



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**LARICE BRUNA FERREIRA SOARES**

**POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DE PLANTAS UTILIZADAS EM  
MEDICINA POPULAR NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Recife – PE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**LARICE BRUNA FERREIRA SOARES**

**POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DE PLANTAS UTILIZADAS EM  
MEDICINA POPULAR NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira  
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Gregório Vieira Aquino  
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Mendonça

Recife – PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S676p

SOARES, LARICE BRUNA FERREIRA  
POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DE PLANTAS UTILIZADAS EM MEDICINA POPULAR NO  
ESTADO DE PERNAMBUCO / LARICE BRUNA FERREIRA SOARES. - 2023.  
102 f.

Orientador: KEILA APARECIDA MOREIRA.  
Coorientador: PEDRO GREGORIO VIEIRA .  
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal,  
Recife, 2023.

1. Plantas medicinais. 2. metabólitos secundários. 3. frações. 4. resistência antimicrobiana. 5. radicais livres. I.  
MOREIRA, KEILA APARECIDA, orient. II. , PEDRO GREGORIO VIEIRA, coorient. III. Título

CDD 636.089

---

LARICE BRUNA FERREIRA SOARES

**POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DE PLANTAS UTILIZADAS EM  
MEDICINA POPULAR NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

TESE APRESENTADA E AVALIADA EM 22 DE JUNHO DE 2023, PARA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM BIOCÊNCIA ANIMAL NA  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO. ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: BIOTECNOLOGIA.

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira (Presidente)  
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

---

Profa. Dra. Ana Carolina de Carvalho Correia (Membro externo)  
Universidade de Pernambuco (UPE)

---

Dr. José Erick Galindo Gomes (Membro externo)  
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

---

Profa. Dra. Rosângela Estevão Alves Falcão (Membro externo)  
Universidade de Pernambuco (UPE)

---

Prof. Dr. Vanderson Barbosa Bernardo (Membro externo)  
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Recife – PE

Junho - 2023

A Deus.

À minha mãe, Maria José Ferreira Rodrigues.

À minha filha, Maria Ísis Ferreira de Andrade.

Ao meu esposo, João Luciano de Andrade Melo Junior.

**DEDICO!!**

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela oportunidade do curso.*

*A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos (IBPG 1609-5.05/18).*

*À professora, Keila Aparecida Moreira, pela orientação inestimável, paciência, incentivo, amizade e confiança. Serei sempre grata pela oportunidade.*

*Ao professor, Pedro Gregório Vieira Aquino, pela orientação inestimável, paciência e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.*

*A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todas as circunstâncias, dando-me força e fé para reerguer-me nos momentos difíceis.*

*À minha filha, Maria Ísis Ferreira de Andrade, motivo pelo qual dou o meu melhor todos os dias e dona de todo meu amor. Tudo é por você, sempre será por você!*

*Ao meu esposo, João Luciano de Andrade Melo Junior, por todo companheirismo, incentivo, paciência, amor e por ser meu exemplo e inspiração. Sem você nada seria possível.*

*À minha mãe, Maria José Ferreira Rodrigues, pela educação, dedicação, amor incondicional e apoio, que me fizeram chegar até aqui. Essa conquista é tão sua quanto minha.*

*Às minhas irmãs e irmão, Luciana Ferreira Rodrigues, Liliane Ferreira Soares, Brenna Lays Ferreira Soares, Lucinaldo Ferreira Soares pelo incentivo e companheirismo.*

*Aos meus sobrinhos Lucas Gabriel Ferreira Lira, Thiago Henrique da Silva Ferreira e José Emanuel Ferreira Lira, por todo amor compartilhado.*

*Aos meus familiares e amigos que vibram e torcem por esta conquista.*

*Ao professor, Marcelo Mendonça, pela atenção dedicada a mim todas as vezes que precisei.*

*Aos colegas que acompanharam essa jornada, Maria Tamires Alves Espíndola, Edson Flávio Teixeira da Silva e Wellington Leal dos Santos muito obrigada pelo apoio e parceria de sempre.*

*A todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos (LMTEB). Em especial, a Gleidson Costa Lima, Mariane Mendes da Silva e Mateus Antônio Souto da Silva, pelo auxílio durante a execução dos experimentos.*

*À Universidade Federal do Agreste de Pernambuco e, todos que fazem parte desta instituição e contribuíram de alguma forma.*

*A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.*

*“É justo que muito custe o que muito vale”.*

Santa Tereza D'Avila

## RESUMO

Compostos bioativos extraídos de plantas com atividade biológica, como antimicrobiana e antioxidante, podem ser a chave para a prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, por este motivo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano, antibiofilme, antioxidante e citotóxico de extratos e frações de plantas utilizadas na medicina popular, no estado de Pernambuco. Dez plantas foram coletadas e identificadas, sendo estas, amora (*Morus alba*), aroeira (*Schinus terebinthifolius*), cajueiro-roxo (*Anacardium occidentale*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), gengibre (*Zingiber officinale*), mandacaru (*Cereus jamacaru*), pitangueira (*Eugenia uniflora*), sambacaitá (*Hyptis pectinata*), unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) e uxi-amarelo (*Endopleura uchi*). Foram preparados extratos etanólicos destas plantas, bem como as frações aquosas, clorofórmicas e hexânicas destes extratos. Os extratos e frações foram testados frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estes isolados bacterianos foram testados quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos pelos testes de difusão em poços, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Foi realizada a quantificação do teor de compostos fenólicos, pelo ensaio Folin-Ciocalteu e flavonóides pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio, avaliado também o potencial antioxidante pelos métodos de sequestro de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), determinação da atividade antibiofilme com o corante cristal violeta e teste de citotoxicidade celular quantificado pelo método MTT, das plantas com maior potencial antimicrobiano. Foi observado, pelo teste de difusão em poços que os extratos etanólicos com maior atividade foram aroeira e pitangueira, com halos de inibição de 21,33 mm para *Enterococcus faecalis* e 18,33 mm para *Bacillus subtilis*, respectivamente, a 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi possível identificar que o extrato etanólico da aroeira mostrou melhor atividade pelo teste de CIM, para todas as cepas testadas, em especial para *B. subtilis*, *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* com valores de CIM variando de 0,78 a 1,56 mg.mL<sup>-1</sup>. A análise quantitativa do conteúdo de compostos fenólicos totais revelou maior presença dos mesmos nas frações aquosas e em seguida nos extratos etanólicos, já o conteúdo de flavonoides totais foi mais expressivo para os extratos etanólicos, para ambas as plantas. Pelos testes de ABTS e DPPH a maior porcentagem de eliminação ocorreu na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, tanto para o extrato etanólico (92,04% e 80,42%), como para a fração aquosa (93,73% e 86,63%) da aroeira, respectivamente. Com o extrato etanólico e fração aquosa das folhas de *E. uniflora*, a eliminação média do ABTS foi de 93,33% e 92,29% e a eliminação média do DPPH foi de 83,29% e 87,55%, respectivamente, a 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi identificado redução do biofilme para o extrato etanólico da pitangueira até 87,08%. Assim pode-se concluir que os extratos etanólico e frações aquosas de ambas as plantas possuem expressivo teor de compostos fenólicos e flavonoides. Para a maioria das cepas Gram-positivas e Gram-negativas testadas, aroeira mostra atividade moderada, destacando possível potencial para sua atuação como antimicrobiano de amplo espectro, também apresenta potencial antibiofilme para ambas as plantas. O extrato etanólico e a fração aquosa das folhas aroeira e pitangueira apresentam elevado potencial antioxidante, quando analisados pelos métodos de ABTS e DPPH. O que demonstra que ambas as plantas podem servir como matérias-primas para indústria farmacêutica, uma vez que possuem compostos bioativos com atividade biológica como antimicrobiana e/ou antioxidante, bem como, justifica o vasto uso popular das mesmas.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais, metabólitos secundários, extratos, frações, resistência antimicrobiana, radicais livres.

## ABSTRACT

Bioactive compounds extracted from plants with biological activity, such as antimicrobial and antioxidant, may be the key to the prevention and/or treatment of several diseases, for this reason, the present work aimed to evaluate the antimicrobial, antibiofilm, antioxidant and cytotoxic potential of extracts and fractions of plants used in folk medicine, in the state of Pernambuco. Ten plants were collected and identified, these being, amora (*Morus alba*), aroeira (*Schinus terebinthifolius*), cajueiro-roxo (*Anacardium occidentale*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), gengibre (*Zingiber officinale*), mandacaru (*Cereus jamacaru*), pitanga (*Eugenia uniflora*), sambacaitá (*Hyptis pectinata*), unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) and uxi-amarelo (*Endopleura uchi*). Then, ethanol extracts of these plants were prepared, as well as their aqueous, chloroform and hexane fractions. The extracts and fractions were tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The isolates were tested for their antimicrobial susceptibility profile by diffusion tests in wells, at concentrations of 10 and 20 mg.mL<sup>-1</sup>, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), at concentrations from 0.195 to 25 mg.mL<sup>-1</sup>. The quantification of the content of phenolic compounds, by the Folin-Ciocalteu assay and flavonoids by the colorimetric method with aluminum chloride, also evaluated the antioxidant potential by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging methods. and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), determination of antibiofilm activity with crystal violet dye and cell cytotoxicity test quantified by the MTT method, of plants with greater antimicrobial potential. It was observed, by the diffusion test in wells, that the ethanolic extracts with greater activity were aroeira and pitangueira, with inhibition zones of 21.33 for *E. faecalis* and 18.33 for *B. subtilis*, respectively, at 20 mg.mL<sup>-1</sup>. It was possible to identify which aroeira ethanolic extract showed better activity by the MIC test, for all strains tested, especially for *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichiacoli* and *Klebsiella pneumoniae* with values of MIC ranging from 0.78 to 1.56 mg.mL<sup>-1</sup>. The quantitative analysis of the content of total phenolic compounds reveals their greater presence in the aqueous fractions and then in the ethanolic extracts, since the content of total flavonoids was more expressive for the ethanolic extracts, for both plants. By the ABTS and DPPH tests, the highest percentage of elimination occurred at the lowest concentration, 0.195 mg.mL<sup>-1</sup>, both for the ethanolic extract, 92.04% and 80.42%, and for the aqueous fraction, 93.73% and 86.63% of *S. terebinthifolius*, respectively. With the ethanolic extract and aqueous fraction of *E. uniflora* leaves, the mean elimination of ABTS was 93.33 and 92.29% and the mean elimination of DPPH was 83.29% and 87.55%, respectively, at 0.195 mg.mL<sup>-1</sup>. Biofilm reduction was identified for the *E. uniflora* ethanolic extract up to 87.08%. It can be concluded that the ethanolic extracts and aqueous fractions of both plants have excellent content of phenolic compounds and flavonoids. For most Gram-positive and Gram-negative strains tested, *S. terebinthifolius* shows moderate activity, highlighting a possible potential for its role as a broad-spectrum antimicrobial. Antibiofilm potential was identified for both plants. The ethanolic extract and the aqueous fraction of the leaves of *S. terebinthifolius* and *E. uniflora* have high antioxidant potential, when analyzed by ABTS and DPPH methods. This demonstrates that both plants can serve as raw materials for the pharmaceutical industry, since they have bioactive compounds with biological activity such as antimicrobial and/or antioxidant, as well as justifying their vast popular use.

**Key words:** antioxidant. antimicrobial resistance. natural products. secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Folhas, frutos (A) e árvore (B) de *Schinus terebinthifolius* Raddi., localizada em Garanhuns – PE.....22
- Figura 2.** Folhas, frutos (A) e árvore (B) de *Eugenia uniflora* L., localizada em Garanhuns – PE.....25

## CAPÍTULO I

### POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIBIOFILME E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Eugenia uniflora* L. E *Schinus terebinthifolius* Raddi

- Figura 1.** Rendimento (%) dos extratos etanólicos e frações aquosas, hexânicas e clorofórmicas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia. uniflora*.....53
- Figura 2.** Inibição da formação de biofilme frente à bactéria *Enterococcus faecalis* pelo extrato etanólico de *Schinus terebinthifolius*.....62
- Figura 3.** Inibição da formação de biofilme frente à bactéria *Listeria monocytogenes* pelo extrato etanólico (A) e fração aquosa (B) de *Eugenia Uniflora*.....63

## CAPÍTULO II

### POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES AQUOSAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi E *Eugenia uniflora* L.

- Figura 1.** Eliminação do radical ABTS+• em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de *Schinus terebinthifolius* e a sua equivalência ao trolox.....80

<b>Figura 2.</b>	Eliminação do radical DPPH• em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de <i>Schinus terebinthifolius</i> e a sua equivalência ao ácido ascórbico.....	82
<b>Figura 3.</b>	Eliminação do radical ABTS+• em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de <i>Eugenia uniflora</i> e a sua equivalência ao trolox.....	83
<b>Figura 4.</b>	Eliminação do radical DPPH• em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de <i>Eugenia uniflora</i> e a sua equivalência ao ácido ascórbico.....	85

### CAPÍTULO III

#### UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.: RELATOS DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA PLANTA DA CAATINGA BRASILEIRA

<b>Figura 1.</b>	Compostos químicos presentes em extratos de <i>E. uniflora</i> L.....	96
------------------	---	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

#### POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIBIOFILME E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Eugenia uniflora* L. E *Schinus terebinthifolius* Raddi

<b>Tabela 1.</b>	Teor de fenólicos totais em extratos etanólicos e frações aquosas, hexânicas e clorofômicas de <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Eugenia uniflora</i> liofilizados.....	51
<b>Tabela 2.</b>	Teor de flavonoides totais em extratos etanólicos e frações aquosas, hexânica e clorofômica de <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Eugenia uniflora</i> liofilizados.....	51
<b>Tabela 3.</b>	Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos (EE), frações aquosas (FA), frações hexânicas (FH) e frações clorofômicas (FC) de <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Eugenia uniflora</i> frente às bactérias Gram-positivas pelo método de difusão em disco.....	56
<b>Tabela 4.</b>	Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos (EE), frações aquosas (FA), frações hexânicas (FH) e frações clorofômicas (FC) de <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Eugenia uniflora</i> frente às bactérias patogênicas Gram-negativas pelo método de difusão em disco.....	57
<b>Tabela 5.</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico (EE) e fração aquosa (FA) e hexânica (FH) da planta <i>Schinus terebinthifolius</i> em bactérias patogênicas, determinadas pelo método de microdiluição.....	58
<b>Tabela 6.</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico (EE) e fração aquosa (FA) e hexânica (FH) da planta <i>Eugenia uniflora</i> em bactérias patogênicas, determinadas pelo método de microdiluição.....	60

## CAPÍTULO II

### POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES AQUOSAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi E *Eugenia uniflora* L.

<b>Tabela 1.</b>	Eliminação do radical ABTS <sup>+</sup> • (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	79
<b>Tabela 2.</b>	Eliminação do radical DPPH• (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	81
<b>Tabela 3.</b>	Eliminação do radical ABTS <sup>+</sup> • (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .....	83
<b>Tabela 4.</b>	Eliminação do radical DPPH• (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> .....	84

## CAPÍTULO III

### UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.: RELATOS DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA PLANTA DA CAATINGA BRASILEIRA

<b>Tabela 1.</b>	Atividade antimicrobiana de extratos de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. para diferentes microrganismos .....	99
------------------	---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Plantas medicinais .....	21
2.1.1 Aroeira ( <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi).....	22
2.1.2 Pitangueira ( <i>Eugenia uniflora</i> L.).....	24
2.2 Metabólitos secundários .....	27
2.3 Resistência microbiana .....	29
2.4 Radicais livres e antioxidante .....	31
3. OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo geral .....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. REFERÊNCIAS .....	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	102

## CAPÍTULO I

### POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIBIOFILME E CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Eugenia uniflora* L. E *Schinus terebinthifolius* Raddi

RESUMO.....	42
ABSTRACT .....	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 Coleta de material.....	45
2.2 Obtenção dos extratos etanólicos .....	45
2.3 Fracionamento dos extratos etanólicos.....	45
2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais .....	46
2.5 Determinação do teor de flavonoides totais .....	47
2.6 Microrganismos .....	47
2.7 Teste de difusão em ágar .....	47
2.8 Determinação da CIM e CBM.....	48

2.9 Avaliação da produção de biofilme bacteriano.....	49
2.10 Atividade antibiofilme.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1 Teor de compostos fenólicos e flavonoides.....	50
3.2 Testes de difusão em disco .....	53
3.3 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima.....	58
3.4 Atividade antibiofilme.....	61
4. CONCLUSÃO.....	64
5. REFERÊNCIAS .....	65

## CAPÍTULO II

### **POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES AQUOSAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi E *Eugenia uniflora* L.**

RESUMO.....	71
ABSTRACT .....	72
1. INTRODUÇÃO.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1 Coleta de material.....	75
2.2 Obtenção dos extratos etanólicos .....	75
2.3 Fracionamento dos extratos etanólicos .....	75
2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais .....	76
2.5 Determinação do teor de flavonoides totais .....	76
2.6 Avaliação da atividade antioxidante.....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4. CONCLUSÃO.....	89
5. REFERÊNCIAS .....	90

## CAPÍTULO III

**UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.: RELATOS  
DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA  
PLANTA DA CAATINGA BRASILEIRA**

1. INTRODUÇÃO.....	94
2. PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS DE FOLHAS <i>Eugenia uniflora</i> L.....	94
3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS <i>Eugenia uniflora</i> L.....	97
4. CONCLUSÃO.....	100
5. REFERÊNCIAS .....	100

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem se tornado cada vez mais comum a resistência a antimicrobianos, consequentemente, aumentando o estímulo a busca de novos fármacos que possam atuar no combate aos microrganismos resistentes, com destaque para os produtos de origem natural, já que os mesmos apresentam uma ampla variedade de compostos a serem descobertos e estudados. As plantas e seus metabólitos secundários, que na maioria das vezes, apresentam grande potencial frente a infecções de origem bacteriana, fúngica, parasitária ou viral, entre tantas outras atividades (NEWMAN; CRAGG, 2020).

A resistência antimicrobiana esta associada ao uso indiscriminado de medicamentos e afeta tanto a saúde humana quanto animal, uma vez que resulta em fármacos ineficazes e consequentemente impossibilitando o tratamento de infecções (OPAS, 2023). Como é o caso da formação de biofilmes por bactérias, podendo aumentar consideravelmente a resistência destas a tratamentos antibióticos (RIZI; GHAZVINI; NOGHODAR, 2018).

Entre as atividades associadas as plantas, a atividade antioxidante, é de grande importância, uma vez que compostos antioxidantes são capazes de minimizar ou impedir a ação deletéria de radicais livres nos organismos e consequentemente ser a chave na prevenção ou tratamento de doenças que afetam a homens e animais (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020; LONGOBARDI *et al.*, 2022; TOLEDO *et al.*, 2023). Além de impedirem a deterioração de alimentos devido a processos de oxidação, sendo de grande importância para a indústria alimentícia (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

Sendo assim, as plantas medicinais são importantes aliadas, consideradas como primeira fonte de substâncias para uso terapêutico, por apresentarem uma diversidade de fitoquímicos com potenciais antimicrobianas e antioxidantes (CHOWDAIAH *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2019; NEWMAN; CRAGG, 2020, SOBEH *et al.* 2020). Diversas técnicas podem ser empregadas para a obtenção de substâncias produzidas na natureza, sendo necessário a utilização de métodos apropriados de extração, a fim de se obter extratos e frações ricas em compostos bioativos (LEFEBVRE; DESTANDAU; LESELLIER, 2021, KAPADIA *et al.*, 2022).

Tendo em vista o aumento contínuo da resistência antimicrobiana a fármacos comerciais e a necessidade de novos componentes que possam ser atuantes contra patógenos, bem como, o conhecimento sobre atividade antioxidante das plantas e a valorização do conhecimento popular, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme,

antioxidante, citotóxica e o perfil fitoquímico preliminar de extratos etanólicos e frações quimicamente diversas de plantas medicinais utilizadas em Pernambuco.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais na Região Nordeste é uma prática antiga e repassada entre gerações, tal prática também está relacionada a diferentes comunidades indígenas, quilombolas, rurais e diversidade local. São diversas as espécies utilizadas, para as mais variadas finalidades farmacológicas como adstringentes, antifúngicos, antimicrobianos, cicatrizantes, anti-inflamatórios, antivirais, antidepressivos, analgésicos, cardiovasculares, endócrinos e estimulantes são algumas atividades relatadas. Sendo que as partes de plantas mais utilizadas são folhas, raiz, casca, fruto e semente (SOUZA *et al.*, 2019; MAGALHÃES; BANDEIRA; MONTEIRO, 2020).

Entre as plantas medicinais utilizadas como antimicrobianas na medicina popular do Nordeste estão *Punica granatum* L. (romã), *Aloe vera* L. (babosa), *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Zingiber officinale* (gengibre), *Azadirachta indica* (nim), *Zyziphus joazeiro* (juazeiro), *Bryophyllum pinnatum* (saião) e *Plectranthus amboinicus* (malvariço), *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão), *Hyptis pectinata* L. (sambacaitá) (BARACUHY *et al.*, 2016).

Na Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro e o maior da Região Nordeste, encontram-se diversas plantas que apresentam potencial para uso medicinal, entre as quais, destacam-se *Hymenaea courbaril* L. (jatobá), *Pombalia calceolaria* (L.) (pepaconha), *Lippia alba* (Mill.) (erva-cidreira-de-arbusto), *Blainvillea acmella* (L.) (agrião), *Operculina macrocarpa* (L.) (jalapa brasileira), *Phyllanthus niruri* L (quebra-pedra), *Myracrodruon urundeuva* All (aroeira do sertão), *Erythroxylum vacciniifolium* (catuaba), *Anacardium occidentale* L. (cajueiro) e *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) e *Cereus jamacaru* DC (mandacaru) (MAGALHÃES; BANDEIRA; MONTEIRO, 2020).

### 2.1.1 Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi. pertence à família Anacardiaceae, gênero *Schinus* L., popularmente conhecida como aroeira-da-praia, aroeira-de-remédio, aroeira-mansa, aroeira-vermelha, estando amplamente distribuída em vários estados brasileiros (Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SIBBR, 2019).

Trata-se de uma árvore ou arbusto que pode chegar de 3 a 15 m de altura, possuindo uma copa larga e arredondada (Figura 1). O tronco geralmente é curto e tortuoso, com casca externa grossa, sulcada e escamosa de coloração escura, com casca interna avermelhada e com aroma característico. As folhas são compostas, alternas, imparipenadas, membranáceas e verde-escuras. Os frutos apresentam coloração vermelho brilhante (CARDOSO e SILVEIRA, 2010).



**Figura 1.** Folhas, frutos (A) e árvore (B) de *Schinus terebinthifolius* Raddi., localizada em Garanhuns – PE.

Fonte: Autoria própria, 2022.

A mesma possui diversas finalidades, por exemplo, os frutos são utilizados como especiaria, enquanto a casca, folhas e raízes são frequentemente usados em medicina popular no tratamento de diferentes distúrbios de saúde, tornando-a importante tanto de forma econômica, quanto medicinal (CARVALHO *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo a família Anacardiaceae relatam diversas atividades farmacológicas, como atividade anti-leishmania (CARVALHO *et al.*, 2017), propriedades gastroprotetoras e anti-inflamatórias (GALVÃO *et al.*, 2018), antimicrobianas, antioxidante (D'SOUSA' COSTA *et al.*, 2015), analgésicas (PICCINELLI *et al.*, 2015) e antivirais (NOCCHI *et al.*, 2017).

