

UNIVERSIDADE VILA VELHA-ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *Psidium Myrtoides* (O. Berg)**

MATHEUS CAMPOS DOS SANTOS

VILA VELHA
FEVEREIRO/2022

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *Psidium Myrtoides* (O. Berg)**

Dissertação apresentada à Universidade de Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

MATHEUS CAMPOS DOS SANTOS

VILA VELHA
FEVEREIRO/2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S237e Santos, Matheus dos.
Composição e atividade biológica de extratos de folhas de
Psidium myrtoides (O. Berg) / Matheus dos Santos . – 2022.
84 f. : il.

Orientador: Rodrigo Scherer.
Dissertação (Biotecnologia vegetal) – Universidade Vila
Velha 2022.
Inclui bibliografias.

1. Biotecnologia vegetal. 2. Biodiversidade. 3. Plantas
I. Scherer, Rodrigo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

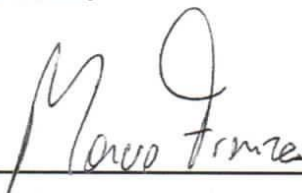
CDD 660.603

MATHEUS CAMPOS DOS SANTOS

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Psidium myrtoides* (O. Berg).

Dissertação apresentada à Universidade de Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022.



Prof. Dr. Márcio Fronza (UVV)



Prof^a. Dr^a. Mayara Fumiére Lemos (MULTIVIX)



Prof. Dr. Rodrigo Scherer (UVV)

Orientador

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Marli Campos, como mãe solteira fez seu papel brilhantemente na criação de seus filhos.

A minha irmã, Esther Campos, que me sempre me apoiou e ainda nos presenteou com o Joca, meu sobrinho, amo vocês.

A toda minha família, que hoje me vê como referência nos estudos.

À Luiza, minha companheira, parceira, geóloga e atleta de altinha nas horas vagas. Você é muito importante pra mim, te amo.

Aos meus sogros que sempre me apoiaram e falam para todo mundo que sou cientista, rs.

Ao LABCROM, vocês são minha família. Estiveram comigo durante esse processo de formação profissional e pessoal. Arthur, Camile, Karla, Leandra, Mayara, Thiago, Lian, Júlia, Henri. Vocês são feras.

Ao PPGBV, fiz amigos que vou levar pra vida.

Aos laboratórios de MICRO, tanto do biopráticas como da veterinária.

Aos laboratórios de PN e cultura de células.

Ao meu orientador, Rodrigo Scherer, que me guiou e acreditou no meu potencial durante esses dois anos e meio.

A FAPES pelo apoio financeiro e a UVV pela infraestrutura e corpo docente.

E por fim, a mim mesmo, por ter conseguido encerrar mais esse ciclo.

“Definitivamente não somos iguais, e é maravilhoso saber que cada um de nós que está aqui é diferente do outro, como constelações...” (Krenak, 2020, p. 33).

RESUMO

DOS SANTOS, Matheus Campos. M.sc, Universidade Vila Velha-ES, fevereiro de 2022. **Composição e atividade biológica de extratos de folhas de *Psidium myrtoides* (O. Berg)**. Orientador: Doutor Rodrigo Scherer.

A bioprospecção de substâncias bioativas a partir da biodiversidade brasileira é necessária para a descoberta de novos fármacos e valorização das espécies nativas. O objetivo do presente trabalho foi produzir extratos brutos e suas frações a partir das folhas de *P. myrtoides*, nos quais investigou-se a composição química por HPLC-UV, quantificação de flavonoides totais, o potencial antioxidante, antibacteriano, antifúngico, e sinérgico com antibiótico e antifúngicos. Uma hidrólise ácida foi realizada nos extratos para a quantificação de flavonoides em equivalentes de quercetina, nos quais apresentaram as maiores concentrações os extratos Acetato de etila (62mg/g) e Etanol 80% (11mg/g). Esses dois extratos apresentaram maiores concentrações de flavonoides totais e atividade antioxidante. Quanto a atividade antibacteriana, o extrato hexânico obteve melhor ação da concentração inibitória mínima (CIM) para *E. faecium* (64µg/mL) e *S. aureus* (32 µg/mL), além de ter sido letal a *S. epidermidis* em 256 µg/mL. Para os fungos, todos os extratos tiveram forte ação da CIM contra cepas de *Candida spp.* por terem inibido o crescimento dos microrganismos em concentrações menores que 100 µg/mL (Cos et.al, 2012). O Etanol 80% teve CIM frente as leveduras nos valores inferiores a 16 µg/mL. No método Checkboard, a interação extrato Hexânico/Tetraciclina em bactérias demonstrou a redução da CIM do antibiótico em 9x para *S. epidermidis*. Para os fungos, a interação do extrato Acetato de etila/Fluconazol apresentou redução de 7x e 6x da CIM do fluconazol para *C. glabrata* e *T. rubrum*. Enquanto a combinação Acetato de Etila/Anfotericina B apresentou melhor ação sinérgica frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. rubrum*, e o valor da CIM para a anfotericina B diminuiu em 4, 7, 3 e 3 vezes para as cepas. Os resultados apresentados fornecem evidências para investigar mecanismos de ação e o potencial terapêutico para os extratos Acetato de etila e Etanol 80% *in vivo*. Por fim, a combinação extrato/antibiótico-antifúngico pode ser uma alternativa terapêutica a infecções bacterianas e fúngicas, no intuito de diminuir a resistência dos microrganismos, além de efeitos hepato e nefrotóxicos causados pela anfotericina B.

Palavras-chave: *Psidium myrtoides*, Sinergismo, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*.

ABSTRACT

DOS SANTOS, Matheus Campos. M.sc, Vila Velha University — ES, fevereiro of 2022. **Composition and biological activity of extracts of leaves of *Psidium myrtoides* (O. Berg)**. Orientador: Advisor: PhD Rodrigo Scherer.

The bioprospecting of bioactive substances from the Brazilian biodiversity is necessary for the discovery of new drugs and the valorization of native species. The present work produced six extracts from the leaves of *P. myrtoides*, investigated the chemical composition by HPLC-UV and tested in vitro the quantification of total flavonoids, the antioxidant, antibacterial, antifungal, and synergistic potential with antibiotics and antifungals. An acid hydrolysis was performed on the extracts for quantification in quercetin equivalents, in which the extracts of Ethyl Acetate (62mg/g) and Ethanol 80% (11mg/g) had the highest concentrations. These two extracts showed higher concentrations of total flavonoids and antioxidant activity. As for the antibacterial activity, the hexane extract obtained the best action of the minimum inhibitory concentration (MIC) for *E. faecium* (64µg/mL) and *S. aureus* (32 µg/mL), in addition to being lethal to *S. epidermidis* at 256 µg /ml For fungi, all extracts had strong MIC action against *Candida* spp. because they inhibited the growth of microorganisms at concentrations lower than 100 µg/mL (Cos et.al, 2012). Ethanol 80% had MIC against yeasts at values lower than 16 µg/mL. In the Checkboard method, the Hexanic extract/Tetracycline interaction in bacteria demonstrated a 9x reduction in the MIC of the antibiotic for *S. epidermidis*. For fungi, the interaction of Ethyl Acetate/Fluconazole extract showed a 7x and 6x reduction in the MIC of fluconazole for *C. glabrata* and *T. rubrum*. While the Ethyl Acetate/Amphotericin B combination showed better synergistic action against *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *T. rubrum*, and the MIC value for amphotericin B decreased by 4, 7, 3 and 3x for the strains. The presented results provide evidence to investigate mechanisms of action and the therapeutic potential for the extracts of Ethyl Acetate and Ethanol 80% in vivo. Finally, the extract/antibiotic-antifungal combination may be a therapeutic alternative to bacterial and fungal infections, in order to reduce the resistance of microorganisms, in addition to the hepatotoxic and nephrotoxic effects caused by amphotericin B.

Keywords: *Psidium myrtoides*, Synergism, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *T. rubrum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos da espécie <i>P. myrtoides</i>	27
Figura 2 – Distribuição de <i>P. myrtoides</i> nas regiões do Brasil.....	28
Figura 3 – Fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários.....	30
Figura 4 – Mapa de localização e coleta da amostra, folhas de <i>P. myrtoides</i>	41
Figura 5 – Processo de extração dos extratos brutos e suas frações em diferentes solventes.....	42
Figura 6 – Cromatograma do ETOH depois da Hidrólise ácida.....	50
Figura 7 – Cromatograma do ETOH depois da Hidrólise ácida.....	50
Figura 8 – Cromatograma do ACET depois da Hidrólise ácida.....	51
Figura 9 – Cromatograma do ACET depois da Hidrólise ácida.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AQS – Extrato aquoso as folhas de *P. myrtoides* O.Berg.
- ACET – Extrato fracionado Acetato de Etila das folhas de *P. myrtoides* O.Berg.
- C. albicans 102* – *Candida albicans 102*
- C. albicans 146* – *Candida albicans 146*
- C. glabrata* – *Candida glabrata*
- C. parapsilosis* – *Candida parapsilosis*
- C. tropicalis* – *Candida tropicalis*
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CBM – Concentração Bactericida Mínima
- CFM – Concentração Fungicida Mínima
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
- EQA – Equivalentes de quercetina
- DIC – Extrato fracionado diclorometano das folhas de *P. myrtoides* O.Berg.
- DMSO – Dimetilsufóxido
- ETOH – Extrato Bruto etanol 80% das folhas de *P. myrtoides* O.Berg.
- HEX – Extrato Bruto hexânico das folhas de *P. myrtoides* O.Berg.
- N-BUT – Extrato fracionado n-butanol das folhas de *P. myrtoides* O.Berg.
- HA – Hidrólise Ácida
- E. coli* – *Escherichia coli*
- E. faecium* – *Enterococcus faecium*
- S. aureus* – *Staphylococcus aureus*
- S. epidermidis* – *Staphylococcus epidermidis*
- T. rubrum* – *Trichophyton rubrum*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO GERAL.....	18
2.1 OBEJTIVOS ESPECÍFICOS	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 MATA ATLÂNTICA.....	19
3. 2 PLANTAS MEDICINAS: SUA IMPORTÂNCIA NA SOCIEDADE	20
3.3 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL	22
3.4 MYRTACEAE	24
3.4.1 O gênero <i>Psidium</i> spp.....	25
3.4.2 <i>Psidium Myrtoides</i> (O. Berg)	26
3.5 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS	28
3.6 METABOLISMO DAS PLANTAS E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS.....	29
3.6.1 Terpenos	30
3.6.2 Alcaloides	31
3.6.3 Compostos Fenólicos	31
3.7 RADICAIS LIVRES.....	32
3.8 BACTÉRIAS E RESISTÊNCIA.....	33
3.8.1 Classe de antibacterianos	35
3.9 FUNGOS E RESISTÊNCIA	36
3.9.1 Classes de antifúngicos.....	37
3.10 MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS.....	39
3.11 SINERGISMO ENTRE SUBSTÂNCIAS NATURAIS, ANTIBIÓTICOS E ANTIFÚNGICOS.....	40
4. METODOLOGIA	40
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.1 Coleta da amostra vegetal.....	40
4.1.2 Extratos e fracionamento.....	41
4.3 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-UV	43
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	44
4.4.1 Ensaio DPPH	44
4.4.2 Ensaio ABTS	44
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	45

4.5.1	Microrganismos	45
4.5.2	Concentração inibitória mínima	45
4.5.3	Concentração bactericida e fungicida mínima	46
4.6	DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE SINÉRGICA (CHECKBOARD) ...	47
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5.	RESULTADOS	48
5.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	48
5.2	AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	49
5.3	FLAVONÓIDES TOTAIS	51
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
5.5	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	52
5.5.1	Concentração inibitória mínima (CIM) E bactericida mínima (CBM)	52
5.6	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	53
5.6.1	Concentração inibitória mínima (CIM) E Fungicida mínima (CFM)	53
5.7	ENSAIO CHECKBOARD	54
5.7.1	Bactérias	54
5.7.2	Fungos	55
6.	DISCUSSÃO	58
6.1	RENDIMENTO	58
6.2	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	59
6.3	FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTES	60
6.4	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	61
6.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	62
6.6	SINERGISMO	63
6.6.1	Extratos e Tetraciclina	63
6.6.2	Extratos e Fluconazol	64
6.6.3	Extratos e Anfotericina B	65
7.	CONCLUSÃO	67
8.	REFERÊNCIAS	67
9.	ANEXOS	81

1. INTRODUÇÃO

Extratos de plantas nativas do Brasil possuem uma composição química complexa que apresentam potencial para diversas atividades biológicas. Essas substâncias secundárias são produzidas a partir do metabolismo secundário vegetal, que confere vantagens adaptativas e reprodução no intuito de garantir sua permanência no meio ambiente (Simões et al., 2017). Os compostos são extraídos de órgãos vegetais de acordo com sua polaridade, solventes orgânicos e metodologia utilizada (Lukitanshing et al., 2020), sendo classificados em fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas dentre outras. As substâncias bioativas extraídas são importantes pelo seu potencial medicinal e terapêutico (Martins; Petropoulos; Ferreira, 2016).

A medicina popular é amplamente utilizada no mundo. Estima-se que 80% da população mundial faz uso de alguma planta medicinal nas suas inúmeras formas de preparo (Mehta et al., 2015) O uso da medicina ancestral e empírica ocorre principalmente em países subdesenvolvidos, por não terem acesso a medicamentos alopatícos e atendimentos primários de saúde. Realizar pesquisas científicas sobre esse conhecimento popular é importante para confirmar o potencial terapêutico de plantas consumidas medicinalmente. É necessário realizar a bioprospecção de novas moléculas químicas que possam ser uma alternativa ou até mesmo serem usadas junto com as drogas sintéticas já estabelecidas no mercado, no intuito de reduzir a toxicidade e a resistência pelos microrganismos.

Drogas sintéticas são cada vez mais estudadas além de produzidas para tratar diversas patologias humanas. Dentre elas, se destacam os antibióticos e antifúngicos, substâncias utilizadas para tratar infecções causadas por bactérias e fungos. Porém, o uso indiscriminado desses medicamentos, associado ao mecanismo de defesa, tem gerado resistência nesses microrganismos, dificultando os tratamentos convencionais (Araujo, 2005; Lee Ventola, 2015; Who, 2018).

A resistência microbiana é considerada um problema de saúde pública, uma vez que esses microrganismos têm gerado novas cepas difíceis de serem tratadas. Dessa forma, é necessária a busca por novas substâncias que sejam eficazes sobre esses microrganismos, assim como a associação com drogas convencionais no intuito de reduzir a toxicidade de drogas sintéticas e a resistência antimicrobiana.

2. OBJETIVO GERAL

Extrair, caracterizar e avaliar o potencial dos extratos de *P. myrtoides* frente à atividade antioxidante e antimicrobiana. Além de observar a atividade sinérgica dos extratos combinados a antibióticos e antifúngicos convencionais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos brutos e frações das folhas de *P. myrtoides* O. Berg.;
- Caracterizar do perfil químico dos extratos e suas frações por HPLC;
- Avaliar a atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antibacteriana;
- Avaliar a atividade antifúngica;
- Avaliar a atividade sinérgica.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica é a formação florestal mais antiga do Brasil, estabelecida a cerca de 70.000.000 anos (Filho, 1987). Por se tratar de um bioma caracterizado pela alta diversidade e elevado nível de endemismo (Fonseca 1985), e que vem sofrendo intensa degradação, a Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais ameaçados do mundo (MYERS et al. 2000). Sua vegetação inclui Floresta Ombrófila Densa Atlântica, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encaves florestais do Nordeste (MMA, 2020). Localizada ao longo da costa brasileira de norte a sul, a Mata Atlântica também penetrava no interior do país, cobrindo a totalidade dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, além de partes dos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul.

Historicamente, a Mata Atlântica foi à primeira floresta a ser colonizada no Brasil. Como o processo de colonização e ocupação do território brasileiro se desenvolveu a partir das regiões próximas do litoral, o bioma vem experimentando séculos de contínuo desflorestamento. Desde então, seguiram-se vários ciclos econômicos em seu domínio. O resultado desses ciclos foi à supressão quase total de sua cobertura original que resultou nos remanescentes florestais existentes. Este bioma foi destacado por Prance, (1981) como a floresta tropical em estado mais crítico de degradação no mundo. De uma área original distribuída ao longo de 17 estados brasileiros, a Floresta Atlântica abrange cerca de 15% do território nacional, sendo o lar de 72% da população brasileira. Além disso, concentra-se 80% do PIB nacional (IBGE, 2014; “Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica”, 2021)

Considerando os novos estudos, esses remanescentes florestais totalizam aproximadamente 12,4% da floresta original e abrangem cerca de 15.700 espécies de plantas, das quais oito mil são endêmicas (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2021). O alto número de espécies endêmicas, juntamente com a perda acelerada de habitat, coloca esse bioma entre os 35 hotspots de biodiversidade do mundo (Myers et al., 2000; Mittermeier et al. 2005).

O Espírito Santo destacou-se como um dos estados brasileiros com menor taxa de desmatamento, onde sua área atual compreende 12,6% (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2021). De acordo com o Brazil Flora Group (BFG - The Group Brazil, 2015) a diversidade de angiospermas estimada para o Espírito Santo compreende cerca de 16,5% da riqueza total de espécies no Brasil, com um número estimado de 32.109 táxons. Após a revisão da lista de angiospermas do Espírito Santo, estima-se um total de 6.204 espécies nativas, representando um aumento de 16% na riqueza de espécies registrada para o Estado. O Espírito Santo abriga 32% das espécies nativas da Floresta Atlântica e apresenta 516 espécies endêmicas (8.3% do total registrado para o Estado)(Dutra; Alves-Araújo; Carrijo, 2015).

O Brasil é detentor da maior diversidade genética do mundo (Melo Carneiro et al., 2014), com cerca de 49.979 espécies da flora reconhecidas (Reflora, 2020). Entretanto, estudos com plantas medicinais têm aumentado apenas 8% anualmente (Fonseca, 2012), o que representa o desconhecimento de possíveis recursos medicinais para a saúde. Visto isso, o território brasileiro apresenta grande potencial para produção de novos fármacos a partir de plantas, entretanto, é necessário o incentivo em pesquisa e desenvolvimento.

3. 2 PLANTAS MEDICINAS: SUA IMPORTÂNCIA NA SOCIEDADE

O histórico do uso de plantas medicinais é uma estratégia terapêutica utilizada pela humanidade para tratar patologias (Alves et al., 2010; Viegas Jr; Bolzani; Barreiro, 2006). Essa técnica empregada é antiga, comprovada a partir de registros de longa data (Tyler, 1996; Ko, 1999; Zank; Peroni; De Araújo, 2015) além de ser utilizada até os dias atuais, baseando-se principalmente na experimentação e propagação de saberes empíricos por gerações (Silva; Nascimento, 2006).

Os primeiros indícios de plantas medicinais são datados de 1500 a.C, no Egito, pela obra "*Ebers papyrus*", um manuscrito com cerca de 700 drogas incluindo plantas, animais, minerais, prescrição e forma de uso para o tratamento de doenças. Dentre as espécies vegetais são mencionadas para fins terapêuticos a maconha (*Cannabis Sativa* L.), Babosa (*Aloe vera*), incenso (*Boswellia serrata*) e o ópio (*Papaver somniferum*) (Newman; Cragg; Snader, 2000; Cristina; Duarte, 2006; Histórico et al., 2011).

Em contrapartida, outros autores acreditam que os primeiros fitoterápicos foram registrados por volta de 3.000 anos a.C na obra de Pen Ts'ao do chinês Shen

Nung, com a descrição de 365 plantas medicinais que serviu de base durante 14 séculos (Tyler, 1996; Anestesiologia, 2002) A efedra é uma das espécies citadas no documento, a qual é rica em alcaloides derivados da fenilalanina e possui ação antiasmática, sendo utilizada até os dias atuais (Boff et al., 2008).

Na idade média, os principais prescritos são de "De Re Medica" de John Mesue (850 DC), "Canon Medicinae" de Avicenna (980-1037) e "Liber Magnae Collectionis Simplicum Alimentorum Et Medicamentorum" de Ibn Baitar (1197 - 1248). Juntas, essas obras compreendem cerca de 1.000 espécies vegetais catalogadas (Petrovks, 2012; Rocha et al, 2015).

Até então, todas as construções relativas às práticas terapêuticas, baseavam-se na observação, experimentação e o contato com a natureza (Beardsell et al., 2017; Henrique; Luis; Maria, 2021). Adiante, com o desenvolvimento do método científico racional, o uso dessas plantas torna-se cada vez mais sofisticado (BEARDSELL et al., 2017). O início do processo de extração de substâncias ativas a partir de indivíduos vegetais é marcado com o isolamento da Morfina da *Papaver somniferum* em 1803 (Booth, 1998; Especial, 2005) seguido da quinidina em 1820 (Pelletier, & Caventou, 1820; Oliveira; Albuquerque; Stern, 2009).

Enquanto a sociedade seguia se modernizando, o crescimento da indústria farmacêutica induziu o aumento do uso fármacos sintéticos, os quais substituem os compostos de origem vegetal por falta de comprovações científicas quanto a sua eficácia e dificuldade do controle físico-químico.

Por volta da década de 1950, inicia-se uma tendência de isolar princípios ativos (Brasil, 2005). Com os avanços técnicos e científicos, o desenvolvimento de novos métodos de isolamento dos compostos naturais aperfeiçoou a identificação dessas substâncias presentes em extratos e óleos voláteis, o que viabilizou novamente a sua exploração (Silva; Nascimento, 2006). Já no final da década de 70, a OMS desenvolve o Programa de Medicina Tradicional, que elaborou políticas da área da medicina popular e alternativa, incluindo a fitoterapia (Brasil, 2006). O mesmo órgão, em 1978, passa a reconhecer o uso dos fitoterápicos com finalidade profilática, curativa e paliativa (Gonçalves et al, 2013). Desde então, políticas publicas para o uso racional de terapias alternativas e coadjuvantes são criadas pela OMS para serem incluídas nos sistemas de saúde pública juntamente com estudos científicos (Brasil, 2006).

Com o avanço da ciência e a promoção da eficácia, qualidade e segurança dos fitoterápicos, ocorre uma expansão do mercado de medicamentos a base de plantas medicinais. Estima-se que o mercado de remédios a base de plantas em 1996 chegou a arrecadar 14 milhões de dólares no mundo.

A partir dos anos 2000, a fitoterapia já crescia em diversos países, aliada a medicina alopática (Matsuda, 2002). Estima-se que 50% dos medicamentos aprovados até 2006 eram a partir de substâncias naturais (Newman & Cragg, 2007; Mehta et al., 2015).

