diarreia. Algumas espécies de *Staphylococcus* são agentes etiológicos de muitas infecções oportunistas em animais e humanos. *Pseudomonas aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. Candidíase é a micose oportunista mais comum, muitas vezes causada por *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. As plantas medicinais têm sido a fonte de muitos remédios tradicionais aplicados na prática clínica. Neste trabalho, os extratos hexânico e etanólico de *Costus cf. arabicus* foram testados quanto a sua atividade antibacteriana de forma isolada e em combinação com aminoglicosídeos e antifúngicos. O sinergismo dos extratos etanólico e hexânico foi verificado pelo método de microdiluição. Foi observado um efeito sinérgico de ambos os extratos quando combinados com os aminoglicosídeos e antifúngicos. Sugere-se, portanto, que os extratos de *Costus cf. arabicus* poderiam ser usados como uma fonte de produtos naturais com atividade modificadora de resistência a drogas antimicrobianas, fornecendo um novo mecanismo contra o problema da resistência bacteriana e fúngica a drogas.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, *Costus cf. arabicus*, modulação de antimicrobianos.

ABSTRACT: (Modulatory activity of ethanol and hexane extracts of *Costus cf. arabicus* roots on antimicrobial drugs). The bacterium *Escherichia coli* is known to produce enterotoxins causing diarrheal diseases. Some species of *Staphylococcus* are recognized as etiological agents of many animal and human opportunistic infections. *Pseudomonas aeruginosa* is the main cause of nosocomial infections, mainly affecting immunocompromised patients. Candidiasis is the most frequent opportunistic mycosis, frequently caused by *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, and *C. krusei*. Medicinal plants have been the source of many remedies used in the clinical practice. In this study, the hexane and methanol extracts of *Costus cf. arabicus* were assayed to the antibacterial activity alone or associated with aminoglycosides and antifungal drugs. Synergism of the ethanol and hexane were verified by the microdilution method. A synergistic effect of the two extracts combined with the aminoglycosides and antifungal agents was demonstrated. It is therefore suggested that the extracts from *Costus cf. arabicus* could be used as a source of natural products with resistance-modifying antimicrobial activity, providing a new mechanism against the problem of bacterial and fungal resistance to drugs.

Key words: *Costus cf. arabicus*, antimicrobial activity, antimicrobial agents modulation.

INTRODUÇÃO

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é uma das principais causas de doenças infecciosas em humanos. São conhecidas por produzir enterotoxinas cujas propriedades e papel nas doenças diarreicas têm sido amplamente investigados. A atividade das citotoxinas e seu papel na infecção humana já foi identificado (Konowalchuk *et al.* 1977, Scotland *et al.* 1980), principalmente em infecções do trato urinário (Hughes *et al.* 1982, Matias *et al.* 2010). Outra bactéria Gram-negativa, responsável por doenças infecciosas, é a *Pseudomonas aeruginosa*. Esta é um importante patógeno humano que está frequentemente associado a infecções hospitalares acometendo, principalmente, pacientes imunossuprimidos (Ferreira *et al.* 2010). Esta espécie bacteriana tem sido

considerada um patógeno oportunista, uma vez que, raramente, está associada a infecções em indivíduos imunocompetentes (Ferreira *et al.* 2010). A composição física e química (polianiónica) da membrana externa deste micro-organismo demonstra poder de barreira à passagem de substâncias, como antibióticos e antissépticos, que precisam saturar toda a sua superfície antes da penetração, conferindo maior resistência a essas cepas (Ferreira *et al.* 2010).

Já as bactérias Gram-positivas, como as do gênero *Staphylococcus*, são distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da pele e na mucosa dos pássaros. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em muitos animais e humanos (Nostro *et al.* 2004, Coutinho *et al.* 2009). *Staphylococ-*

1. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri (URCA), Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brasil.
2. Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri (URCA), Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, CEP 63105-000, Crato, Ceará, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: santorelison@gmail.com