Na medicina popular, *S. terebinthifolius* é usada no tratamento de diversas doenças, como por exemplo, infecções do trato respiratório, distúrbios urinários, febrífugo, analgésico, anti-inflamatório, antimicrobiano, cicatrizante, doenças sexualmente transmissíveis e distúrbios digestivos (GALVÃO *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2019); fazendo parte da Lista Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do Sistema Único de Saúde - SUS - RENISUS (BRASIL, 2009).

Estudos fitoquímicos de extratos metanólicos de folhas de *S. terebinthifolius* relataram a presença de polifenóis e flavonoides como principais componentes (EL-MASSRY *et al.*, 2009, SANTANA *et al.*, 2012), em outro estudo, foram identificados os compostos fenólicos, antraquinonas, alcaloides e terpenoides (BARBIERI *et al.*, 2014). Ainda a partir do extrato metanólico de folhas, foram identificados dois derivados do ácido gálico, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -glucopiranosídeo e galato de metila; e quatro flavonoides, robustaflavona, quercetina, quercetrina e luteolina (SILVA *et al.*, 2017). Compostos fenólicos e flavonoides, em especial o ácido gálico, galotanino e flavonóis glicosilados foram os últimos a serem identificados (ROCHA *et al.*, 2019).

No extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolius*, diversos compostos fenólicos já foram identificados, entre eles, estão o ácido cafeico, o ácido cumárico e o ácido singárico (EL-MASSRY *et al.*, 2009). Triterpenos tirucalanos, foram isolados por técnicas cromatográficas e confirmados por ressonância magnética nuclear e análise espectral (MORAIS *et al.*, 2014).

Outro estudo utilizou dois métodos distintos de extração e identificou diferenças de acordo com a técnica utilizada, por ultrassom foram obtidos maiores teores de flavonoides e por maceração foi obtido maior teor de compostos fenólicos totais. Através de análises de espectrometria de massa, foram identificados como principais componentes dos extratos a quercetina, além dos ácidos ferúlico e cafeico (ULIANA *et al.*, 2016). Da Silva *et al.* (2018), relataram a presença de ácidos fenólicos, taninos, ácidos graxos e triterpenos, por análises fitoquímicas e a presença de galato de etila, em espectrometria de massas.

Quando avaliado o potencial antimicrobiano, nos extratos metanólico e acetato de etila de folhas de *S. terebinthifolius*, os mesmos demonstraram inibição na formação de biofilmes *in vitro* frente aos microrganismos *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* com valor da

Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) de 0,007 mg.mL<sup>-1</sup> para ambas as cepas (BARBIERI *et al.*, 2014).

Ao estudarem a atividade antimicrobiana de extrato etanólico, extrato de diclorometano e óleo essencial de folhas da aroeira, pelo método de difusão em disco e concentração mínima de inibição (CIM), os resultados indicaram que o extrato de diclorometano de folhas mostrou forte inibição no crescimento das cepas *Pseudomonas aeruginosa* (23 mm com CIM de 0,55 mg.mL<sup>-1</sup>), *Staphylococcus aureus* (20 mm com 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>), *Aspergillus niger* (18 mm com 0,85 mg.mL<sup>-1</sup>), *Aspergillus parasiticus* (15 mm com 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>) e *Candida albicans* (19 mm com 0,75 mg.mL<sup>-1</sup>). O óleo essencial e o extrato etanólico mostraram atividade moderada com valores de CIM variando entre 0,75 e 1,10 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo a menor atividade para cepa *Escherichia coli*, como controle positivo foram utilizados sulfato de gentamicina e nistatina (50 UI) (EL-MASSRY *et al.*, 2009).

Ainda se tratando de extratos etanólicos de folhas, foi identificada maior inibição frente a *S. aureus* e *E. coli* e atividade moderada para *C. albicans* com valores de CIM de 500, 250 e 750 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em comparação ao óleo essencial com valor de CIM > 1000 µg.mL<sup>-1</sup> e ao controle positivo com norfloxacina CIM > 500 µg.mL<sup>-1</sup>, amplamente utilizada no tratamento em infecções do trato urinário (ULIANA *et al.*, 2016).

Avaliando-se a atividade antimicrobiana de extrato etanólico e suas frações, obtidas de frutos e folhas de *S. terebinthifolius* contra *E. coli*, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans*, observou-se que todas as amostras analisadas mostraram efeito microbicida. A maior sensibilidade para as amostras analisadas foi observada contra a cepa *E. coli*, com valores de 78 µg.mL<sup>-1</sup> para CBM e CIM, para o extrato etanólico e para a fração hexânica, e de 39 µg.mL<sup>-1</sup> para fração com o acetato de etila (DA SILVA *et al.*, 2018).

### 2.1.2 Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

Conhecida popularmente como pitangueira, *Eugenia uniflora* L. é uma espécie nativa do Brasil e amplamente distribuída nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul. Trata-se de um arbusto denso que normalmente apresenta de dois a quatro metros de altura (Figura 2). As folhas são opostas, simples, com pecíolo curto de mais ou menos 2,0 mm, e quando maceradas exalam um odor característico. Sua fenologia é fortemente influenciada pelas condições climáticas e por este motivo as épocas de floração e frutificação, podem variar (SIBBR, 2021).



**Figura 2.** Folhas, frutos (A) e árvore (B) de *Eugenia uniflora* L., localizada em Garanhuns – PE.

Fonte: Autoria própria, 2022.

Na medicina tradicional, a mesma é utilizada para diversas finalidades de tratamento de doenças infecciosas, principalmente contra infecções intestinais, além de afrodisíaco, anti-inflamatório, diurético, antirreumático, antidiabético, antifebril entre outras possibilidades. Diversas partes das plantas são utilizadas para estas finalidades, desde galhos, folhas, frutas e partes aéreas, especialmente por meio de infusões (DE SOUZA *et al.*, 2018; FIDELIS *et al.*, 2022).

Além disso, diversos estudos estão sendo realizados a fim de elucidar seu potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico, antidiabético (FALCÃO *et al.*, 2018; SOBEH *et al.*, 2019), hepatoprotetor (SOBEH *et al.*, 2020), neuroprotetor (FLORES *et al.*, 2020), antiparasitário (ABDELFATTAH *et al.*, 2021), dentre outras diversas atividades. Assim como, o perfil químico de seus extratos etanólicos e frações (FALCÃO *et al.*, 2018).

Estudos a respeito dos compostos isolados da planta vêm sendo descritos na literatura, quando avaliado extratos produzidos a partir de folhas de *E. uniflora*. Na análise fitoquímica do extrato metanólico de *E. uniflora*, foi identificado a presença de fenóis, taninos, chalconas, auronas, flavonas, catequinas, flavonoides, saponinas, ácidos fortes fixos, esteroides livres e quinonas (SILVA *et al.*, 2012). Também utilizando extrato metanólico de folhas de *E. uniflora*,

submetidas a procedimentos cromatográficos e a caracterização dos compostos por análises ultravioleta, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear, foi isolado um novo composto, ácido gálico 3-O-[6'-O-acetil-β-D-glucosídeo], juntamente com 16 metabólitos secundários vegetais já conhecidos (SOBEH *et al.*, 2019).

Quando avaliado o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, por cromatografia líquida de alta eficiência, foram identificados os ácidos gálico, clorogênico, cafeico, elágico, bem como os compostos cianidina, delphinidina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina, campferol e luteolina. No mesmo estudo, foi demonstrado ainda que o extrato em questão não foi citotóxico nem genotóxico para leucócitos humanos nas concentrações testadas (DA CUNHA *et al.*, 2016).

Pela técnica de microextração em fase sólida foi identificado a presença de 33 compostos em amostras de folhas de *E. uniflora*, com biótipos de frutos de coloração laranja, vermelho e roxo. Destes, a maioria dos constituintes voláteis pertencem a classe dos hidrocarbonetos sesquiterpenos (MESQUITA *et al.*, 2017). Enquanto, no perfil cromatográfico obtido com o extrato acetônico de folhas de *E. uniflora* foram identificados a presença de um ácido gálico e miricitrina (SOUZA *et al.*, 2018).

Quando avaliado a composição química de extrato acetônico bruto, fração aquosa e de acetato de etila de folhas de *E. uniflora* foram identificados através de análises cromatográficas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os compostos ácido gálico e ácido elágico e o flavonoide miricitrina (FALCÃO *et al.*, 2018). No perfil fitoquímico da fração acetato de etila de folhas vermelhas de *E. uniflora* foram identificados uma grande variedade de polifenóis, como quercetina, miricetina, apigenina e kaempferol (SOBEH *et al.*, 2020).

Quando analisado a atividade antimicrobiana do extrato acetônico bruto, frações aquosas e acetato de etila das folhas da pitangueira foi observado que os mesmos inibiram o crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, com valores de CIM variando de 0,000313 a 0,0025 mg.mL<sup>-1</sup>. O extrato acetônico não apresentou ação frente a *S. aureus* MRSA. Os antibióticos cefalotina, gentamicina e vancomicina foram utilizadas como controle positivo com valores de CIM variando de 0,00025 a 0,008 mg.mL (FALCÃO *et al.*, 2018).

Em um estudo, onde foi avaliado a atividade antibacteriana *in vitro*, do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, foi identificado que o mesmo reduziu a formação de biofilme de *Streptococcus mutans*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei*, além da redução de sangramentos causados por gengivite (JOVITO *et al.*, 2016).

Ao analisarem a atividade antibacteriana do extrato metanólico bruto de folhas de *E. uniflora*, frente a cepas *S. aureus* e *E. coli*, SILVA *et al* (2012) observaram valor da CIM de 24,1 e 15,9 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, neste estudo não foi utilizado controle positivo.

Em um estudo de Fiuza *et al.* (2008), o extrato etanólico bruto das folhas de *E. uniflora* inibiu o desenvolvimento das bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus roseus*, *M. luteus*, *Bacillus cereus*, *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* e a cepa Gram-negativa *P. aeruginosa*, com CIMs variando de 0,273 a 8,75 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ao utilizarem o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* com potencial antifúngico frente a cepas *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, Santos *et al.* (2013), constataram que o mesmo apresentou uma CIM > 1,024 mg.mL<sup>-1</sup>, o que não demonstrou relevância do mesmo como antifúngico, no entanto, foi observado efeito sinérgico quando houve associação do mesmo com o metronidazol contra a cepa de *C. tropicalis*, reduzindo a CIM desse antifúngico em quatro vezes.

Quando se trata de atividade antifúngica do extrato bruto utilizando o solvente acetona frente a diferentes espécies de *Candida* spp., foi identificado uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,312 mg.mL<sup>-1</sup> para *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis* e de 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> para *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Bem como, foi identificado que o mesmo reduziu de forma significativa a formação de biofilmes em cepas produtoras de biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis*, na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> (SOUZA *et al.*, 2018).

## 2.2 Metabólitos secundários de plantas

Metabólitos secundários são compostos químicos sintetizados a partir do metabolismo de plantas que atuam em funções essenciais, principalmente na adaptação das mesmas em condições de estresses bióticos e abióticos do meio ambiente, sobretudo na proteção contra herbívoros, bactérias, fungos, vírus e plantas concorrentes (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020).

Fatores genéticos e ambientais podem interferir na biossíntese e no acúmulo de metabólitos secundários nas plantas, como luz, temperatura, umidade do solo, fertilidade do solo, estação do ano, radiação ultravioleta e salinidade. Para a maioria das plantas, a mudança de apenas um destes fatores pode levar a mudanças quimiotípicas ou alterar os níveis dos metabólitos presentes nas mesmas, ainda que os demais fatores permaneçam constantes (YANG *et al.*, 2018; YESHI *et al.*, 2022).

Os metabólitos secundários de plantas são utilizados com finalidades medicinais e mais de 25% das drogas existentes tem como base esses metabólitos, sejam como fármacos ou servindo de matéria prima para modificações semissintéticas, bem como aditivos alimentares para fins terapêuticos, aromáticos e culinários (YANG *et al.*, 2018; YESHI *et al.*, 2022). Compostos naturais de variadas classes são utilizados com diversas finalidades medicinais como, por exemplo, antigota, expectorante, anticâncer, analgésico, anti-alzheimer, antimalárica, antisséptica, antiemético, entre outras (YANG *et al.*, 2018; WAWROSCHEK; ZOTCHEV, 2021).

Existem três principais grupos de metabólitos secundários de plantas que são os terpenoides que incluem esteróis, carotenóides, saponinas e glicosídeos; os compostos fenólicos que incluem flavonoides, ácidos fenólicos, lignina, lignanas, cumarinas, estilbenos e taninos; e por fim compostos contendo nitrogênio que seriam os alcaloides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos (YESHI *et al.*, 2022).

Martínez *et al.* (2021) reportaram os produtos antibacterianos mais utilizados em estudos entre 2016 a 2021, tendo como base compostos de origem vegetal, identificando que a grande maioria dos estudos relaciona esta atividade a extratos vegetais, seguido dos compostos puros como terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos e alcaloides. Entre os compostos que apresentaram atividade antimicrobiana alta com valores de CIM inferiores a  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  estão os flavonoides. O mecanismo de ação de terpenos e flavonoides está associado principalmente ao rompimento da membrana plasmática bacteriana e extravasamento do conteúdo intracelular (MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

Entre as atividades associadas aos flavonoides, também está a ação antioxidante dos mesmos, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres. Além destes, fenóis, ácidos fenólicos, carotenoides são compostos relacionados a esta atividade (SOBEH *et al.*, 2020; TOLEDO *et al.*, 2023).

### **2.3 Resistência antimicrobiana**

A importância do estudo de novas substâncias antimicrobianas, como os metabólitos secundário de plantas, está diretamente relacionada ao mau uso de substâncias na prevenção, controle ou tratamento de doenças infecciosas em humanos e animais, tem contribuído significativamente para o aumento da resistência a antimicrobianos. Esse aspecto, tem se

agravado, pela transmissão de agentes infecciosos resistentes de pessoa para pessoa e através de fontes ambientais. Tornando cada dia mais difícil o desenvolvimento de tratamentos eficientes no combate dessas infecções em especial quanto ao uso de antibióticos (BRINKAC *et al.*, 2017; MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

A grande maioria das classes de antimicrobianos utilizados em humanos, também é usada em animais, para manter a saúde e a produtividade, especialmente na bovinocultura, avicultura e suinocultura, onde há uma crescente utilização de antibióticos na prevenção de doenças e como promotores de crescimento. Estima-se que este aumento quanto ao uso de antimicrobianos de forma global será de 67%, entre os anos de 2010 a 2023 (BOECKEL *et al.*, 2015), desta forma, quando se trata da saúde animal, é importante considerar o uso de antimicrobianos de forma indiscriminada, uma vez que estes na sua maioria das vezes são de suma importância no combate de infecções para os seres humanos (MCEWEN; COLLIGNON, 2018).

Outros fatores causadores da resistência antimicrobiana que devem ser destacados é a venda de antibióticos sem prescrição médica, aplicação em lavouras, saneamento inapropriado e descarte inadequado de medicamentos ou resíduos industriais que podem levar a poluição de solos e córregos, permitindo que microrganismos desenvolvam resistência (SAMREEN *et al.*, 2021).

A Organização Mundial de Saúde recentemente sinalizou o aumento da resistência a antibióticos em infecções bacterianas na corrente sanguínea acima de 50% para as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter* spp., sendo necessário a utilização de antibióticos de último recurso como os carbapenêmicos, sendo que, 8% das infecções por *Klebsiella pneumoniae* mostraram-se resistentes aos carbapenêmicos, elevando assim o risco de morte em humanos. Além disso, infecções por *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. aumentaram em pelo menos 15%, comparado aos anos anteriores (OMS, 2022).

Também foi identificado aumento da resistência a fármacos utilizados no tratamento das doenças causadas por várias bactérias que acarretam infecções comuns, como foi observado em mais de 20% dos isolados de *E. coli*, patógeno mais comum em infecções do trato urinário, mostrando resistência aos medicamentos de primeira linha como ampicilina e cotrimoxazol e aos tratamentos de segunda linha como é o caso das fluoroquinolonas (OMS, 2022).

Todos esses fatores influenciam diretamente na questão econômica mundial, gerando um alto custo financeiro, principalmente pelos custos do tratamento relacionados a maior duração em hospitalizações, além de colocar milhões de vidas em risco (SAMREEN *et al.*, 2021). Estima-se que 1,3 milhão de pessoas morrem anualmente devido à resistência bacteriana.

Ademais, é importante ressaltar que 1,3 bilhão de pessoas dependem da pecuária para sua subsistência, especialmente em países em desenvolvimento. O aumento de cepas resistentes afeta diretamente essa atividade, uma vez que causa maior sofrimento e perdas de animais (OIE, 2022).

Em ação conjunta a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (ONU/FAO), o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), recentemente lançaram uma plataforma multissetorial de resistência antimicrobiana, com o intuito de garantir que as crescentes ameaças e impactos da resistência antimicrobiana sejam abordados globalmente (FAO; UNEP; WHO; WOA, 2022). Por estes motivos, torna-se necessário a busca por novas alternativas que atuem no combate a estas infecções.

A resistência microbiana ocorre quando o micro-organismo (bactérias, fungos, vírus ou parasitos) sofrem alterações quando expostos ao uso indevido ou excessivo a antimicrobianos, resultando em fármacos ineficazes e impossibilitando o tratamento de infecções, levando ao aumento do risco de transmissão para outras pessoas e/ou animais (OPAS, 2023).

A mesma pode ocorrer de forma intrínseca, adquirida ou adaptativa. De forma intrínseca, ou seja, fatores inerentes a bactéria, como é o caso de bactérias Gram-negativas, que possuem maior impermeabilização da membrana externa por possuírem uma camada de peptidoglicanos. A adquirida ocorre quando a bactéria previamente sensível adquire resistência por mutação ou aquisição de material genético por transferência horizontal de genes (transformação, transdução ou conjugação). E adaptativa, quando o micro-organismo se torna resistente a um ou mais antibióticos por fatores ambientais, como estresse, pH, condições nutricionais, níveis subinibitórios do fármaco, formação de biofilmes, entre outros, de tal maneira que acontece de forma transitória (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2019).

A formação de superfícies de biofilme consiste na produção de uma matriz polissacarídica, produzida por bactérias livres (plactônicas) que facilitam o acesso das mesmas a nutrientes, a multiplicação e união entre células bacterianas formando uma estrutura complexa (OLSEN, 2015).

Tal estrutura dificulta o acesso de antibióticos às células bacterianas presentes em camadas mais internas do biofilme, uma vez que a diminuição do contato das mesmas com o ambiente, bem como a penetração de substância acontece de forma lenta e restrita (RIZI; GHAZVINI; NOGHONDAR, 2018), podendo aumentar em até 1000 vezes a resistência a tratamentos antibióticos, quando comparadas a infecções por bactérias que não apresentam atividade formadora de biofilmes (OLSEN, 2015).

## 2.4 Radicais livres e antioxidante

Radicaís livres são produzidos pelo metabolismo celular, como por exemplo respiração, digestão ou através de eventos patológicos e, quando em excesso no organismo podem causar oxidação de moléculas biológicas, podendo destruir componentes celulares, impedir a ação de enzimas importantes, causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos, bloquear a geração de energia, dentre outras ações (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Os mesmos podem ser classificados como EROS, quando se trata de espécies reativas de oxigênio (PISOSCHI; POP, 2016). Em quantidade adequada, os radicaís livres atuam em funções para homeostase do organismo, como por exemplo na destruição intracelular de bactérias por fagocitose, imunidade e defesa celular. Porém em desequilíbrio, podem estar envolvidos com um grande número de doenças (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Os principais radicaís livres derivados do oxigênio são superóxido ( $O_2\cdot$ ) e radical hidroxila ( $HO\cdot$ ), estes estão associados condições de danos celular e apoptose (PADUREANU *et al.*, 2019). Por este motivo estão relacionados a doenças diversas, como neoplasias, diabetes, doenças pulmonares (REUTER *et al.*, 2010), artrite (OLEIVEIRA; SCHOFFEN, 2010), acidente vascular cerebral, problemas cardíacos (LONN *et al.*, 1994), doenças neurológicas e neurodegenerativas (PADUREANU *et al.*, 2019) e envelhecimento (HYUN *et al.*, 2006).

Na Medicina Veterinária, há evidências de que o acúmulo de ERO está ligado diretamente na etiologia e patogenia de diversas doenças, como afecções e câncer renal (LONGOBARDI *et al.*, 2022), doenças hepáticas, cardiovasculares (RODRIGUEZ; MENGE; CÉRON, 2011), doenças metabólicas, respiratórias, inflamatórias e articulares (CELI, 2011).

Os antioxidantes são substâncias produzidas pelo corpo ou absorvidas na dieta que atuam impedindo o excesso de radicaís livres no organismo e consequentemente reduzem e/ou inibem a ação danosa dos mesmos. Os antioxidantes naturais podem ser classificados em endógenos, enzimáticos ou não enzimáticos, ou exógenos, estes por sua vez, podem ser oriundos de alimentos, fármacos e suplementos alimentares. Alguns exemplos são os carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros (PISOSCHI; POP, 2016).

Uma vez que para a planta, esses compostos são importantes para controlar o estresse oxidativo causado pelos raios solares (SCARTEZZINI; SPERONI, 2000), nos organismos, os compostos fenólicos estão associados a prevenção de doenças crônicas e degenerativas causadas pelo estresse oxidativo (SANTOS-BUELGA *et al.*, 2019). Entre as atividades associadas aos flavonoides, está a ação antioxidante dos mesmos, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicaís livres (TOLEDO *et al.*, 2023), fornecendo proteção contra

oxidação, inflamação e doenças crônicas (SHEN *et al.*, 2022). Alguns fitoquímicos, ingeridos de forma diária, tem mostrado ação na prevenção do câncer e no tratamento de doenças incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Para a indústria alimentícia, os antioxidantes naturais são utilizados, uma vez que os mesmos podem evitar a oxidação de alimentos, e conseqüentemente reduzir a utilização de aditivos indesejáveis para saúde, bem como impedir ou retardar a deterioração de alimentos, como mudanças no sabor, odor, coloração e evitar perdas nutricionais (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial antimicrobiano, antioxidante, antibiofilme e citotóxico de extratos e frações de plantas utilizadas na medicina popular dentro do estado de Pernambuco.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Obter extratos etanólicos de plantas medicinais;
- Obter frações aquosa, clorofórmica e hexânica a partir destes extratos;
- Avaliar atividade antimicrobiana dos extratos e frações;
- Avaliar atividade inibidora da formação de biofilme dos extratos e frações;
- Avaliar atividade citotóxica dos extratos e frações;
- Avaliar a atividade antioxidante de extratos e frações;
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides de extratos e frações.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABDELFATTAH, M. A. *et al.* *Eugenia uniflora* and *Syzygium samarangense* extracts exhibit anti-trypanosomal activity: Evidence from in-silico molecular modelling, *in vitro*, and *in vivo* studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111508, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111508.
- BARACUHY, *et al.* **Plantas medicinais da região Nordeste do Brasil**. 2. Ed. Campina Grande: Editora Da Universidade Federal De Campina Grande – EDUFCG, p. 205, 2016.
- BARBIERI, D. S. V. *et al.* Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on *in vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 9, p. 887-96, 2014. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.006
- BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649–54, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1503141112.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. **RENISUS MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009.
- BRINKAC, L.; VOORHIES, A.; GOMEZ, A.; NELSON, K. E. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 4, p. 1001-1008, 2017. DOI: 10.1007/s00248-017-0985-z.
- CARDOSO, J. H.; SILVEIRA, J. V. Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* RADDI). **Embrapa Clima Temperado Estação Experimental Cascata Área de Sistemas Agroflorestais Espécies Nativas da Encosta da Serra do Sudeste**, p. 1-6, 2010.
- CARVALHO C. E. S. *et al.* Anti-leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 59-67, 2017. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.02.012.
- CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: Chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013. DOI: 10.1590/S1516-05722013000100022.
- CASTILLO, R. C; MENGE, W. F; CERÓN, J. J. Oxidative stress in veterinary medicine. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011. DOI: 10.4061/2011/812086.
- CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 33, n. 2, p. 233-40. DOI: 10.3109/08923973.2010.514917.
- CHOWDAIAH, M.; SHARMA, P.; DHAMODHAR, P. A study on phytochemicals from medicinal plants against multidrug resistant *Streptococcus mutans*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 25, p. 1581-1593, 2019. DOI: 10.1007/s10989-018-09801-3.