3.3 USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

O conhecimento do uso de plantas medicinais no Brasil é marcado pela sabedoria indígena, por serem os povos originários que habitavam o território antes da colonização (Vaz et al., 2002; Walker, 2013). Durante a chegada de povos imigrantes, o conhecimento indígena foi documentado e exportado para diversos países. Por exemplo, Bertomi foi um botânico do século XIX que registrou o vasto conhecimento sobre plantas medicinais pela tribo Guarani. Nesse contexto, houve grande influência da cultura europeia e africana no país, o que resulta em obras como “*Systema Materiae Medicae Vegetabilis Brasiliensis*”, a qual descreve mais de 470 espécies (Mello, 1980).

Junto aos colonizadores, os jesuítas também registraram o conhecimento sobre as espécies de plantas medicinais, suas indicações e forma de uso, e produziram uma farmacopeia brasileira (Calainho, 2005; Walker, 2013). A evolução da literatura sobre a flora brasileira contribuiu para a comercialização de fitoterápicos em várias regiões do país, os quais passaram a serem os fármacos mais utilizados pelo Império português (Walker, 2013). Por exemplo, a água febrífuga, feita a partir de uma espécie nativa da Amazônia, foi amplamente utilizada pelos portugueses (Pereira, 1996).

A comprovação científica de tecnologias ancestrais, junto à popularização dos fitoterápicos, foi importante para as comunidades de baixa renda visto que o acesso médico-hospitalar era restrito, mesmo com o avanço da medicina alopática na metade do século XX (Veiga-Junior; Pinto; Maciel, 2005; Henrique; Luis; Maria, 2021). Posteriormente, em função da expansão da Indústria farmacêutica, há o crescimento do uso de medicamentos alopáticos, e somente a partir da metade da década de 1970 ocorre uma nova ascensão das medicinas alternativas, vistas como uma opção mais

natural para o tratamento de doenças (Sheldon, 1997; Batista & Valença, 2012; Bruning, 2012;)

No Brasil, a politização e a democratização do acesso à saúde proporcionada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), criado em 1988, foi um importante marco para o avanço do uso de plantas medicinais. Foi previsto por meio de resolução, a implantação da fitoterapia nos serviços de saúde, e mais tarde a instância máxima de deliberação de políticas de saúde (Conferência Nacional de Saúde) recomendou a introdução da fitoterapia no SUS (Brasil, 1998; Brasil, 2006a; Brasil, 2006b).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária elabora normas de regulamentação desde 1995, com a portaria nº6, e estabelece que indústrias farmacêuticas devam apresentar dados de eficácia e segurança dos medicamentos. Posteriormente, houve atualizações da regulamentação, como a RDC nº17 de 2000, e a RDC nº18 de 2004, as quais se encontram em vigor (Silva; Nascimento, 2006). A Agência define fitoterápicos como medicamentos provenientes da matriz vegetais ativas, cuja sua eficácia e segurança são referenciadas por evidências científicas. Esses medicamentos devem garantir a qualidade, eficácia, composição padronizada e segurança de uso para a população (ANVISA, 2021).

O Ministério da Saúde, a fim de garantir prevenção, tratamento e recuperação da saúde desenvolveu em 2006 o Plano Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico (Brasil, 2011a) e Práticas Integrativas e Complementares (PICS), oferecendo aos usuários do SUS uma atenção primária a saúde a partir da fitoterapia (Mattos, 2018; Ferreira; Meneghim; Checchi, 2020; Henrique; Luis; Maria, 2021). Essas diretrizes regulamentam o uso racional das plantas medicinais, além do fortalecimento da agricultura familiar, o uso sustentável dos recursos naturais e por fim, incentivar o desenvolvimento científico e inovação (Ministério Da Saúde, 2006; Brasil, 2006; Borges; Sales, 2018)

Com objetivo de subsidiar mais pesquisas sobre essa temática, o Ministério da Saúde aprovou a Relação Nacional de Plantas Medicinais e Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), uma lista com 71 espécies vegetais que foram selecionadas por técnicos e pesquisadores da área de plantas medicinais e fitoterápicos representando as diversas regiões brasileiras (Brasil, 2015a). Esse documento serviu de base para um novo documento, o RENAME – Relação de Plantas Medicinais Essenciais, o qual selecionou os 12 fitoterápicos mais utilizados

pela população brasileira e disponibilizou na assistência farmacêutica na atenção básica (Brasil, 2011; Brasil, 2015).

3.4 MYRTACEAE

Myrtaceae é considerada uma das maiores famílias botânicas conhecidas (Beardsell et al, 1993; Wilson, 2001; Franzon, 2009), e compreende aproximadamente 132 gêneros e 6000 espécies (WCSP, 2018), com distribuição pantropical e picos de diversidade nas regiões da Austrália e América do Sul (Wilson, 2011; Bernardes et.al, 2018). No Brasil, a família está distribuída por todo território, representada por 29 gêneros, 1193 espécies e de modo geral o grupo é caracterizado por folhas simples, opostas, penínérveas, com nervura marginal e glândulas translúcidas, sem estípulas, flores brancas e polistêmones, frutos carnosos e indeiscentes (Proença; Costa; Tuler, 2020).

A família é constituída por gêneros que se destacam quanto a sua importância econômica e cultural no país (Souza & Lorenzi 2005; Thornhill et al., 2015), como *Eucalyptus spp.*, *Melaleuca spp.*, *Myrciaria spp.*, *Leptospermum spp.*, *Syzygium spp.* e *Psidium spp.*. Algumas espécies são cultivadas, como *Eucalyptus spp.*, da qual a madeira é utilizada para a produção de papel, carvão e aromatizantes, outras como ornamentais e algumas são usadas como especiarias, por exemplo, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, popularmente chamada de “cravo-da-índia” ou cravo. Diversas espécies produzem frutas comestíveis que são utilizadas na fabricação de sucos, geleias e doces, como *Psidium guajava* L. (“goiabeira” e “goiaba”), *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg (“jabuticabeira”), *Eugenia uniflora* L. (“Pitangueira”), *Syzygium spp.* (“Jambo”), mas nem todos são cultivados (Frazon, 2009; Cascaes, 2015).

As espécies de Myrtaceae também são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, principalmente distúrbios gastrointestinais, doenças hemorrágicas e infecciosas, com ação provavelmente relacionada às suas propriedades adstringentes. Além de apresentarem propriedades anti-inflamatórias (Do Nascimento et al., 2018), antimicrobianas (Dias et al., 2019) e antioxidantes (Durães; Paula; Naves, 2015).

3.4.1 O gênero *Psidium* spp.

O gênero *Psidium* é marcado por apresentar folhas simples e opostas, com típica venação bronquidódroma, e flores solitárias, axilares ou em pequenos racemos, dicásio ou botrióides. Além disso, as flores são pentâmeras e os botões maduros variam de 4mm a 15mm; o cálice possui morfologia variável, oscilando até de cupuliforme até caliptrato e, raramente, apendiculado; as pétalas são livres e alternadas, de cor branca ou creme; há muitos estames, variando de 60 até 320, arranjados em 3 a 12 verticilos; ovário ínfero, com 2 a 5 lóculos, com placentação intrusiva; frutos com muitas sementes, que apresentam testas ósseas e embrião coclear com cotilédones apicais (Tuler et al., 2017).

Em sua distribuição nativa, *Psidium* é considerado um gênero neotropical, por ocorrer desde o México até Buenos Aires, com mais de 100 espécies distribuídas. No Brasil, ele ocorre em todo território e é representado por mais de 60 espécies, das quais 38 são consideradas endêmicas (Reflora, 2020). Os principais três territórios marcados pela alta diversidade de espécies são o oeste das Índias; Sul do Brasil e Paraguai. O que explica essas três áreas apresentarem uma vasta diversidade de habitats e espécies é o seu sucesso adaptativo, ocorrendo em áreas sob diferentes condições ambientais como de estresses abióticos constantes, incluindo água e temperaturas extremas (Coelho et al., 2004).

As diferentes condições ambientais influenciam diretamente no crescimento do organismo vegetal durante a fase vegetativa e reprodutiva. Visto que essas plantas já estão adaptadas a esses fatores ambientais devido a sua longa permanência no meio ambiente, seus órgãos são ricos em metabólitos secundários que possuem diversas propriedades funcionais tanto para si próprias como para nós humanos. A riqueza de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e terpenos são diretamente associados a diversas atividades biológicas (Medina et al., 2011).

Essa fonte de compostos metabólicos está consolidada no grupo, porque é representada por espécies comestíveis, com frutos altamente apreciados, como a *Psidium guajava*, conhecida popularmente como a goiaba. Como também na medicina popular, já que essas plantas possuem alto teor de vitamina C, até 5 vezes mais que frutas cítricas em sua composição e com isso possuem elevada atividade antioxidante (Franzon et al., 2009; Medeiros et al., 2015).

Indicações terapêuticas das espécies do gênero já são relatadas na literatura. A espécie *Psidium acutangulum* DC. (goiaba araçá) é indicada para diarreia e

disenteria (Medicinales Aromáticas, 2017; Pedrollo Et Al., 2016). A *Psidium cattleianum* (araçá do brejo) possui indicação terapêutica para diarreia, dor de estômago, doenças no sistema digestivo, dor de garganta, doenças geniturinários, disenteria e doenças respiratórias (Brito; Marín; Cruz, 2017; Yazbek et al., 2019). A *P. guineense* Sw. (araçá-mirin), atua no tratamento de disenteria, influenza, dor de estômago, diarreia e problemas intestinais (Beltreschi; De Lima; Da Cruz, 2019; Charneau et al., 2016). Por fim, a *Psidium myrsinites* DC. (goiabinha) auxilia em doenças como diarreia e dor de estômago (Lozano et al., 2014; Ribeiro et al., 2014).

Há estudos que abordam a composição química de extratos e óleos essenciais de várias espécies do grupo, e a relação deles em atividades biológicas. O óleo essencial das folhas tem sido relatado por apresentar atividades antioxidante (Do Nascimento et al., 2018), anti-inflamatória (Do Nascimento et al., 2018) larvicida (Noleto Dias et al., 2015), e antimicrobiana (Leão et al., 2019; Moniz et al., 2019; Noleto Dias et al., 2015) (Dias, et al., 2019; Moniz et al., 2019; Macedo et al., 2018). Já para extratos de folhas obtidos com diferentes solventes, também foram relatadas atividades antioxidante (Senanayake et al., 2018; Dacoreggio; Moroni; Kempka, 2019; Saber et al., 2018; Scur et al., 2016; Sobral-Souza et al., 2019), anti-inflamatório (Houël et al., 2016) e antimicrobiana (Brito; Marín; Cruz, 2017; Macaúbas-Silva et al., 2021; Morais-Braga Et al., 2016; Saber et al., 2018).

3.4.2 *Psidium Myrtoides* (O. Berg)

A *Psidium myrtoides* (O. Berg), é também conhecida como araçá-roxo, araçá-úna, ou simplesmente araçá no Brasil. A espécie também tem como sinônimos: *Psidium gigantenum* Mattos., *Guajava myrsinoides* (O. Berg) Kuntze., *Eugenia orlandoi* (Mattos)., *Psidium myrsinoides* O.Berg., *Calycorectes orlandoi* Mattos., e *Guavaja myrtoides* (O.Berg) Kuntze (Reflora, 2021).

A espécie é caracterizada por ser uma árvore de grande porte de 6 a 12 metros, com caule do tipo tronco e presença de cascas esfoliantes e lâminas papiráceas. Suas folhas são opostas e provenientes do mesmo nó do caule. Seu período de floração é de abril a dezembro, onde suas flores apresentam botões abertos com quatro lobos; e os frutos são caracterizados por serem verdes na fase inicial e quando maduras apresentam uma coloração roxa. (Tuler et al., 2017; Reflora, 2021)(Figura 1).

A distribuição *Psidium myrtoides* é observada desde a região Nordeste até o Sul do país (Figura 2), abrangendo os domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Reflora, 2020). A ampla ocorrência dessa espécie pode ser explicada pela poliploidia presente nos indivíduos, que aumenta sua capacidade competitiva associada a estratégias fenológicas que asseguram o seu papel no ecossistema e permanência no meio ambiente (Tuler et al., 2019; Tuler et al., 2017). A produção de metabólitos secundários é de extrema importância para a permanência desses organismos, uma vez que apresenta uma composição química complexa.

A composição química e algumas propriedades biológicas de *P. myrtoides* já foram abordadas na literatura, porém para extratos vegetais ainda não há estudos. Quanto ao óleo essencial, estudos identificaram a composição química das folhas, que apresentou *trans*- β -cariofileno (30,9%), α -humuleno (15,9%) como os principais constituintes além de comprovar a eficácia nas atividades antibacteriana e antimoral (Forim et al., 2018), herbicida e antifúngica (De Macêdo et al., 2020). Para frutos também há relatos, onde os compostos β -cariofileno e limoneno (20,0% e 32,9%) foram as substâncias majoritárias, e apresentaram atividade antioxidante e antifúngica (Dias et al., 2019).

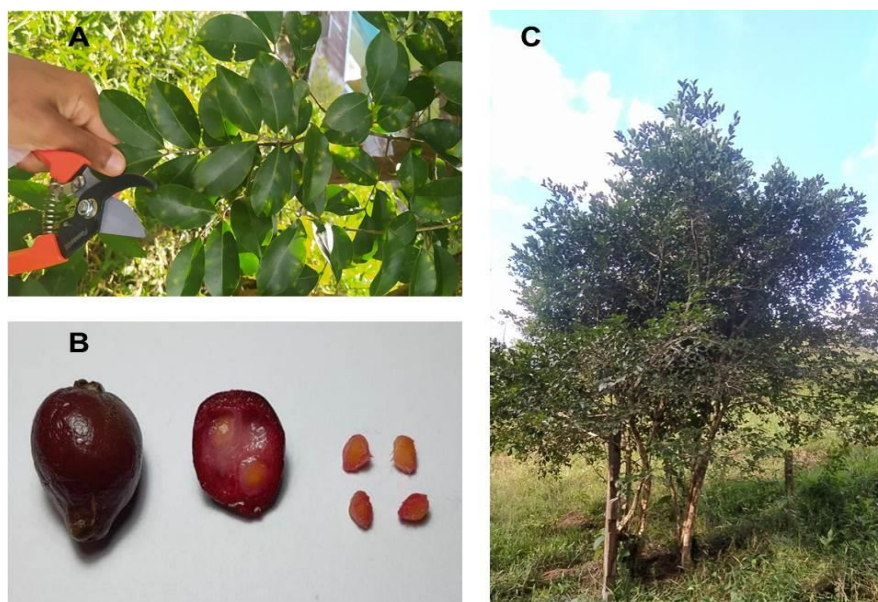


Figura 1. Fotos da espécie *P. myrtoides*. (A): Folhas de *P. myrtoides*; (B): Fruto e sementes de *P. myrtoides*; (C) Árvore de *P. myrtoides*. Fonte: Autor.



Figura 2. Distribuição de *P. myrtooides* nas regiões do Brasil. (Rosa): Bahia, Ceará, Maranhão; (Verde): Tocantins; (Amarelo): Goiás; (Vermelho): Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo; (Azul): Paraná e Rio Grande do Sul. Fonte: Reflora, 2020. Modificado.

3.5 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS

O processo de extração é a primeira etapa para a obtenção de metabólitos secundários de uma espécie vegetal (Couto et.al, 2010). Este processo foi aplicado pela primeira vez em 1835 por Robiquet, que realizou a extração de compostos de flores (Hui, 2007) e é considerado um processo físico-químico de transferência de massa, uma vez que o contato solvente-amostra leva a extração dessas substâncias (Clark, 1985).

As substâncias presentes na matriz sólida são extraídas e dissolvidas em um solvente líquido, no processo conhecido como sólido-líquido. Outra forma de extração é a líquido-líquido, onde ocorre a partição da amostra em duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) (Queiroz; Collins, 2001). A solução final após o processo de extração é removida em um evaporador para a obtenção de um extrato concentrado (Danisco, 2001).

O rendimento do produto da extração depende principalmente: da natureza do solvente usado com polaridade variável, temperatura, método de extração, natureza do composto químico, existência de substâncias interferentes e razão de volume de solvente para amostra (Koleva et al., 2002; Wongkittipong et al., 2004; Couto et al., 2010).

O solvente exerce grande influência no produto, pois pode alterar quais substâncias serão obtidas e em qual quantidade (Falbkenberg, 2004). Os compostos apolares são solúveis em solventes apolares ou de baixa polaridade, enquanto os compostos de alta polaridade são solúveis em solventes também polares, o que está de acordo com a regra empírica de grande utilidade: "polar dissolve polar, apolar dissolve apolar" ou "o semelhante dissolve o semelhante" (Martins; Araújo; Bittencourt, 2013).

3.6 METABOLISMO DAS PLANTAS E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS

A beleza da natureza é sustentada por uma guerra de sobrevivência dos mais aptos. As plantas são organismos sésseis que evoluíram e competem por um espaço no ambiente defendendo de ataques de herbívoros e patógenos, além de competirem pela disponibilidade de nutrientes. Milhões de anos depois, esses organismos vegetais desenvolveram um metabolismo sofisticado junto a uma composição química complexa de substâncias que lhe permitem defesas químicas próprias contra predadores (Ferreira & Pinto, 2010).

O metabolismo é representado por reações químicas que sintetizam compostos que podem ser classificados como primárias ou secundárias. As primárias são responsáveis por atuarem no metabolismo primário, exercendo uma função essencial para a vida da planta, como os aminoácidos, proteínas, carboidratos, clorofila e lipídios que atuam em eventos como a fotossíntese, respiração e transporte de solutos (Wink, 2010). Já o metabolismo secundário é sintetizado a partir da necessidade da espécie, para a adaptação da planta frente a patógenos e estresse ambiental (Simões et al., 2017).

Os compostos secundários são substâncias que auxiliam as plantas na percepção do meio externo que colaboram com sua sobrevivência, desempenhando funções específicas como proteção contra patógenos, luz ultravioleta (Farah; Donangelo, 2006), atração de polinizadores além de atribuir coloração a flores, frutos e folhas. Essas substâncias são influenciadas pela sazonalidade, temperatura, altitude, índice pluviométrico, idade da planta entre outros (Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Simões et al., 2017)(Figura 3). Os principais metabolitos secundários são os terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (Taiz; Zeiger, 2009; Wink, 2010; Khanna et al., 2021; Kumar et al., 2022).



Figura 3. Fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários. Fonte: Gobbo – Neto; Lopes, (2007).

3.6.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenoides compõem a maior classe de produtos naturais existentes (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000). Eles atuam como componentes das membranas celulares (esterol, um triterpeno); do fotosistema I e II (Carotenoides, pigmentos naturais e tetraterpênicos) (Mesquita; Teixeira; Servulo, 2017) e como fitohormônios (giberilina que é um composto isoprenoide formado por diterpenos) (Keszei; Brubaker; Foley, 2008). Esses compostos são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos, e quando submetidos a altas temperaturas podem se decompor e se reordenar em isoprenos que formam cadeias lineares ou em anel (Prasanthi; Lakshmi, 2012).

As cadeias podem conter 10 carbonos (monoterpenos, C10), 15 átomos de carbono (sesquiterpenos, C15), 20 átomos de carbonos (diterpenos, C20), 30 átomos de carbono (triterpenos) (Peres, 2004) (Anexo 3). O isopreno é um composto sintetizado naturalmente e que não está diretamente ligado a produção desses grupos, já que eles são produzidos a partir de seus precursores, difosfato de isopentila (IPP) e difosfato de dimetilalilo (DMAPP). No ciclo do IPP, a síntese inicia a partir da Acetil-coenzima A (Acetil-COA), e posteriormente entra na rota do ácido mevalônico no citoplasma, e do difosfato de dimetilalilo (DMAPP) apresenta dois precursores

diferentes, o piruvato ou gliceraldeído-3-fosfato, seguido da rota do metileritriol-4-fosfato (MEP) nos plástídeos (BREITMAIER, 2006); Cechinel Filho; Yunes, 2007).

3.6.2 Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos que apresentam pelo menos um átomo de Nitrogênio (N) em suas moléculas (ACCAME, 2001) (Anexo 4), e um estado de oxidação negativo (Henriques ET.AL, 2004). Essas substâncias constituem um grupo com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados e que pode ser encontrado em 20% das espécies vegetais (Dewick, 2002; Taiz & Zeiger, 2004; Meyer; Soares; Tomba, 2013).

Esses produtos naturais de baixo peso molecular são derivados do metabolismo dos aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) e aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) (Peres, 2004). Nas plantas, essas substâncias exercem papel fundamental na defesa contra predadores (Taiz; Zeiger, 2006b), e podem causar intoxicação após serem ingeridos (Neto; Azevedo; Araújo, 2002).

Muitos alcaloides possuem atividades farmacológicas, e sua afinidade por sítios cerebrais possibilita seu uso como calmante, analgésico e até mesmo narcótico (Neto; Caetano, 2005). Como principais alcaloides, vale destacar a morfina, um analgésico proveniente do ópio (*papaver soniferum*), a quinina, capaz de estimular apetite e é utilizada para síndromas gripais (*Cinchona*, sp.), e a cafeína (*coffea arabica*), a nicotina (*nicotina tabacum*) e atropina que atuam na diminuição de espasmos (*Atropa belladonna*) (Cabral; Pita, 2015).

3.6.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam uma estrutura química formada por um ou mais núcleos aromáticos, em que seus hidrogênios são substituídos por hidroxilas ou derivados funcionais (ésteres, ésteres e glicosídeos) (Dai; Munper, 2010; Simões et al., 2017), de uma simples molécula fenólica a polímeros complexos de elevado peso molecular (Balange E Benjakul, 2009; Vaquero et all., 2007; Shahidi; Ambigaipalan, 2015).

Estima-se que este grupo possui mais de 8.000 moléculas identificadas a partir do tipo e número de anel fenólico, e apresenta ampla distribuição na natureza (Farah; Donangelo, 2006; Martins; Petropoulos; Ferreira, 2016). A partir da identificação, essas substâncias fenólicas podem ser classificadas em dois grupos,

flavonoides e não flavonoides. Os Flavonoides são representados por flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas/antocianinas. Já os compostos fenólicos não flavonoides são representados pelos ácidos fenólicos e outros derivados como estilbenos, cumarinas e taninos (Abe et al., 2007; Anastasiadi et al., 2010; Liu et al., 2015; Martins; Petropoulos; Ferreira, 2016) (Anexo 5).

Os compostos fenólicos são multifuncionais devido a sua estrutura química variável (Angelo; Jorge, 2007) (Figura 4). O potencial farmacológico dessas substâncias está sendo cada vez mais pesquisado, uma vez que são encontrados em organismos vegetais, principalmente plantas superiores (angiospermas). Além disso, esses compostos são essenciais na dieta humana sendo considerados de grande interesse (Ahmad et al., 2016), devido a suas propriedades antimicrobianas que atuam na membrana citoplasmática (Laudy, 2015; Onitsuka; Hamada; Okamura, 2019) e antioxidantes na eliminação de radicais livres (Ahmad et al., 2016; Radojković et al., 2016; Sánchez-Salcedo et al., 2016).

3.7 RADICAIS LIVRES

Os radicais livres são moléculas instáveis e altamente reativas, que possuem um elétron não aparelhado em seu orbital (Fang; Yang; Wu, 2002; Filipović et al., 2015). A formação ocorre a partir de um processo contínuo e fisiológico que desempenha funções biológicas importantes. Essa produção contínua de radicais livres pelos sistemas enzimáticos é uma função celular normal que ocorre nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma (Alves et al., 2010; Filipović et al., 2015). Para manter esse equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua remoção, há mecanismos de defesa que atuam em prol dessa manutenção. O desequilíbrio devido à excessiva formação de radicais livres, acometido tanto por fatores endógenos e exógenos, desencadeia um processo chamado estresse oxidativo (Barreiros; David; David, 2006; Fang; Yang; Wu, 2002; Soares et al., 2015).

O estresse oxidativo é decorrente da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes. Os radicais livres, cujo elétron desemparelhado é o oxigênio e o nitrogênio, compreendem as espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Eles estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, quando em excesso, essas espécies reativas podem levar a oxidação de biomoléculas interferindo nas suas funções

biológicas e desequilíbrio homeostático (Barbosa et al., 2010; “Halliwell; Whiteman, 2004; Robert, 2014).

Diante do dano oxidativo em células e tecidos, o processo em questão está relacionado ao caráter etiológico de várias doenças, como diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos, cardiovasculares e carcinogênicos (Machado et al., 2009; Soares et al., 2015). Além disso, as espécies reativas em excesso, muitas vezes podem reagir com lipídeos, proteínas e com o DNA (Barreiros; David; David, 2006). Para remover os radicais livres e estabelecer o equilíbrio no organismo, o sistema de defesa produz os antioxidantes e são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, sejam capazes de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz (Barbosa et al., 2010; Halliwell; Whiteman, 2004).

Essas substâncias antioxidantes podem ter origens endógenas, a partir de um sistema de defesa enzimática, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); e exógenas, como vitaminas (C, E e A), compostos fenólicos e minerais. Tanto os sistemas enzimáticos como o não enzimático possuem a função de inibir e reduzir os danos causados pela ação nociva dos radicais livres, no qual atuam em três mecanismos de ação: (1) na forma de prevenção, impedindo a formação de radicais livres; (2) como forma de varredura, bloqueando a ação e de (3) reparo, atuando na reconstituição de estruturas lesadas (Barbosa et al., 2010; Oroian; Escriche, 2015; Shahidi; Ambigaipalan, 2015).

Os compostos antioxidantes podem ser encontrados em plantas, animais e microrganismos. Compostos bioativos provenientes de espécies vegetais têm ganhado espaço na pesquisa devido o seu potencial para atividades biológicas, principalmente antioxidantes, já que eliminam radicais livres e trazem benefícios a saúde humana. Entretanto, a eficiência desses compostos irá depender de fatores genéticos e ambientais, uma vez que são metabólitos secundários. Dentre essas substâncias, compostos fenólicos tem se destacado quanto a sua atividade antioxidante e podem ser uma alternativa aos antioxidantes sintéticos (Soares et al., 2008; De Oliveira et al., 2009; Bergamaschi, 2010; Vieira et al., 2011).

3.8 BACTÉRIAS E RESISTÊNCIA

As infecções bacterianas foram umas das principais causas de mortes no século XX (Davies; Davies, 2010). Com a descoberta da penicilina, deu início a

chamada “Era do ouro” que revolucionou a medicina, por ter iniciado o desenvolvimento dos antibióticos utilizados na prevenção e tratamentos de doenças, salvando milhares de vidas (Davies; Davies, 2010; Luepke et al., 2016).

Os antibióticos tiveram papel importante no aumento da expectativa de vida dos humanos, já que reduziram os índices de morte por infecções bacterianas (Pidcock, 2012). O amplo espectro de mecanismo de ação na célula bacteriana e a baixa toxicidade seletiva foram responsáveis pelo êxito dos primeiros antibióticos (Mardigan et.al, 2016). Esses agentes antimicrobianos foram considerados uma panaceia, ou seja, a cura de infecções, independente de sua utilização ser apropriada ou não (World Health Organization, 2015).

Ao longo das décadas, o uso indiscriminado desses fármacos antimicrobianos provocou a pressão seletiva sobre microrganismos, e conseqüentemente o surgimento de bactérias com elevado padrão de resistência, em proporções epidêmicas (Casellas, 2011; Lee Ventola, 2015; Michael et al., 2014). A resistência ocorre de forma natural e, ao longo do tempo, quando esses microrganismos são submetidos às substâncias usadas de forma incorreta e tratamentos ineficazes, há agravamento de infecções no corpo e aumento de risco de transmissão a outros indivíduos (WHO, 2018).

Os microrganismos desenvolveram mecanismos de resistência que podem ser uma capacidade intrínseca, por ser inerente de uma espécie bacteriana ou adquirida, esta acontece quando bactérias alteram seu DNA através da indução de mutação ou a partir da transferência do material genético (genes de resistência) da mesma espécie ou espécies diferentes (Macgowan; Macnaughton, 2017; ANVISA). Com isso, ocorre uma alteração na permeabilidade de substâncias, na bomba de efluxo, mecanismo enzimático e alteração no sítio de ação.

A resistência antimicrobiana virou um problema de emergência de saúde global, pelo aumento da mortalidade causada por bactérias resistentes, que chegam a mais de 700 mil pessoas no ano no mundo (WHO, 2014). Caso não sejam adotadas medidas efetivas, estima-se que até 2050, bactérias multirresistentes matarão 10 milhões de pessoas anualmente, sendo mais letal que câncer e diabetes (By; Neill, 2016). No Brasil o cenário é preocupante, visto que ocorrem cerca de 720 mil infecções bacterianas resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos convencionas (Barros et al., 2012).

3.8.1 Classe de antibacterianos

Há uma diversidade de antimicrobianos convencionais, ou seja, o que são utilizados em casos clínicos usados na prevenção e tratamento terapêutico. Essas drogas possuem mecanismos de ação quando submetidos frente as bactérias, devido principalmente a sua estrutura química. As principais classes são os β -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclínas.

β -lactâmicos

O β -lactâmicos é um grupo de antimicrobianos que possui em seu núcleo estrutural o anel β -lactâmico, que confere uma atividade bactericida. A sua estrutura química lateral define seu espectro de ação além de suas propriedades farmacológicas. O mecanismo de ação desses compostos é interferir na síntese do peptídeoglicano, que é responsável pela integridade da parede bacteriana. Os compostos penetram a membrana externa da parede celular e ligam-se às proteínas ligadoras de penicilina, responsáveis pelo último processo da síntese bacteriana (NICOLAOU, 2008; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Seu mecanismo de resistência ocorre pela produção de β -lactamases, enzimas que degradam os antimicrobianos, e causa modificações estruturais nas proteínas ligadoras de penicilina e diminuição da permeabilidade bacteriana ao agente antimicrobiano (Alcaine; Warnick; Wiedmann, 2007; Alterthum, 2008; ANVISA, 2022).

Sulfonamidas

As sulfonamidas são substâncias bacteriostáticas derivadas das sulfonilamida, com estrutura similar ao ácido para-aminobenzóico. Esses agentes antimicrobianos inibem o metabolismo do ácido fólico (importante para síntese de DNA e RNA) pelo mecanismo de competitividade. Como as células bacterianas dependem da produção endógena, não conseguem replicar seu material genético. A resistência a esses compostos ocorre a partir de mutações que elevam a produção de diidropteróico sintetase, o qual possui pouca afinidade com o antimicrobiano, ou seja, há diminuição da permeabilidade a partir de enzimas com pouca afinidade a essas substâncias (Walsh, 2004; ANVISA, 2022).

Tetraciclínas

As tetraciclínas são agentes bacteriostáticos de amplo espectro de ação, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essas substâncias penetram a

célula bacteriana por difusão, em um processo que depende do gasto de energia. Após entrarem na célula, ligam-se a poção 30s do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador e conseqüentemente impedindo a síntese proteica, que é importante para o metabolismo da célula bacteriana. A resistência pode ocorrer pela diminuição do acúmulo de droga no interior da célula ou cromossômica, mediada por plasmídeos ou transposos (Patrick, 2013; ANVISA, 2022) (Anexo 6).

3.9 FUNGOS E RESISTÊNCIA

Os fungos são amplamente distribuídos na natureza e contam com vários fatores que ajudam na sua dispersão. Apesar de ser parte da microbiota de um indivíduo saudável, quando encontram condições para sua reprodução, como fatores locais ou sistêmicos, podem invadir tecidos e tornarem-se patogênicos, o que pode culminar em infecções fúngica (Brasil, 2014; Pigatto, 2019)

A incidência de infecções fúngicas aumentou consideravelmente nas últimas décadas, e tem sido considerado um problema de saúde pública mundial, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Bellmann; Smuszkiewicz, 2004; Meersseman et al., 2017; Nichelle; Zimmermann, 2019). De acordo com a OMS (2016), as mortes relatadas por infecções fúngicas foram à quinta maior causa de mortalidade no mundo, ficando atrás apenas de tuberculose, diarreia, acidentes de trânsito e diabetes. As mortes por fungos chegam a 2 milhões de pessoas todo ano (GAFFI, 2020). No Brasil, o ministério da saúde informa que mais de 3,8 milhões de indivíduos sofrem de alguma infecção fúngica séria (Giacomazzi et al., 2016). Essas infecções fúngica são tratadas a partir de antifúngicos, criados no final da década de 1930. Ao longo do tempo, novas drogas foram criadas para um tratamento mais eficaz contra esses patógenos. Geralmente infecções fúngicas são de difícil tratamento, e o uso indiscriminado associado à falha de um tratamento clínico pode acarretar aos agentes etiológicos a resistência frente aos antifúngicos modernos (Araujo, 2005).

A resistência fúngica é diferente da que ocorre aos agentes bacterianos, uma vez que fungos não são capazes de inativar ou modificar os agentes antifúngicos como meio de adquirir resistência, e por não haver transferência de material genético célula a célula (Espinel-Ingroff, 2008). A resistência pode ser classificada a partir de duas perspectivas, microbiológica e a clínica (Alcazar-Fuoli; Mellado, 2014).

O mecanismo microbiológico pode ser explicado pela resistência adquirida ou mutacional, as quais dependem diretamente do microrganismo. Os fungos já são

resistentes anteriormente à exposição da droga ou essa resistência aparece em resposta prévia do antifúngico (Alcazar-Fuoli; Mellado, 2014). Já o mecanismo clínico ou falha no tratamento, refere-se à persistência da infecção fúngica mesmo após a terapia adequada, em que é classificado o fungo em suscetível, tolerante ou resistente. Suscetível quando há sucesso terapêutico; tolerante por serem considerados tratados, porém em doses elevadas e insertas; resistentes devido ao crescimento ou falha na inibição mesmo após o tratamento terapêutico (Alcazar-Fuoli; Mellado, 2004; Sanguinetti; Posteraro; Lass-Flörl, 2015).

A resistência em microrganismo será diferente entre as classes de antifúngicos utilizadas, porque cada droga apresenta um mecanismo de ação diferente. Os mecanismos de ação mais ocorrentes em fungos são através das bombas de efluxo, alteração fenotípica dos ligantes ao fármaco, vias compensatórias que diminuem a toxicidade da droga e a formação de biofilme (Espinel-Ingroff, 2008; Kucukates et al., 2016; Sanglard et al., 2009; Srinivasan; Lopez-RIBOT; 2014) RAMASUBRAMANIAN, 2014).

3.9.1 Classes de Antifúngicos

Os antifúngicos são importantes para o tratamento de infecções fúngicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. O tratamento pode ser realizado a partir de três classes de antifúngicos, que são os poliênicos, azoles e equinocandinas, cujos mecanismos de ação são diferentes.

Poliênicos

Os poliênicos são antifúngicos com estrutura química formada por átomos de carbono divalentes, e distribuídos em série com um anel lactâmico. A anfotericina B (Anf B) é uma das substâncias mais importantes neste grupo (Anexo 6), disponibilizada na década de 1950, a qual possui amplo espectro antifúngico e atividade fungicida, sendo uma droga referência no controle de infecções fúngicas e viscerais. Seu mecanismo de ação se dá a partir da ligação com o ergosterol da membrana fúngica, a qual altera sua permeabilidade e promove a perda dos constituintes citoplasmáticos, as reações de oxidação e alterações metabólicas, o que ocasiona a morte do fungo (Martinez, 2006; Spampinato; Leonardi, 2013; Murray et al, 2014).

A resistência aos poliênicos faz com que os microrganismos diminuam a quantidade de ergosterol, a partir de genes que sintetizam essa substância. Assim, o

ergosterol é substituído por outros esteróis que se ligam a esses poliênicos, porém com baixa afinidade (Espinel-Ingroff, 2008; Kanafani; Perfect, 2008).

Azólicos

Os azólicos são antifúngicos que apresentam majoritariamente atividade fungistática e são muito utilizados na clínica, devido a sua boa tolerância celular e amplo espectro antifúngico. Sua estrutura química apresenta um anel pentagonal, que divide essa classe em dois grupos: imidazólitos (3 carbonos e 2 nitrogênios) e triazólitos (2 carbonos e 3 nitrogênios). O Fluconazol é a triazólico (Anexo 6) mais representativo nesse grupo, pois possui ótima biodisponibilidade. O mecanismo de ação dos azólicos ocorre pela inibição da síntese do ergosterol, substância presente na membrana da célula fúngica, e conseqüentemente há modificação da permeabilidade da membrana. Atuam modificando a síntese de lipídios e inibindo enzimas que fazem parte do processo oxidativo, que irão gerar radicais livres com potencial para causar danos as células (Bassetti; Peghin; Timsit, 2016; Martinez, 2006; Pfaller et al., 2010; Roemer; Krysan, 2014; Spampinato; Leonardi, 2013).

Por ser um dos antifúngicos mais utilizados em infecções fúngica, há maior ocorrência de resistência a esse grupo de drogas. O mecanismo de resistência pode ser a partir da mutação do gene (ERG11), que codifica a enzima 14- α -desmetilase alterando o alvo do antifúngico ou causa a super expressão no mesmo gene, necessitando de uma maior concentração do antifúngico no interior na célula. Pode ocorrer também a expressão de genes que atuam nas bombas de efluxo, como os CDR1 e CDR2 (Espinel-Ingroff, 2008).

Equinocandinas

Por fim, as equinocandinas são uma classe composta por anidulafungina, caspofungina e micafungina, quimicamente caracterizadas como lipopeptídeos semissintéticos, as quais possuem hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácidos graxos. Apresenta amplo espectro e forte atividade fungicida, com mecanismo de ação na parede celular, onde inibi a enzima responsável pela síntese da β -1,3-D-glunaca, uma das principais substâncias que confere rigidez a célula fúngica. São empregadas de forma secundária, para tratar casos de resistência a Anf B ou azólicos, sendo raramente observados casos de resistência (Bassetti; Peghin; Timsit, 2016; Larru; Zaoutis, 2013; Martinez, 2006).

Como dito anteriormente, é raro a resistência a essa classe de antifúngicos. O mecanismo de resistência pode ocorrer a partir da mutação do gene FKS1, que

possui a função de codificar a β -1,3-D-glucan sintase. Essa enzima é responsável pela síntese da β -1,3-D-glucana, e como não há inibição desta enzima, a célula fúngica terá sua parede celular intacta (Perlin, 2007).

3.10 MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais, nesse contexto, representam uma alternativa para a modernização de fármacos antimicrobianos, visto que a resistência aos fármacos tradicionais se tornou uma problemática de saúde global. A exemplo das substâncias antibacterianas, compostos secundários na forma de extratos e óleos essenciais são uma alternativa, por apresentarem efeitos terapêuticos a partir da ação isolada ou sinérgica dessas substâncias, que atuam em diversos mecanismos de ação (Burt, 2004; Parreira; Lima, 2018).

Os mecanismos de ação de produtos naturais frente aos microrganismos mais conhecidos envolvem a desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo, e coagulação do conteúdo da célula. Porém, nem toda ação dos produtos naturais agem em alvos específicos, o que pode afetar outros sítios em consequência de outros mecanismos de ação (Burt, 2004).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais está diretamente relacionada aos terpenos que o constituem (Greay; Hammer, 2011). Esses compostos apresentam propriedades lipofílicas, sendo seu local de ação a bicamada lipídica. Por causa da hidrofobicidade de seus compostos, sua ação permite a alteração da membrana celular, desintegração das estruturas, aumento da permeabilidade a íons e prótons, degradação da parede celular, e a lise celular (Guinoiseau et al., 2010; Lambert et al., 2001; Cristina et al., 2019).

Os compostos fenólicos atuam como antimicrobianos em função de sua estrutura química, a qual o anel aromático e o grupo hidroxila atuam na alteração da membrana citoplasmática. Essa ação interfere no metabolismo energético de produção de ATP, lise da parede celular, inativação de enzimas e interação com as bases nitrogenadas, inibindo a sínteses de DNA e RNA. (Cowan, 1999; Fowler et al., 2011; Hendra et al., 2011; Kurek et al., 2011).

3.11 SINERGISMO ENTRE SUBSTÂNCIAS NATURAIS, ANTIBIÓTICOS E ANTIFÚNGICOS.

Durante seus respectivos mecanismos de ação, é possível ocorrer a interação entre as substâncias medicamentosas, a qual pode ser classificada como antagonista, indiferente e sinérgica.

A interação de antagonismo é definida como negativa entre duas ou mais substâncias, porque elas são suprimidas na presença da outra, inibindo ou até mesmo competindo entre si. A interação indiferente é definida por não haver interação farmacológica entre os medicamentos, ou seja, não ocorre influência na ação dos fármacos (Oliveira, 1986). A interação de sinergismo é definida como positiva, na qual a associação entre duas ou mais substâncias resulta numa melhor ação em relação à quando são utilizadas de forma isoladas. Com isso, há aumento da eficácia, diminuição da toxicidade, redução da dose terapêutica e também a diminuição do avanço de resistência do microrganismo (Oliveira, 1986; Van Vuuren; Viljoen, 2011).

O sinergismo entre produtos naturais e antibióticos já é relatado na literatura. A ação sinérgica já foi observada para cepas *Staphylococcus aureus* (Torres et.al, 2017), *Escherichia coli* (Akinyele et al., 2017; Alayande; Pohl; Ashafa, 2018), *Enterococcus faecium*(SAKAGAMI et al., 2005) e *Staphylococcus epidermidis* (Mirzaei et al., 2022).

Há também uma vasta literatura que comprova ação sinérgica entre produtos naturais e antifúngicos. Foi observado o sinergismo contra cepas de *Candida albicans* (Cleomaceae et al., 2019; Endo et al., 2010; Sardi et al., 2016), *Candida glabrata* (Rosato et al., 2008; SharifzadeH et al., 2017, 2018), *Candida tropicalis* (Rosato et al., 2008), *Candida parapsilosis* (Rosato et al., 2008) e *Trichophyton rubrum* (Pyun; Shin, 2006).

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Coleta da amostra vegetal

As folhas foram coletadas no distrito Buenos Aires, no município de Guarapari, Espírito Santo (-20° 32'32,3"S; -40° 36'09,1"W) (Figura 4). A identificação botânica foi realizada na Universidade Vila Velha (ES, Brasil), pela Dra. Solange Schneider e o

voucher da espécie n° 2620 foi depositado no herbário da Universidade Vila Velha. Folhas sadias foram selecionadas e coletadas, secas a 40°C em estufa de ventilação de ar forçada, trituradas em moinho de facas e armazenadas em embalagens âmbar.

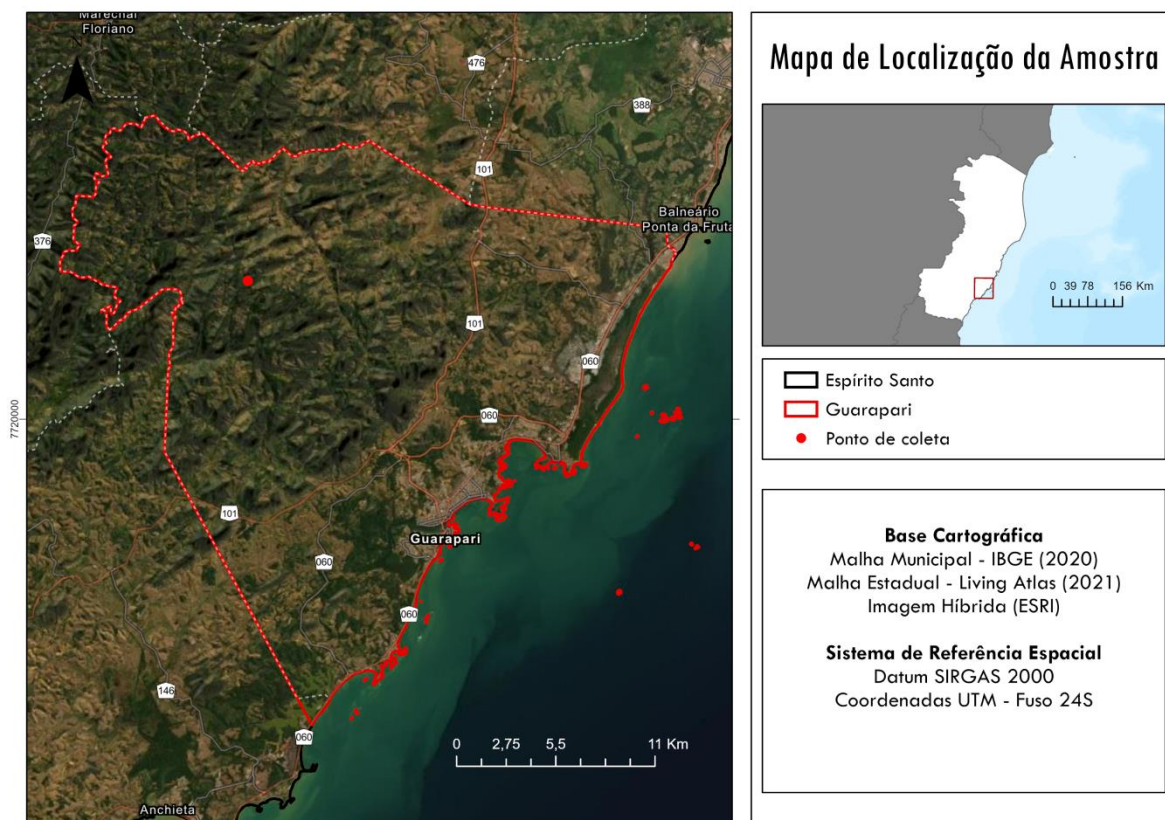


Figura 4. Mapa de localização e coleta da amostra, folhas de *P. myrtooides*.