CHRISTAKI, E; MARCOU, M; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, p. 26-40, 2020. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3.

DA CUNHA, F. A. B. *et al.* Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614-621, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.089.

DA SILVA J. H. S. *et al.* Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural Product Research**. v. 32, n. 11, p. 1365-1368, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2017.1344657.

DE SOUZA, A. M. *et al.* Traditional uses, phytochemistry, and antimicrobial activities of *Eugenia* species - A Review. **Planta Medica**. v. 84, n. 17, p. 1232-1248, 2018. DOI: 10.1055/a-0656-7262.

D'SOUSA COSTA, C. O. *et al.* Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**., v. 11, n. 43, p. 607-14, 2015. DOI: 10.4103/0973-1296.160459.

EL-MASSRY, K.; EL-GHORAB, A.; SHAABAN, H.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5265-70, 2009. DOI:10.1021/jf900638c.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: The blurred functional trichotomy. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 39-52, 2020. DOI: 10.1104/pp.20.00433.

FALCÃO, T. R. *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 84, p. 1-12, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2144-6.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; UNEP - United Nations Environment Programme; WHO - World Health Organization; WOAHA - World Organisation for Animal Health. **Antimicrobial resistance (AMR) multi-stakeholder partnership platform catalyzing a global movement for action against AMR, 2022.**

FIDELIS, E. M. *et al.* Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 103691, 2022. DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.103691.

FIUZA, T. S. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 245-250, 2008.

FLORES, N. P. *et al.* *Eugenia uniflora* fruit extract exerts neuroprotective effect on chronic unpredictable stress-induced behavioral and neurochemical changes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, p. 13442, 2020. DOI: 10.1111/jfbc.13442.

GALVÃO, W. R. *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - A conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.04.024.

GHISALBERTI, E. L. **Detection and Isolation of Bioactive Natural Products**. In: COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. (Eds.). *Bioactive natural products - detection, isolation and structural determination*. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 11–76, 2008.

HYUN, D. H; HERNANDEZ, J. O; MATTSON, M. P; CABO, R. “O sistema redox da membrana plasmática no envelhecimento,” **Aging Research Reviews**, v. 5, p. 209–220, 2006.

JOVITO, C. *et al.* *Eugenia uniflora* dentifrice for treating gingivitis in children: antibacterial assay and randomized clinical trial. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, p. 387-392, 2016. DOI: 10.1590/0103-6440201600769.

KAPADIA, P. *et al.* Extraction of high-value chemicals from plants for technical and medical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10334. DOI: 10.3390/ijms231810334.

LEFEBVRE, T; DESTANDAU, E; LESELLIER, E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: **Journal of Chromatography A**, v. 1635, p. 461770, 2020. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461770.

LONGOBARDI, C. *et al.* Ochratoxin A and kidney oxidative stress: The role of nutraceuticals in veterinary medicine-A Review. **Toxins (Basel)**, v. 14, n. 6, p. 398, 2022. DOI: 10.3390/toxins14060398.

LONN, E. *et al.* Effects of oxygen free radicals and scavengers on the cardiac extracellular collagen matrix during ischemia-reperfusion. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 10, n. 2, p. 203-13, 1994. PMID: 8143221.

LOURENÇO, S. C; MOLDÃO-MARTINS, M; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132. DOI: 10.3390/molecules24224132.

MAGALHÃES, K. DO N.; BANDEIRA, M. A. M.; MONTEIROS, M. P. **Plantas medicinais da Caatinga do Nordeste brasileiro [livro eletrônico]: Etnofarmacopeia do Professor Francisco José de Abreu Matos**. 1. Ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 1-256, 2020.

MARTÍNEZ, A. F. J.; CATALÁN, B. E.; LÓPEZ, H. M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action, **Phytomedicine**, v. 90, 2021. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153626.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

MESQUITA, P. R. *et al.*, 2017. Discrimination of *Eugenia uniflora* L. biotypes based on volatile compounds in leaves using HS-SPME/GC-MS and chemometric analysis. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 79-87. 2017. DOI: 10.1016/j.microc.2016.08.005

MORAIS, T. R.; DA COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G. Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): structure/activity relationships. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5761-5776, 2014. DOI:10.3390/molecules19055761.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NOCCHI, S. R. *et al.* Antiviral activity of crude hydroethanolic extract from *Schinus terebinthifolia* against Herpes simplex Virus Type 1. **Planta Medica**, 2017, v. 83, p. 509-518. DOI: 10.1055/s-0042-117774.

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLSEN. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, 877-886, 2015. DOI:10.1007/s10096-015-2323-z.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Report signals increasing resistance to antibiotics in bacterial infections in humans and need for better data. Dezembro de 2022. Acesso em 13 de 12 de 2022, disponível em: <https://www.who.int/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. **Resistência antimicrobiana**, 2023. Acesso em 17 de março de 2023, disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>.

PADUREANU, R. *et al.* Oxidative stress and inflammation interdependence in multiple sclerosis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1815. DOI: 10.3390/jcm8111815.

PICCINELLI, A. C. *et al.* Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 217-24, 2015. DOI: 10.1179/1476830514Y.0000000119.

PISOSCHI, A. M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

REUTER, S; GUPTA, S.C; CHATURVEDI, M. M; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n.11, p.1603-16. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

RIZI, K. S.; GHAZVINI, K.; NOGHONDAR, M. K. Adaptive antibiotic resistance: overview and perspectives. **Journal of Infectious Diseases & Therapy**, v. 6, n. 3, p. 363, 2018. DOI: 10.4172/2332-0877.1000363.

ROCHA, S. *et al.* Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 220, p. 36-46, 2019. DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.02.007.

SAMREEN, A. I.; MALAK, H. A.; ABULREESH, H. H. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101-111, 2021. DOI: 10.1016/j.jgar.2021.08.001.

SANTANA, J.; SARTORELLI, P.; MATSUO, A. Isolation and evaluation of cytotoxic potential of phenolic derivatives from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 2245-2248, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012001100029.

SANTOS, K. K. *et al.* Enhancement of the antifungal activity of antimicrobial drugs by *Eugenia uniflora* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 7, p. 669-71, 2013. DOI: 10.1089/jmf.2012.0245.

SANTOS-BUELGA, E. *et al.* Chapter Four - Plant phenolics as functional food ingredients. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 90, p. 183-257, 2019. DOI: 10.1016/bs.afnr.2019.02.012.

SCARTEZZINI, P; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.1, n.2, p. 23-43. DOI: 10.1016/s0378-8741(00)00213-0.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in Physiology**. v. 2; p. 11-694, 2020 DOI: 10.3389/fphys.2020.00694.

SHEN, N. *et al.* Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity, **Food Chemistry**, v. 383, p. 132531, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132531.

SIBBR. Sistema de Informação Sobre a Biodiversidade Brasileira. **Schinus terebinthifolius in Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr)**. Disponível em: <[https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/schinus\\_terebinthifolius](https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/schinus_terebinthifolius)>. Acesso em 07-08-2019.

SIBBR. Sistema de Informação Sobre a Biodiversidade Brasileira. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/340821>. Acesso em 13 de janeiro de 2023.

SILVA, M. M. *et al.* *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445-452, 2017. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.12.007.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1510-1514, 2012. DOI: 10.1080/14786419.2011.564582.

SOBEH, M. *et al.* A polyphenol-rich fraction from eugenia uniflora exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 84, 2020. DOI: 10.3390/ph13050084.

SOBEH, M. *et al.* Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 10, p. 240:111939, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2019.111939.

SOUZA, L. B. F. C. *et al.* Influence of *Eugenia uniflora* extract on adhesion to human buccal epithelial cells, biofilm formation, and cell surface hydrophobicity of *Candida* spp. from the oral cavity of kidney transplant recipients. **Molecules**, v. 23, p. 1-20, 2018. DOI: 10.3390/molecules23102418

SOUZA, Z. N *et al.* **Plantas medicinais utilizadas no nordeste do brasil: uma revisão de literatura**. I congresso internacional das ciências da saúde, 2019. DOI: 10.31692/ICOINTERPDVS.2019.0011

TOLEDO, A. G. *et al.* Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical prospection of *Eugenia involucrata* DC. leaf extracts. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023. DOI: 10.1590/1519-6984.245753.

ULIANA M. P. *et al.* Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.077.

WAWROSCH, C.; ZOTCHEV, S. B. Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies-status and outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 18, p. 6649-6668, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11539-w.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em 26 de Mar. 2019.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH – WOA. OIE List of antimicrobial agents of veterinary importance, 2018. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/A\\_OIE\\_List\\_antimicrobials\\_May2018.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf). Acesso em 26 de março de 2019.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH – WOA. OIE. **Antimicrobial resistance: Now is the time for collective action**, 2022. Publicado em 18 novembro de 2022. Disponível em: <https://www.woah.org/en/antimicrobial-resistance-now-is-the-time-for-collective-action/>. Acesso em 11 de janeiro de 2023.

YANG, L. *et al.* Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018. DOI: 10.3390/molecules23040762.

YESHI, K.; CRAYN, D.; RITMEJERYTĖ, E.; WANGCHUK, P. Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 313, 2022. DOI: 10.3390/molecules27010313.

## **CAPÍTULO I**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIBIOFILME E CARACTERIZAÇÃO  
FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHAS DE  
*Eugenia uniflora* L. E *Schinus terebinthifolius* Raddi**

## RESUMO

O aumento contínuo da resistência antimicrobiana a fármacos comerciais, proporciona a necessidade de buscar novos componentes que possam atuar no combate contra estes microrganismos. Neste sentido, destacam-se os produtos de origem natural, já que apresentam grandes quantidades de compostos capazes de atuar de forma eficaz como antimicrobianos. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo investigar as atividades antimicrobiana, antibiofilme e o perfil fitoquímico preliminar de extratos etanólicos e frações aquosas, clorofórmicas e hexânicas de *Eugenia uniflora* e *Schinus terebinthifolius*. As plantas foram coletadas e devidamente identificadas e registradas, posteriormente foi obtido o extrato etanólico bruto e frações aquosa, clorofórmica e hexânica pela técnica de partição líquido-líquido. Foi realizada a quantificação do teor de compostos fenólicos e flavonoides, pelo ensaio Folin-Ciocalteu e pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio, respectivamente. A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e frações foi realizada pelos testes de difusão em poços nas concentrações 10 e 20 mg.mL<sup>-1</sup> e os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), nas concentrações de 0,195 a 25 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo testadas frente as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Além disso, foi avaliado o potencial antibiofilme utilizando o ensaio com o corante cristal violeta. Foi possível identificar que a análise quantitativa do conteúdo de compostos fenólicos totais apresentou maior presença dos mesmos nas frações aquosas 97,08 e 79,78 mgEAG.g<sup>-1</sup>, já o conteúdo de flavonoides totais foi mais expressivo para os extratos etanólicos 53,29 e 56,88 mgEQ.g<sup>-1</sup>, para *S. terebinthifolius* e *E. uniflora*, respectivamente. O extrato etanólico de *S. terebinthifolius* mostrou melhor atividade para todas as cepas testadas em especial para *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* com valores de CIM variando de 0,78 a 1,56 mg.mL<sup>-1</sup>. A fração aquosa inibiu o crescimento bacteriano frente a maioria das cepas testadas, em destaque, a cepa *E. faecalis* com CIM de 0,78 mg.mL<sup>-1</sup>. Houve redução do biofilme em até 32,8% para o extrato etanólico de *S. terebinthifolius* frente a *E. faecalis*. Para a planta *E. uniflora* essa redução variou de 49,65 - 87,08% e 26,41 - 57,29%, para o extrato etanólico e fração aquosa, respectivamente, frente a *L. monocytogenes*. Para a maioria das cepas Gram-positivas e Gram-negativas testadas, *S. terebinthifolius* mostra atividade moderada, destacando um possível potencial para sua atuação como antimicrobiano de amplo espectro. Por sua vez, *E. uniflora*, apesar de apresentar menor potencial de inibição pelo teste CIM quando comparado com a *S. terebinthifolius*, ainda apresenta potencial biológico, o que pode fomentar novas pesquisas. O que demonstra que ambas as plantas podem servir como matérias-primas de caráter antimicrobiano, bem como, justifica o vasto uso popular das mesmas e o grande potencial que o bioma caatinga e sua diversidade, em especial as plantas *S. terebinthifolius* e *E. uniflora* representam para a indústria farmacêutica.

**Palavras-chave:** Aroeira. Compostos fenólicos. Flavonoides. Microrganismos . Pitanga.

## ABSTRACT

In recent decades, antimicrobial resistance has become increasingly common and, consequently, the search for new drugs that can act in the fight against resistant microorganisms has become increasingly common, with emphasis on products of natural origin, since they represent a wide variety of. Thus, this work aimed to investigate the antimicrobial, antibiofilm and preliminary phytochemical profile of ethanolic extracts and aqueous, chloroformic and hexane fractions of *Eugenia uniflora* and *Schinus terebinthifolius*. The plants were collected and properly identified and registered, subsequently obtaining the crude ethanol extract and aqueous, chloroform and hexane fractions using the liquid-liquid partition technique. The antimicrobial activity of ethanolic extracts and fractions was performed by diffusion tests in wells at concentrations 10 and 20 mg.mL<sup>-1</sup> and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), at concentrations from 0.195 to 25 mg.mL<sup>-1</sup>, tested against the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. The quantification of the content of phenolic compounds and flavonoids was performed using the Folin-Ciocalteu test and the colorimetric method with aluminum chloride, respectively. In addition, the antibiofilm potential was evaluated using the crystal violet dye assay. It was possible to identify that the quantitative analysis of the content of total phenolic compounds showed a greater presence of them in the aqueous fractions 97.08 and 79.78 mgEAG.g<sup>-1</sup>, whereas the content of total flavonoids was more expressive for the ethanolic extracts 53,29 and 56.88 mgEQ.g<sup>-1</sup> for *S. terebinthifolius* and *E. uniflora*, respectively. The ethanol extract of *S. terebinthifolius* showed better activity for all tested strains, especially for *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* with MIC values ranging from 0.78 to 1.56 mg.mL<sup>-1</sup>. The aqueous fraction inhibited bacterial growth against most strains tested, in particular, *E. faecalis* strains with MIC of 0.78 mg.mL<sup>-1</sup>. There was a biofilm reduction of up to 32.8% for the ethanolic extract of *S. terebinthifolius* against *E. faecalis*, for the *E. uniflora* plant this reduction ranged from 49.65% - 87.08% and 26.41% - 57.29 %, for the ethanolic extract and aqueous fraction, respectively, against *L. monocytogenes*. For most Gram-positive and Gram-negative strains tested, *S. terebinthifolius* shows moderate activity, highlighting a possible potential for its performance as a broad-spectrum antimicrobial. In turn, *E. uniflora*, despite having a lower inhibition potential by the MIC test when compared to *S. terebinthifolius*, still shows biological potential, which can encourage further research. This demonstrates that both plants can serve as antimicrobial raw materials, as well as justifies their vast popular use and the great potential that the caatinga biome and its diversity have, especially the plants *S. terebinthifolius* and *E. uniflora* represent for the pharmaceutical industry.

**Keywords:** aroeira. flavonoids. microorganisms. phenolic compound. pitanga.

## 1. INTRODUÇÃO

Na área médica, seja ela humana ou veterinária, práticas e saberes populares são bastante utilizados na prevenção e tratamento de enfermidades de diferentes etiologias (GIORDANI *et al.*, 2016). A utilização de plantas medicinais é uma atividade repassada entre gerações, sendo diversos os fatores que contribuem para aplicação deste recurso, como o excelente custo-benefício, a procura por produtos de origem natural e conseqüentemente mais sustentáveis (BERNARDES *et al.*, 2011) e o seu fácil acesso (ZENI *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, houve um crescente aumento na escolha de produtos vegetais como alvo de estudos, com o intuito de isolar novos compostos que apresentem atividade antimicrobiana (SHARMA *et al.*, 2020). Alguns fatores estão relacionados a esse aumento, entre eles, a alta taxa de morbidade e mortalidade causada por microrganismos; vacinas disponíveis que atuam na prevenção apenas de uma pequena porcentagem das doenças infecciosas; deterioração de alimentos por microrganismos e o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos mais rapidamente do que a velocidade da descoberta de medicamentos (LIMA FILHO; CORDEIRO, 2014; TILLOTSON *et al.*, 2017; CHRISTAKI *et al.*, 2020).

A resistência antimicrobiana é uma preocupação global de saúde humana e animal (OIE, 2018). O mau uso de substâncias na prevenção, controle ou tratamento de doenças infecciosas, bem como o uso indiscriminado em sistemas de produção animal, tem contribuído significativamente para esse aumento. Esse aspecto tem se agravado pela transmissão de agentes infecciosos resistentes de pessoa para pessoa e através de fontes ambientais, tornando cada dia mais difícil o desenvolvimento de tratamentos eficientes, em especial quanto ao uso de antibióticos (BRINKAC *et al.*, 2017).

Sendo assim, as plantas medicinais são importantes aliadas, consideradas como primeira fonte de substâncias para uso terapêutico, por apresentarem uma fonte rica de fitoquímicos e potenciais propriedades antimicrobianas (CHOWDAIAH, *et al.*, 2019; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Neste sentido, pode-se destacar as plantas *Eugenia uniflora* (pitanga) e *Schinus terebinthifolius* (aroeira), que na medicina popular são usadas para diversas finalidades como no tratamento de doenças infecciosas, analgésico, antidiabético, antifebril, anti-inflamatório, antirreumático, cicatrizantes, distúrbios urinários, diurético, infecções do trato respiratório, infecções intestinais, entre outras possibilidades. Diversas partes destas plantas são utilizadas, desde galhos, folhas, frutas e partes aéreas, principalmente por meio de infusões (DE SOUZA

*et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2019). No Brasil, essas plantas fazem parte da Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2009).

Tendo em vista o aumento contínuo da resistência microbiana a fármacos comerciais e a necessidade de novos componentes que possam ser atuantes contra patógenos, bem como, a valorização do conhecimento popular, este trabalho teve como objetivo avaliar as atividades antimicrobiana e antibiofilme, e o perfil fitoquímico de extratos etanólicos brutos e frações aquosas, clorofórmicas e hexânicas de *Eugenia uniflora* e *Schinus terebinthifolius*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de material**

As folhas de *E. uniflora* e *S. terebinthifolius* foram coletadas na microrregião de Garanhuns (Pernambuco, Brasil) (Latitude: 8° 53' 27" Sul, Longitude: 36° 29' 48" Oeste; altura: 841 m) no período de março e outubro de 2019, respectivamente. Estas plantas foram identificadas taxonomicamente pela botânica Dra. Rita de Cássia Pereira, com as respectivas exsicatas 94314 e 94315, e depositadas no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). As coletas foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), cadastro A576AF3.

### **2.2 Obtenção dos extratos etanólicos**

Para obtenção dos extratos brutos e frações o material vegetal coletado foi seco em estufa com circulação de ar (Tecnal, TE-394/3, São Paulo, Brasil) a 50 °C e depois de seco, triturado em moinho de facas (Marconi, MA 340, São Paulo, Brasil) com peneira de 5 mm. Posteriormente, o material triturado foi submetido a maceração em etanol 96% em três ciclos de 48 horas cada. Após cada ciclo de maceração, os resíduos foram combinados. Após a combinação dos três ciclos o solvente foi eliminado sob pressão reduzida a uma temperatura máxima de 40 °C em evaporador rotativo (Buchi R-100, São Paulo, Brasil).

### **2.3 Fracionamento dos extratos etanólicos**

Os extratos brutos foram fracionados por meio da técnica de partição líquido-líquido. A técnica consiste em separar os constituintes químicos presentes em uma determinada amostra de acordo com sua polaridade. O particionamento foi realizado de forma sequencial: (1) Fração solúvel em hexano – uma porção do extrato etanólico bruto (60g) foi dissolvida em uma mistura de metanol e água na proporção de 3:2 (200 mL) e levada a um funil de separação e, adicionado um volume igual de hexano (200 mL), para realizar a extração de substâncias de polaridade baixa. A extração foi realizada três vezes e o material solúvel em hexano combinado para eliminação do solvente sob pressão reduzida a uma temperatura máxima de 40 °C; (2) Fração solúvel em clorofórmio – a porção metanol:água, restante da etapa anterior, foi concentrada sob pressão reduzida para eliminação do metanol e o resíduo teve seu volume completado com água destilada para 200 mL e submetido a extração em 200 mL de clorofórmio em funil de separação, para extração de substâncias de polaridade intermediária. O processo de extração foi repetido por três vezes e o material combinado, seco sob pressão reduzida e a temperatura máxima de 40 °C; e (3) Fração aquosa – foi o resíduo aquoso, a qual reúne aquelas substâncias de polaridade mais elevada.

Todos os extratos brutos e frações obtidos foram submetidos a um processo de liofilização (Liofilizador Terroni® LD 1500, São Paulo, Brasil) para obtenção de um pó livre de umidade e então calculou-se o rendimento total dos extratos etanólicos, utilizando a fórmula:  $Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100$ . Onde: Re = Rendimento total do extrato (%);  $P_{ext}$  = Peso do extrato seco (g);  $P_{folhas}$  = Peso das folhas frescas (g), de acordo com (RODRIGUES *et al.*, 2011), o rendimento (%) das frações foi calculado a partir das 60 g utilizadas dos extratos brutos (Figura 1).

## 2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos e frações foi mensurada pela reação de Folin-Ciocalteu com adaptações das metodologias descritas por Singleton *et al.* (1999) e Scherer; Godoy (2014). Uma alíquota de 0,25 mL de uma solução etanólica (70%) de extratos e frações secos ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) foi adicionada a 2,75 mL de reagente Folin-Ciocalteu 3% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Após 5 minutos adicionou-se 0,25 mL de carbonato de sódio a 10% e homogeneizou-se em agitador tipo vortex (Marconi, Ma-162, São Paulo, Brasil). A mistura reacional foi mantida por 1 h na ausência de luz, à temperatura ambiente ( $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A absorbância foi mensurada a 765 nm em espectrofotômetro

(Biochrom Libra S22, Cambridge, Reino Unido) e convertida ao teor de fenólicos de acordo com uma curva de calibração feita com ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas por grama de equivalência de ácido gálico (EAG) por grama de extrato bruto ou fração, todas as leituras foram feitas em triplicata.