4.1.2 Extratos e fracionamento

O processo de extração ocorreu em duas etapas, usando ultrassom e extração líquido-líquido. Primeiramente, 200g de material foram extraídos com 500 mL de hexano durante 60 minutos por maceração assistida por ultrassom. Em seguida, o extrato foi filtrado, e o processo repetido com mais 500 mL de hexano. As frações orgânicas foram reunidas e evaporadas para obtenção da fração hexânica. Em seguida, o resíduo vegetal desengordurado passou pelo mesmo processo de dois ciclos de extração em ultrassom com etanol 80%, sendo o solvente também evaporado para obtenção do extrato etanólico. Os extratos foram armazenados a -80°C overnight e liofilizados por 48h.

Para obtenção das frações diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água, foi realizado o processo de extração líquido-líquido (Vogel, 1981). Uma alíquota de 30

g do extrato etanólico foi solubilizado em 1000 mL de água deionizada. Essa solução foi transferida para funil de separação, onde foram realizadas três extrações com alíquotas de 150 mL de diclorometano (DCM). As frações orgânicas foram reunidas, filtradas com sulfato de sódio e evaporadas em capela. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado com acetato de etila (ACET), e por fim, o mesmo procedimento realizado com n-butanol (N-BUT). A fração aquosa restante foi coletada, congelada a -80°C e liofilizada por 48h. Todas as partições foram armazenadas em capela para evaporação total dos solventes, seguido de congelamento em ultra freezer -80°C overnight, liofilizado por 48h e armazenadas em ultra freezer a -80°C (Anexo 1).

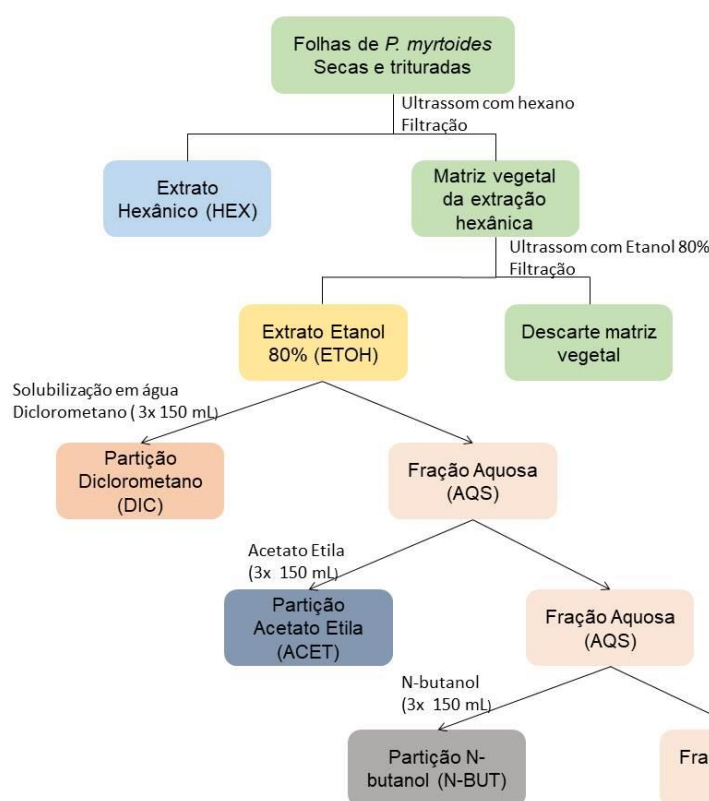


Figura 5. Processo de extração dos extratos brutos e suas frações em diferentes solventes.

4.2 FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada segundo Xu e Chang (2007), com modificações. Em microplacas de 96 poços foram adicionados diretamente em cada poço 180 μL de solução dos extratos ($0,2 \text{ g.mL}^{-1}$) e 15 μL de NaNO_2 2,5 %. Após seis minutos foram adicionados 15 μL de AlCl_3 10% e, depois de

cinco minutos, foram adicionados 50 μL de NaOH 1M. Aguardou-se 10 minutos para a formação do complexo flavonoide-alumínio à temperatura ambiente. A curva padrão foi elaborada com quercetina (Sigma Chemical co.) ($0,1-100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As leituras foram realizadas a 415 nm, todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ).

4.3 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-UV

Para uma melhor identificação foi realizada uma hidrólise ácida nos extratos. Pesou-se 100 mg de extrato e foi adicionado 80 mL uma solução etanólica ácida (HCl 1M em etanol 80%), a qual permaneceu em refluxo a 75°C por 1h. Após o resfriamento, completou-se volume para 100 mL com a solução ácida. Para a injeção, as amostras foram filtradas e diluídas 1:1 (v/v) com água (YANG et al., 2019).

As análises dos compostos foram realizadas em um UHPLC (Dionex Ultimate 3000rs - Thermo Scientific) equipado com bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático e forno de coluna, acoplado a um detector DAD. Para separação, foi usada uma coluna C18 (100 x 2.1 mm, $1.8 \mu\text{m}$ - ACE Generix) a 35°C . As amostras foram diluídas em fase móvel A na concentração 0,5 mg/mL, filtradas ($0,45 \mu\text{m}$) e injetadas no HPLC. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido acético 1% (A) e acetonitrila acidificada 1% com ácido acético (B), em um fluxo de 0,2 mL/min. Foi utilizado um gradiente de eluição conforme a tabela 1.

Tabela 1. Gradiente de eluição.

Tempo (min)	A(%)	B(%)
0	95	5
25	85	15
40	70	30
50	60	40
51	95	5
60	95	5

A detecção dos compostos foi feita com um detector DAD nos comprimentos de onda de 259 e 370nm. A quercetina foi identificada nas amostras pelo tempo de retenção e espectro de absorção comparando a um padrão autêntico, sendo um dos compostos majoritários. Como foram identificados outros picos com perfil semelhante à quercetina, os mesmos foram quantificados como equivalentes de quercetina,

através de uma curva de calibração com o padrão, utilizando o software Chromeleon 7.

A quantificação foi realizada por curva de padronização externa com a quercetina com 10 pontos (diluição seriada) em triplicata na concentração inicial de 100µg/ml. A curva de calibração também foi utilizada na avaliação da faixa de linearidade. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados pela relação sinal/ruído, onde o LOD foi definido como a concentração do analito que produz sinal de três vezes a amplitude do ruído, e seis vezes para o LOQ.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Ensaio DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foram determinados através do método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de acordo com (Scherer; Godoy, 2009) modificado. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 20 µL das soluções dos extratos em diferentes concentrações em DMSO e 280 µL de uma solução metanólica de DPPH 40 µg/mL. Soluções dos extratos foram testadas nas concentrações 0,5 mg/mL até 0,001 mg/mL. No branco foram adicionados 20 µL de DMSO. Todos os testes foram realizados em três repetições e em triplicata. As placas ficaram mantidas no escuro em temperatura ambiente por 60min, e a leitura foi realizada à 517nm no leitor de microplacas (Spectramax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA). A atividade de eliminação de radicais foi calculada da seguinte forma: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$, onde a absorbância Abs0 é a do branco e a Abs1 é a absorbância na presença do extrato em diferentes concentrações. Os índices foram utilizados para o cálculo de IR50 (concentração que reduz 50% dos radicais livres), que foi calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração (concentração versus o índice correspondente). A ação antioxidante foi expressa em IR50 (concentração que reduz 50% dos radicais livres), calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração (concentração versus o índice correspondente).

4.4.2 Ensaio ABTS

A atividade antioxidante dos extratos foram determinadas através do método do sequestro do radical livre ABTS de acordo com (Re et al., 1999) modificado. Inicialmente, forma-se o radical ABTS que será diluído em etanol até obter-se uma

solução com absorvância de $0,70 \pm 0,01$, a 734nm. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 270 μL do radical ABTS e 30 μL de cada concentração dos extratos. Soluções dos extratos foram preparadas nas seguintes concentrações finais: 0,2 mg/mL até 0,000625 mg/mL. No branco foram adicionados 30 μL de DMSO. Após 6 minutos de reação no escuro, foi realizada a leitura em 734 nm no leitor de microplacas (Spectramax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA). A atividade de eliminação de radicais foi calculada da seguinte forma: $I\% = [(Abs0 - Abs1) / Abs0 \times 100]$, no qual a absorvância Abs0 refere-se ao branco e Abs1 é a absorvância na presença dos extratos em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em IR50 (concentração que reduz 50% dos radicais livres), que foi calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração (concentração versus o índice correspondente).

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Microrganismos

Os extratos foram testados contra quatro cepas de bactérias (*Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Escherichia coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Staphylococcus epidermidis* CCCD S010). Adicionalmente foram testadas cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 146, *Candida glabrata* 1M1C, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* 30M1 e *Trichophyton rubrum*.

4.5.2 Concentração inibitória mínima

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo do CLSI M7-A9 (2015) para bactérias, M27-A3 para leveduras (2008), e M38-A2 para fungos filamentosos (2008). As concentrações testadas nos microrganismos variaram entre 1000 $\mu\text{g/mL}$ até 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

Para as bactérias foi preparado inóculo em solução salina 0,9% com turbidez equivalente a escala McFarland 0,5 (absorvância 0.08 a 0.13 a 625nm), por método espectrofotométrico (espectrômetro T80+, PG Instruments, Leicestershire, Reino Unido). Em seguida, o inóculo foi ajustado em caldo de Mueller Hinton para *Escherichia coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Staphylococcus epidermidis* CCCD S010. Para *Enterococcus faecium*, o inóculo foi ajustado em Caldo

BHI. Quando a suspensão de bactérias foi inoculada no caldo a concentração final de bactérias foi de 5×10^5 UFC/mL.

Para as leveduras foi preparado inóculo em solução salina 0.85%, com turbidez equivalente a escala McFarland 0,5 (transmitância 85% a 90% a 530 nm). Em seguida o inóculo foi ajustado em caldo de RPMI para as espécies de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* 146, *Candida glabrata* 1M1C, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* 30M1. Quando a suspensão de leveduras foi inoculada no caldo a concentração final de bactérias foi de 0.4 a 5×10^5 UFC/mL.

Para os fungos filamentosos foi preparado inóculo em solução salina 0.85% +Tween 40 a 0.05%, com turbidez equivalente a escala McFarland 0,5 (transmitância 65% a 70% a 530 nm). A suspensão foi diluída em caldo RPMI a fim de obter concentração 0.4 a 5×10^4 UFC/mL.

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, com controle positivo (inóculo do microrganismo testado e meio de cultura a 2,5% de DMSO), controle de esterilidade (meio de cultura sem microrganismo) e poços teste contendo o microrganismo e a soluções com os extratos de *P. myrtoides*.

Todas as análises foram em 3 repetições e duplicatas. As placas foram incubadas a 35°C por 24h para bactérias, a 35°C por 48h para as leveduras e a 35°C por 72h para fungos filamentosos. Adicionalmente as placas foram seladas para minimizar as perdas do meio de cultura. Para a visualização do resultado, foi adicionado 15 µL de risazurina a 0,01% e em seguida incubados a 35°C por mais 4h. A CIM do composto foi determinada pela concentração mais baixa que inibiu o crescimento visível do microrganismo, que foi confirmado pela mudança na coloração do corante resazurina (células mortas permanecem coradas em azul, enquanto que células vivas metabolizam o corante que muda de cor para rosa).

4.5.3 Concentração bactericida e fungicida mínima

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM) o ensaio foi realizado de acordo com (CLSI, 1999). Alíquotas de 20 µL dos poços onde não foi observado crescimento na determinação da CIM, foram semeadas em placas de Petri em meio de ágar Mueller-Hinton para *Escherichia coli* ATCC8739, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 e *Staphylococcus epidermidis* CCCC S010; ágar BHI para

Enterococcus faecium, e incubadas em estufa a 35°C por 24h para bactérias. O teste foi realizado em triplicatas e a CBM foi definida como diminuição de 99,9% (falta de crescimento) em células viáveis.

Para determinar as concentrações fungicidas mínimas (CFM) o ensaio foi realizado de acordo com M27-A3 CLSI (2008) para leveduras e M38-A2 CLSI (2008) para fungos filamentosos. Alíquotas de 20 µL dos poços onde não foi observado crescimento na determinação da CIM foram semeadas em ágar sabouraud para leveduras a 35°C por 48h e para os fungos filamentosos ágar CSDA a 35°C por 72h. O CFM foi definido como diminuição de 99,5% (falta de crescimento) em células viáveis.

4.6 DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE SINÉRGICA (CHECKBOARD)

O estudo da interação entre os extratos, antibiótico e antifúngico foi realizado de acordo com o método do tabuleiro de xadrez (Checkboard method) (Lorian, 2005). Com base nos valores da CIM de bactérias foram preparadas soluções em caldo Mueller Hinton dos extratos e da Tetraciclina. As soluções obtidas apresentaram concentrações que variaram da CIM a concentrações subinibitórias 1/128 para extratos e 1/256 para antibacteriano/antifúngico (Anexo 11).

Em microplacas de 96 poços, foram adicionados na orientação vertical 50 µL das diluições do antibacteriano, e na horizontal 50µL dos extratos. Em seguida foram adicionados 10 µL de suspensão bacteriana contendo 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 24h e para a leitura final foram adicionados 15 µL de resazurina a 0,01%, e em seguida incubados a 35°C por mais 4h.

Para os fungos, foram adicionados numa placa de 96 poços na orientação vertical 50 µL das diluições do antifúngico, e na horizontal 50µL dos extratos. Em seguida foram adicionados 100 µL de suspensão fúngica contendo 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 24h e para a leitura final foram adicionados 15 µL de resazurina a 0,01%, e em seguida incubados a 35°C por mais 4h.

A interpretação destas interações foi realizada através do cálculo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) pela seguinte equação $FICI = (CIM \text{ da associação antibacteriano e extrato} / CIM \text{ de extrato}) + (CIM \text{ da associação antibacteriano e extrato} / CIM \text{ do agente antibacteriano})$. Valores do FICI $\leq 0,5$ foram interpretados como uma interação sinérgica total; $0,5 < FICI \leq 0,75$ um sinergismo

parcial. Uma interação indiferente quando os valores do FICI foram entre $0,75 < \text{FICI} \leq 2,0$ e um efeito antagônico quando FICI foi maior que 2,0 (FADLI et al., 2012).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada a partir do teste de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos, seguido do pós-teste de Duncan para revelar diferenças estatísticas entre os extratos através do ranqueamento das médias, utilizando um nível de significância de 5%.

Para a análise das correlações da atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS com o teor de compostos fenólicos totais foram determinados o coeficiente de correlação de Pearson (r). Todas as análises foram feitas utilizando o software SAS.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os rendimentos dos extratos obtidos a partir da extração dos extratos brutos e suas frações estão apresentados na tabela 2. Pode-se observar o alto rendimento do extrato bruto etanólico e aquoso das frações.

Os extratos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para traçar o perfil químico de cada extrato. As Figuras 6 a 9 mostram cromatogramas típicos obtidos antes e após a hidrólise.

Tabela 2. Massa e rendimento das extrações obtidas nos extratos brutos a partir de 200g de folhas. As partições foram realizadas a partir de 30g do extrato bruto de Etanol 80%.

EXTRATO BRUTO	MASSA OBITIDA (g)	RENDIMENTO (%)
Hexano	6,37	3,18
Etanol 80%	33,6	16,8
PARTIÇÕES		
Diclorometano	4,17	13,9
Acetato de etila	10,46	34,86
N-butanol	8,06	26,86

Água	15,97	53,23
------	-------	-------

5.2 AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Tanto nas Figuras 6 e 7, como nas Figuras 8 e 9, observamos que praticamente todos picos encontrados eram flavonoides glicosilados derivados de quercetina, visto que após a hidrólise, o pico de quercetina aglicona aumentou, e os demais picos praticamente desapareceram. Além disso, os espectros de absorção dos picos eram similares ao espectro da quercetina aglicona. Após a hidrólise também foi observado a presença de outros 5 compostos não identificados (Tabela 2), entretanto foram quantificados em equivalentes de quercetina por apresentarem similaridade de espectros de absorção dos flavonoides (Anexo 2).

Tabela 3. Análise de compostos fenólicos nos extratos de *P. myrtooides* através de HPLC-UV (mg/g de extrato) após a hidrólise ácida.

Composto	TR	UV (nm)	UVmáx	ETOH	ACET	DIC	N-BUT	AQS
A (NI)	36,2	259	254/370	0,57±0,07	-	-	-	-
Quercetina	42,3	259	255/371	11,2±0,01	62,6±1,3	-	-	-
B (NI)	47,3	259	265/365	0,61±0,05	5,53±0,1	-	-	-
C (NI)	48,4	259	255/371	0,22±0,02	0,87±0,1	-	-	-

(NI) compostos não identificados, mas quantificados em equivalentes de quercetina; (TR) tempo de retenção; UV Comprimento de onda; ETOH: extrato etanólico 80%; ACET: fração acetato de etila; DIC: fração diclorometano; N-BUT: fração n-butanol; AQS: fração aquosa.

Em todos os extratos foram identificados flavonoides, exceto no extrato hexânico. Nota-se que foram encontrados valores elevados de quercetina aglicona no extrato obtido com acetato de etila, chegando a 6,5% da composição do extrato. Além disso, o composto A não identificado, mas quantificado como equivalente em quercetina, chega a mais de 13% do total do extrato, juntos, os compostos A, B e a quercetina, correspondem a 22% do total do extrato.

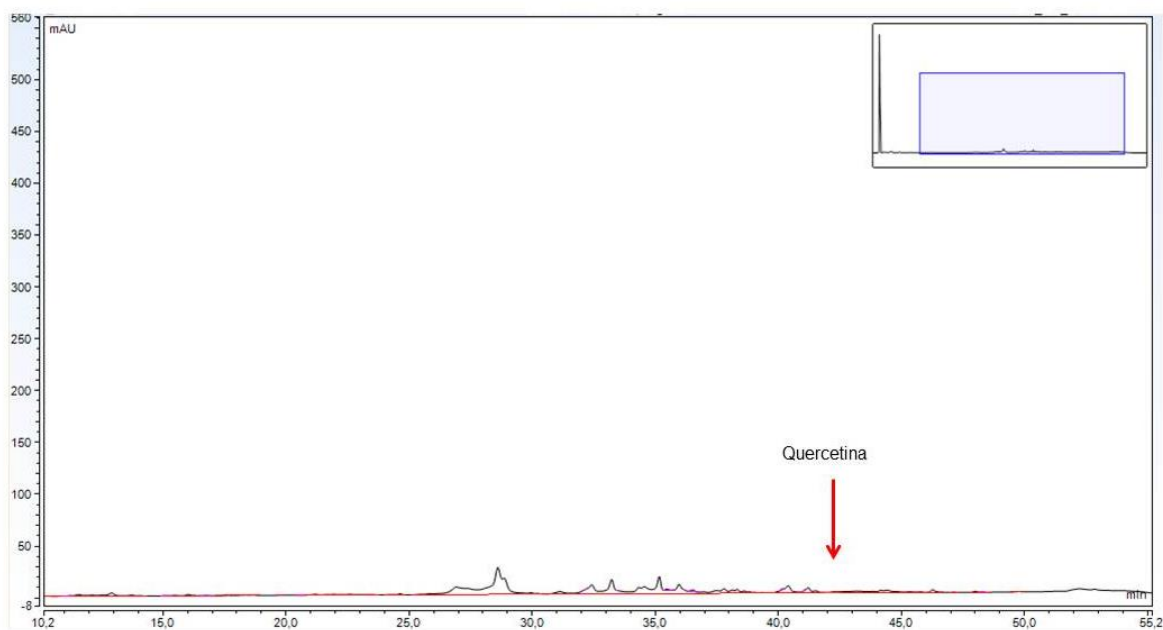


Figura 6. Cromatograma do extrato ETOH antes da hidrólise ácida. Detetor DAD em 259 nm.

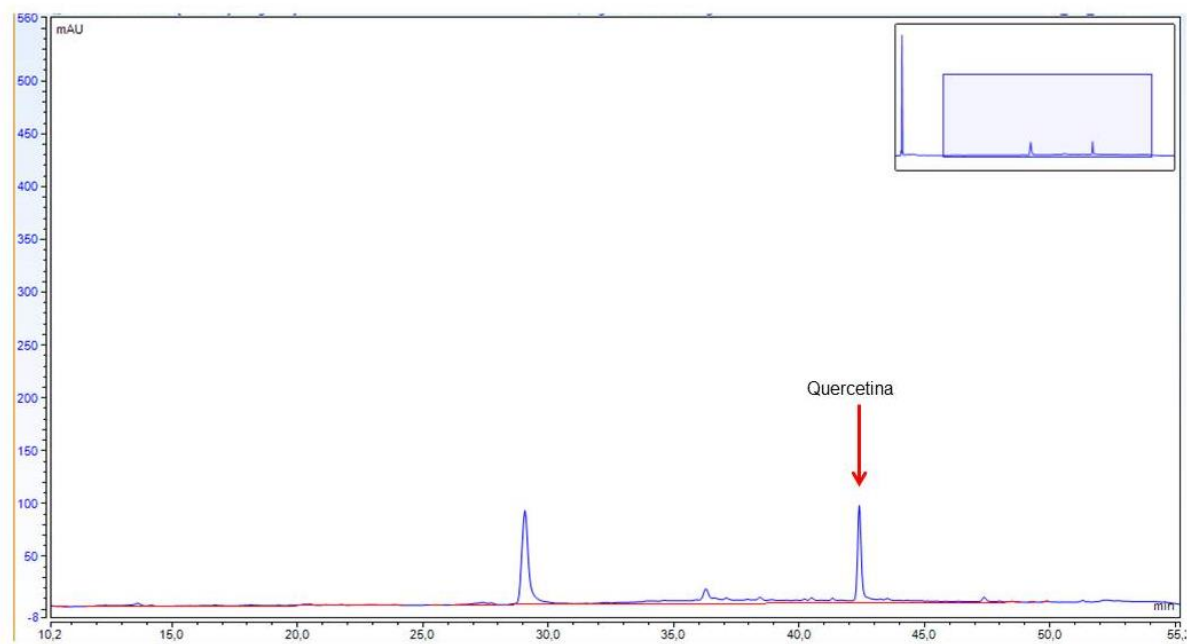


Figura 7. Cromatograma do extrato ETOH depois da hidrólise ácida. Detetor DAD em 259 nm.

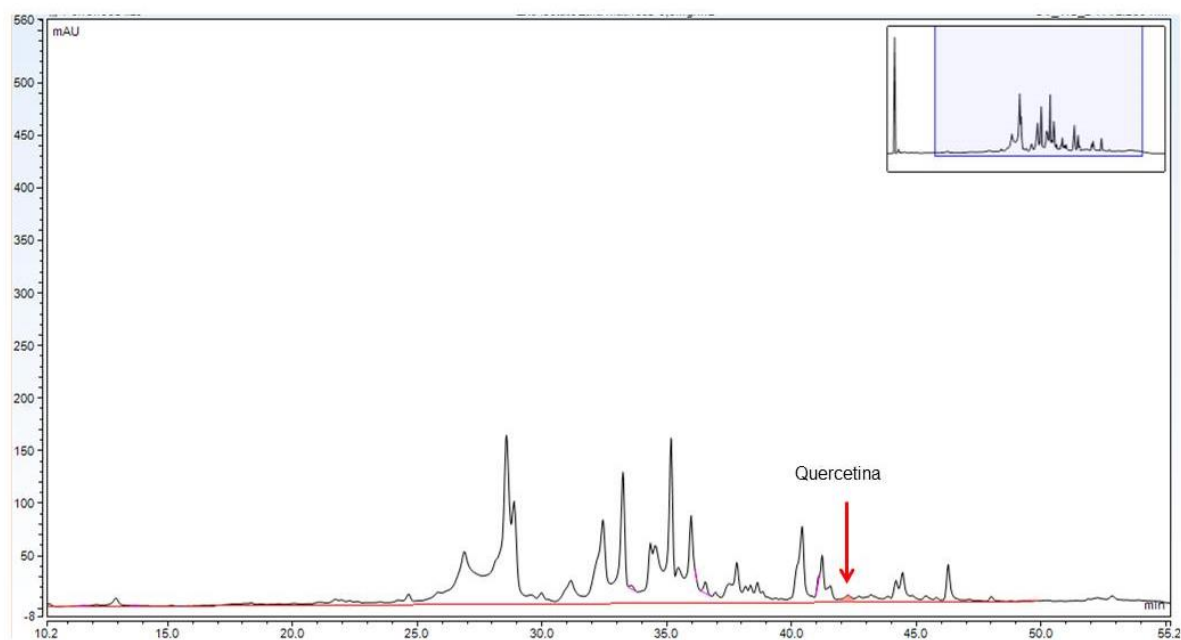


Figura 8. Cromatograma da fração acetato de etila antes da hidrólise ácida. Detector DAD em 259 nm.

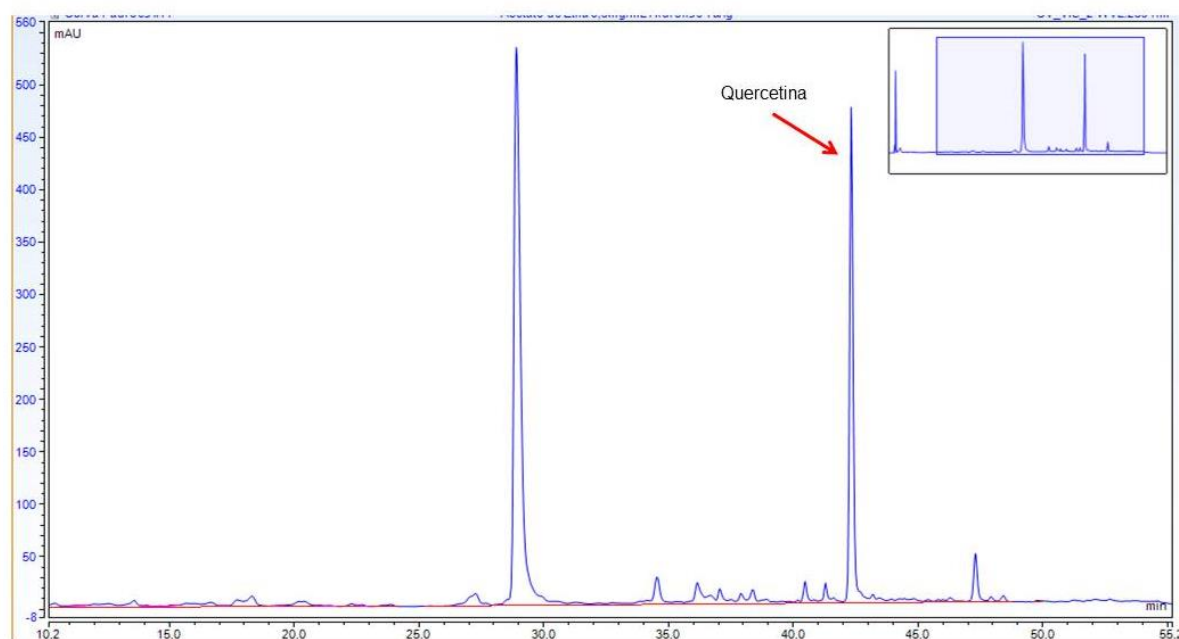


Figura 9. Cromatograma da fração acetato de etila depois da hidrólise ácida. Detector DAD em 259 nm.

5.3 FLAVONÓIDES TOTAIS

A quantidade de flavonoides totais dos extratos das folhas de *P. myrtoides* nos diferentes solventes está descrito na Tabela 4. Pode-se observar que o extrato

acetato de etila apresentou o valor mais elevado ($p < 0,05$) $674 \pm 0,6$ mg/g, quando comparado as frações e extratos brutos. Para (Rockenbach et al., 2008), o solvente utilizado e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na extração de flavonoides totais e conseqüentemente na capacidade antioxidante.

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Foi determinada a capacidade de eliminação de radicais livres dos extratos a partir de dois métodos antioxidantes químicos, DPPH e ABTS. Conforme os resultados da Tabela 4, todos os extratos apresentaram capacidade de eliminação de radicais livres, com atividade mais forte nas frações polares. O Extrato acetato de etila apresentou maior inibição do radical quando comparado aos outros extratos no método DPPH. Já no ABTS, os extratos ACET e ETOH se destacaram quanto a sua capacidade de eliminação de radicais livres quando comparado aos demais extratos, e estes não apresentarem diferença significativa ($p > 0,05$) entre si (Anexo 7).

Tabela 4. Atividade Antioxidante dos extratos nos ensaios DPPH e ABTS expressos em IR50. Determinação dos flavonoides totais, expressos em mg/g de extrato.

EXTRATOS	DPPH (IR50)	ABTS (IR50)	FLAVONÓIDES
Hexano	$85,3 \pm 3,05^f$	$93,3 \pm 5,86^f$	$311 \pm 1,89^f$
Etanol 80%	$7,47 \pm 0,36^c$	$5,76 \pm 0,30^b$	$593 \pm 0,37^b$
Diclorometano	$81,2 \pm 0,59^e$	$85,7 \pm 0,96^e$	$450 \pm 1,13^e$
Acetato de etila	$6,38 \pm 0,29^b$	$5,81 \pm 0,31^b$	$674 \pm 0,56^a$
N-butanol	$11,5 \pm 0,35^d$	$8,29 \pm 0,79^d$	$502 \pm 0,12^c$
Água	$7,5 \pm 0,48^c$	$6,98 \pm 0,49^c$	$504 \pm 1,83^c$
Quercetina	$3,93 \pm 0,05^a$	$1,15 \pm 0,04^a$	-

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa no valor de ($p < 0,05\%$).

5.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.5.1 Concentração inibitória mínima (CIM) E bactericida mínima (CBM)

Os resultados da concentração inibitória mínima dos extratos, frações e do antibiótico convencional para as quatro cepas de bactérias estão apresentados na Tabela 5.

O extrato hexânico apresentou melhor potencial de inibição, pois foi capaz de impedir o crescimento de três espécies de bactérias (*E. faecium*, *S. aureus*, *S. epidermidis*), nas respectivas concentrações 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$ e 128 $\mu\text{g/mL}$, sendo

consideradas com forte ação para os microrganismos que apresentam a CIM menor que 100 µg/mL, de acordo com a classificação de COS et al., 2006.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (µg/mL) dos extratos de *P. myrtooides* em diferentes solventes testadas em bactérias gram (-) e gram (+).

Extratos	<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Hexano	-	64	32	128
Etanol 80%	-	-	1000	-
Diclorometano	-	-	256	-
Acetato de etila	-	-	100	-
N-butanol	-	-	-	-
Água	-	-	-	-
Tetraciclina	0,0001	0,0005	0,0002	0,002

Legenda: (-) Crescimento bacteriano.

Com relação à CBM, o único extrato que apresentou atividade bactericida foi o hexânico, e apenas contra estirpe *S. epidermidis* (CBM = 0,2 mg/mL), demais extratos não apresentaram capacidade bactericida (Anexo 9).

5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

5.6.1 Concentração inibitória mínima (CIM) E Fungicida mínima (CFM)

Neste procedimento, os extratos e dois antifúngicos padrões foram testados em cinco leveduras e um fungo filamentosos. Todos os extratos apresentaram excelentes concentrações de inibição, dados apresentados na Tabela 6, por três razões: (1) Os extratos apresentaram concentrações de inibição abaixo de 100 µg/mL para as cepas testadas, valor considerado relevante e seletivo para microrganismos de acordo com (Cos et al., 2006); (2) O mesmo autor relata que essa concentração é para CIM de IC50, e neste trabalho, considera CIM a concentração capaz de inibir 100% do crescimento do microrganismo, ou seja, IC100; (3) Os extratos ETOH, ACET e AQS apresentaram CIM igual ou menor que os padrões utilizados (FCZ e ANF B) para *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. (Anexo 8).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (µg/mL) em diferentes solventes testada em leveduras e fungos filamentosos.

Extratos	<i>C. albicans</i> 102	<i>C. albicans</i> 146	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>T. rubrum</i>
Hexano	32	64	2	4	8
Etanol 80%	8	16	2	2	32
Diclorometano	32	32	4	4	512
Acetato de etila	8	128	8	8	128
N-butanol	8	32	4	4	128
Água	16	8	2	4	32
Fluconazol	0,5	0,5	2	2	4
Anfotericina B	0,06	0,25	0,25	0,25	0,06

Para determinar a CFM, os extratos foram testados em concentrações a partir do MIC até 1024ug, os resultados estão contidos na tabela 6, sendo observadas ações letais em espécies de *Candida* spp e *T. rubrum* (Anexo 10).

Tabela 7. Concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos diferentes solventes testados em leveduras e fungos filamentosos.

Extratos	<i>C. albicans</i> 102	<i>C. albicans</i> 146	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>T.rubrum</i>
Hexano	-	-	8	128	-
Etanol 80%	-	32	32	8	-
Diclorometano	256	-	4	64	-
Acetato de etila	-	-	-	32	-
N-butanol	128	64	-	32	-
Água	-	8	4	8	32

5.7 ENSAIO CHECKBOARD

5.7.1 Bactérias

Os valores para as concentrações inibitórias mínimas e o índice da concentração inibitória fracionada da associação Tetra/Extratos frente às cepas de bactérias (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecium*) estão apresentados na Tabela 7. O extrato hexânico foi o único que apresentou sinergismo para três das quatro bactérias testadas, sendo elas *S. aureus* (IFIC: 0,498), *S. epidermidis* (IFIC: 0,01), *E. faecium* (IFIC:0,5).

Tabela 8. Avaliação *in vitro* das interações entre o antibiótico Tetraciclina/Extratos frente às estirpes de bactérias. (Resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$).

Extrato	MIC		FIC(T)-		FIC(E)-		IFIC	Atividade
	MIC(E)	(T)	FIC(T)	FIC(E)	Cal	Cal		
<i>Staphylococcus aureus</i>								
HEX	32	0,25	8	0,062	0,25	0,248	0,498	Sinergismo Tetra
ETOH	1024	0,25	512	0,125	0,5	0,5	1	Aditividade
DIC	256	0,25	128	0,007	0,5	0,028	0,528	Aditividade
ACET	100	0,25	100	0,25	1	1	2	Indiferente
<i>Staphylococcus Epidermidis</i>								
HEX	128	2	16	0,007	0,125	0,0035	0,01	Sinergismo Tetra
<i>Enterococcus faecium</i>								
HEX	64	0,5	16	0,125	0,25	0,25	0,5	Sinergismo

(MIC(E)): Concentração Inibitória Mínima do Extrato; (MIC (T)): Concentração Inibitória Mínima da Tetraciclina; (FIC(T)): Contração Inibitória Fracionada da Tetraciclina; (FIC(E)): Concentração Inibitória do Extrato; (FIC(T)-Cal): Contração Inibitória Fracionada da Tetraciclina Calculada; (FIC(E)-Cal): Contração Inibitória Fracionada do Extrato Calculada (IFIC): Soma do FIC(T)-Cal e FIC(E)-Cal.

5.7.2 Fungos

Para avaliar a atividade sinérgica frente às cepas de fungos (*Candida spp.* e *T. rubrum*), os extratos foram combinados com os antifúngicos convencionais, Fluconazol e Anfotericina B. As Tabelas 8 e 9 contêm os resultados do método checkboard.

Tabela 9. Avaliação *in Vitro* das interações entre o antifúngico Fluconazol/Extratos frente às espécies de *Candida spp.* e *T. rubrum*. (Resultados expressos em µg/mL).

Extrato	MIC		FIC		FIC(F)-		FIC (E)-		Atividade
	MIC(E)	(F)	FIC(F)	(E)	Cal	Cal	IFIC		
<i>Candida albicans 102</i>									
HEX	32	0,5	0,062	16	0,125	0,5	0,625	Aditivo para Hex	
ETOH	8	0,5	0,5	8	1	1	2	Indiferente	
DIC	32	0,5	0,5	32	1	1	2	Indiferente	
ACET	8	0,5	0,25	0,5	0,5	0,062	0,562	Aditivo para Acet	
N-BUT	8	0,5	0,125	0,125	0,25	0,015	0,265	Sinergismo	
AQS	16	0,5	0,125	0,125	0,25	0,007	0,257	Sinergismo	
<i>Candida albicans 146</i>									

HEX	64	0,5	0,5	1	1	0,01	1	Aditividade para Ext
ETOH	16	0,5	0,125	4	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
DIC	32	0,5	0,001	32	0,002	1	1	Aditividade para Ext
ACET	128	0,5	0,5	128	1	1	2	Indiferente
N-BUT	32	0,5	0,5	32	1	1	2	Indiferente
AQS	8	0,5	0,5	8	1	1	2	Indiferente
<i>Candida glabrata</i>								
HEX	2	2	1	0,25	0,125	0,125	0,25	Sinergismo
ETOH	2	2	2	0,5	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
DIC	4	2	0,5	0,125	0,062	0,031	0,093	Sinergismo
ACET	8	2	0,5	0,25	0,062	0,031	0,093	Sinergismo
N-BUT	2	2	1	0,5	0,125	0,25	0,375	Sinergismo
AQS	2	2	2	0,125	0,25	0,062	0,312	Sinergismo
<i>Candida parapsilosis</i>								
HEX	4	2	0,5	0,5	0,25	0,125	0,375	Sinergismo
ETOH	2	2	1	2	0,5	1	1,5	Aditividade
DIC	4	2	0,125	0,25	0,062	0,062	0,125	Sinergismo
ACET	8	2	2	8	1	1	2	Indiferente
N-BUT	4	2	2	4	1	1	2	Indiferente
AQS	4	2	2	4	1	1	2	Indiferente
<i>T. rubrum</i>								
HEX	8	4	2	1	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
ETOH	32	4	4	1	0,125	0,25	0,375	Sinergismo
DIC	512	4	12	4	1	1	2	Indiferente
ACET	128	4	32	0,003	0,25	0,003	0,253	Sinergismo
N-BUT	28	4	6	0,25	0,125	0,062	0,187	Sinergismo
AQS	32	4	2	1	0,062	0,25	0,312	Sinergismo

(MIC(E)): Concentração Inibitória Mínima do Extrato; (MIC (F)): Concentração Inibitória Mínima do Fluconazol; (FIC(F)): Contração Inibitória Fracionada da Tetraciclina; (FIC(E)): Concentração Inibitória do Extrato; (FIC(T)-Cal): Contração Inibitória Fracionada do Fluconazol Calculada; (FIC(F)-Cal): Contração Inibitória Fracionada do Extrato Calculada (IFIC): Soma do FIC(F)-Cal e FIC(E)-Cal.

O sinergismo variou entre as cepas e também para a combinação dos extratos com os dois antifúngicos convencionais. O extrato ACET combinado ao FCZ foi o mais

eficaz frente *C. glabrata* (Anexo 12) e *T. Rubrum*, nos quais apresentaram uma redução da CIM do antifúngico no valor de 7 e 6 vezes menor do que quando isolado.

Com a ANF B, *C. glabrata* (Anexo 13) foi mais sensível à ação dos fármacos assim como *T. rubrum*. O extrato ACET obteve melhor resultado frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. rubrum*, o valor da CIM para a ANF B diminuiu em 4, 7,3 e 3 vezes para as cepas, respectivamente.

Tabela 10. Avaliação *in Vitro* das interações entre o antifúngico Anfotericina B/Extratos frente às espécies de *Candida* spp. e *T. rubrum*. (Resultados expressos em µg/mL).

Extrato	MIC(E)	MIC (A)	FIC(A)	FIC(E)	FIC(A)-Cal	FIC(E)- Cal	IFIC	Atividade
<i>Candida albicans 102</i>								
HEX	32	0,06	0,003	8	0,05	0,25	0,38	Sinergismo
ETOH	8	0,06	0,007	2	0,13	0,25	0,38	Sinergismo
DIC	32	0,06	0,007	8	0,13	0,25	0,38	Sinergismo
ACET	8	0,06	0,003	2	0,05	0,25	0,3	Sinergismo
N-BUT	8	0,06	0,015	1	0,25	0,125	0,375	Sinergismo
AQS	32	0,06	0,015	8	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
<i>Candida albicans 146</i>								
HEX	64	0,25	0,06	16	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
ETOH	16	0,25	0,06	4	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
DIC	32	0,25	0,06	2	0,25	0,03	0,28	Sinergismo
ACET	128	0,25	0,03	32	0,13	0,25	0,38	Sinergismo
N-BUT	32	0,25	0,03	8	0,13	0,25	0,38	Sinergismo
AQS	8	0,25	0,06	2	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
<i>Candida glabrata</i>								
HEX	2	2	0,25	0,125	0,125	0,06	0,185	Sinergismo
ETOH	2	2	0,125	0,125	0,06	0,06	0,12	Sinergismo
DIC	4	2	0,01	0,5	0,005	0,125	0,13	Sinergismo
ACET	8	2	0,01	0,125	0,005	0,015	0,02	Sinergismo
N-BUT	4	2	0,007	0,125	0,003	0,03	0,033	Sinergismo
AQS	2	2	0,007	0,03	0,003	0,015	0,018	Sinergismo
<i>Candida parapsilosis</i>								
HEX	4	2	0,5	1	0,25	0,25	0,5	Sinergismo
ETOH	2	2	0,5	0,25	0,25	0,125	0,375	Sinergismo
DIC	4	2	0,5	0,03	0,25	0,007	0,257	Sinergismo
ACET	8	2	0,25	1	0,125	0,125	0,25	Sinergismo

Extrato	MIC(E)	MIC (A)	FIC(A)	FIC(E)	FIC(A)-Cal	FIC(E)- Cal	IFIC	Atividade
N-BUT	4	2	0,25	0,5	0,125	0,125	0,25	Sinergismo
AQS	4	2	0,5	0,5	0,25	0,125	0,375	Sinergismo
<i>T. rubrum</i>								
HEX	8	0,06	0,015	1	0,25	0,125	0,375	Sinergismo
ETOH	32	0,06	0,007	4	0,13	0,125	0,255	Sinergismo
DIC	512	0,06	0,003	64	0,065	0,125	0,19	Sinergismo
ACET	128	0,06	0,007	8	0,13	0,06	0,19	Sinergismo
N-BUT	128	0,06	0,007	16	0,13	0,123	0,255	Sinergismo
AQS	32	0,06	0,007	8	0,12	0,25	0,38	Sinergismo

(MIC(E)): Concentração Inibitória Mínima do Extrato; (MIC (ANF B)): Concentração Inibitória Mínima da Anfotericina B; (FIC(ANF B)): Contração Inibitória Fracionada da Anfotericina B; (FIC(E): Concentração Inibitória do Extrato; (FIC(T)-Cal): Concentração Inibitória Fracionada da Anfotericina Calculada; (FIC(E)-Cal): Concentração Inibitória Fracionada o Extrato Calculada; (IFIC): Soma do FIC(T)-Cal e FIC(E)-Cal.

6. DISCUSSÃO

6.1 RENDIMENTO

A matriz vegetal de *P. myrtoides* passou por duas etapas, diferenciadas entre ultrassom e seguida pela extração líquido-líquido, nos quais resultaram diferentes rendimentos. Como apresentado na Tabela 2, o extrato de Etanol 80% obteve maior rendimento, com a maior quantidade de compostos polares no material vegetal. Em trabalhos prévios também foi observado que o extrato etanólico apresenta alto rendimento de extração, como das folhas de *Hagenia abyssinica* (Kifle et al., 2021) e *Buddleja polystachya* (Getahun et al., 2021).

Os processos de extração consistem na liberação dos componentes da matriz vegetal, os quais irão reuni-los no mesmo concentrado, a fim de viabilizar sua utilização para outros fins. Para alcançar um produto de melhor qualidade e com ótimo rendimento, é preciso definir métodos, características físico-químicas do substrato, tempo, temperatura, proporção de solvente/material vegetal e o solvente a ser utilizado (Franzen, 2018; Lukitanshing et al, 2020).

O etanol é produzido em escala mundial, tornando-o um solvente de fácil acesso, com baixa toxicidade e possivelmente proveniente de materiais renováveis. É caracterizado como um ótimo solvente, principalmente quando

associado à água, o que potencializa sua função extratora ao ampliar seu espectro de ação e maior rendimento de extrato vegetal (Otta et al., 2017; Baqueta et al., 2017).