## **2.5 Determinação do teor de flavonoides totais**

A determinação do teor de flavonoides totais foi mensurada utilizando método colorimétrico com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), adaptado de Chand *et al.* (2002). Uma alíquota de 0,5 mL de uma solução etanólica (70%) de extratos secos ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada a 0,5 mL de solução de etanol de  $\text{AlCl}_3$  a 2%, homogeneizou-se por 10 s. A mistura reacional foi mantida por 1 h na ausência de luz, à temperatura ambiente. A absorbância foi mensurada a 420 nm em espectrofotômetro e convertida ao teor de flavonoides de acordo com uma curva de calibração feita com quercetina ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em miligramas por grama de equivalência de quercetina por grama de extrato bruto ou fração, todas as leituras foram feitas em triplicata.

## **2.6 Microrganismos**

Foram utilizadas cepas pertencentes a coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco e outras cedidas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco sendo as bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, e Gram-negativas - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

## **2.7 Teste de difusão em ágar**

Os isolados foram testados quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação, pelo método de difusão em ágar, de acordo com Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI (2016).

Os inóculos das bactérias foram previamente padronizados a concentração de 0,1 de D.O. em espectrofotômetro a 600 nm. Os mesmos foram utilizados até no máximo 15 minutos após o ajuste da turbidez. Foi utilizado *swab* estéril para inoculação em Ágar Mueller Hinton. Poços de 6 mm de diâmetro foram perfurados no ágar contido em placa de Petri, com distância entre eles de pelo menos 2 cm, e adicionado 20 µL dos extratos e frações (etanólico bruto e frações aquosa, clorofórmica e hexânica) a serem testado, nas concentrações de 10 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Os extratos foram solubilizados em solução de DMSO e água destilada na proporção de 2:8. As placas foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Para o controle positivo foi utilizado o cloranfenicol 20 mg.mL<sup>-1</sup> e para controle negativo o DMSO e água destilada na proporção de 2:8, todos os testes foram realizados em triplicatas.

## 2.8 Determinação da CIM e CBM

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em microplacas de 96 poços de fundo plano, estéreis, pelo método de microdiluição para avaliar a inibição do crescimento bacteriano, através da turbidez em microplaca. Para os ensaios, foram utilizados 100 µL dos extratos e frações obtidos a partir de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora*, em diferentes concentrações (0,195 – 25 mg.mL<sup>-1</sup>), solubilizados em solução de DMSO e água destilada na proporção de 2:8 e esterilizados através de filtros millipore de 0,22 µm. Em seguida, foram acrescentados 90 µL de caldo Mueller-Hinton e 10 µL de suspensão bacteriana, previamente padronizadas a concentração de 0,1 de D.O. em espectrofotômetro a 600 nm. Para o controle positivo foi utilizado 100 µL do antimicrobiano comercial cloranfenicol na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>, 90 µL de caldo Mueller-Hilton e 10 µL do inóculo bacteriano. O controle negativo foi composto por 100 µL da solução contendo DMSO e água destilada na proporção 2:8, 90 µL de caldo Mueller Hilton e 10 µL do inóculo bacteriano, testado sob as mesmas condições experimentais. Todos os testes foram conduzidos em triplicata (NCCLS, 2009; LIMA FILHO; CORDEIRO, 2014). A atividade de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi expressa em porcentagem de inibição de crescimento e calculada através da equação 1:

$$CIM(\%) = \left( \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100$$

Onde,  $A_{controle}$  corresponde a densidade ótica do controle negativo para a inibição do crescimento e  $A_{amostra}$  corresponde a densidade ótica da cepa bacteriana do ensaio, ambas

submetidas a uma leitura de absorvância de 600 nm em leitora de microplacas (Biochrom ASYS UVM 340, Cambridge, Reino Unido) (WU *et al.*, 2013).

Os resultados da CIM foram classificados de acordo com Puton *et al.* (2018), como forte quando os resultados forem  $\leq$  que 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, moderado de 0,6 a 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> e fraco quando  $\geq$  que 1,6 mg.mL<sup>-1</sup>.

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram utilizados 10  $\mu$ L de solução dos poços sem crescimento visível e espalhados com alça bacteriológica em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, incubados no intervalo de tempo de 24-48 h a 37 °C. A falta de unidade formadoras de colônia indica que os extratos foram bactericidas (LIMA FILHO; CORDEIRO, 2014).

## 2.9 Avaliação da produção de biofilme bacteriano

A avaliação da produção de biofilme bacteriano foi realizada por meio do ensaio com o corante cristal violeta (CV) de acordo com Darwish e Asfour (2013). As colônias foram inoculadas em TSB estéril suplementado com 0,25% de glicose e incubadas por 24 horas a 37 °C, após este período foi realizada uma diluição da suspensão 1:40 em TSB glicosado estéril. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo plano e estéreis, nestas foram adicionados 200  $\mu$ L da suspensão bacteriana após a diluição. O meio TSB estéril foi utilizado como controle negativo e poços com a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo. Em seguida, as microplacas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Decorrido o período de incubação, o conteúdo da placa foi removido por aspiração, utilizando micropipeta, os poços foram lavados três vezes com 250  $\mu$ L de solução salina estéril para remover as células bacterianas não aderidas, posteriormente as placas foram invertidas e postas para secar em estufa a 37 °C por 1 hora. Foram distribuídos 200  $\mu$ L de metanol P.A. em cada poço e mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos para a fixação das células aderidas e transcorrido esse período o excesso do álcool foi removido por inversão da placa. Em seguida, 160  $\mu$ L do corante cristal violeta (0,5%) foram adicionados em cada poço durante 1 minuto, por conseguinte, a solução corante foi desprezada e os ensaios foram lavados com água destilada estéril até a remoção completa do corante, após esta etapa foram distribuídos 160  $\mu$ L de etanol 95% em cada poço, sendo removido logo em seguida. A placa foi submetida à análise de absorvância em leitora de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. As cepas Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, e Gram-negativas - *Escherichia*

*coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 foram testadas em triplicata, quanto a capacidade de produção de biofilme. Para a interpretação dos resultados do biofilme, os isolados foram classificados como não produtores, fracos, moderados e forte produção, com base nos valores médios de densidade ótica (DO):  $DO_{(isolado)} \leq DO_{(controle)}$  = não produtor de biofilme;  $DO_{(controle)} \leq DO_{(isolado)} \leq 2 DO_{(controle)}$  = fraco produtor;  $2 DO_{(controle)} \leq DO_{(isolado)} \leq 4 DO_{(controle)}$  = produção moderada;  $4 DO_{(controle)} \leq DO_{(isolado)}$  = forte produção.

## 2.10 Atividade antibiofilme

A determinação da atividade antibiofilme foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Kalfman *et al.* (2017) e Jadhav *et al.* (2013), com adaptações. Todos os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços de fundo plano e estéreis, em triplicata e consistiram na pipetagem de 160  $\mu$ L da suspensão bactéria e TSB na proporção 1:40, bem como, 40  $\mu$ l do extrato ou fração a ser testado em diferentes concentrações (0,195 - 25 mg.mL<sup>-1</sup>). No controle de crescimento foram adicionados 160  $\mu$ L da suspensão bacteriana e 40  $\mu$ l de água destilada estéril. Volumes iguais de solução água destilada e DMSO na proporção 8:2 foram adicionados como controle negativo. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. O meio de cultivo caldo TSB glicosado foi utilizado isoladamente como um controle adicional para confirmar a esterilidade do meio. A atividade antibiofilme foi avaliada usando o ensaio com o corante cristal violeta, seguido da imediata leitura de absorbância a 570 nm. O percentual antibiofilme será expresso pela equação 2:

$$Antibiofilme (\%) = 100 - \left[ \left( \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \right) * 100 \right]$$

Onde,  $A_{amostra}$  corresponde a densidade ótica da cepa bacteriana que foi submetida a ação do extrato e  $A_{controle}$  corresponde aos ensaios onde a cepa bacteriana não sofre ação do extrato (JADHAV *et al.*, 2013).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Teor de compostos fenólicos e flavonoides

A análise quantitativa do conteúdo de compostos fenólicos totais detectou maior presença dos mesmos nas frações aquosas com valores de 98,35 mgEAG.g<sup>-1</sup> e 88,67 mgEAG.g<sup>-1</sup>, em seguida os extratos etanólicos 97,08 mgEAG.g<sup>-1</sup> e 79,78 mgEAG.g<sup>-1</sup> e frações clorofórmicas 68,98 mgEAG.g<sup>-1</sup> e 63,90 mgEAG.g<sup>-1</sup>, para *S. terebinthifolius* e *E. uniflora*, respectivamente. Já as frações hexânicas diferiram das demais, apresentando valores inferiores. O conteúdo de flavonoides totais foi mais expressivo para os extratos etanólicos de *S. terebinthifolius* com valor de 53,29 mgEQ.g<sup>-1</sup> e para *E. uniflora* com valor de 56,88 mgEQ.g<sup>-1</sup> (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Teor de fenólicos totais em extratos etanólicos e frações aquosas, hexânicas e clorofórmicas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* liofilizados.

<b>Espécie</b>	<b>Extrato/Fração</b>	<b>Teor de fenóis totais em mg equivalentes de ácido gálico.g<sup>-1</sup></b>
<i>S. terebinthifolius</i>	Etanólico	97,08 ± 2,0
	Aquosa	98,35 ± 3,6
	Hexânica	26,76 ± 1,7
	Clorofórmica	68,98 ± 2,0
<i>E. uniflora</i>	Etanólico	79,78 ± 1,7
	Aquosa	88,67 ± 3,6
	Hexânica	25,02 ± 3,1
	Clorofórmica	63,90 ± 2,6

**Tabela 2.** Teor de flavonoides totais em extratos etanólicos brutos e frações aquosas, hexânica e clorofórmica de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* liofilizados.

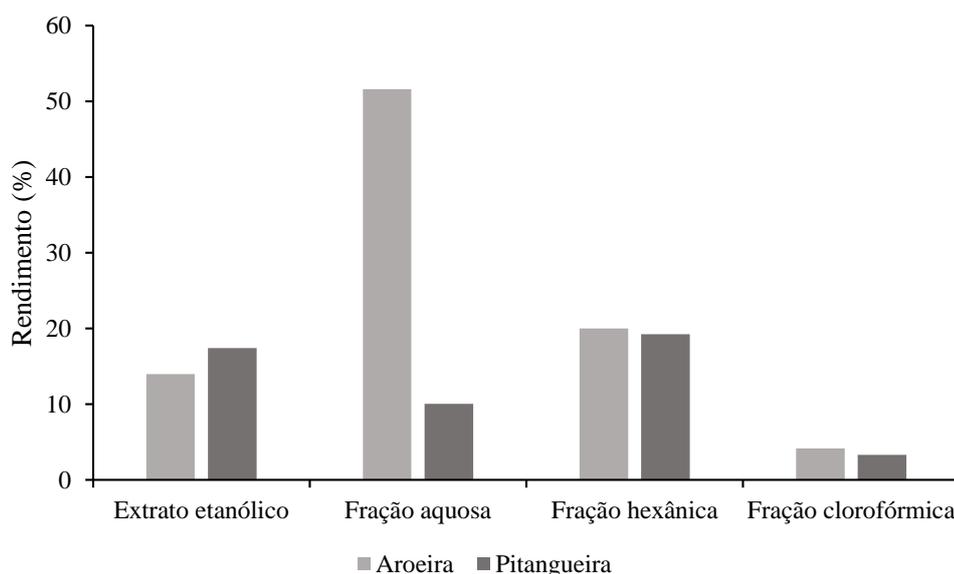
<b>Espécie</b>	<b>Extrato/Fração</b>	<b>Teor de flavonoides em mg equivalentes de quercetina.g<sup>-1</sup></b>
<i>S. terebinthifolius</i>	Etanólico	53,29 ± 1,2
	Aquosa	35,15 ± 0,3
	Hexânica	31,03 ± 0,3
	Clorofórmica	32,01 ± 0,6
<i>E. uniflora</i>	Etanólico	56,88 ± 0,6
	Aquosa	42,35 ± 0,5
	Hexânica	34,78 ± 2,2
	Clorofórmica	38,29 ± 0,2

Dados semelhantes foram obtidos por Uliana *et al.* (2016), que identificaram pelo método de maceração em etanol uma concentração mais elevada quanto ao teor de compostos fenólicos totais 221,63 mgEAG.g<sup>-1</sup> e de 69,67 mgEQ.g<sup>-1</sup> de flavonoides totais, no extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolius*. Este perfil também foi identificado ao analisar frutos de *S. terebinthifolius* sendo que frutos maduros apresentaram concentração mais elevada de compostos fenólicos 599,2 mgEAG.100g<sup>-1</sup> e teor de flavonoides de 22,4 mgEQ.100g<sup>-1</sup>, já para os frutos verdes o teor de compostos fenólicos foi de 139,7 mgEAG.100g<sup>-1</sup> e 21,9 mgEQ.100g<sup>-1</sup> de flavonoides (BRAGA *et al.*, 2020).

Figueiroa *et al.* (2013), identificaram maior quantidade de compostos fenólicos em fração aquosa de folhas de *E. uniflora*, quando comparado ao teor de flavonoide com valores de 2445 mgEAG.g<sup>-1</sup> e 2,1 mgEQ.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Em outro estudo, encontraram o teor de compostos fenólicos de 166,19 mgEAG.g<sup>-1</sup> em sementes de *E. uniflora* (LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ *et al.*, 2021).

No presente trabalho, a maior concentração de compostos fenólicos identificada foi obtida pelas frações aquosas e extratos etanólicos, já as frações hexânicas apresentaram resultado inferior, em ambas as plantas. Uma vez que a utilização de solventes de maior polaridade na extração, tende a obter uma quantidade maior de compostos fenólicos extraídos (SANTOS *et al.*, 2016), como é o caso dos solventes etanol e água.

Foi identificado maior rendimento para a fração aquosa, extrato etanólico e fração hexânica de *S. terebinthifolius*, respectivamente (Figura 1). Para a planta *E. uniflora* o maior rendimento obtido foi para a fração hexânica, seguida do extrato etanólico e fração aquosa (Figura 1).



**Figura 1.** Rendimento (%) dos extratos etanólicos e frações aquosas, hexânicas e clorofórmicas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*.

### 3.2 Testes de difusão em disco

Entre as bactérias Gram-positivas testadas foi identificado que o extrato etanólico de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora* mostrou atividade nas concentrações de 10 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>, tendo destaque o extrato etanólico de *S. terebinthifolius*, que apresentou maior inibição com todas as cepas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*). Seguido do extrato de *E. uniflora* que mostrou inibição a *B. subtilis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, apenas na concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 3).

As bactérias que apresentaram maior sensibilidade foram *E. faecalis*, com valores de 21,33 ± 0,33 e 16,66 ± 0,66 mm, para as concentrações de 10 e 20 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato etanólico de *S. terebinthifolius*, e *B. subtilis* com a zona de inibição apresentando diâmetros de 18,33 ± 0,33 mm e 15,66 ± 0,66 mm para *E. uniflora* e *S. terebinthifolius*, a 20 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 3).

Quando testadas as bactérias Gram-negativas, o extrato de *S. terebinthifolius* apresentou atividade frente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, nas concentrações de 10 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Seguido do extrato de *E. uniflora*, que mostrou atividade contra *E. coli*, *K. pneumoniae* a 20 mg.mL<sup>-1</sup> e *P. aeruginosa* a 10 e 20 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4).

As bactérias Gram-negativas de maior sensibilidade foram, *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, com zona de inibição de  $15,33 \pm 0,66$  mm,  $15,33 \pm 0,66$  mm e  $15,00 \pm 0,58$  a  $20$  mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para extrato etanólico de *S. terebinthifolius* (Tabela 4).

Entre as frações testadas, as frações aquosas de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora* mostraram maior potencial de inibição, atuando frente todas as cepas Gram-positivas e Gram-negativas testadas, na concentração de  $20$  mg.mL<sup>-1</sup>, seguidas das frações hexânicas, já as frações clorofórmicas demonstraram um menor potencial para atividade antimicrobiana (Tabela 3 e 4).

As bactérias Gram-positivas que apresentaram maior sensibilidade, foram *E. faecalis* que mostrou a maior sensibilidade com valor de  $17,33 \pm 1,15$  mm, seguido de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, com  $13,66 \pm 0,33$  mm e  $13,33 \pm 0,88$  mm, respectivamente, para a fração aquosa da aroeira e *B. subtilis* com a zona de inibição apresentando diâmetros de  $13,66 \pm 0,33$  mm para ambas as frações aquosas a  $20$  mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 3).

Para as Gram-negativas, a maior sensibilidade foi observada para *E. coli* com zona de inibição de  $16,66 \pm 0,66$  mm, para ambas as frações aquosas. *S. typhimurium* com  $15,00 \pm 0,58$  mm, para a fração aquosa da *S. terebinthifolius*. *K. pneumoniae* como  $12,33 \pm 0,88$  mm para as frações aquosa e hexânica da *S. terebinthifolius* e  $13,00 \pm 0,58$  mm para fração aquosa da *E. uniflora*. e *P. aeruginosa* com valor de  $12,33 \pm 0,88$  mm, para fração aquosa de *E. uniflora* a  $20$  mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4).

De acordo com os estudos de El-Massry *et al.* (2009), que avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólico e diclorometano, e óleo essencial de folhas de *S. terebinthifolius*, pelo método de difusão em disco, esses observaram que o extrato de diclorometano de folhas mostrou forte inibição no crescimento de cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com zona de inibição de  $23$  mm e de  $20$  mm, respectivamente. Esses valores foram superiores aos encontrados neste trabalho, porém, o estudo citado não menciona quais concentrações foram utilizadas.

Resultados encontrados por Salem *et al.* (2018), usando o extrato acetônico de frutos de *S. terebinthifolius* na concentração de  $2$  mg.mL<sup>-1</sup>, mostraram zonas de inibição de  $14,6 \pm 0,6$  mm para *B. subtilis*, e  $15,3 \pm 0,8$  mm para *S. aureus*, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Porém divergindo para as cepas Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*, com halos de inibição de  $18,3 \pm 0,3$  mm e  $18,3 \pm 0$ , respectivamente, os quais foram superiores aos do presente estudo.

Fiuza *et al.* (2008), identificaram inibição para as cepas *B. subtilis* (15 mm), *S. aureus* (25 mm), *E. coli* (14 mm) e *P. aeruginosa* (25 mm), ao estudar o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, halos superiores aos encontrados neste estudo, com exceção da cepa *B. subtilis*.

Enquanto Victoria *et al.* (2012) analisaram o óleo essencial de *E. uniflora* e identificaram os seguintes halos de inibição para as cepas *L. monocytogenes*  $18 \pm 3,2$  mm, *S. aureus*  $26 \pm 7,0$  mm, valores estes superiores aos do nosso estudo, diferente de quando comparadas as cepas *E. coli*  $10 \pm 0,6$  mm e *P. aeruginosa*  $8 \pm 0,5$  mm, onde halos de inibição para o extrato etanólico e frações aquosa e hexânica testadas em nosso estudo foram superiores a estes.

Diferentes métodos de extração foram utilizados para comparação, uma vez que há escassez de dados na literatura, este fato ressalta o ineditismo deste trabalho. Esses dados sugerem que os compostos fenólicos e flavonóides presentes nos extratos etanólicos e frações aquosas são possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana, uma vez que foi identificado maior teor dos mesmos.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos (EE), frações aquosas (FA), frações hexânicas (FH) e frações clorofórmicas (FC) de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* frente às bactérias Gram-positivas pelo método de difusão em disco.

	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	<i>Schinus terebinthifolius</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				Cloranfenicol	DMSO
		Zona de inibição (mm)									
		EE	FA	FH	FC	EE	FA	FH	FC		
<i>Bacillus subtilis</i>	10	14,66 ± 0,66	13,00 ± 0,58	0	6,33 ± 0,33	0	12,33 ± 0,88	0	0	35,00 ± 0,58	0
	20	15,33 ± 0,66	13,66 ± 0,33	11,00 ± 0,58	10,33 ± 0,47	18,33 ± 0,33	13,66 ± 0,33	9,00 ± 0,58	11,66 ± 0,33	35,66 ± 0,94	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	16,66 ± 0,66	0	0	0	0	0	0	0	31,00 ± 0,58	0
	20	21,33 ± 0,33	17,33 ± 1,15	0	0	0	8,66 ± 0,47	0	0	32,33 ± 0,33	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	13,00 ± 1,00	7,66 ± 0,58	7,66 ± 0,58	0	0	10,00 ± 0,81	0	0	35,00 ± 1,00	0
	20	15,00 ± 0,58	13,66 ± 0,33	8,33 ± 0,47	0	13,00 ± 1,00	10,66 ± 0,47	0	0	36,00 ± 1,00	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	13,66 ± 0,33	0	0	0	0	0	0	0	27,66 ± 1,20	0
	20	14,00 ± 1,15	13,33 ± 0,88	10,33 ± 0,47	0	13,33 ± 0,88	11,00 ± 0,58	9,00 ± 0,58	0	31,66 ± 0,88	0

Os resultados são médias de três repetições (n = 3) ± erro padrão.

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos (EE), frações aquosas (FA), frações hexânicas (FH) e frações clorofórmicas (FC) de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* frente às bactérias patogênicas Gram-negativas pelo método de difusão em disco.

	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	<i>Schinus terebinthifolius</i>				<i>Eugenia uniflora</i>				Cloranfenicol	DMSO
		Zona de inibição (mm)									
		EE	FA	FH	FC	EE	FA	FH	FC		
<i>Escherichia coli</i>	10	15,00 ± 1,00	11,66 ± 0,33	9,66 ± 0,34	0	0	13,66 ± 0,33	0	0	35,00 ± 0,58	0
	20	15,33 ± 0,66	16,66 ± 0,65	11,00 ± 0,58	9,00 ± 0,58	13,00 ± 0,58	16,66 ± 0,66	11,00 ± 0,58	0	35,66 ± 0,94	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	13,00 ± 1,00	10,00 ± 0,58	0	0	0	9,00 ± 0,58	0	0	31,00 ± 0,58	0
	20	14,00 ± 2,00	12,33 ± 0,88	12,33 ± 0,88	0	14,00 ± 0,00	13,00 ± 0,58	9,00 ± 0,58	0	32,33 ± 0,33	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	13,66 ± 0,33	9,00 ± 0,58	0	0	0	0	0	0	35,00 ± 1,00	0
	20	15,33 ± 0,66	15,00 ± 0,58	9,66 ± 0,34	9,00 ± 0,58	0	12,00 ± 0,58	0	0	36,00 ± 1,00	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	14,00 ± 1,00	0	0	0	13,66 ± 0,88	0	0	0	27,66 ± 1,20	0
	20	15,00 ± 0,58	12,00 ± 0,58	10,66 ± 0,34	0	14,00 ± 1,15	12,33 ± 0,88	10,66 ± 0,34	0	31,66 ± 0,88	0

Os resultados são médias de três repetições (n = 3) ± erro padrão.