6.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos foram determinados após o processo de hidrólise ácida nos extratos e suas frações. A quercetina aglicona foi a substância de maior quantidade, com mais de 60 mg/g na fração acetato de etila de acordo com os dados na tabela 3. Essa substância está presente em outras espécies do mesmo gênero *Psidium* spp. (Bezerra et al., 2020; Macaúbas-Silva et al., 2021; Ortega et al., 2017; Senanayake ET AL., 2018).

A quercetina é flavonoide encontrado em espécies vegetais e pode ser encontrado em seus vários glicosídeos, como quercetina-3-glicosídeo (Q3G ou isoquercitrina, quercetina-4'-glicosídeo (Q4'G), quercetina-3,4'-diglicosídeo (Q3,4'G) e rutina (quercetina-3-rutinoside). De acordo com Yang et al., 2019, a hidrólise ácida foi aplicada na rutina para que sua quantificação fosse realizada, uma vez que é composta por uma molécula de quercetina e um grupo C3, e possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Após realizarem a hidrólise ácida na rutina, puderam observar que a conversão da rutina em quercetina aumentou suas atividades antioxidantes, anti-inflamatória e anti-adipogênica, o que corrobora com os dados deste trabalho.

A hidrólise ácida é um processo de preparação de amostra, um método alternativo para determinação de flavonoides, visto que há uma ampla variedade de glicosídeos para cada flavonoide descrito e nem todos estão disponíveis dentro de padrões comerciais. (Hertog, 1992; Hoffmann-Ribani; Rodriguez-Amaya, 2008). O desfecho desse método pode ser influenciado pelo tipo de açúcar ligado ao flavonoide, solvente utilizado, tempo de extração da desglicosilação, concentração do ácido empregado, temperatura da extração, além da degradação ou mesmo hidrólise incompleta do glicosídeo, então necessita de atenção (Hoffmann-Ribani; Rodriguez-Amaya, 2008). Posteriormente, essa amostra hidrolisada é analisada a partir de métodos cromatográficos, como o UHPLC e pelo espectrômetro de massas (MS), nos quais irão quantificar e identificar os flavonoides agliconas presentes na amostra, ou extrato, como proposto neste trabalho.

Portanto, o método de hidrólise ácida foi eficaz para a determinação dos flavonoides agliconas nos extratos, com maior concentração no acetato de etila e esse é o primeiro estudo com aplicação desse método em extratos brutos e fracionados das folhas de *P. myrtoides*.

6.3 FLAVONÓIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTES

Os extratos ACET e ETOH apresentaram maior concentração de flavonoides totais (Tabela 4). Estes tiveram um perfil químico mais complexo após o processo de hidrólise, além de maiores concentrações de substâncias presentes no cromatograma (Figura 9 e 7). O alto teor de flavonoides presente no extrato de acetato de etila também foi encontrado em outros trabalhos (Nurcholis, 2021; Fadil & Es-Safi, 2022), assim como para o extrato ETOH (Zhang et al, 2021; Long et.al, 2021; Dibacto, 2021).

O extrato acetato de etila da espécie *P. myrtoides* obteve maior concentração de flavonoides totais, com $p < 0,05$. O alto teor é devido a polaridade do solvente, a diversidade dos compostos bioativos encontrados no extrato e também pela elevada quantidade de quercetina expressa após o processo de hidrólise ácida (Dibacto, 2021). O extrato apresenta valores maiores que outras espécies do gênero e, portanto, tem um grande potencial a ser investigado, chegando a mais de 6% do extrato em quercetina aglicona.

Após a identificação e quantificação dessas substâncias, investigou-se o potencial antioxidante desses extratos ricos em flavonoides na eliminação de radicais livres. Portanto, realizaram-se dois métodos padrão de antioxidantes, DPPH e ABTS, e novamente, ACET e ETOH se destacaram como os melhores extratos (Tabela 4). Para o método DPPH, ACET teve melhor resposta, com $P < 0,05$, enquanto para ABTS, não houve diferença significativa.

O IC50 para o DPPH (Tabela 4) dos extratos foram menores que o antioxidante sintético BHA (8,23 $\mu\text{g/mL}$) e o flavonoide isolado rutina (12,09 $\mu\text{g/mL}$), padrões já estabelecidos (Scherer & Godoy, 2009). Essa forte ação oxidante está diretamente relacionada diferentes estruturas estereoquímicas de ABTS⁺ e radicais DPPH, bem como a solubilidade, polaridade e capacidade quelante de metais que podem interferir na ação do extrato (Ita; Eduok, 2022). Além da presença dos compostos majoritários, como a quercetina.

A quercetina tem se destacado em diversas pesquisas, as quais apontam para suas propriedades antioxidantes a partir da sua estrutura química composta por

hidroxilas capazes de sequestrar radicais livres (Li et al., 2018; Xu et al., 2019; Beardsell et al., 2017). Apresentou efeito no estresse oxidativo induzido pela gentamicina *in vitro e in vivo* (Bustos et al., 2016), e no COVID-19, demonstrando a capacidade de interferir na replicação do SARS-CoV-2 (Derosa Et Al., 2020; Di Pierro et al., 2021). Essa substância está presente em extratos de espécies do gênero *Psidium*, como no extrato hidrometanólico das folhas de *P. guineense* (Felipe Do Nascimento et al., 2021), extrato aquoso de *P. guajava* (Dacoreggio; Moroni; Kempka, 2019), apresentando atividade antioxidante e corroborando com os resultados encontrados no presente estudo (Tabela 4).

Após os resultados obtidos nos métodos de flavonóides totais e antioxidante, foi identificado que os extratos com maiores teores de flavonóides também eram os que tinham melhor atividade antioxidante. Portanto, para observar essa relação flavonoide – antioxidante, foi aplicado o teste de correlação de Person.

A Correlação de Person avaliou os flavonoides totais e a capacidade de eliminação de radicais livres nos dois métodos antioxidantes. O valor de $R = -0,9575$ para o DPPH e $R = -0,9502$ para ABTS, demonstrou forte correlação entre flavonoides dos extratos e sua atividade antioxidante. Nesta correlação, o valor de R foi negativo, pois quanto menor a concentração do extrato, melhor sua capacidade antioxidante, o que corrobora com os estudos de Youwei; Jinlian; Yonghong (2008) e Fernandes et al., (2014).

Visto isso, confirma-se que compostos fenólicos são importantes contribuintes para a atividade antioxidante observada nos extratos, e são um dos fatores importantes no efeito benéfico desta planta (El Jemli et al., 2016; Islam; Yu; Xu, 2016). Devido a estrutura química dos flavonoides, eles facilitam a doação de Hidrogênio para os radicais livres, que gera estabilidade nessas moléculas.

Os métodos foram realizados *in vitro*, portanto, deve-se investigar esses dois extratos em modelo *in vivo* para podermos observar se há atuação na eliminação de radicais livres num organismo animal.

6.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.

Dos seis extratos testados, quatro apresentaram atividade inibitória frente às cepas bacterianas, com destaque para o hexano e acetato de etila. Esses dois extratos apresentaram MIC menores que 100 µg para *S. aureus*, e outros estudos também observaram o potencial de inibição do extrato hexânico (Akinyele & Okoh,

2011; Eve, 2020; Akbar et al., 2020), assim como o acetato de etila (Akbar, 2020; Degu et al., 2021; Ling et al., 2021).

A sensibilidade de bactérias gram+ comparada as gram- quando submetidas a produtos naturais, pode ser ocasionada pela ausência de uma membrana externa formada de polipeptídios que é encontrada nas gram- (Mardigan et al., 2016). A membrana externa, além da parede celular e membrana citoplasmática, impedem a chegada das substâncias bioativas na membrana citoplasmática evitando sua desintegração, o que foi observado por outros autores (Zhang et al., 2018; Guimarães et al., 2019).

Esse mecanismo de defesa presente nas bactérias gram- não foi capaz de impedir a forte ação inibitória do extrato hexânico na cepa *E. faecium*, assim como na gram+ *S. aureus*. O solvente hexânico tem a capacidade de extrair compostos apolares, como terpenos e ácidos graxos, cuja ação pode ser diretamente na membrana plasmática causando danos e conseqüentemente o vazamento dos componentes intracelulares. Deste modo, o extrato hexânico pode ser uma aliado contra *E. faecium* e ser uma alternativa contra esse patógeno. Estudos em modelo animal devem ser realizados, para avaliar seu potencial antibacteriano e quanto a sua toxicidade.

6.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os extratos testados apresentaram concentrações de inibição para todas as espécies de *Candida* (Tabela 6). O ETOH destacou-se por apresentar menores concentrações de inibição e letalidade (CFM) para uma maior parcela de cepas de *Candida*, além disso, essa concentração foi igual ao fármaco padrão Fluconazol para *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

A ação de extratos vegetais, em especial etanólicos, foi observada em outros trabalhos (Zhong et al., 2021; Tian & Pugen, 2018; Anibal et al., 2013). Compostos secundários, como os flavonoides, possuem em sua estrutura química o anel aromático mais um grupo hidroxila, nos quais podem atuar na alteração da membrana citoplasmática interferindo no metabolismo energético na produção de ATP e lise da parede celular (Bennett; Rosa; Simo, 2009; Kurek et al., 2011). Dentre esses flavonoides, a quercetina foi um dos compostos de maior concentração no extrato, essa substância pode induzir a apoptose celular nas cepas de *Candida* devido ao seu

potencial antioxidante, como os achados de alguns autores (Dribben; Eisenman; Mennerick, 2010; Kwun; Lee, 2020; Rocha Da Silva et al., 2014).

O extrato ETOH foi o que apresentou concentrações mais baixas frente às espécies de microrganismo testadas. O solvente etanol 80% é de amplo espectro, extraíndo uma grande variedade de compostos bioativos. Dentre esses compostos bioativos, temos a quercetina que demonstrou potencial antifúngico *in vitro* contra espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Alves et al., 2014). Além disso, a presença de outros compostos não identificados foi importante para a forte ação inibitória e letal, o que pode vir a ser uma ação sinérgica entre as substâncias presentes no extrato. Para aumentar as evidências científicas a cerca desse extrato, é necessário estudos *in vivo*, no intuito de observar sua segurança e eficácia

6.6 SINERGIMO

6.6.1 Extratos e Tetraciclina

O uso de antibióticos de forma errônea pode acarretar em espécies resistentes. Visto isso, avaliar a associação de antibióticos com extratos é uma forma de reduzir as chances de ativação dos mecanismos de resistência de bactérias. São relatados na literatura estudos sobre a interação entre extratos vegetais e antibióticos, os quais indicaram sinergia quando combinados (Adwan & Mhanna, 2008 ; Olajuyigbe et al., 2013).

Neste trabalho, a combinação entre extrato hexânico e tetraciclina levou a uma expressiva redução da CIM frente a cepa *S. epidermidis*. A tetraciclina, de forma isolada, apresenta a CIM 8 vezes maior quando comparada a interação com o extrato hexânico. Resultados semelhantes foram observados no estudo (Enemchukwu & Oli, 2019; Akiniele et al., 2017). Outros estudos trazem resultados do sinergismo de extratos com antibióticos β -lactâmicos, como os de (Torres et al., 2017; Akiniele et al., 2017; Zhao, 2001). Estes apresentaram maior sinergismo do que outros grupos de antibióticos, e pode ser explicada pela inibição da síntese de peptídeoglicano a partir do antibiótico junto ao desconserto da membrana celular pelos compostos dos extratos (Akiniele et al., 2017).

Os mecanismos de ação da interação extrato e antibiótico frente bactérias, incluem inibição sequencial de vias bioquímicas comuns, inibição de enzimas protetoras, combinação de agentes ativos de membrana e uso de agentes

membranotrópicos para aumentar a difusão de outros antimicrobianos (Sokolova et al., 2005; Torres et al., 2017).

Staphylococcus aureus é um dos patógenos mais importantes que podem causar supuração, formação de abscessos, uma variedade de infecções piogênicas e até septicemia fatal em humanos. Esta bactéria foi considerada o agente causador da maioria das infecções de pele (Torres et al., 2017), e há cepas resistentes a meticilina e outros betalactâmicos (OMS, 2014). *Staphylococcus epidermidis* é uma das duas causas mais frequentes de infecção hospitalar, e *Enterococcus faecium* corresponde a 9% de infecções sanguíneas (López-Luis et al., 2021).

Os resultados dos testes de sinergismo aqui apresentados sugerem que a combinação da tetraciclina com extrato hexânico das folhas de *P. myrtoides* pode oferecer uma alternativa interessante contra esses microrganismos, portanto é necessário estudos *in vivo* para observar os mecanismos de ação dos compostos utilizados na terapia de combinação.

6.6.2 Extratos e Fluconazol

O extrato ACET combinado ao FCZ foi o mais eficaz frente *C. glabrata* e *T. Rubrum*, o qual apresentou redução da CIM do antifúngico no valor de 7 e 6 vezes menor do que quando isolado.

O sinergismo entre extratos e o fluconazol já é relatado na literatura (Endo, 2010; Santos et al., 2019; Moraes et al., 2017). Em trabalho prévio, o sinergismo da catequina e quercetina com Fluconazol foram avaliados usando cepas de *Candida* sp. resistentes ao Fluconazol. Verificou-se que a associação desses flavonoides com o fármaco desencadeou apoptose celular, despolimerização mitocondrial, acúmulo de ROS (espécies reativas de oxigênio) e danos ao DNA (Alves et al., 2014). Esse resultado corrobora com os achados deste trabalho, onde foi observada atividade sinérgica entre extrato ACET e Fluconazol, além desse extrato apresentar alta concentração de quercetina.

O Fluconazol é um antifúngico com atividade fungistática que atua desestabilizando a membrana fúngica. O mecanismo de ação desta droga consiste na inibição da lanosterol 14 α azol-demetilase (um produto do gene ERG11), que é uma enzima do citocromo P450 essencialmente envolvida na via biossintética do ergosterol (AH & Lucca, 1998). Quando associado a extratos, os compostos fenólicos presentes acessam com maior facilidade o interior da célula, devido à desintegração

membrana plasmática. O ACET é um extrato rico em quercetina, uma substância que atua no aumento de Mg^{2+} causando uma disfunção mitocondrial incluindo a produção de ROS e, eventualmente a apoptose celular (Kwun; Lee, 2020).

Portanto, o sinergismo entre extratos e Fluconazol merecem atenção e estudos *in vivo* devem ser realizados para que novas alternativas de tratamento sejam inseridas em casos clínicos, já que *C. glabrata* é um fungo oportunista, de ampla distribuição e por já apresentar casos de resistência, assim como *T. rubrum*, um fungo dermatófito.

6.6.3 Extratos e Anfotericina B

O extrato ACET obteve melhor resultado frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. rubrum*, o valor da CIM para a ANF B diminuiu em 4, 7,3 e 3 vezes para as cepas, respectivamente

O efeito sinérgico a partir da combinação entre ANF B e extratos já são observados na literatura, por Han (2007), que avaliou a combinação entre extrato de semente de uva e anfotericina B contra cepas de *C. albicans in vitro* e *in vivo* (camundongos). Os autores relataram que os flavonoides tiveram indução imunológica no que ajudou a resistirem à doença causada pelo fungo. Já Silva et al., (2011), observou em estudos *in vitro* a redução do MIC de ANF B de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para 0,06 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando que o óleo essencial foi de extrema importância para a redução do antifúngico convencional. Os estudos corroboram com os achados da nossa pesquisa.

A ação da anfotericina B, antifúngico utilizado no tratamento de infecções fúngicas, ocorre através da sua ligação com membrana plasmática alterando sua permeabilidade que leva a liberação do conteúdo intracelular. Os flavonoides tendem a atuar com maior facilidade na parede celular contribuindo para inibição do crescimento dos fungos, como foi observado no extrato da casca do caule de *Lafoensia pacari* A. St-Hill (Silva Junior et al., 2010). Outro mecanismo de ação das substâncias bioativas é o colapso das células fúngicas através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como foi observado no extrato das raízes de *Scutellaria baicalensi* (Da et al., 2019).

Portanto, o fato de que os extratos e suas frações das folhas de *P. myrtoides* tiverem ação sinérgica, em especial o ACET *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. rubrum* pode ter relevância clínica. Dessa forma, estudos *in vivo* devem ser

realizados para trazer uma alternativa terapêutica para utilização de menores concentrações de ANF B, pelo fato desse fármaco ser um fungicida base para o tratamento de infecções fúngicas e apresentar efeitos adversos como hepato e nefrotoxicidade (Dupont et al., 1996).

7. CONCLUSÃO

A busca de substâncias a partir da flora nativa é uma alternativa para a descoberta de novos fármacos. Estudos dos extratos e frações das folhas de *P. myrtoides* em diferentes atividades biológicas não haviam sido relatados na literatura. No presente trabalho, após a hidrólise ácida, o extrato ACET apresentou maior teor de quercetina, com 6,5% da substância na sua composição, o que pode ser uma fonte de extração, para isolar esse composto e inseri-lo no mercado. O extrato hexânico na sua forma isolada e também quando associado a tetraciclina podem ser uma alternativa ao uso de antibióticos para inibição de bactérias, e o uso em conjunto do extrato hexânico a tetraciclina pode reduzir a resistência bacteriana. Nos fungos, o extrato etanólico se destacou na inibição de cepas de *Candida* sp. em concentrações iguais a antifúngicos usados na clínica. Com isso, ele possui potencial para ser um novo fármaco no tratamento de infecções fúngicas que acomete milhares de pessoas anualmente. No efeito sinérgico, o extrato ACET foi o que mais apresentou interação positiva com FCZ e ANF B para cepas de *Candida* sp., com concentrações de inibições inferiores a antifúngicos isolados. Portanto, esses resultados fortalecem o potencial terapêutico da combinação entre extrato/antifúngico para o tratamento de infecções fúngicas e na redução da resistência fúngica acometida por fármacos padrões utilizados de forma isolada e equivocada. Além disso, a combinação dos compostos poderá diminuir a hepato e nefrotoxicidade causada pela ANF B. Pesquisas mais avançadas, como *in vivo* e clínica, devem ser realizadas para observar mecanismos de ação e produção de um novo fármaco no mercado para tratamento terapêutico de infecções bacterianas e fúngicas.

8. REFERÊNCIAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27,

n. 2, p. 394–400, 2007.

AHMAD, N. et al. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chemistry**, v. 190, p. 80–89, 2016.

AKINYELE, T. A. et al. In vitro assessment of the synergism between extracts of *Cocos nucifera* husk and some standard antibiotics. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 306–313, 1 abr. 2017.

ALAYANDE, K. A.; POHL, C. H.; ASHAF, A. O. T. Significance of combination therapy between *Euclea crispa* (Thunb.) (leaf and stem bark) extracts and standard antibiotics against drug resistant bacteria. **South African Journal of Botany**, v. 118, p. 203–208, 1 set. 2018.

ALCAINE, S. D.; WARNICK, L. D.; WIEDMANN, M. **Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal Salmonella** *Journal of Food Protection*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/70/3/780/1679504/0362-028x-70_3_780.pdf>.

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. [s.d.].

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

ALVES, M. S. M. et al. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 215–221, 2010.

ANASTASIADI, M. et al. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 805–813, 2010.

ANESTESIOLOGIA, M. A Farmacobotânica , Ainda tem Lugar na. v. 52, p. 368–380, 2002.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista Institucional Adolfo lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ARAUJO C. R; ET.AL. **Identificação das leveduras do gênero Candida por métodos manunais convencionais e pelo método cromógeno chromoagar candida.** *Revista de Patologia Tropical*, , 2005.

Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. 2021.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense.

Quimica Nova, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARROS, L. M. et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 429–435, 2012.

BASSETTI, M.; PEGHIN, M.; TIMSIT, J. F. The current treatment landscape: Candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. ii13–ii22, 2016.

BEARDSELL, D. V. et al. DFT study of chemical reactivity of free radicals ABTS° + and DPPH° by Myricetin, Quercetin and Kaempferol. **Natural Product Research**, v. 24, n. 1, p. 435–444, 2017.

BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, · PIOTR. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, [s.d.].

BELTRESCHI, L.; DE LIMA, R. B.; DA CRUZ, D. D. Traditional botanical knowledge of medicinal plants in a “quilombola” community in the Atlantic Forest of northeastern Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, v. 21, n. 3, p. 1185–1203, 2019.

BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S.; SIMO, M. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. p. 746–757, 2009.

BEZERRA, C. F. et al. UPLC-MS-ESI-QTOF analysis and Anti-Candida activity of fractions from Psidium guajava L. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 421–427, 2020.

BFG - THE GROUP BRAZIL. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

BOFF, B. D. S. et al. Artigo Investigação da presena de efedrinas em Ephedra tweediana Fisch. v. 18, n. 3, p. 394–401, 2008.

BORGES, F. V.; SALES, M. D. C. Políticas Públicas De Plantas Medicinai s E Fitoterápicos No Brasil: Sua História No Sistema De Saúde. **Pensar Acad mico**, v. 16, n. 1, p. 13–27, 2018.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE.SECRETARIA DE ATENO   SAÚDE.DEPARTAMENTO DE ATENO BÁSICA. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: uma ao de inclusão**. [s.l: s.n.]. v. 11

BRASIL, O. Prevalência de infeco es fúngicas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis , Rio Grande do Sul. v. 51, n. 3, 2019.

BRITO, M. F. M. DE; MARÍN, E. A.; CRUZ, D. D. DA. MEDICINAL PLANTS IN RURAL SETTLEMENTS OF A PROTECTED AREA IN THE LITTORAL OF NORTHEAST BRAZIL. **Ambiente & Sociedade**, v. 20, n. 1, p. 83–104, mar. 2017.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. DE M. A utilizao

da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: A visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675–2685, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 1 ago. 2004.

BUSTOS, P. S. et al. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 253–264, 1 dez. 2016.

BY, C.; NEILL, J. I. M. O. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON. n. May, 2016.

CABRAL, C.; PITA, J. R. **Alcalóides – Relevância na Farmácia e no Medicamento**. [s.l: s.n.].

CALAINHO, D. B. Jesuítas e medicina no Brasil colonial. **Tempo**, v. 10, n. 19, p. 61–75, 2005.

CHARNEAU, S. et al. In vitro investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against Plasmodium falciparum, Trypanosoma cruzi and T. brucei gambiense. **Natural Product Research**, v. 30, n. 11, p. 1320–1326, 2016.

CLARK, N. A. Surface Memory Effects in Liquid Crystals : Influence of Surface Composition. v. 55, n. 3, 1985.

CLEOMACEAE, R. et al. Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Chemical composition and anti- Candida potencial of the extracts of Tarenaya. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 64, n. December 2018, p. 14–19, 2019.

CLSI. M26-A Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline This document provides procedures for determining the lethal activity of antimicrobial agents. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, n. September, 1999.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 19 jul. 2006.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CRISTINA, A. et al. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. p. 1–12, 2019.

CRISTINA, M.; DUARTE, T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. [s.d.].

DA, X. et al. Antifungal activity and mechanism of action of Ou-gon (Scutellaria root extract) components against pathogenic fungi. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

DACOREGGIO, M. V.; MORONI, L. S.; KEMPKA, A. P. Antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities and surface disinfection of the extract of *Psidium cattleianum* sabine leaves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101295, 1 set. 2019.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 74, n. 3, p. 1092–2172, 2010.

DE MACÊDO, D. G. et al. Seasonality influence on the chemical composition and antifungal activity of *Psidium myrtoides* O. Berg. **South African Journal of Botany**, v. 128, p. 9–17, 2020.

DEROSA, G. et al. A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Phytotherapy Research**, 2020.

DI PIERRO, F. et al. Potential clinical benefits of quercetin in the early stage of COVID-19: Results of a second, pilot, randomized, controlled and open-label clinical trial. **International Journal of General Medicine**, v. 14, p. 2807–2816, 2021.

DIAS, A. L. B. et al. Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research**, v. 33, n. 17, p. 2566–2570, 2019.

DO NASCIMENTO, K. F. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 351–358, 10 jan. 2018.

DRIBBEN, W. H.; EISENMAN, L. N.; MENNERICK, S. Magnesium induces neuronal apoptosis by suppressing excitability. **Cell Death and Disease**, p. 63, 2010.

DURÃES, E. R. B.; PAULA, J. A. M. DE; NAVES, P. L. F. Gênero *Psidium*: Aspectos Botânicos, Composição Química e Potencial Farmacológico. p. 33–40, [s.d.].

DUTRA, V. F.; ALVES-ARAÚJO, A.; CARRIJO, T. T. Angiosperm Checklist of Espírito Santo: Using electronic tools to improve the knowledge of an Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1145–1152, 2015.

EL JEMLI, M. et al. Radical-Scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, 2016.

ENDO, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 534–540, 1 set. 2010.

ESPECIAL, A. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides *. v. 55, p. 135–

146, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A. **Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi** *Rev Iberoam Micol.* [s.l: s.n.].

FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. v. 9007, n. 02, p. 872–879, 2002.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee 1. v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FERNANDES, M. R. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39–44, 2014.

FILHO, H. D. F. L. Considerações sobre a florística de florestas tropicais e sub-tropicais do Brasil. **Ipef**, v. 35, n. 1987, p. 41–46, 1987.

FILIPOVIĆ, M. et al. QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. **Comptes Rendus Chimie**, v. 18, n. 5, p. 492–498, 1 maio 2015.

FORIM, M. R. et al. Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtilodes* O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research**, v. 6419, p. 1–5, 2018.

FOWLER, Z. L. et al. Development of Non-Natural Flavanones as Antimicrobial Agents. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 25681, 2011.

GAFFI. Report on activities for 2020. n. March 2021, 2020.

GETAHUN, A. et al. In vivo evaluation of 80% methanolic leaves crude extract and solvent fractions of *buddleja polystachya fresen* (buddlejaceae) for wound healing activity in normal and diabetic mice. **Metabolism Open**, v. 11, p. 100110, 1 set. 2021.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. p. 145–150, 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS Leonardo Gobbo-Neto e Norberto P. Lopes*. v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes : anticancer and antimicrobial activity. 2011.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. **Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes** *Química Nova*, 2010.

GUINOISEAU, E. et al. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. [s.d.].

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?** *British Journal of Pharmacology* British Journal of Pharmacology, , 2004.

HENDRA, R. et al. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl Fruit. *Int. J. Mol. Sci*, v. 12, p. 3422–3431, 2011.

HENRIQUE, F.; LUIS, R.; MARIA, P. Uso de plantas medicinais : Histórico e relevância Use of medicinal plants: History and relevance Uso de las plantas medicinales : Historia y relevancia. v. 2021, p. 1–11, 2021.

HISTÓRICO, U. S. O. et al. ARTIGO SOBRE PLANTAS MEDICINAIS * ON MEDICINAL PLANTS. 2011.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. *Química Nova*, v. 31, n. 6, p. 1378–1384, 2008.

HOUËL, E. et al. Wayanin and guajaverin, two active metabolites found in a *Psidium acutangulum* Mart. ex DC (syn. *P. personii* McVaugh) (Myrtaceae) antimalarial decoction from the Wayana Amerindians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 187, p. 241–248, 1 jul. 2016.

ISLAM, T.; YU, X.; XU, B. Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *LWT - Food Science and Technology*, v. 72, p. 423–431, 1 out. 2016.

ITA, B. N.; EDUOK, S. I. In vitro antioxidant and antifungal activities of *Rhizophora racemosa* G.F.W. Mey. stem bark extracts. *Scientific African*, v. 15, p. e01091, 1 mar. 2022.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. • **ANTIMICROBIAL RESISTANCE Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 120–128, 2008.

KESZEI, ANDRAS; BRUBAKER, CURT; FOLEY J, W. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. p. 197–213, 2008.

KHANNA, K. et al. Herbal immune-boosters: Substantial warriors of pandemic Covid-19 battle. *Phytotherapy*, v. 85, p. 153361, 1 maio 2021.

KIFLE, Z. D. et al. In vivo hypoglycemic, antihyperglycemic and antidyslipidemic effects of the solvent fractions of *Hagenia abyssinica* leaves in mice. *Metabolism Open*, v. 12, p. 100139, 1 dez. 2021.

KO, R. J. Causes , Epidemiology , and Clinical Evaluation of Suspected Herbal Poisoning. v. 37, n. 6, p. 697–708, 1999.

KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, v. 13, n. 1, p.

8–17, 2002.

KUCUKATES, E. et al. Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agents. [s.d.].

KUMAR, A. et al. Role of herbal medicines in the management of patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 11 jan. 2022.

KUREK, A. et al. New Antibacterial Therapeutics and Strategies. v. 60, n. 1, p. 3–12, 2011.

KWUN, M. S.; LEE, D. G. Quercetin-induced yeast apoptosis through mitochondrial dysfunction under the accumulation of magnesium in *Candida albicans*. **Fungal Biology**, v. 124, n. 2, p. 83–90, 1 fev. 2020.

LAMBERT, R. J. W. et al. **A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol**. [s.l: s.n.].

LARRU, B.; ZAOUTIS, T. E. **Newer antifungal agents** *Current Opinion in Pediatrics*, 2013.

LAUDY, A. E. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family **CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME MEDICINAL PLANTS FROM LAMIACEAE FAMILY**. n. August, 2015.

LEÃO, K. M. M. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity in novel systems containing buriti oil and structured lipids nanoemulsions. **Biotechnology Reports**, v. 24, 2019.

LI, F. et al. The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent. **Food Research International**, v. 111, p. 351–360, 1 set. 2018.

LIU, Y. et al. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. 2015.

LÓPEZ-LUIS, B. A. et al. Risk factors and outcomes associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and ampicillin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteraemia: A 10-year study in a tertiary-care centre in Mexico City. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 198–204, 1 mar. 2021.

LOZANO, A. et al. The apparency hypothesis applied to a local pharmacopoeia in the Brazilian northeast. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2014.

LUEPKE, K. H. et al. Past , Present , and Future of Antibacterial Economics : Increasing Bacterial Resistance , Limited Antibiotic Pipeline , and Societal Implications. v. 2050, 2016.

MACAÚBAS-SILVA, C. et al. Araçain, a tyrosol derivative and other

phytochemicals from *Psidium guineense* Sw. **Natural Product Research**, v. 35, n. 14, p. 2424–2428, 2021.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antimicrobial therapy: principles of use. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 614–621, 1 out. 2017.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449–460, out. 2006.

MARTINS, C. R.; ARAÚJO, W.; BITTENCOURT, J. *Quim. Nova*, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions : A review. v. 211, p. 41–50, 2016.

MEDICINALES AROMÁTICAS, P. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de*. 2017.

MEERSSEMAN, W. et al. Invasive Aspergillosis in Critically Ill Patients without Malignancy. [s.d.].

MEHTA, P. et al. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants—A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 4, p. 207–227, 1 out. 2015.

MELO CARNEIRO, F. et al. TENDÊNCIAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL Trends of studies for medicinal plants in Brazil. n. 2, p. 44–75, 2014.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, F. C. Artigo Carotenoides : Propriedades , Aplicações e Mercado Carotenoids : Properties , Applications and Market Carotenoides : Propriedades , Aplicações e Mercado. v. 9, n. 2, 2017.

MICHAEL, C. A. et al. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. 2014.

MIRZAEI, R. et al. Prevention, inhibition, and degradation effects of melittin alone and in combination with vancomycin and rifampin against strong biofilm producer strains of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 147, p. 112670, 1 mar. 2022.

MONIZ, A. M. H. et al. Biological evaluation of essential oil from green fruits of *psidium striatum* of the roraima state, Brazil. **Chemical Engineering Transactions**, v. 75, n. September 2018, p. 379–384, 2019.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 200–207, 2016.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; PRANCE, G. T. Distribution Patterns and

Conservation of Eastern Brazilian Coastal Forest Tree Species. **Brittonia**, v. 33, n. 2, p. 233, 1981.

NICHELE, S. M.; ZIMMERMANN, E. S. MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE VORICONAZOL NO THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF VORICONAZOLE. p. 581–590, 2019.

NOLETO DIAS, C. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). 2015.

OLAJUYIGBE, O. O. et al. Evaluation of Combination Effects of Ethanolic Extract of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. and Antibiotics against Clinically Important Bacteria Academic Editors. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

OLIVEIRA, F. C. DE; ALBUQUERQUE, U. P. DE; STERN, V. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. 2009.

ONITSUKA, S.; HAMADA, T.; OKAMURA, H. Preparation of antimicrobial gold and silver nanoparticles from tea leaf extracts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 242–248, 1 jan. 2019.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10–36, 1 ago. 2015.

ORTEGA, J. T. et al. **Glycosylated flavonoids from psidium guineense as major inhibitors of HIV-1 Replication in vitro** **Natural Product Communications**, 2017.

PARREIRA, A. G.; LIMA, W. G. DE. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais Potencial antifúngico e antibacteriano de extratos vegetais da região de Divinópolis / MG Antifungal and antibacterial potential of vegetable extracts of the Divinópolis / MG region. p. 25–37, 2018.

PEDROLLO, C. T. et al. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 111–124, 20 jun. 2016.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. [s.d.].

PETROVSKA, B. B. **Historical review of medicinal plants' usage** **Pharmacognosy Reviews**, 2012.

PFALLER, M. A. et al. Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 2, p. 162–171, 1 jun. 2010.

PIDDOCK, L. J. V. The crisis of no new antibiotics — what is the way forward ? p. 249–253, 2012.

PRASANTHI, D.; LAKSHMI, P. K. Terpenes: Effect of lipophilicity in enhancing transdermal delivery of alfuzosin hydrochloride. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [s.d.].

PYUN, M. S.; SHIN, S. Antifungal effects of the volatile oils from Allium plants against Trichophyton species and synergism of the oils with ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 394–400, 12 jun. 2006.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E/OU CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS ENCONTRADOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA Sonia C. N. Queiroz, Carol H. Collins e Isabel C. S. F. Jardim. v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RADOJKOVIĆ, M. et al. Biological activities and chemical composition of Morus leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 117, p. 50–58, 1 nov. 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1 maio 1999.

Redalyc.O USO TERAPÊUTICO DA FLORA NA HISTÓRIA MUNDIAL. 2015.

RIBEIRO, D. A. et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522–1533, 29 set. 2014.

ROBERT, L. ScienceDirect Longevity and aging . Role of free radicals and xanthine oxidase . Longe Une revue. v. 62, p. 61–66, 2014.

ROCHA DA SILVA, C. et al. Synergistic Effect of the Flavonoid Catechin, Quercetin, or Epigallocatechin Gallate with Fluconazole Induces Apoptosis in Candida tropicalis Resistant to Fluconazole. 2014.

ROCKENBACH, I. I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (Vitis vinifera) variedades Tannat e Ancelota Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity . **Food Science and Technology**, v. 28, n. 002600, p. 238–244, 2008.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. **Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches**Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2014. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>>

ROSATO, A. et al. The inhibition of Candida species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 635–638, 1 ago. 2008.

SABER, F. R. et al. UPLC/QTOF/MS profiling of two Psidium species and the in-vivo hepatoprotective activity of their nano-formulated liposomes. **Food Research International**, v. 105, p. 1029–1038, 1 mar. 2018.

SAKAGAMI, Y. et al. Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. **Phytomedicine**, v. 12, n. 3, p. 203–208, 22 mar. 2005.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M. et al. (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC–MS approach. **Food Chemistry**, v. 212, p. 250–255, 1 dez. 2016.

SANGLARD, D. et al. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. [s.d.].

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLEORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. 2015.

SARDI, J. DE C. O. et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 4, p. 387–391, 1 dez. 2016.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654–658, 1 fev. 2009.

SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 101–108, 12 fev. 2016.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. **Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review** *Journal of Functional Foods*, 2015.

SHARIFZADEH, A. et al. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 390–396, 1 jun. 2017.

SHARIFZADEH, A. et al. Potential effect of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol) alone and in combination with fluconazole against clinical isolates of *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p. 294–299, 1 jun. 2018.

SILVA JUNIOR, I. F. et al. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 422–428, jul. 2010.

SILVA, M.; NASCIMENTO, E. D. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. v. 42, 2006.

SOARES, E. R. et al. Compostos bioativos em alimentos , estresse oxidativo e inflamação : uma visão molecular da nutrição. p. 64–72, [s.d.].

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. LC–MS analysis and cytoprotective effect

against the mercurium and aluminium toxicity by bioactive products of *Psidium brownianum* Mart. ex DC. **Journal of Hazardous Materials**, v. 370, p. 54–62, 15 maio 2019.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 13, 2013.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. Overcoming antifungal resistance. 2014.

THORNHILL, A. H. et al. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 93, p. 29–43, 2015.

TORRES, C. A. et al. Antibacterial synergism of extracts from climbers belonging to Bignoniaceae family and commercial antibiotics against multi-resistant bacteria. **Journal of Herbal Medicine**, v. 8, p. 24–30, 1 jun. 2017.

TULER, A. C. et al. Flora of Espírito santo: *Psidium* (Myrtaceae). **Rodriguesia**, v. 68, n. 5, p. 1791–1805, 2017.

TULER, A. C. et al. Diversification and geographical distribution of *Psidium* (Myrtaceae) species with distinct ploidy levels. **Trees - Structure and Function**, v. 33, n. 4, p. 1101–1110, 2019.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. **Plant-based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaction between natural products** *Planta Medica*, 2011. Disponível em: <10.1055/s-0030-1250736>

VAZ, P. et al. FLORA E VEGETAÇÃO DO BRASIL NA CARTA DE CAMINHA NA Tarciso S. Filgueiras^{1 3} Ariane Luna Peixoto^{2 3} Introdução O descobrimento do Brasil está documentado em várias fontes primárias que podem ser divididas em três grupos: cartas escr. v. 16, n. 3, p. 263–272, 2002.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis - Causes and Threats. **P & T journal**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 5. ed. [s.l: s.n.].

VON DÖHREN, H. Antibiotics: Actions, origins, resistance, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 pp. \$99.95 (hardcover). **Protein Science**, v. 13, n. 11, p. 3059–3060, 2009.

XU, D. et al. **Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application** *Molecules*, 2019. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/molecules>

YANG, J. et al. Conversion of Rutin to Quercetin by Acid Treatment in Relation

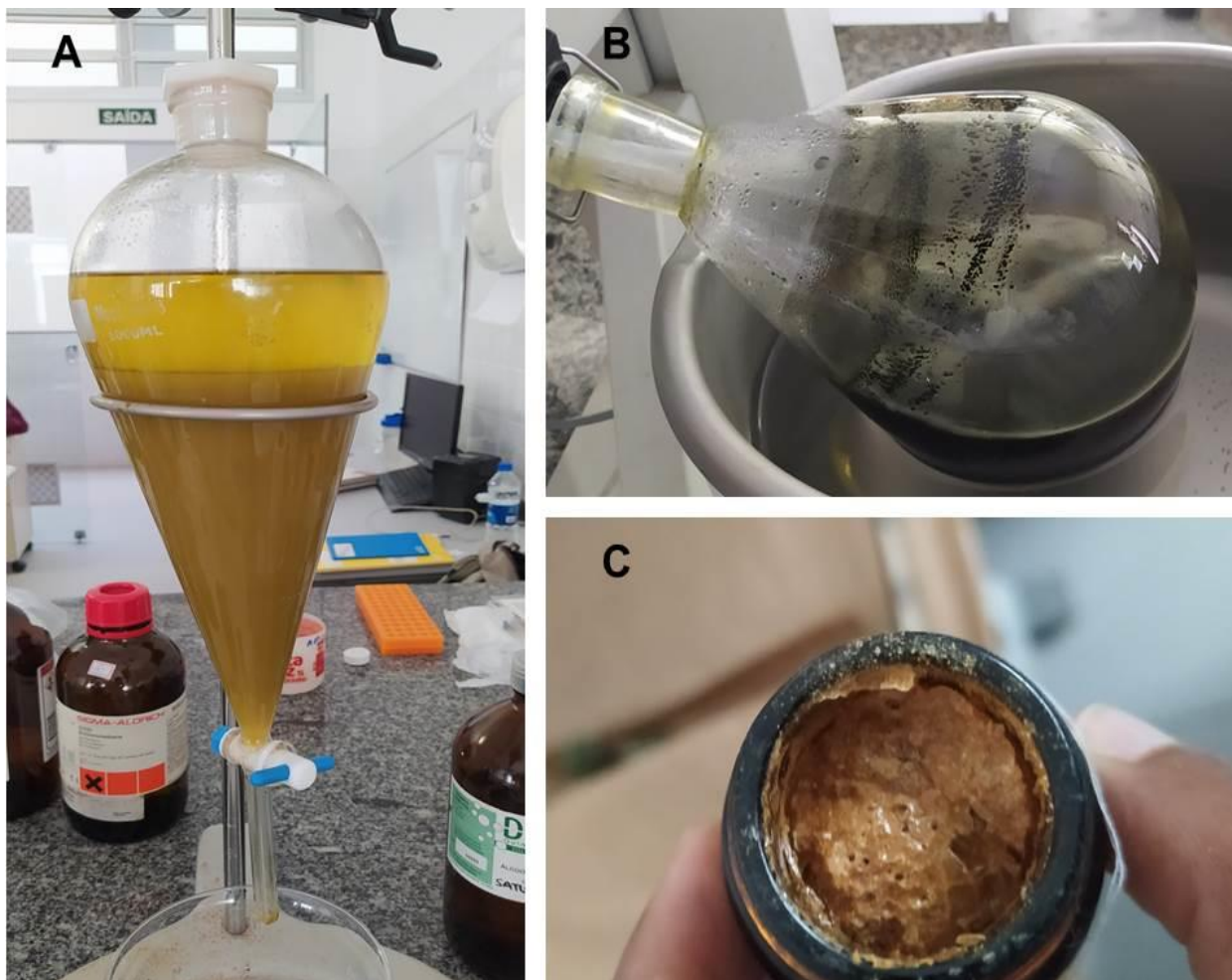
to Biological Activities. 2019.

YAZBEK, P. B. et al. Plants utilized as medicines by residents of Quilombo da Fazenda, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brazil: A participatory survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 112123, 15 nov. 2019.

YOUWEI, Z.; JINLIAN, Z.; YONGHONG, P. A comparative study on the free radical scavenging activities of some fresh flowers in southern China. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1586–1591, 1 nov. 2008.

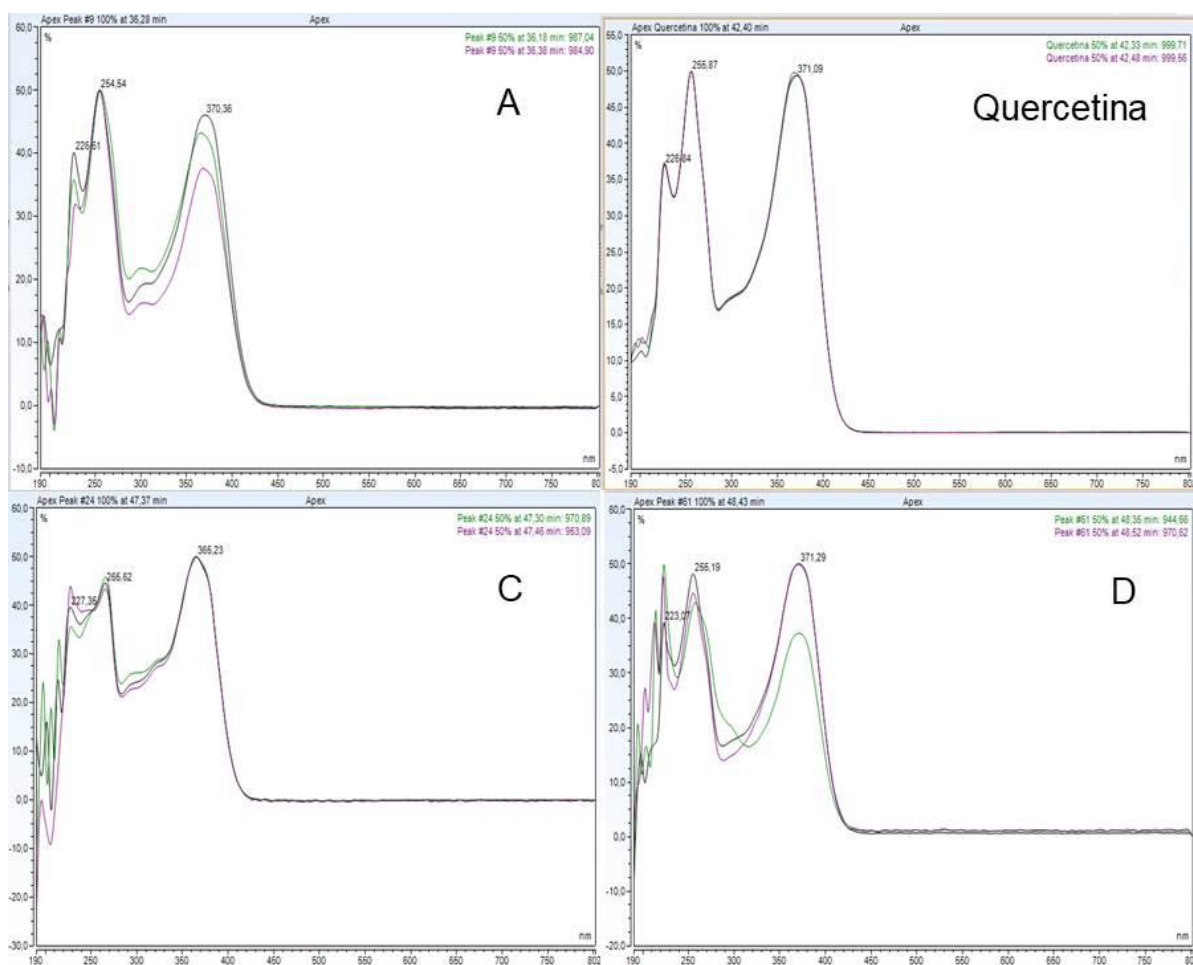
9. ANEXOS

ANEXO 1. PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS EXTRATOS E SUAS FRAÇÕES.