### 3.3 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Foi possível identificar, através dos valores da CIM (Tabela 5) de extratos e frações de folhas de *S. terebinthifolius* que, o extrato etanólico apresentou melhor atividade para todas as cepas testadas em especial para *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae* com valores de CIM variando de 0,78 a 1,56 mg.mL<sup>-1</sup>, o que demonstra uma atividade moderada do mesmo frente a estas cepas. Já a fração aquosa, inibiu o crescimento bacteriano frente a maioria das cepas testadas, em destaque, a cepas *E. faecalis* que mostrou atividade moderada com CIM de 0,78 mg.mL<sup>-1</sup>. As bactérias *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* apresentaram valores de CIM de 3,12, 3,12 e 6,2 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A fração hexânica mostrou atividade para as cepas *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* porém, apenas na concentração de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 5).

**Tabela 5.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico (EEB) e fração aquosa (FA) e hexânica (FH) da planta *Schinus terebinthifolius* em bactérias patogênicas, determinadas pelo método de microdiluição.

Bactéria	EEB	FA	FH	EEB	FA	FH
	CIM (mg.mL <sup>-1</sup> )			CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )		
<i>Bacillus subtilis</i>	1,56	-	12,5	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,78	0,78	-	1,56	3,12	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,78	3,12	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,78	6,25	12,5	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1,56	-	-	6,25	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,78	3,12	12,5	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	6,25	12,5	12,5	-	12,5	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5	12,5	12,5	-	12,5	-

Os resultados são médias de três repetições (n=3); - : não houve CIM e/ou CBM para as concentrações testadas

O extrato etanólico apresentou atividade bactericida para as cepas de *E. faecalis* e *E. coli* com valores de CBM de 1,56 e 3,12 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A fração aquosa apresentou atividade bactericida para as cepas *E. faecalis*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, com valores de CBM de 3,12, 12,5 e 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 5).

Valores semelhantes foram encontrados em um estudo com o óleo essencial, extrato diclorometano e o extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolius*, o mesmo apresentou atividade moderada com valores de CIM variando entre 0,75 e 0,95 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo a menor atividade para cepa *E. coli* (EL-MASSRY *et al.*, 2009). Ainda se tratando de extratos etanólicos de folhas, foi identificado maior inibição frente *S. aureus* e *E. coli* com atividade significativa com valores de CIM de 0,25 e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (ULIANA *et al.*, 2016). No presente estudo foi identificada atividade moderada para estas cepas, com valores de CIM de 0,78 mg.mL<sup>-1</sup> e 1,56 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para o extrato etanólico de *S. terebinthifolius*.

Avaliando-se a atividade antimicrobiana de extratos etanólico e suas frações, obtidas de frutos e folhas de *S. terebinthifolius* contra *E. coli* e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), os mesmos observaram forte atividade para a cepa *E. coli*, com valores semelhantes para CBM e CIM, de 0,078 mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato etanólico de folhas e frutos e, de 0,078 mg.mL<sup>-1</sup> para fração hexânica e de 0,039 mg.mL<sup>-1</sup> para fração acetato de etila de folhas e associaram esta atividade antimicrobiana a presença de ácidos fenólicos, taninos, ácidos graxos e triterpenos (DA SILVA *et al.*, 2018), valores de CIM inferiores aos observados no presente estudo.

Tanto o extrato etanólico, quanto a fração aquosa de *E. uniflora* mostraram atividade inferior quando comparadas as de *S. terebinthifolius*, apresentando atividade para as cepas *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *S. typhimurium* com as respectivas concentrações de 6,25, 12,5, 12,5 e 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato etanólico, a fração aquosa mostrou atividade apenas frente *K. pneumoniae* a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>. A fração hexânica não foi ativa para nenhuma das cepas testadas. Foi identificada um valor de CBM de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> para *K. pneumoniae* e *E. faecalis* para o extrato etanólico, enquanto a fração aquosa foi ativa apenas para a cepa *K. pneumoniae* (Tabela 6).

Em um estudo de Fiuza *et al.* (2008), o extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* inibiu o desenvolvimento das cepas Gram-positivas *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* e Gram-negativa *P. aeruginosa* com CIMs variando de 2,187 a 17,5 mg.mL<sup>-1</sup>, resultados estes inferiores aos observados no presente estudo.

Os resultados diferem do estudo de Falcão *et al.* (2018), que ao analisarem a atividade antimicrobiana do extrato acetônico, fração aquosa e fração de acetato de etila de folhas de *E. uniflora*, foi observado que os mesmos inibiram o crescimento bacteriano de *S. aureus*, *S.*

*epidermidis*, *E. faecalis* e uma cepa de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), *Salmonella enteritidis* e *P. aeruginosa*. Já para *E. coli*, não houve inibição pelos extratos testados. Os valores de CIM, foram ativos em concentrações mais baixas do que as que identificamos em nosso estudo, variando de 0,313 a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, o extrato não apresentou ação frente a MRSA.

Dados semelhantes foram observados em relação ao estudo de Falcão *et al.* (2018), pelo fato de que o extrato acetônico apresentou valores de CIM inferiores quando comparados as demais frações. O mesmo ocorreu em nosso estudo onde foi identificado maior atividade para o extrato etanólico, quando comparado as frações aquosa, hexânica e clorofórmica.

**Tabela 6.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico (EEB) e fração aquosa (FA) e hexânica (FH) da planta *Eugenia uniflora* em bactérias patogênicas, determinadas pelo método de microdiluição.

Bactéria	EEB	FA	FH	EEB	FA	FH
	CIM (mg.mL <sup>-1</sup> )			CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )		
<i>Bacillus subtilis</i>	12,5	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	12,5	-	-	12,5	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,25	12,5	-	12,5	12,5	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	12,5	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-

Os resultados são médias de três repetições (n=3); - : não houve CIM e/ou CBM para as concentrações testadas.

No estudo de Lazzarotto-Figueiró *et al.* (2021), os melhores resultados foram encontrados com o extrato etanólico de semente de *E. uniflora*, que inibiu *S. aureus*, com valores de CIM a partir da concentração de 0,875 mg.mL<sup>-1</sup>, quando comparado aos extratos

acetato de etila. Esses resultados estão de acordo com o nosso estudo, uma vez que a atividade para o extrato etanólico foi mais eficiente quando comparada as demais frações testadas.

Em outro estudo, ao analisarem a atividade antibacteriana frente a cepas *S. aureus* e *E. coli*, o valor CIM<sub>90</sub> foram de 24,1 e 15,9 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, quando testado o extrato metanólico de *E. uniflora* (SILVA *et al.*, 2012). Esses valores de CIM são superiores aos encontrados no presente estudo.

Foi identificado que os extratos etanólicos, seguido pelas frações aquosas, tanto para *S. terebinthifolius* quanto para *E. uniflora*, apresentarem melhores resultados frente a inibição dos microrganismos testados. Bem como, que o fracionamento do extrato etanólico das folhas das mesmas, por partição líquido/líquido levou a uma diminuição da atividade antimicrobiana original, esses dados estão de acordo com os encontrados por Da Silva *et al.* (2018) com o extrato etanólico de frutos distribuído para partições hexano e diclorometano.

Este fato pode estar relacionado a maior quantidade de compostos químicos presentes nos extratos, principalmente os compostos polares, apresentando sinergismo entre estas substâncias, que atuam com melhor atividade antimicrobiana (LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ *et al.*, 2021).

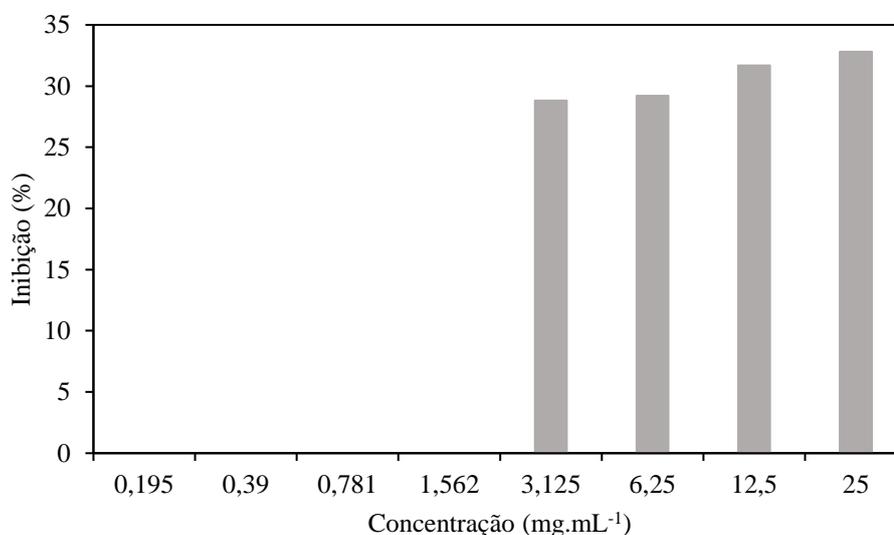
Essas diferenças de valores de CIM podem estar relacionadas a complexidade química das amostras analisadas, uma vez que, a composição dos metabólitos secundários nas espécies vegetais é dinâmica, diversos fatores podem interferir na composição final da amostra, desde a pré-colheita como local, horário, altitude, clima; e pós-colheita como método de conservação, método de extração, solvente utilizado na extração (FALCÃO *et al.*, 2018).

Outro fator a ser levado em consideração, pelo ensaio fitoquímico realizado, destacando a presença de compostos fenólicos no extrato etanólico e frações aquosas de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora*, em especial os flavonoides (Tabelas 1 e 2), estes podem ser responsáveis pelos efeitos antimicrobianos dos mesmos. De acordo com Kachur e Suntres (2020), compostos fenólicos atuam como antimicrobianos e esse efeito pode estar relacionado a diferentes mecanismos, como na ruptura da membrana bacteriana, prevenção na formação e ruptura de biofilmes pré-formados e inibição da motilidade bacteriana, entre outras.

### **3.4 Atividade antibiofilme**

Dentre as cepas testadas, foi identificado fraca formação de biofilme para as cepas Gram-positivas *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 e *L. monocytogenes* ATCC 19117, e para cepas Gram-negativas *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* UFPEDA416.

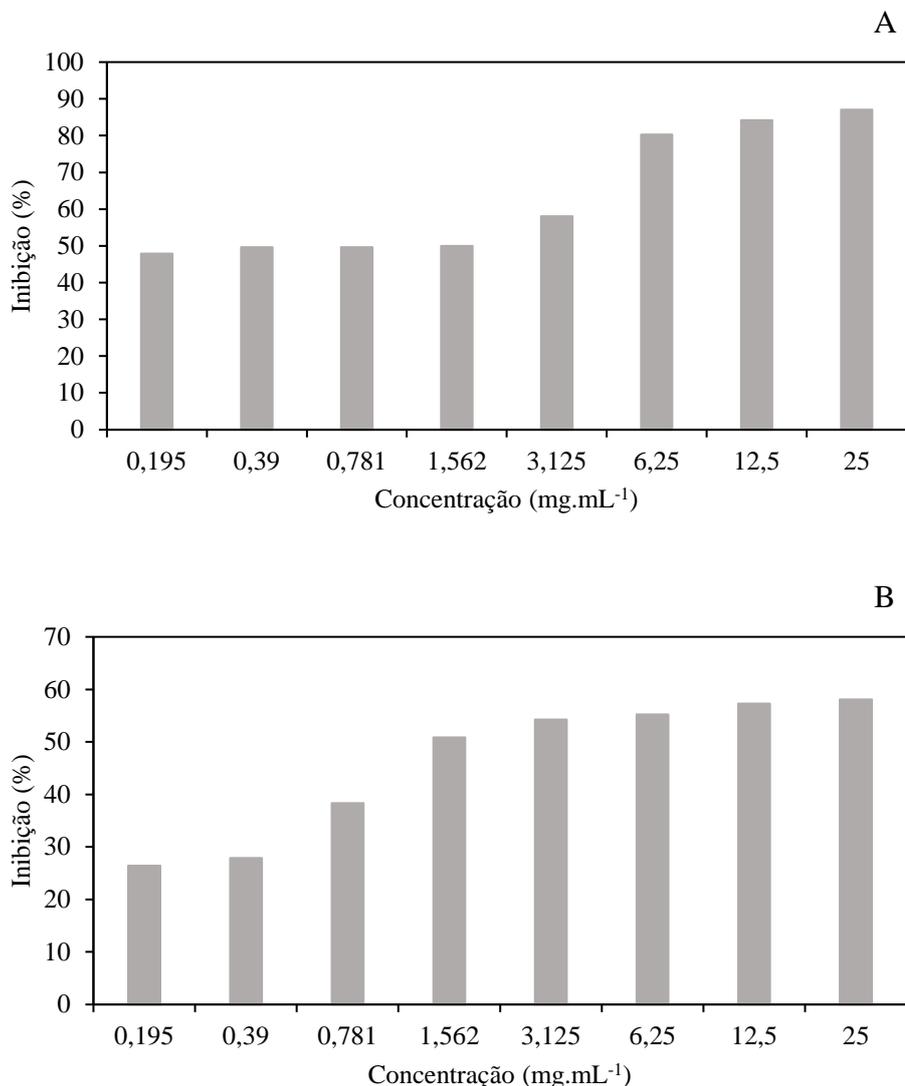
O extrato etanólico de *S. terebinthifolius* mostrou atividade frente a cepa *E. faecalis* com atividade antibiofilme nas concentrações de 3,125 - 25 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura. 2). O extrato etanólico e a fração aquosa de *E. uniflora* mostraram atividade frente a cepa *L. monocytogenes* para as concentrações de 0,39 - 25 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,195 - 25 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 3).



**Figura 2.** Inibição da formação de biofilme frente à bactéria *Enterococcus faecalis* pelo extrato etanólico de *Schinus terebinthifolius*.

Barbieri *et al.* (2014) avaliaram a atividade antibiofilme de *S. terebinthifolius*, onde o extrato metanólico bruto reduziu 29% e 44% a formação de biofilme em solvente etanólico e as frações, metanol: acetato de etila do extrato reduziu em 49% e 47%, a fração metanólica reduziu em e 33% e 41% a formação de biofilme em solvente etanólico, contra *C. albicans* e *Streptococcus mutans*, respectivamente. Neste estudo foi associado a ação antibiofilme a presença de compostos fenólicos, antraquinonas, terpenóides e alcalóides.

No presente estudo foi identificado inibição de até 32,8% da capacidade de formação de biofilme para o extrato etanólico de *S. terebinthifolius* frente a *E. faecalis*. A atividade de *E. uniflora*, aconteceu frente a bactéria *L. monocytogenes*, mostrando inibição da formação de biofilme em que variou de 49,65 - 87,08% e 26,41 - 57,29%, para o extrato etanólico e fração aquosa, respectivamente. Estas reduções na formação de biofilme podem ser associadas a presença de compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato.



**Figura 3.** Inibição da formação de biofilme frente à bactéria *Listeria monocytogenes* pelo extrato etanólico (A) e fração aquosa (B) de *Eugenia Uniflora*.

Em estudo realizado por De Souza *et al.* (2018) que avaliaram a atividade antibiofilme do extrato acetônico de *E. uniflora*, para diferentes espécies de *Candida*, houve potencial de redução que variou de 25-65%, as espécies que apresentaram maior sensibilidade foram *Candida metapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, com redução da capacidade de adesão de 65, 57 e 53%, respectivamente. Esses resultados foram associados a presença de ácidos fenólicos e flavonoides.

Ha uma escassez de dados relatando a atividade antibiofilme de extratos destas plantas, porém em nosso estudo identificamos um potencial de inibição da formação de biofilme frente ao extrato etanólico e fração aquosa da planta *E. uniflora*, frente a *L. monocytogenes*.

Autores sugerem que extratos vegetais previnem a formação de biofilme sem interferir no crescimento dos microrganismos, o que sugere que essa inibição ocorre através de vias alternativas (TRENTIN, GIORDANI; MACEDO, 2013) uma vez que, os metabólitos secundários de plantas, em especial os taninos, inibem a formação de biofilme através de suas propriedades bacteriostáticas, na medida em que danificam a membrana bacteriana e, conseqüentemente, a um crescimento bacteriano mínimo o que dificulta a produção de matriz (TRENTIN et al., 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

Os extratos etanólico e frações aquosas de *E. uniflora* e *S. terebinthifolius* possuem maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, quando comparado a fração hexânica e clorofórmica. Para a maioria das cepas Gram-positivas e Gram-negativas testadas, *S. terebinthifolius* apresenta atividade moderada, destacando um possível potencial para sua atuação como antimicrobiano de amplo espectro. Por sua vez, *E. uniflora*, apesar de apresentar menor potencial de inibição pelo teste CIM quando comparado com a *S. terebinthifolius*, ainda mostra potencial biológico, o que pode fomentar novas pesquisas. Foi identificado potencial antibiofilme para o extrato etanólico de *S. terebinthifolius* frente a bactéria *E. faecalis* e do extrato etanólico e fração aquosa de *E. uniflora* frente a *L. monocytogenes*. O que demonstra que ambas as plantas podem servir como matérias-primas de caráter antimicrobiano, bem como, justifica o vasto uso popular das mesmas e o grande potencial que o bioma caatinga e sua diversidade, em especial as plantas *S. terebinthifolius* e *E. uniflora* representam para a indústria farmacêutica.

## 5. REFERÊNCIAS

BERNARDES, C. A. C. G.; SILVA, F. A. da; MOLEIRO, F. C. Uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro Cohab Tarumã, Tangará da Serra, MT para o tratamento da alergia ou de seus sintomas. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, p. 16-172, 2011.

BERNARDES, N. R. *et al.* Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de aroeira. **VÉRTICES**, Campos dos Goytacazes, v. 13, n. 3, p. 117-128, 2011.

BRAGA, N. S. M *et al.* Ação Antibacteriana e composição fenólica do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a patógenos multirresistentes. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 5, p. 00-00, 2020. DOI: 10.21577/1984-6835.20200087.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. **RENISUS MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009.

BRINKAC, L.; VOORHIES. A.; GOMEZ, A.; NELSON, K. E. The threat of antimicrobial resistance on the human microbiome. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 4, p. 1001-1008, 2017. DOI: 10.1007/s00248-017-0985-z.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, 2002. DOI: 10.38212/2224-6614.2748

CHOWDAIAH, M.; SHARMA, P.; DHAMODHAR, P. A study on phytochemicals from medicinal plants against multidrug resistant *Streptococcus mutans*. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 25, p. 1581–1593, 2019. DOI: 10.1007/s10989-018-09801-3.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, p. 26-40, 2020. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard, v. 29, p. 1-65, 2009.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 26<sup>th</sup> edition. M100-S. 2016.

DARWISH, S. F; ASFOUR, H. A. Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **Scientific World Journal**, v. 2, p. 378492, 2013. DOI: 10.1155/2013/378492.

DA SILVA J. H. S. *et al.* Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural Product Research**, v. 32, n. 11, p. 1365-1368, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2017.1344657.

DE SOUZA, A. M. *et al.* Traditional uses, phytochemistry, and antimicrobial activities of *Eugenia* species - A Review. **Planta Medica**, v. 84, n. 17, p. 1232-1248, 2018. DOI: 10.1055/a-0656-7262.

EL-MASSRY, K.; EL-GHORAB, A.; SHAABAN, H.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5265-70, 2009. DOI: 10.1021/jf900638c.

FALCÃO, T. R. *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 84, p. 1-12, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2144-6.

FERRERA, T. S. *et al.* Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-de-são-paulo sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FIGUEIRÔA, E. de O. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. **Scientific World Journal**, v. 5; 2013. DOI: 10.1155/2013/125027.

FIUZA, T. S. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 245-250, 2008.

GIORDANI, C. *et al.* Plantas com potencial medicinal e tóxico em comunidade atendida pelo Ambulatório Veterinário-UFPel. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 23, n. 3-4, p. 126-132, 2016.

GUEDES, R. A. *et al.* **Fitoterapia na Medicina Veterinária**, Tópicos Especiais em Ciência Animal V, cap. 9, 1. Ed. Alegre, ES: CAUFES, 2016.

JADHAV, S. *et al.* Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, p. 125-130, 2013.

KACHUR, K.; SUNTRES Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 18, p. 3042-3053, 2020. DOI: 10.1080/10408398.2019.1675585.

KAUFFMANN, C. *et al.* Potencial antimicrobiano e antibiofilme in vitro de espécies do gênero *Eugenia*, myrtaceae, nativas do sul do Brasil. **Caderno Pedagógico**; v. 14, n. 2, 2017. DOI: 10.22410/issn.1983-0882.v14i2a2017.1512.

LAZZAROTTO-FIGUEIRÓ, J. *et al.* Antioxidant activity, antibacterial and inhibitory effect of intestinal disaccharidases of extracts obtained from *Eugenia uniflora* L. seeds. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, p. 291-300, 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.224852.

LI, Z. *et al.* Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hidrolisates. **Jounal Dairy of Science**, v. 96, p. 4242-4251, 2013.

LIMA-FILHO, J. V.; CORDEIRO, R. A. In vitro and in vivo antibacterial and antifungal screening of natural plant products: prospective standardization of basic methods. **Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology**, Humana Press, New York, NY, pp 275-291, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

OIE – WOA. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **OIE List of antimicrobial agents of veterinary importance**, 2018. Disponivel em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/A\\_OIE\\_List\\_antimicrobials\\_May2018.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf). Acesso em 26 de Mar. 2019.

PUTON, B. M. S. *et al.* Minimun inhibitory concentration and antioxidant activity of the extract of *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae) extracted by different solvents. **Perspectiva, Erechim**, v. 42, n. 159, p. 109-118, 2018.

ROCHA, S. *et al.* Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v. 220, p. 36-46, 2019. DOI:10.1016/j.cbpc.2019.02.007.

RODRIGUES, T. S; GUIMARÃES, S. F; RODRIGUES, D. R. G; GABRIEL, J. V. Methods estimated drying and percentage of extracts in leaves of *Plectranthus barbatus* (Brazilian bold) and *P. ornatus* (false bold). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, p. 587-590, 2011. DOI: 10.1590/S1516-05722011000500014.

SALEM, M. Z. M *et al.* Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius* ripened fruits against some pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, p. 119-127, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.04.040.

SANTOS, D. N., SOUZA, L. L., FERREIRA, N. J., OLIVEIRA, A. L. Study of supercritical extraction from brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 365-374, 2015. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.04.005.

SCHERER, R., GODOY, H. T. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. **Brazilian Journal of Medical Plants**, v. 161, p. 41–46, 2014.

SHARMA, A., BIHAREE, A., KUMAR, A., JAITAK, V. Antimicrobial terpenoids as a potential substitute in overcoming antimicrobial resistance. **Current Drug Targets**, v. 21, n. 14, p. 1476-1494, 2020. DOI: 10.2174/1389450121666200520103427.

SILVA, N. C. C., BARBOSA, L., SEITO, L. N., FERNANDES JUNIOR, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1510-1514, 2012. DOI: 10.1080/14786419.2011.564582.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Method Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOBEH, M. *et al.* A polyphenol–rich fraction from eugenia uniflora exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 84, 2020. DOI: 10.3390/ph13050084.

TILLOTSON, G. S.; ZINNER, S. H. Burden of antimicrobial resistance in an era of decreasing susceptibility. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 15, n. 7, p. 663-676, 2017. DOI: 10.1080/14787210.2017.1337508.

TRENTIN, D. S; GIORDANI, R. B; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

TRENTIN, D. S. et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66257. DOI: 10.1371/journal.pone.0066257.

ULIANA M. P. *et al.* Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.11.077.

WU, S. *et al.* Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. **Food Chemistry**. v. 141, p. 2944–2951, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.050.

VICTORIA, F. N. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.8, p.2668-74, 2012. DOI: 10.1016/j.fct.2012.05.002.

ZENI, A. L. B. *et al.* Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, 2017.

## CAPÍTULO II

### **POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS E FRAÇÕES AQUOSAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi E *Eugenia uniflora* L.**

## RESUMO

O conhecimento sobre a atividade antioxidante das plantas ou de seus metabólitos é extremamente importante, uma vez que essa atividade pode ser a chave para a prevenção e/ou tratamento de doenças, e que os compostos antioxidantes atuam impedindo a ação nociva dos radicais livres no organismo. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos etanólicos e frações aquosas obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Eugenia uniflora* L., analisado pelos métodos de ABTS e DPPH. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8x2 (oito concentrações x extrato e fração), em triplicata. Para a reação foram utilizados 10 µL das amostras nas concentrações de 0,195 – 25 mg.mL<sup>-1</sup> foram misturados com 190 µL da solução do radical ABTS +•, incubados a 30 °C durante seis minutos e lidos a 734 nm. O radical DPPH (0,2 mM) foi diluído em etanol 96%. Neste caso, 20 µL de amostra nas concentrações de 0,195 – 25 mg.mL<sup>-1</sup> foram misturados a 180 µL da solução que continha o radical DPPH. A reação ocorreu durante 30 minutos ao abrigo de luz e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. Foi realizada uma análise dos coeficientes de correlação de Pearson entre os resultados obtidos, e as suas respectivas equivalências ao trolox e ao ácido ascórbico. Maior porcentagem de eliminação do ABTS ocorreu com a menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, tanto para o extrato etanólico, 92,04%, como para a fração aquosa, 93,73%, das folhas de *S. terebinthifolius*, correspondendo a 0,91 e 0,92 µM, respectivamente, do trolox. A porcentagem média de eliminação do DPPH para o extrato etanólico e fração aquosa de *S. terebinthifolius*, na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, foi de 80,42% e 86,63%, respectivamente, e esses valores corresponderam a 0,84 mM do ácido ascórbico para o extrato, e 0,86 mM para a fração. Com o extrato etanólico e fração aquosa das folhas de *E. uniflora*, a eliminação média do ABTS foi de 93,33% e 92,29%, respectivamente, na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo as equivalências 0,91 µM, do trolox, tanto para extratos como frações. A eliminação média do DPPH, na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, foi 83,29% para o extrato etanólico, e 87,55% para a fração aquosa das folhas de *E. uniflora*, equivalendo a 0,88 mM do ácido ascórbico, tanto para o extrato como para a fração. O extrato etanólico e a fração aquosa das folhas de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora* apresentam elevado potencial antioxidante, quando analisados pelos métodos de ABTS e DPPH. A eliminação do ABTS e do DPPH, nas diferentes concentrações do extrato etanólico e da fração aquosa, obtida das folhas de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora*, e as equivalências ao trolox e ao ácido ascórbico, respectivamente, correlacionam-se significativa e positivamente.

**Palavras-chave:** Aroeira. Extratos foliares. Plantas medicinais. Pitangueira. Radicais livres.

## ABSTRACT

Knowledge about the antioxidant activity of plants or their metabolites is important, since this activity may be the key to preventing and/or treating diseases, and that antioxidant compounds act by preventing the harmful action of these free radicals in the body. In this context, the objective of this work was to evaluate the antioxidant potential of ethanolic extracts and aqueous fractions obtained from the leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi and *Eugenia uniflora* L., analyzed by ABTS and DPPH methods. A completely randomized experimental design was used, in an 8x2 factorial scheme (eight concentrations x extract and fraction), in triplicate. For the reaction, 10  $\mu\text{L}$  of the samples at concentrations of 0.195 – 25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  were mixed with 190  $\mu\text{L}$  of the ABTS radical solution. Assays were incubated at 30°C for six minutes and read at 734 nm. The DPPH radical (0.2 mM) was diluted in 100% ethanol. In this case, 20  $\mu\text{L}$  of sample at concentrations of 0.195 – 25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  were mixed with 180  $\mu\text{L}$  of the solution containing the DPPH radical. The reaction took place for 30 minutes in the dark and the reading was performed in a spectrophotometer at 517 nm. An analysis of Pearson's correlation, and their respective equivalences to trolox and ascorbic acid was performed. The highest percentage of ABTS elimination occurred at the lowest concentration, 0.195  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , both for the ethanolic extract, 92.04%, and for the aqueous fraction, 93.73%, of *S. terebinthifolius* leaves, corresponding to 0.91 and 0.92  $\mu\text{M}$ , respectively, of trolox. The average percentage of DPPH elimination for the ethanolic extract and aqueous fraction of *S. terebinthifolius*, at the lowest concentration, 0.195  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , was 80.42 and 86.63%, respectively, and these values corresponded to 0.84 mM of ascorbic acid for the extract, and 0.86 mM for the fraction. With the ethanolic extract and aqueous fraction of *E. uniflora* leaves, the average elimination of ABTS was 93.33 and 92.29%, respectively, at the lowest concentration, 0.195  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , with equivalences being 0.91  $\mu\text{M}$ , from trolox, both for extracts and fractions. The average elimination of DPPH, at the lowest concentration, 0.195  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , was 83.29% for the ethanolic extract, and 87.55% for the aqueous fraction of *E. uniflora* leaves, equivalent to 0.88 mM of ascorbic acid, both for the extract and for the fraction. The ethanolic extract and the aqueous fraction of the leaves of *S. terebinthifolius* and *E. uniflora* have high antioxidant potential, when analyzed by ABTS and DPPH methods. The elimination of ABTS and DPPH, in the different concentrations of the ethanolic extract and the aqueous fraction, obtained from the leaves of *S. terebinthifolius* and *E. uniflora*, and the equivalences to trolox and ascorbic acid, respectively, are significantly and positively correlated.

**Key words:** aroeira. free radicals. leaf extracts. medicinal plants. pitangueira.

## 1. INTRODUÇÃO

Moléculas bioativas derivadas de plantas vêm se destacando em pesquisas científicas devido ao potencial terapêutico promissor das mesmas, seja na prevenção ou tratamento de diversas doenças. Sendo utilizadas de variadas formas, desde a planta inteira, extratos de plantas ou compostos isolados (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020). Da mesma forma que, diversas técnicas podem ser empregadas para a obtenção desses compostos (SASIDHARAN *et al.*, 2011).

Quando se trata das plantas *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Eugenia uniflora* L., estudos apontam variadas atividades estudadas, desde antimicrobianas (SOBEH *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018), anti-inflamatórios (GALVÃO *et al.*, 2018), antivirais (NOCCHI *et al.*, 2017), antiparasitárias (ABDELFATTAH *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2017), hepatoprotetoras (SOBEH *et al.*, 2020), neuroprotetoras (FLORES *et al.*, 2020), destacando o potencial promissor das mesmas para as mais diversas finalidades.

Estudos sobre atividade antioxidante vêm sendo realizados, a fim de elucidar este potencial dessas plantas, variando de acordo com a parte da planta utilizada, forma de obtenção, seja extratos, óleos essenciais ou frações pelos mais variados solventes utilizados no preparo dos mesmos (EL-MASSRY *et al.*, 2009; BERNARDES *et al.*, 2011; FERRERA *et al.*, 2016; ULIANA *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2019; SOBEH *et al.*, 2020). Além do método e/ou solvente utilizado para a extração, fatores ambientais podem interferir e alterar a presença dos metabólitos presentes (SOUZA *et al.*, 2018).

É importante o conhecimento sobre a atividade antioxidante de plantas ou seus metabólitos, uma vez que esta atividade pode ser a chave para atuar na prevenção e/ou tratamento de doenças, e que compostos antioxidantes atuam impedindo a ação danosa dos radicais livres no organismo (TOLEDO *et al.*, 2023; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020), uma vez que a presença espécies reativas em oxigênio (EROS), quando presente de forma excessiva no organismo, atuam como fatores predominantes para o desenvolvimento de patologias, em especial aquelas de caráter crônico, se tornando um problema para saúde humana (PADUREANU *et al.*, 2019) ou animal (LONGOBARDI *et al.*, 2022).

Além dos conhecidos benefícios a saúde, em especial a redução dos efeitos deletérios dos radicais livres no organismo, os antioxidantes apresentam ainda importância para a indústria alimentícia, uma vez que as reações de oxidação também ocorrem em alimentos quando expostos ao calor, luz ou oxigênio. Os antioxidantes podem ser utilizados com o intuito de retardar ou impedir a oxidação dos mesmos e seus efeitos indesejáveis como alterações no

sabor, odor, textura e perdas nutricionais (LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos etanólicos e frações aquosas obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, analisado pelos métodos de ABTS e DPPH.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de material**

As folhas de *E. uniflora* e *S. terebinthifolius* foram coletadas na microrregião de Garanhuns (Pernambuco, Brasil) (Latitude: 8° 53' 27" Sul, Longitude: 36° 29' 48" Oeste; altura: 841 m) no período de março e outubro de 2019, respectivamente. Estas plantas foram identificadas taxonomicamente pela botânica Dra. Rita de Cássia Pereira, com as respectivas exsicatas 94314 e 94315, e depositadas no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). As coletas foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), cadastro A576AF3.

### **2.2 Obtenção dos extratos etanólicos brutos**

Para obtenção dos extratos brutos e frações o material vegetal coletado foi seco em estufa com circulação de ar (Tecnal, TE-394/3, São Paulo, Brasil) a 50 °C e depois de seco, triturado em moinho de facas (Marconi, MA 340, São Paulo, Brasil) com peneira de 5 mm. Posteriormente, o material triturado foi submetido a maceração em etanol 96% em três ciclos de 48 horas cada. Após cada ciclo de maceração, os resíduos foram combinados. Após a combinação dos três ciclos o solvente foi eliminado sob pressão reduzida a uma temperatura máxima de 40 °C em evaporador rotativo (Buchi R-100, São Paulo, Brasil).

### **2.3 Fracionamento dos extratos etanólicos brutos**

Os extratos brutos foram fracionados por meio da técnica de partição líquido-líquido. A técnica consiste em separar os constituintes químicos presentes em uma determinada amostra de acordo com sua polaridade. O particionamento foi realizado de forma sequencial: (1) Fração solúvel em hexano – uma porção do extrato etanólico bruto (60g) foi dissolvida em uma mistura de metanol e água na proporção de 3:2 (200 mL) e levada a um funil de separação e, adicionado um volume igual de hexano (200 mL), para realizar a extração de substâncias de polaridade baixa. A extração foi realizada três vezes e o material solúvel em hexano combinado para eliminação do solvente sob pressão reduzida a uma temperatura máxima de 40 °C; (2) Fração solúvel em clorofórmio – a porção metanol:água, restante da etapa anterior, foi concentrada sob

pressão reduzida para eliminação do metanol e o resíduo teve seu volume completado com água destilada para 200 mL e submetido a extração em 200 mL de clorofórmio em funil de separação, para extração de substâncias de polaridade intermediária. O processo de extração foi repetido por três vezes e o material combinado, seco sob pressão reduzida e a temperatura máxima de 40 °C; e (3) Fração aquosa – foi o resíduo aquoso, a qual reúne aquelas substâncias de polaridade mais elevada.

Todos os extratos brutos e frações obtidos foram submetidos a um processo de liofilização (Liofilizador Terroni® LD 1500, São Paulo, Brasil) para obtenção de um pó livre de umidade.

#### **2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

A determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos e frações foi mensurada pela reação de Folin-Ciocalteu com adaptações das metodologias descritas por Singleton *et al.* (1999) e Scherer; Godoy (2014). Uma alíquota de 0,25 mL de uma solução etanólica (70%) de extratos e frações secos ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada a 2,75 mL de reagente Folin-Ciocalteu 3% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Após 5 minutos adicionou-se 0,25 mL de carbonato de sódio a 10% e homogeneizou-se em agitador tipo vortex (Marconi, Ma-162, São Paulo, Brasil). A mistura reacional foi mantida por 1 h na ausência de luz, à temperatura ambiente ( $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A absorvância foi mensurada a 765 nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Cambridge, Reino Unido) e convertida ao teor de fenólicos de acordo com uma curva de calibração feita com ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas por grama de equivalência de ácido gálico (EAG) por grama de extrato bruto ou fração, todas as leituras foram feitas em triplicata.

#### **2.5 Determinação do teor de flavonóides totais**

A determinação do teor de flavonoides totais foi mensurada utilizando método colorimétrico com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), adaptado de Chang *et al.* (2002). Uma alíquota de 0,5 mL de uma solução etanólica (70%) de extratos secos ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adicionada a 0,5 mL de solução de etanol de  $\text{AlCl}_3$  a 2%, homogeneizou-se por 10 s. A mistura reacional foi mantida por 1 h na ausência de luz, à temperatura ambiente. A absorvância foi mensurada a 420 nm em espectrofotômetro e convertida ao teor de flavonoides de acordo com uma curva de

calibração feita com quercetina em  $\text{mg.L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em miligramas por grama de equivalência de quercetina por grama de extrato etanólico, todas as leituras foram feitas em triplicata.

## 2.6 Avaliação da atividade antioxidante

Para a obtenção da atividade antioxidante, em extratos etanólicos e frações aquosas das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, analisada pelos métodos ABTS e DPPH, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $8 \times 2$  (oito concentrações x extrato e fração), em triplicata.

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada com o radical cátion  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ , gerado a partir do 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) de acordo com RE *et al.* (1999), modificada. Para formação do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ , persulfato de potássio e ABTS foram preparados a uma concentração final de 2,45 e 7 mM, respectivamente, sendo a solução incubada ao abrigo da luz por 16 h em temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C). A absorbância da solução do radical foi ajustada para  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm, através de espectrofotômetro, por diluição em tampão fosfato-salino (PBS) 100 mM, pH 7,4. Para a reação, 10  $\mu\text{L}$  das amostras nas concentrações de 0,195 – 25  $\text{mg.mL}^{-1}$  foram misturados com 190  $\mu\text{L}$  da solução do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ . Os ensaios foram incubados a 30 °C durante seis minutos e lidos a 734 nm, em triplicata. A curva do antioxidante padrão foi obtida a partir da diluição seriada do Trolox (0,004 – 2,0  $\mu\text{M}$ ), para avaliar a eficiência dos ensaios.

Além do método com ABTS, também foram realizados ensaios de atividade antioxidante utilizando outro radical livre, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila ( $\text{DPPH}^\bullet$ ). A avaliação da atividade sequestradora do radical livre DPPH foi realizada segundo a metodologia descrita por Li *et al.* (2013), modificada. O radical DPPH (0,2 mM) foi diluído em etanol 96 %. Neste caso, 20  $\mu\text{L}$  de amostra nas concentrações de 0,195 – 25  $\text{mg.mL}^{-1}$  foram misturados a 180  $\mu\text{L}$  da solução que continha o radical DPPH. A reação ocorreu durante 30 minutos ao abrigo de luz e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. A curva do antioxidante padrão foi obtida a partir da diluição seriada do ácido ascórbico (0,004 – 2,0 mM).

As atividades antioxidantes foram calculadas em relação à equivalência dos antioxidantes padrões, Trolox e ácido ascórbico. Além disso, foram calculados o de captura dos radicais ABTS e DPPH, conforme a Equação:

$$\text{Atividade antioxidante}(\%) \left( \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) * 100$$

Onde,  $A_{\text{controle}}$  representa a absorbância inicial do ABTS e  $A_{\text{amostra}}$  a absorbância após a adição dos extratos ou frações (RE *et al.*,1999).

## 2.7 Análise estatística

Os dados de atividade antioxidante obtidos nas diferentes concentrações de extratos etanólicos e frações aquosas das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo a comparação de médias feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi realizada uma análise dos coeficientes de correlação de Pearson entre os resultados da eliminação do ABTS e DPPH em diferentes concentrações dos extratos etanólicos e frações aquosas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, e as suas respectivas equivalências ao trolox e ao ácido ascórbico. As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* Sigmaplot 13 (SYSTAT SOFTWARE, 2019).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante obtida com o uso do extrato etanólico e fração aquosa de folhas de *Schinus terebinthifolius*, analisadas pelo método de ABTS. Observou-se que as porcentagens de atividade antioxidante não diferiram significativamente entre as concentrações de 0,195 e 0,781 mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato etanólico, e que não houve diferença significativa entre as médias de todas as concentrações para a fração aquosa. Esses resultados mostraram que as maiores atividades antioxidantes, 92,04% e 93,73%, respectivamente para extrato etanólico e fração aquosa, foram obtidas na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Eliminação do radical ABTS+• (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	Extrato etanólico	Fração aquosa
25	77,12 Bcd	88,94 Aa
12,5	74,02 Bcd	88,90 Aa
6,25	62,63 Be	90,99 Aa
3,125	71,82 Bd	91,75 Aa
1,562	81,19 Bbc	92,40 Aa
0,781	87,82 Bab	92,76 Aa
0,39	90,81 Aa	93,26 Aa
0,195	92,04 Aa	93,73 Aa
<b>Concentrações (Con.)</b>		23,07 **
<b>Extratos (E)</b>		196,27 **
<b>Interação Con. x E</b>		14,50 **
<b>CV (%)</b>		3,44

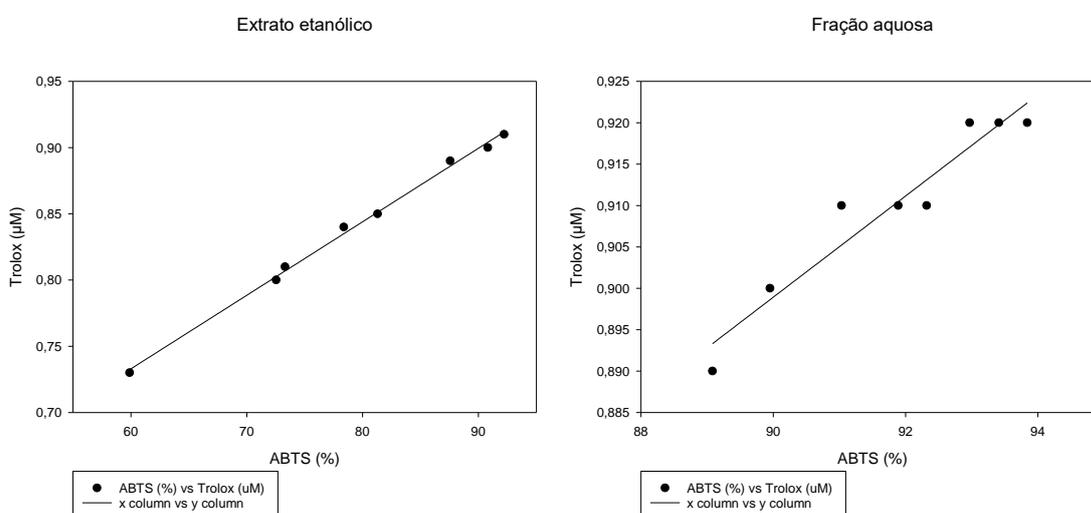
Nas colunas, as médias de concentrações, dentro de cada extrato, seguidas de pelo menos uma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Nas linhas, as médias de extratos, dentro de cada concentração, seguidas de pelo menos uma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. (\*\*) Significativo a 1% de probabilidade.

Para o extrato etanólico, verificou-se que em concentrações menores, 0,195 e 0,39 mg.mL<sup>-1</sup>, foram obtidas as maiores atividades antioxidantes, 92,04 e 90,81%, respectivamente,

não diferindo significativamente entre si e a concentração de  $0,781 \text{ mg.mL}^{-1}$ , cuja porcentagem de atividade antioxidante foi 87,82% (Tabela 1).

Comparando-se as médias de atividade antioxidante obtida com o extrato etanólico com as médias de atividade obtidas com a fração aquosa, foi observado pela Tabela 1 que o uso da fração aquosa de folhas de *Schinus terebinthifolius* conferiu ação antioxidante maior que o extrato etanólico para todas as concentrações testadas, não diferindo significativamente apenas nas concentrações de  $0,195$  e  $0,39 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Maior porcentagem de eliminação do ABTS ocorreu na menor concentração,  $0,195 \text{ mg.mL}^{-1}$ , tanto para o extrato etanólico, 92,04%, como para a fração aquosa, 93,73%, das folhas de *Schinus terebinthifolius*, correspondendo a  $0,91$  e  $0,92 \text{ } \mu\text{M}$ , respectivamente, do Trolox (Figura 1). Os coeficientes de correlação entre atividade antioxidante obtida no extrato etanólico ou na fração aquosa, em diferentes concentrações, e equivalência ao trolox, foram de  $0,99$  ( $P = 0,0000110$ ) e  $0,96$  ( $P = 0,00135$ ), respectivamente para extratos e frações.



**Figura 1.** Eliminação do radical  $\text{ABTS}^+\bullet$  em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de *Schinus terebinthifolius* e a sua equivalência ao trolox.

A porcentagem de atividade antioxidante para o extrato etanólico obtido das folhas de *Schinus terebinthifolius*, e analisada pelo método de DPPH, não diferiu significativamente entre as concentrações de  $0,195$  a  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Tabela 2). Nas menores concentrações do extrato, foi possível observar que a atividade antioxidante aumentou, sendo essa atividade de 80,42% na concentração de  $0,195 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Ressaltando-se que na concentração de  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$ , a maior testada, a atividade antioxidante foi de apenas 20,58%.

**Tabela 2.** Eliminação do radical DPPH• (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )	Extrato etanólico	Fração aquosa
25	20,58 Bb	73,87 Ab
12,5	77,09 Aa	82,34 Aab
6,25	76,71 Ba	84,67 Aa
3,125	81,11 Aa	85,59 Aa
1,562	81,46 Aa	86,52 Aa
0,781	83,30 Aa	87,05 Aa
0,39	84,67 Aa	86,59 Aa
0,195	80,42 Ba	86,63 Aa
<b>Concentrações (Con.)</b>		71,62 **
<b>Extratos (E)</b>		104,56 **
<b>Interação Con. x E</b>		31,94 **
<b>CV (%)</b>		4,73

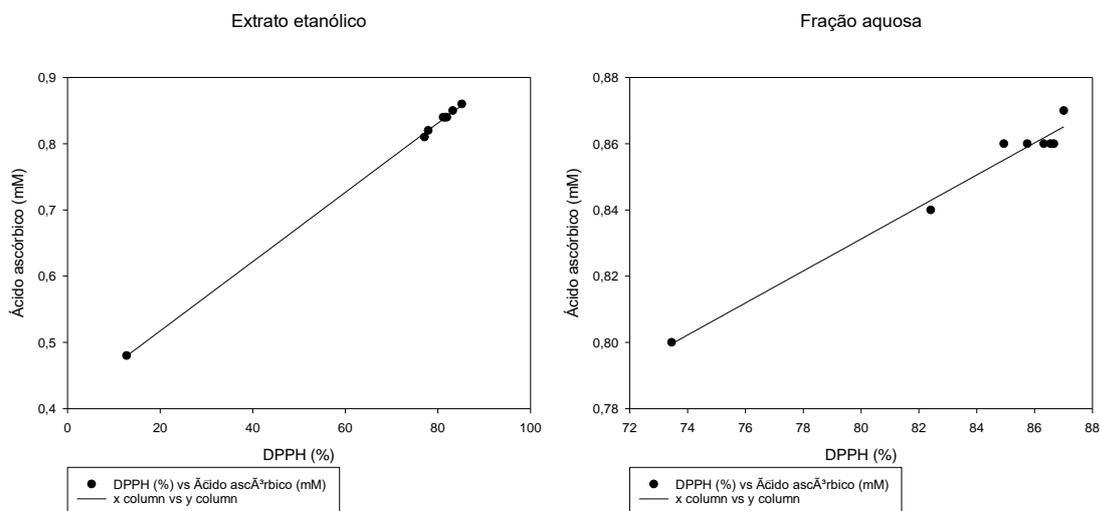
Nas colunas, as médias de concentrações, dentro de cada extrato, seguidas de pelo menos uma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Nas linhas, as médias de extratos, dentro de cada concentração, seguidas de pelo menos uma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. (\*\*) Significativo a 1% de probabilidade.

Para a fração aquosa, foram obtidos resultados semelhantes aos do extrato etanólico, não sendo verificada diferença significativa entre concentrações de 0,195 a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>, e entre a concentração de 12,5 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>, de acordo com a Tabela 2. Pelo método de DPPH, a atividade antioxidante obtida de fração aquosa das folhas de *Schinus terebinthifolius*, foi de 86,63%, na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, indicando que em concentrações menores desta fração, a porcentagem de atividade antioxidante aumentou.

A fração aquosa apresentou maior atividade antioxidante do que o extrato etanólico para todas as concentrações, mas não diferiu significativamente das porcentagens de atividades obtidas nas concentrações de 0,39 a 3,125, e 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 2). Na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, a atividade antioxidante de fração aquosa foi de 86,63%.

A porcentagem média de eliminação do DPPH para o extrato etanólico e fração aquosa de *Schinus terebinthifolius*, na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, foi de 80,42 e 86,63%, respectivamente, e esses valores corresponderam a 0,84 mM do ácido ascórbico para o extrato, e 0,86 mM para a fração (Figura 2). Os coeficientes de correlação entre essas atividades e a

equivalência ao ácido ascórbico foram de 0,99 ( $P = 0,0000383$ ) para o extrato etanólico, e 0,98 ( $P = 0,000392$ ) para a fração aquosa obtida das folhas de *S. terebinthifolius*.



**Figura 2.** Eliminação do radical DPPH• em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de *Schinus terebinthifolius* e a sua equivalência ao ácido ascórbico.

Na Tabela 3 estão os resultados médios das porcentagens de atividade antioxidante de extrato etanólico e fração aquosa das folhas de *Eugenia uniflora*, analisada pelo método de ABTS. Não foram constatadas diferenças significativas entre as atividades antioxidantes obtidas nas concentrações de 0,195 a 1,562 mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato etanólico, sendo a maior atividade, 93,33%, obtida na menor concentração desse extrato, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>.

Para a fração aquosa, a porcentagem de atividade antioxidante não diferiu significativamente entre todas as concentrações testadas (Tabela 3). Entretanto, essa fração obtida das folhas de *Eugenia uniflora*, e analisada pelo método de ABTS, apresentou-se como excelente antioxidante, uma vez que a porcentagem de atividade variou de 90,52%, na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>, a 92,67%, na concentração de 0,39 mg.mL<sup>-1</sup>.

A interação Con. x E na Tabela 3, mostrou que o resultado da atividade antioxidante na fração aquosa não diferiu significativamente do resultado obtido no extrato etanólico, nas concentrações de 0,195 a 1,562 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo que para *Eugenia uniflora*, no geral, a fração aquosa apresentou maior capacidade antioxidante do que o extrato etanólico.

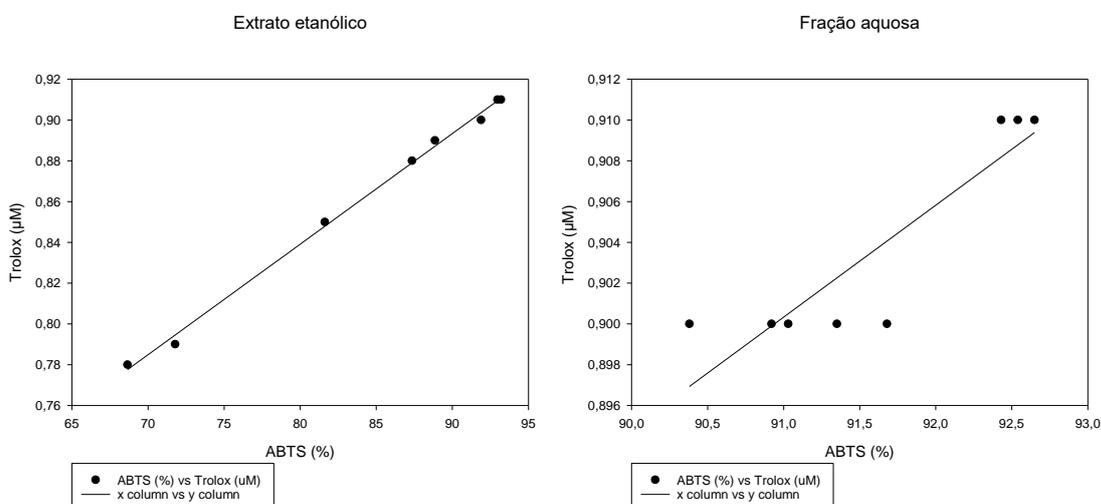
Com o extrato etanólico e fração aquosa das folhas de *Eugenia uniflora*, a eliminação média do ABTS foi de 93,33 e 92,29%, respectivamente, na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo as equivalências 0,91 μM, do trolox, tanto para extratos como frações (Figura 3). Os coeficientes de correlação entre porcentagem de atividade antioxidante obtida em cada

concentração do extrato etanólico ou fração aquosa, e a equivalência ao trolox, foram de 0,99 ( $P = 0,0000685$ ) para os extratos, e de 0,89 ( $P = 0,00248$ ) para as frações.

**Tabela 3.** Eliminação do radical  $ABTS^{+\bullet}$  (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de *Eugenia uniflora*.

Concentração ( $mg.mL^{-1}$ )	Extrato etanólico	Fração aquosa
25	69,69 Bd	90,52 Aa
12,5	70,74 Bd	90,99 Aa
6,25	80,79 Bc	91,25 Aa
3,125	86,12 Bb	91,53 Aa
1,562	89,19 Aab	91,68 Aa
0,781	91,67 Aa	92,40 Aa
0,39	92,72 Aa	92,67 Aa
0,195	93,33 Aa	92,29 Aa
<b>Concentrações (Con.)</b>		40,35 **
<b>Extratos (E)</b>		166,27 **
<b>Interação Con. x E</b>		30,17 **
<b>CV (%)</b>		2,25

Nas colunas, as médias de concentrações, dentro de cada extrato, seguidas de pelo menos uma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Nas linhas, as médias de extratos, dentro de cada concentração, seguidas de pelo menos uma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. (\*\*) Significativo a 1% de probabilidade.



**Figura 3.** Eliminação do radical  $ABTS^{+\bullet}$  em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de *Eugenia uniflora* e a sua equivalência ao trolox.

Como não houve diferença significativa, a 5% de probabilidade, para a interação Con. x E, nas atividades antioxidantes obtidas de extrato etanólico e fração aquosa das folhas de *Eugenia uniflora* pelo método DPPH, as médias de concentrações independem do extrato ou da fração aquosa, sendo esses dois fatores analisados separadamente (Tabela 4).

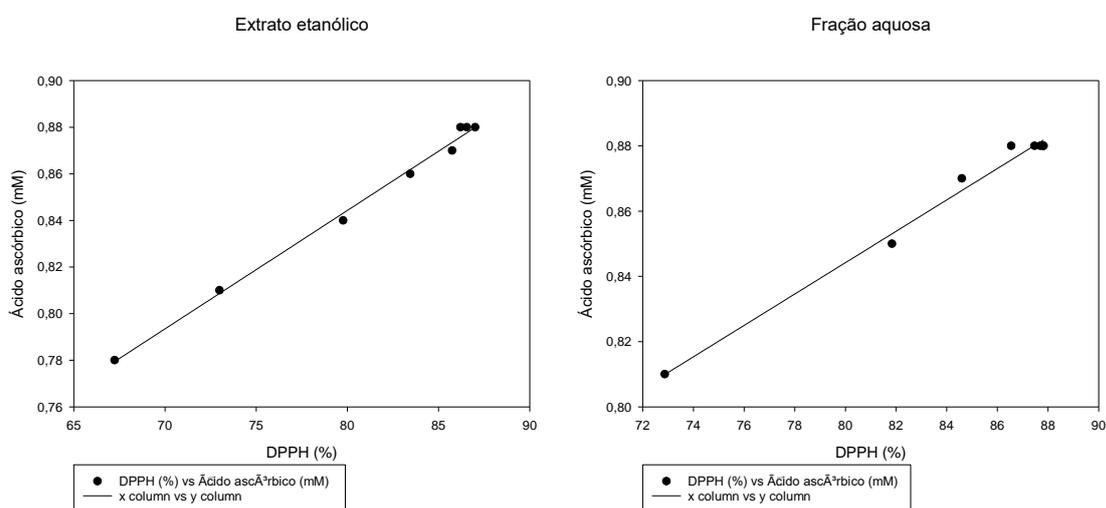
**Tabela 4.** Eliminação do radical DPPH• (%) pelo extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de *Eugenia uniflora*.

<b>Concentração (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Extrato etanólico</b>	<b>Fração aquosa</b>	<b>Média</b>
<b>25</b>	66,09	72,91	69,50 d
<b>12,5</b>	74,06	82,03	78,04 c
<b>6,25</b>	78,16	84,94	81,55 bc
<b>3,125</b>	82,83	86,59	84,71 ab
<b>1,562</b>	85,67	87,82	86,74 a
<b>0,781</b>	86,05	87,70	86,88 a
<b>0,39</b>	86,82	87,70	87,26 a
<b>0,195</b>	83,29	87,55	85,42 ab
<b>Média</b>	80,37 b	84,65 a	
<b>Concentrações (Con.)</b>			45,72 **
<b>Extratos (E)</b>			44,63 **
<b>Interação Con. x E</b>			2,16 ns
<b>CV (%)</b>			2,69

As médias de concentrações seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As médias de extratos seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (\*\*) Significativo a 1% de probabilidade. (ns) Não significativo a 5% de probabilidade.

A porcentagem de atividade antioxidante analisada pelo método de DPPH não diferiu significativamente entre as concentrações de 0,195 a 3,125 mg.mL<sup>-1</sup>, independentemente do uso do extrato etanólico ou da fração aquosa, observando os resultados médios apresentados na Tabela 4. Na maior concentração, 25 mg.mL<sup>-1</sup>, a atividade antioxidante média foi menor, 69,50%. Considerando o extrato etanólico ou a fração aquosa obtida das folhas de *Eugenia uniflora* independentemente das concentrações, verificou-se que com a fração aquosa, a atividade antioxidante média foi 84,65%, diferindo significativamente do extrato etanólico, que apresentou atividade de 80,37%.

A eliminação média do DPPH, na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, foi 83,29% para o extrato etanólico, e 87,55% para a fração aquosa das folhas de *Eugenia uniflora*, equivalendo a 0,88 mM do ácido ascórbico, tanto para o extrato como para a fração (Figura 4). Os coeficientes de correlação entre médias de atividade antioxidante obtidas no extrato etanólico (P, 0,0000431) ou na fração aquosa (P = 0,000448) e equivalência ao ácido ascórbico, foram de 0,99, para extratos e frações.



**Figura 4.** Eliminação do radical DPPH• em diferentes concentrações do extrato etanólico e fração aquosa de *Eugenia uniflora* e a sua equivalência ao ácido ascórbico.

As substâncias formadas por pigmentos naturais, fenóis e outros compostos vegetais podem bloquear o efeito danoso de radicais livres, conferindo a determinado extrato ou fração, maior capacidade antioxidante (MARQUARDT *et al.*, 2020; FERRERA *et al.*, 2016). O que, provavelmente, explica os resultados encontrados nesse trabalho, uma vez que nos extratos etanólicos e frações aquosas das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, o teor de fenólicos e flavonóides totais foi alto, apresentando capacidade antioxidante.

Vários autores vêm estudando o potencial antioxidante de extratos e frações obtidos de *Schinus terebinthifolius* (ROCHA *et al.*, 2019; ULIANA *et al.*, 2016; BERNARDES *et al.*, 2011; EL-MASSRY *et al.*, 2009) e *Eugenia uniflora* (SOBEH *et al.*, 2020; FIGUEIRÔA *et al.*, 2013).

Rocha *et al.* (2019), avaliando a qualidade microbiológica, perfil químico e atividades antioxidante e antidiabética de diferentes partes de *Schinus terebinthifolius*, observaram que, os extratos metanólicos das raízes, casca do caule e folhas de *S. terebinthifolius* mostraram segurança microbiológica juntamente com atividades antioxidantes e antidiabéticas, provavelmente mediada por seus constituintes químicos, como ácido gálico.

Esses autores identificaram potencial antioxidante em extratos metanólicos de folhas de *Schinus terebinthifolius* analisado pelos métodos de ABTS e DPPH, e atribuíram a sua maior eficácia para as atividades biológicas testadas ao maior teor de compostos fenólicos desse extrato, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Uliana *et al.* (2016) investigaram a atividade antioxidante e antimicrobiana e a composição química do extrato da folha e do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*. Em resumo, esses achados demonstram o potencial antioxidante e atividade antimicrobiana dos extratos de *S. terebinthifolius*, que podem ajudar a explicar o uso popular para infecção do trato urinário.

Nesse trabalho, os autores utilizaram o método de maceração das folhas para obtenção do extrato etanólico de *Schinus terebinthifolius*, observando, com uso desse extrato, uma atividade antioxidante considerada como muito forte. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, pois a porcentagem de atividade antioxidante dos extratos etanólicos, também obtidos das folhas de *S. terebinthifolius*, analisada tanto pelo ABTS como pelo DPPH, foi alta.

Bernardes *et al.* (2011), quantificaram os teores de taninos e fenóis totais nos frutos da *Schinus terebinthifolius*, buscando estabelecer uma possível correlação entre essas substâncias e sua atividade antioxidante. Nesse trabalho, os autores observaram baixos teores de taninos condensados e fenóis totais nas cascas dos frutos, não sendo detectados taninos hidrolisáveis nos mesmos. Apesar disso, o extrato metanólico apresentou elevado potencial antioxidante, indicando a inexistência de uma correlação entre a atividade antioxidante e os teores de compostos fenólicos nesses frutos.

Esses resultados divergiram dos encontrados no presente trabalho, uma vez que existe correlação positiva entre os caracteres teor de fenólicos e flavonóides totais e atividade antioxidante, ou seja, quanto maior o teor de fenólicos e flavonóides totais em extratos etanólicos e frações aquosas das folhas de *Schinus terebinthifolius*, maior será a capacidade antioxidante desses.

El-Massry *et al.* (2009) analisaram composições químicas e atividades antioxidantes e antimicrobianas de várias amostras preparadas a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius* cultivadas no Egito. Nos ensaios, a atividade antioxidante do extrato etanólico foi superior ao óleo essencial e ao extrato de diclorometano. Nesses achados, a atividade antioxidante, analisada pelo método de DPPH, foi de aproximadamente 90%, na concentração de 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>. Esses resultados foram semelhantes aos deste trabalho, onde a porcentagem de atividade,

obtida do extrato etanólico de folhas de *S. terebinthifolius*, foi de 84,67%, na concentração de 0,39 mg.mL<sup>-1</sup>, também pelo método DPPH (Tabela 2).

Ao determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Combretum collinum* Fresen, analisada pelos métodos ABTS e DPPH, e compararam com padrões. Nesse trabalho, a atividade antioxidante obtida foi maior que 80%, para ambos os métodos, na menor concentração testada, 0,0015625 mg.mL<sup>-1</sup>, diferindo significativamente do padrão trolox, cuja atividade foi menor que 50%, tanto para o ABTS como para o DPPH (MARQUARDT *et al.* 2020).

Os achados deste trabalho mostram resultados semelhantes, para os extratos etanólicos das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, onde na menor concentração, 0,195 mg.mL<sup>-1</sup>, a porcentagem média de atividade antioxidante obtida foi de 90,04 e 80,42%, Tabelas 1 e 2, para *S. terebinthifolius*, e de 93,33 e 83,29%, Tabelas 3 e 4, para *E. uniflora*, ABTS e DPPH, respectivamente.

Um ensaio de fracionamento bioguiado conduzido por Sobeh *et al.* (2020), mostrou que o extrato metanólico e fração de acetato de etila, obtidos das folhas de *Eugenia uniflora*, e analisados pelo método de DPPH, têm elevada capacidade antioxidante, sendo essa atividade atribuída a presença de pelo menos 22 metabólitos secundários, principalmente derivados da miricetina e quercetina.

Figueirôa *et al.* (2013) quantificaram os teores de polifenóis e flavonóides e avaliaram os potenciais imunomodulador, antioxidante e citotóxico das frações de *Eugenia uniflora* e *Eugenia malaccensis* L. Os resultados indicaram que espécies da família Myrtaceae são ricas em compostos com capacidade antioxidante, que podem auxiliar na redução da resposta inflamatória. Esses autores observaram que frações de acetato de etila, butanol e aquosa obtidas das folhas e sementes de *Eugenia uniflora*, analisada pelo método de DPPH, apresentaram potencial como antioxidante, e que a correlação da atividade antioxidante encontrada com os teores de polifenóis seria positiva.

Os teores de fenólicos totais foram de 97,08 mgEAG.g<sup>-1</sup>, para extratos etanólicos, e de 98,35 mgEAG.g<sup>-1</sup>, para frações aquosas da *Schinus terebinthifolius*. Em *Eugenia uniflora*, os valores encontrados foram de 79,78 e 88,67 mgEAG.g<sup>-1</sup>, para extrato etanólico e fração aquosa, respectivamente. Quanto ao teor de flavonóides totais, o extrato etanólico da *S. terebinthifolius* apresentou 53,29 mgEQ.g<sup>-1</sup>, e a fração aquosa, 35,15 mgEQ.g<sup>-1</sup>. Enquanto, no extrato etanólico de *E. uniflora* esse teor foi de 56,88 mgEQ.g<sup>-1</sup>, e na fração aquosa, 42,35 mgEQ.g<sup>-1</sup>.

Este maior teor de fenólicos totais encontrado em frações aquosas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, explica em parte, porque ocorreu de maneira geral, maior

eliminação do ABTS e DPPH nas diferentes concentrações dessa fração, comparando-se com os resultados obtidos nos extratos etanólicos.

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante de extratos e frações vegetais, tendo destaque os flavonóides, já que os mesmos possuem grupos OH<sup>-</sup> que atuam como doadores de H<sup>+</sup>, ressaltando seu efeito antioxidante devido às suas propriedades de oxirredução (MARQUARDT *et al.*, 2020; FERRERA *et al.*, 2016; PIETTA, 2000). Nesse contexto, observou-se que extrato etanólico e fração aquosa obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* podem atuar como doadores de H<sup>+</sup>, tanto para o ABTS+• quanto DPPH•.

Como já era esperado, os resultados da eliminação do ABTS e do DPPH, nas diferentes concentrações do extrato etanólico e da fração aquosa de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, e as suas respectivas equivalências ao trolox e ao ácido ascórbico, correlacionaram-se positiva e significativamente. O extrato etanólico e a fração aquosa de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora* apresentaram alta atividade antioxidante, sendo muito eficaz comparativamente às referências, mesmo que testado por mais de um mecanismo.

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato etanólico e a fração aquosa das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* apresentam elevado potencial antioxidante, quando analisados pelos métodos de ABTS e DPPH. A atividade antioxidante é maior na fração aquosa do que no extrato etanólico, para *Schinus terebinthifolius*, tanto pelo ABTS como DPPH, e para *Eugenia uniflora*, apenas no DPPH. A eliminação do ABTS e do DPPH, nas diferentes concentrações do extrato etanólico e da fração aquosa, obtida das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, e as equivalências ao trolox e ao ácido ascórbico, respectivamente, correlacionam-se significativa e positivamente.

## 5. REFERÊNCIAS

ABDELFATTAH, M. A. *et al.* *Eugenia uniflora* and *Syzygium samarangense* extracts exhibit anti-trypanosomal activity: Evidence from in-silico molecular modelling, *in vitro*, and *in vivo* studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111508, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111508.

BERNARDES, N. R. *et al.* Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de aroeira. **VÉRTICES**, Campos dos Goytacazes, v. 13, n. 3, p. 117-128, 2011.

CARVALHO, C. E. S. *et al.* Anti-leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 59-67, 2017. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.02.012.

EL-MASSRY, K.; EL-GHORAB, A.; SHAABAN, H.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5265-70, 2009. DOI: 10.1021/jf900638c.

FERRERA, T. S. *et al.* Substâncias fenólicas, flavonóides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FIGUEIRÔA, E. O. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. **Scientific World Journal**, v. 5, p. 1-7, 2013. DOI: 10.1155/2013/125027.

FLORES, N. P. *et al.* *Eugenia uniflora* fruit extract exerts neuroprotective effect on chronic unpredictable stress-induced behavioral and neurochemical changes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, p. 13442, 2020. DOI: 10.1111/jfbc.13442.

GALVÃO, W. R. *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory activities integrated to chemical composition of *Myracrodruon urundeuva* Allemão - A conservationist proposal for the species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 177-189 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.04.024.

LI, Z. *et al.* Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. **Journal Dairy of Science**, v. 96, p. 4242-4251, 2013.

LONGOBARDI, C. *et al.* Ochratoxin A and kidney oxidative stress: The role of nutraceuticals in veterinary medicine-A Review. **Toxins (Basel)**, v. 14, n. 6, p. 398, 2022. DOI: 10.3390/toxins14060398.

LOURENÇO, S. C; MOLDAÃO-MARTINS, M; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132. DOI: 10.3390/molecules24224132.

MARQUARDT, P. *et al.* Phytochemical characterization and in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity of *Combretum collinum* Fresen leaves extracts from Benin. **Molecules**, v. 10, n. 25, p. 288, 2020. DOI: 10.3390/molecules25020288.

NOCCHI, S. R. *et al.* Antiviral Activity of crude hydroethanolic extract from *Schinus terebinthifolius* against Herpes simplex Virus Type 1. **Planta Medica**, v. 83, p. 509-518, 2017. DOI: 10.1055/s-0042-117774.

PADUREANU, R. *et al.* Oxidative stress and inflammation interdependence in multiple sclerosis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 1815. DOI: 10.3390/jcm8111815.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000. DOI: 10.1021/np9904509.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

ROCHA, S. *et al.* Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 220, p. 36-46, 2019. DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.02.007.

SASIDHARAN, S. *et al.* Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, 2002. DOI: 10.38212/2224-6614.2748.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. **Brazilian Journal of Medical Plants**, v. 161, p. 41-46, 2014.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 2; p. 11-694, 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.00694.

SILVA, J. H. S. *et al.* Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. **Natural Product Research**, v. 32, n. 11, p. 1365-1368, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2017.1344657.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Method Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOBEH, M. *et al.* A polyphenol–rich fraction from *Eugenia uniflora* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 84, 2020. DOI: 10.3390/ph13050084.

SOBEH, M. *et al.* Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, p. 240:111939, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2019.111939.

SOUZA, L. B. F. C. *et al.* Influence of *Eugenia uniflora* extract on adhesion to human buccal epithelial cells, biofilm formation, and cell surface hydrophobicity of *Candida* spp. from the oral cavity of kidney transplant recipients. **Molecules**, v. 23, p. 1-20, 2018. DOI: 10.3390/molecules23102418.

TOLEDO, A. G. *et al.* Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical prospection of *Eugenia involucrata* DC. leaf extracts. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023. DOI: 10.1590/1519-6984.245753.

ULIANA, M. P. *et al.* Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.11.077.

Systat Software Inc. (2019). Sigmaplot for Windows (No. 14). <https://systatsoftware.com/products/sigmaplot/>.

### **CAPÍTULO III**

#### **UTILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L: RELATOS DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA PLANTA DA CAATINGA BRASILEIRA**

**Capítulo aceito na obra Química de Produtos Naturais do Brasil: trajetória, atualidades e perspectivas - volume 1, Sociedade Brasileira de Química, 2023.**

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que apresenta grande biodiversidade vegetal, e conseqüentemente grande potencial quanto a utilização da mesma para fins terapêuticos, visto que as plantas produzem substâncias atuantes, por exemplo, na prevenção e tratamento de infecções, entre estas, as de origem bacteriana.<sup>1,2</sup> A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga e repassada entre gerações, também relacionada à diversidade de comunidades indígenas, quilombolas, comunidades rurais e diversidade local.<sup>3</sup>

Na Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro e o maior da Região Nordeste, encontram-se diversas plantas que apresentam potencial para uso medicinal, entre as quais, *Eugenia uniflora* L., além deste bioma, a mesma está amplamente distribuída nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul.<sup>3</sup>

Na medicina tradicional, esta planta é utilizada para diversas finalidades de tratamento de doenças infecciosas, principalmente contra infecções intestinais, além de afrodisíaco, anti-inflamatório, diurético, antirreumático, antidiabético, antifebril, entre outras possibilidades. Variadas partes das plantas são utilizadas para estas finalidades, como galhos, folhas, frutos e partes aéreas, especialmente por meio de infusões.<sup>4,5</sup>

Diversas técnicas podem ser empregadas para a obtenção de substâncias produzidas na natureza, sendo necessário a utilização de métodos apropriados de extração, a fim de se obter extratos e frações ricas em compostos bioativos.<sup>6</sup> A escolha do material vegetal a ser submetido às pesquisas que podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos se dá, muitas vezes, através da associação do conhecimento empírico de comunidades que fazem uso destas plantas medicinais, caracterizando uma abordagem etnofarmacológica.<sup>7</sup>

Levando em consideração o rico valor que *E. uniflora* representa para medicina popular do Brasil e seu potencial bioativo, este capítulo tem o objetivo de reunir estudos reportados na literatura científica do Brasil, a fim de elucidar o potencial de folhas desta planta quanto à atividade antimicrobiana e o perfil químico da mesma.

## 2. PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS DE FOLHAS *Eugenia uniflora* L.

Conhecida popularmente como pitangueira, *Eugenia uniflora* L. é uma espécie nativa do Brasil. Trata-se de um arbusto denso que normalmente apresenta de dois a quatro metros de altura. As folhas são opostas, simples, com pecíolo curto de mais ou menos 2,0 mm, e quando

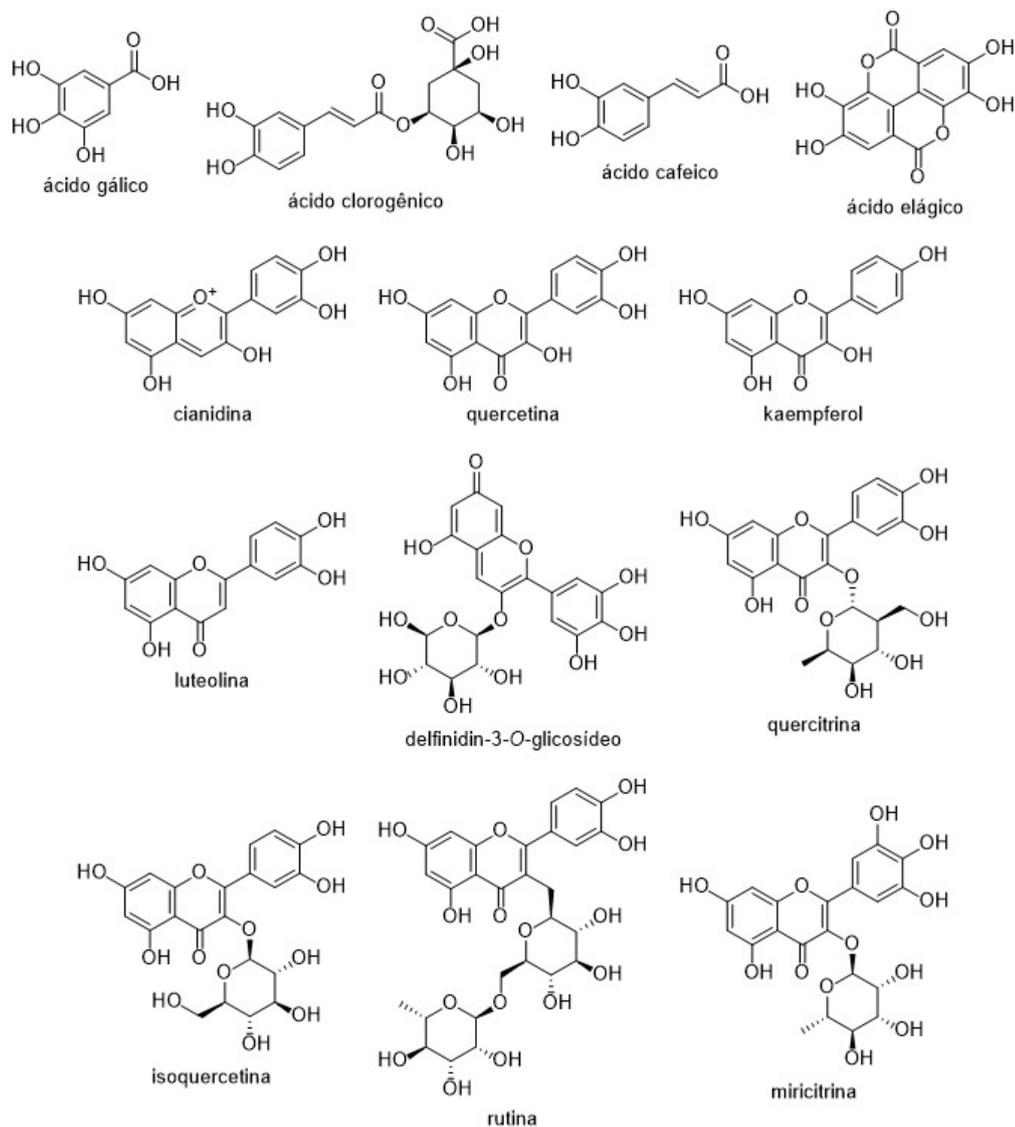
maceradas exalam um odor característico. Sua fenologia é fortemente influenciada pelas condições climáticas e por este motivo as épocas de floração e frutificação, podem variar.<sup>8</sup>

Além disso, diversos estudos estão sendo realizados a fim de elucidar seu potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico, antidiabético<sup>9,10</sup>, hepatoprotetor<sup>11</sup>, neuroprotetor<sup>12</sup>, antiparasitário<sup>13</sup>, dentre outras diversas atividades. Assim como, análises do perfil químico de seus extratos etanólicos e suas respectivas frações.<sup>9</sup>

A literatura científica reporta publicações relacionadas às análises fitoquímicas das substâncias isoladas das folhas de *E. uniflora*. A mesma espécie vegetal pode apresentar variações nas substâncias químicas encontradas a depender das condições inerentes ao potencial genético, condições edafoclimáticas, como temperatura, altitude, relevo, pluviosidade e outros fatores da região onde a espécie vegetal se encontra.<sup>14-16</sup>

Na análise fitoquímica do extrato metanólico de folhas de *E. uniflora*, coletadas no município de Botucatu, no estado de São Paulo, foi identificado a presença de fenóis, taninos, chalconas, auronas, flavonas, catequinas, flavonoides, saponinas, ácidos fortes fixos, compostos quaternários, esteroides livres e quinonas.<sup>17</sup>

Quando avaliado o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora*, coletadas no estado do Ceará, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foram identificados os ácidos gálico, clorogênico, caféico e elágico, bem como os compostos cianidina, delpinidin-3-O-glucosídeo rutina, quercitrina, isoquercetina, quercetina, kaempferol e luteolina (Figura 1). No mesmo estudo, foi demonstrado ainda que o extrato em questão não é citotóxico nem genotóxico para leucócitos humanos nas concentrações de 1–480 µg.mL<sup>-1</sup>.<sup>18</sup>



**Figura 1.** Compostos químicos presentes em extratos de *E. uniflora* L.

Em extratos obtidos pela técnica de microextração e caracterizados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, foram identificados a presença de 33 compostos em amostras de folhas de *E. uniflora*, coletadas no estado da Bahia, com biótipos de frutos de coloração laranja, vermelho e roxo. Destes, a maioria dos constituintes voláteis pertencem a classe dos hidrocarbonetos sesquiterpenos.<sup>19</sup> Em extrato acetônico de folhas de *E. Uniflora* obtidas no estado de Pernambuco, pela técnica turbo-extração, foram identificados os polifenóis, ácido gálico e miricitrina, através de HPLC.<sup>20</sup>

Quando avaliado a composição química de extrato bruto obtido com acetona, fração aquosa e de acetato de etila de folhas de *E. uniflora* oriundas do estado de Pernambuco, foram identificados através de HPLC, os compostos ácido gálico e ácido elágico e o flavonoide miricitrina (Figura 1).<sup>9</sup> Enquanto no perfil cromatográfico obtido com o extrato acetônico de

folhas de *E. uniflora*, obtidas no estado do Rio Grande do Norte, foram identificados a presença de ácido gálico e miricitrina (Figura 1).<sup>21</sup>

### 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE FOLHAS *Eugenia uniflora* L.

Quando analisado a atividade antimicrobiana do extrato bruto obtido em acetona, frações aquosas e acetato de etila das folhas da pitangueira, foi observado que os mesmos inibiram o crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, com valores de concentração inibitória mínima - CIM variando de 0,313 a 2,500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 1). Esses valores podem estar associados a presença de ácidos fenólicos e flavonoides identificados. O extrato acetônico não apresentou ação frente a MRSA. Os antibióticos cefalotina, gentamicina e vancomicina foram utilizadas como controle positivo com valores de CIM variando de 0,25 a 8,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .<sup>9</sup>

No estudo onde foi avaliado a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* coletadas na Paraíba, frente as bactérias *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus oralis* e *Lactobacillus casei* (Tabela 1), bem como, foi identificada uma redução de sangramentos causados por gengivite, quando comparado ao grupo controle, em ensaios clínicos realizados.<sup>22</sup>

Ao analisar a atividade antibacteriana do extrato metanólico bruto de folhas de *E. uniflora*, frente a cepas *S. aureus* e *Escherichia coli*, os autores observaram valor da CIM de 24,1 e 15,9  $\text{mg.mL}^{-1}$  (Tabela 1), respectivamente, neste estudo não foi utilizado controle positivo. Valores estes podem estar relacionado a presença de compostos fenólicos, flavonoides e terpenos, identificados no estudo em questão.<sup>17</sup>

Em um estudo onde analisaram o extrato etanólico bruto das folhas de *E. uniflora* obtidas em Goiânia - Goiás, inibiu o desenvolvimento das bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus roseus*, *M. luteus*, *Bacillus cereus*, *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* e a cepa Gram-negativa *P. aeruginosa*, com valores de CIM variando de 0,273 a 8,75  $\text{mg.mL}^{-1}$  (Tabela 1).<sup>23</sup>

Ao utilizarem o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* coletadas no Ceará, com potencial antifúngico frente a cepas *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, foi constatado que o mesmo apresentou CIM  $> 1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 1), o que não demonstrou relevância do mesmo como antifúngico, no entanto, foi observado efeito sinérgico quando

houve associação do mesmo com o metronidazol contra a cepa de *C. tropicalis*, reduzindo a CIM desse antifúngico em quatro vezes.<sup>24</sup>

Quando se trata de atividade antifúngica do extrato bruto utilizando o solvente acetona, foi identificada CIM de 0,312 mg.mL<sup>-1</sup> para *C. albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* e de 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> para *C. tropicalis* e *Candida glabrata* (Tabela 1). Foi identificado que o mesmo reduziu de forma significativa a formação de biofilmes em cepas produtoras de biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis*, na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Esses resultados foram associados a presença de ácido gálico e miricitrina no extrato.<sup>21</sup>

No estudo no qual foi avaliado a atividade antifúngica de extratos aquoso e acetônico de *E. uniflora*, foi identificada atividade significativa frente a *Candida* spp., com valores de CIM<sup>90</sup> variando de 1,25 a 5 mg.mL<sup>-1</sup>, para ambos os extratos (Tabela 1), esta atividade pode estar associada a presença de flavonoides e taninos presentes nos extratos.<sup>20</sup>

Pode-se classificar bactérias de acordo com potencial antimicrobiano em relação a CIM, como forte para CIM igual ou menor que 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, moderado de 0,6 a 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> e fraco quando for igual ou maior que 1,6 mg.mL<sup>-1</sup>.<sup>25</sup> Desta maneira pode-se observar que relatos de extratos acetônicos mostraram forte atividade com CIM inferiores a 0,5 (Tabela 1) para bactérias *S. epidermidis*<sup>9</sup> e fungos do gênero *Candida* spp.<sup>21</sup>

Alguns trabalhos relatam atividade moderada (Tabela 1) como os extratos acetônicos para bactérias *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*<sup>9</sup> e fungos *Candida* spp.<sup>20,21</sup> Os extratos, aquoso e etanólico, também mostraram atividade moderada para cepas do gênero *Candida* spp.<sup>20,24</sup>

Estes resultados que demonstram que o potencial antimicrobiano classificado de forte a moderado, para extratos de diferentes solventes para folhas de *E. uniflora*, foram associados a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, sendo estes os principais compostos identificados.<sup>9, 20, 21</sup>

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Eugenia uniflora* L. para diferentes microrganismos .

Extratos/Fração	Microrganismos	Teste de difusão (mm)	CIM (mg.mL <sup>-1</sup> )	Referências
Extrato acetônico	<i>E. faecalis</i>		1,25	(9)
	<i>P. aeruginosa</i>		1,25	
	<i>S. aureus</i>		1,25	
	<i>S. epidermidis</i>		0,31	
Fração acetato de etila	<i>E. faecalis</i>		2,50	(9)
	<i>P. aeruginosa</i>		2,50	
	<i>S. aureus</i>		2,50	
	<i>S. aureus</i> (MRSA)		2,50	
	<i>S. epidermidis</i>		0,62	
Fração aquosa	<i>E. faecalis</i>		2,50	(9)
	<i>P. aeruginosa</i>		1,87	
	<i>S. aureus</i>		2,50	
	<i>S. aureus</i> (MRSA)		2,50	
Extrato acetônico	<i>Candida albicans</i>		0,31	(21)
	<i>C. dubliniensis</i>		0,31	
	<i>C. parapsilosis</i>		0,62	
	<i>C. tropicalis</i>		0,62	
	<i>C. glabrata</i>		0,31	
	<i>C. albicans</i>		0,31	
Extrato aquoso	<i>C. albicans</i>		1,25	(20)
	<i>Candida spp.</i>		5,00	
Extrato acetônico	<i>C. albicans</i>		5,00	(20)
	<i>Candida spp</i>		1,25	
Extrato etanólico	<i>B. subtilis</i>	15	2,18	(23)
	<i>Escherichia coli</i>	14	17,5	
	<i>P. aeruginosa</i>	25	4,37	
	<i>S. aureus</i>	25	8,75	
	<i>S. aureus</i>	25	8,75	
Extrato etanólico	<i>Streptococcus mutans</i>	14		(22)
	<i>S. oralis</i>	23		
	<i>S. oralis</i>	26		
	<i>Lactobacillus casei</i>			
Extrato etanólico	<i>C. albicans</i>		1,02	(14)
	<i>C. krusei</i>		1,02	
	<i>C. tropicalis</i>		1,02	
Extrato metanólico	<i>E. coli</i>		15,9	(17)
	<i>S. aureus</i>		24,1	

CIM – Concentração Inibitória Mínima

#### 4. CONCLUSÃO

Estudos realizados nos estados da Bahia, Ceará, Goiás, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e São Paulo, utilizando folhas de *Eugenia uniflora* L., relatam a presença de compostos de classes distintas, especialmente os flavonoides e ácidos fenólicos, obtidos de extratos e frações da mesma, que também demonstraram atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas, gram-negativa e fungos, reafirmando seu potencial bioativo e consequentemente corroborando para que novas pesquisas sejam realizadas e possam elucidar o potencial desta planta como antimicrobiana, especialmente com o uso de técnicas como de fracionamento bioguiado para isolamento de compostos bioativos.

#### 5. REFERÊNCIAS

1. Chowdaiah, M.; Sharma, P.; Dhamodhar, P. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 25, 1581-1593, **2019**, doi: 10.1007/s10989-018-09801-3.
2. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Journal of Natural Products, **2020**, 83, 770-803, doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
3. Magalhães, K. do N.; Bandeira, M. A. M.; Monteiro, M. P.; Plantas medicinais da caatinga do nordeste brasileiro [livro eletrônico]: etnofarmacopeia do Professor Francisco José de Abreu Matos, 1<sup>th</sup> Ed., Fortaleza: Imprensa Universitária, **2020**.
4. De Souza, A. M. *et al.* Planta Medica. **2018**, 84, 1232-1248, doi:10.1055/a-0656-7262.
5. Fidelis, E. M. *et al.* Arabian Journal of Chemistry, **2022**, 15, 103691, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.103691.
6. Sasidharan, S.; Chen, Y.; Saravanan, D.; Sundram, K. M.; Latha, Y. L. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, **2011**, 8, 1-10.
7. Brusotti, G.; Cesari, I.; Dentamaro, A.; Caccialanza, G.; Massolini G. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2014**, 87, 218-28, doi: 10.1016/j.jpba.2013.03.007.
8. <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/340821>, acessada em janeiro 2023.
9. Falcão, T. R. *et al.* BMC Complementary and Alternative Medicine, **2018**, 18, 1-12, [doi: 10.1186/s12906-018-2144-6](https://doi.org/10.1186/s12906-018-2144-6).
10. Sobeh, M. *et al.* Journal of Ethnopharmacology. **2019**, 10, doi: 10.1016/j.jep.2019.111939.
11. Sobeh, M. *et al.* Pharmaceuticals, **2020**, 3, 84, doi: 10.3390/ph13050084.
12. Flores, N. P. *et al.* Journal of Food Biochemistry, **2020**, 44, 13442, doi: 10.1111/jfbc.13442
13. Abdelfattah, M. A. *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy, **2021**, 138, 111508, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111508.

14. Santos, D. N., Souza, L. L., Ferreira, N. J., Oliveira, A. L. *Food and Bioproducts Processing*, **2016**, 94, 365-374, doi: 10.1016/j.fbp.2014.04.005.
15. Yang, L. *et al.* *Molecules*, **2018**, 23, 762, doi: 10.3390/molecules23040762.
16. Yeshi, K.; Crayn, D.; Ritmejerytė, E.; Wangchuk, P. *Molecules*, **2020**, 27, 313, doi: 10.3390/molecules27010313
17. Silva, N. C. C.; Barbosa, L.; Seito, L. N.; Fernandes Junior, A. *Natural Product Research*, **2012**, 26, 1510-1514, doi: 10.1080/14786419.2011.564582.
18. Da Cunha, F. A. B. *et al.* *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2016**, 84, 614-621, doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.089.
19. Mesquita, P. R. *et al.*, 2017. *Microchemical Journal*, **2017**, 130, 79-87, doi: [10.1016/j.microc.2016.08.005](https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.08.005)
20. Ferreira, M. R. A. *et al.* *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2020**, 56, e18456, doi: 10.1590/s2175-97902020000118456.
21. Souza, L. B. F. C. *et al.* *Molecules*, **2018**, 23, 1-20, doi: 10.3390/molecules23102418.
22. Jovito, V. C.; Freires, I. A.; Holanda, D. A.; Queiroz, F. M.; Castro, P. R. D. *Brazilian Dental Journal*, **2016**, 27, 87-392, doi: 10.1590/0103-6440201600769.
23. Fiuza, T. S.; Sabóia-Morais, S. M. T.; Paula, J. R.; Tresvenzol, L. M. F.; Pimenta, F. C. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **2008**, 29, 245-250.
24. Santos, K. K. *et al.* *Journal of Medicinal Food*, **2013**, 16, 669-71, doi: 10.1089/jmf.2012.0245.
25. Puton, B. M. S. *et al.* *PERSPECTIVA, Erechim*, **2018**, 42, 159, 109-11.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos etanólico e frações aquosas de aroeira e pitangueira possuem maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, quando comparado a fração hexânica e clorofórmica.

Para a maioria das cepas Gram-positivas e Gram-negativas testadas, aroeira mostra atividade moderada, algumas destas também apresentaram atividade bactericida e potencial antibiofilme frente a bactéria *Enterococcus faecalis*, destacando um possível potencial para sua atuação como antimicrobiano de amplo espectro.

Por sua vez, os extratos e frações de *E. uniflora*, apesar de apresentar menor potencial de inibição pelo teste CIM quando comparado com a *S. terebinthifolius*, ainda mostra potencial biológico, o que pode fomentar novas pesquisas. Foi identificado potencial antibiofilme para o extrato etanólico e fração aquosa de *E. uniflora* frente a *Listeria monocytogenes*.

O extrato etanólico e a fração aquosa das folhas de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora* apresentam elevado potencial antioxidante, quando analisados pelos métodos de sequestro dos radicais ABTS e DPPH. A atividade antioxidante é maior na fração aquosa do que no extrato etanólico, para aroeira, tanto pelo ABTS como DPPH, e para pitangueira, apenas no DPPH.

A eliminação do ABTS e do DPPH, nas diferentes concentrações do extrato etanólico e da fração aquosa, obtida das folhas de *S. terebinthifolius* e *E. uniflora*, e as equivalências ao trolox e ao ácido ascórbico, respectivamente, correlacionam-se significativa e positivamente.

Junto a estes dados, análises de atividade citotóxica estão sendo realizadas e servirão para elucidar se os extratos são capazes de causar danos celular, a fim de complementar os estudos sobre aplicação destes nas atividades biológicas citadas anteriormente.

O que demonstra que ambas as plantas podem servir como matérias-primas para indústria farmacêutica, uma vez que possuem compostos bioativo com atividade biológica como antimicrobiano e/ou antioxidante, bem como, justifica o vasto uso popular das mesmas.