(A): Extração líquido-líquido; (B) Extrato no rotaevaporador – eliminação do solvente; (C): Extrato liofinizado.

ANEXO 2. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS QUATRO COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS APÓS A HIDRÓLISE ÁCIDA.



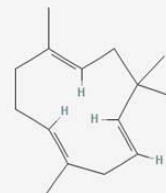
(Letras: A, C, D): compostos não identificados por HPLC nos extratos e frações das folhas de *P. myrtooides*. Detector DAD:259 nm

ANEXO 3. ESTRUTURA QUÍMICA DOS TERPENOS.

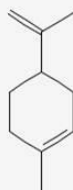
TERPENOS

 β -cariofileno

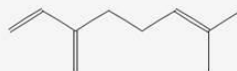
Eucaliptol



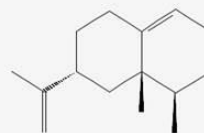
Humuleno



Limoneno



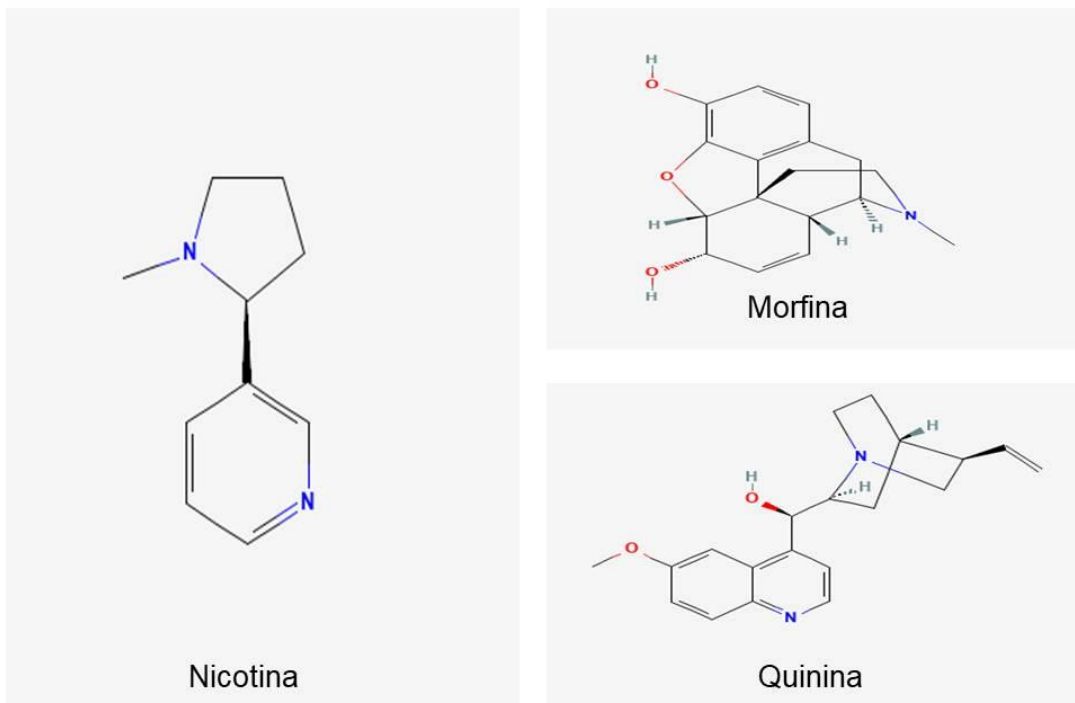
Mirceno



Velenceno

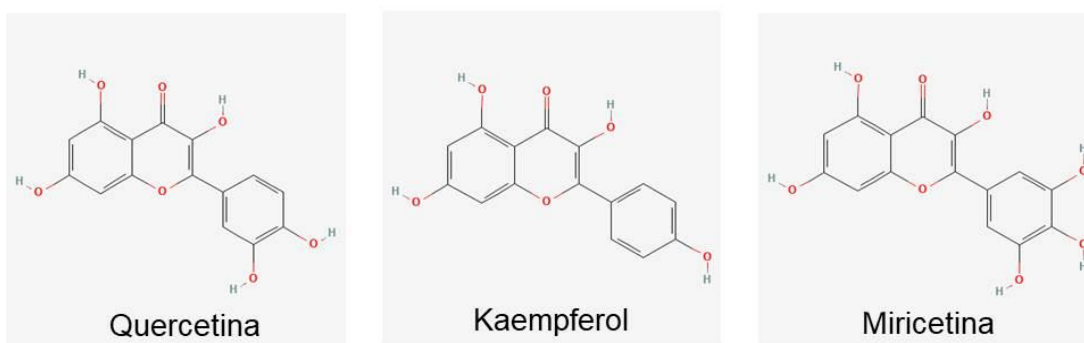
ANEXO 4. ESTRUTURA QUÍMICA DOS ALCALOIDES.

ALCALÓIDES

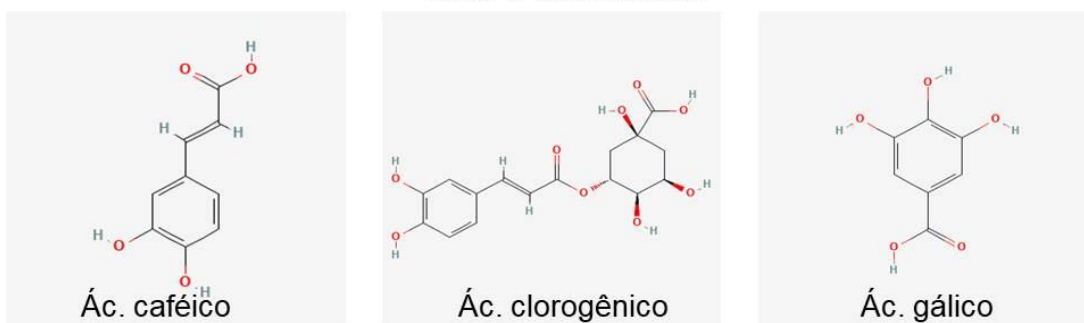


ANEXO 5. ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.

Flavonoides

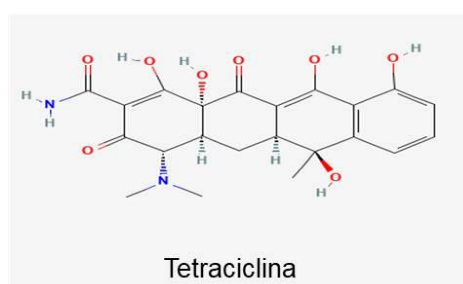
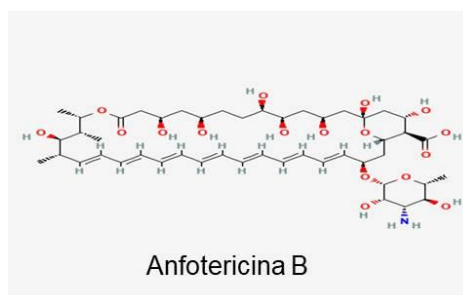
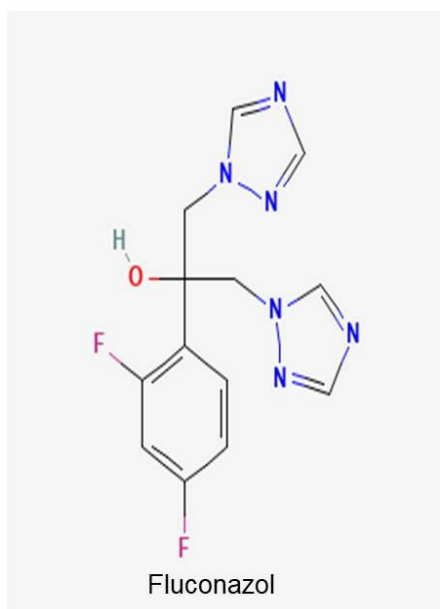


Não Flavonoides



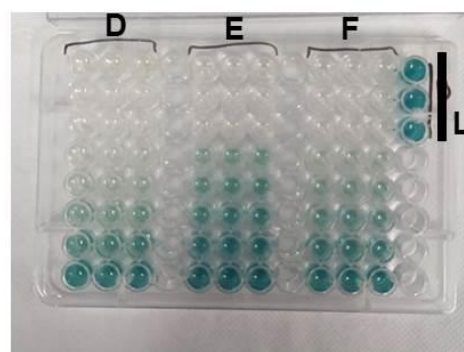
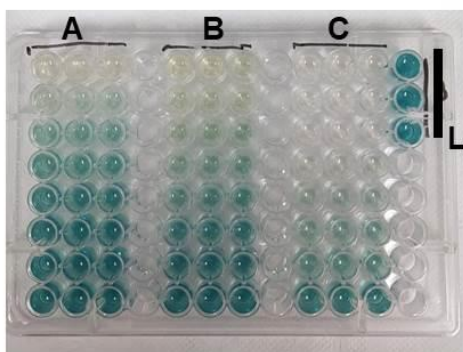
ANEXO 6. ESTRUTURA QUÍMICA DE ANTIMICROBIANOS (ANTIFÚNGICOS E ANTIBIÓTICOS).

ANTIMICROBIANOS

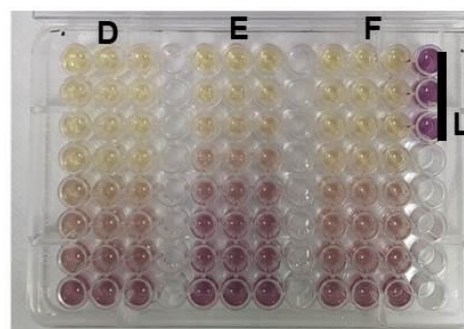
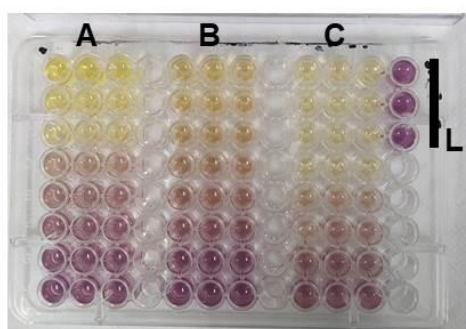


ANEXO 7. ENSAIOS ANTIOXIDANTES COLORIMÉTRICOS DPPH E ABTS.

ENSAIO ABTS



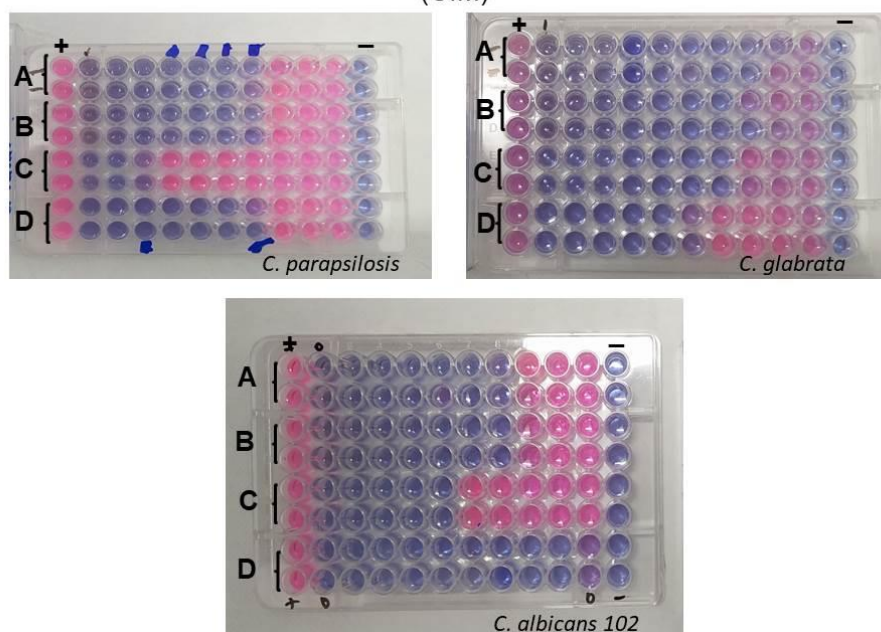
ENSAIO DPPH



(A): Extrato HEX; (B): Extrato DIC; (C): Extrato ETOH; (D): Extrato ACET; (E): Extrato N-BUT; (F): Extrato AQS; (L): Controle.

ANEXO 8. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – FUNGOS

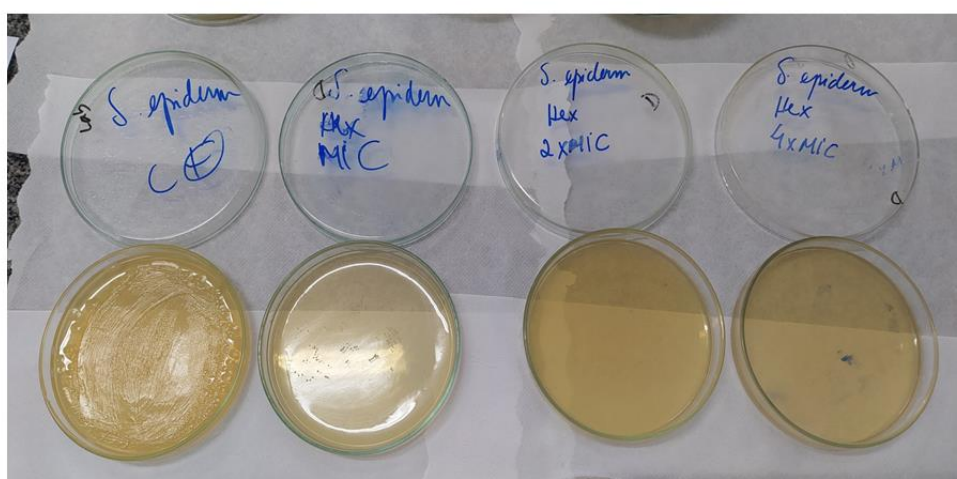
CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)



(A): Extrato HEX; (B): Extrato ETOH; (C): Extrato ACET; (D): Extrato AQS; (+): Controle +; (-): Controle -; (Rosa): crescimento do fungo; (Azul): inibição do fungo.

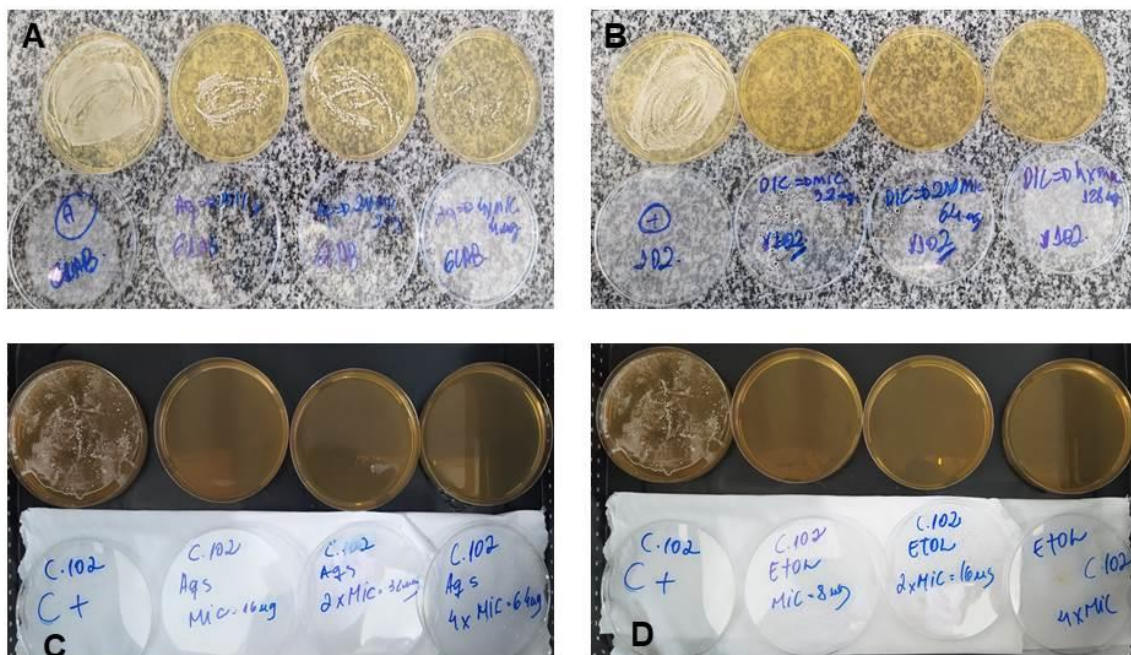
ANEXO 9. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA.

CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)



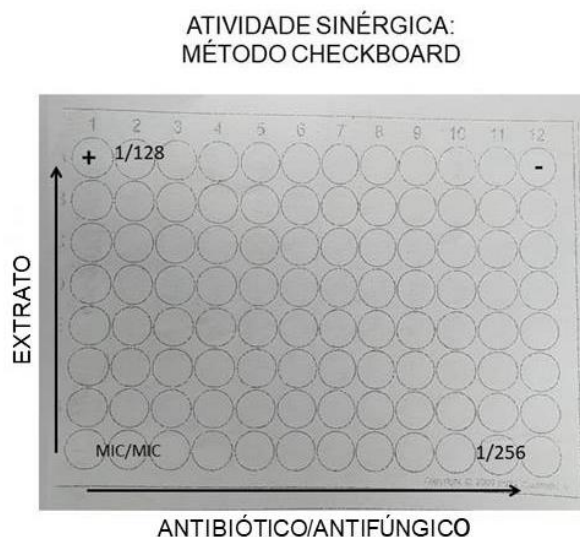
(C+): controle +; (CIM): concentração inibitória mínima; (2xMIC): 2x a concentração inibitória mínima; (4xMIC): 4x a concentração inibitória mínima – concentração letal do extrato HEX frente a cepa *S. epidermidis*.

ANEXO 10. CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA.

CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA
(CFM)

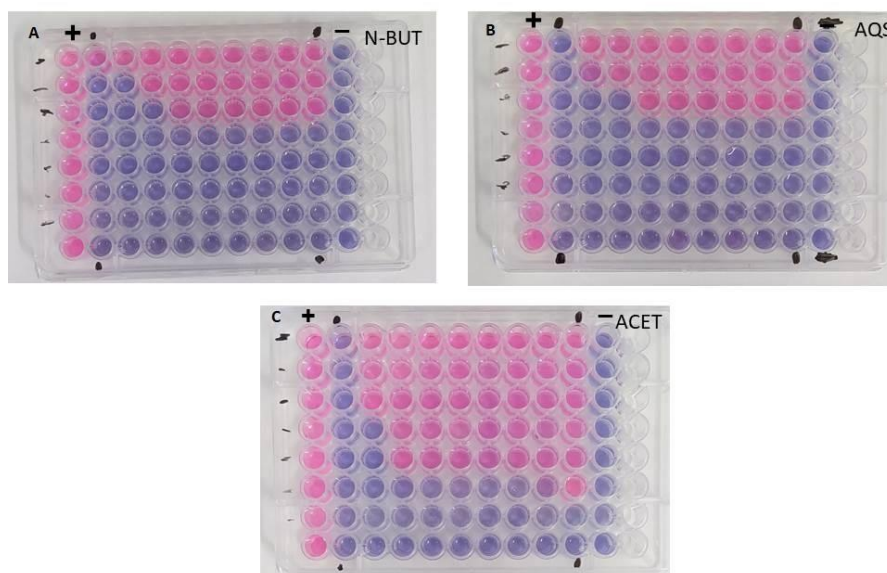
(A): *C. glabrata* e extrato AQS nas concentrações MIC, 2xMIC, 4xMIC; (B): *C. albicans* 102 e extrato DIC nas concentrações MIC, 2xMIC, 4xMIC; (C) *C. albicans* 102 e extrato AQS nas concentrações MIC, 2xMIC, 4xMIC; (D): *C. albicans* 102 e extrato ETOH nas concentrações MIC, 2xMIC, 4xMIC. *Houve crescimento das espécies em todas as concentrações.

ANEXO 11. MÉTODO CHECKBOARD – TABULEIRO XADREZ.



ANEXO 12. ENSAIO CHECKBOARD ENTRE EXTRATOS E FLUCONAZOL FRENTE A *C. GLABRATA*.

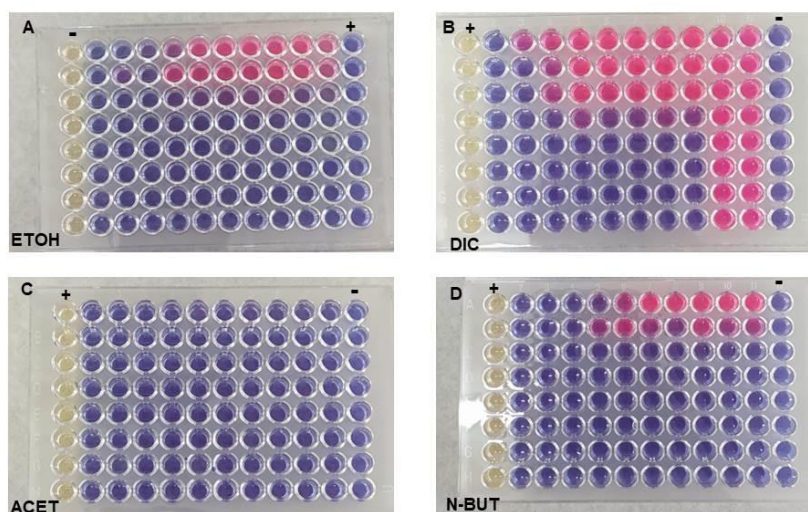
ATIVIDADE SINÉRGICA
(FCZ+ EXTRATOS – *C. glabrata*)



(A): Extrato N-But; (B): Extrato AQS; (C): Extrato ACET; (+): Controle +; (-): Controle -; (Rosa): crescimento do fungo; (Azul): inibição do fungo.

ANEXO 13. ENSAIO CHECKBOARD ENTRE EXTRATOS E ANFOTERICINA B FRENTE A *C. GLABRATA*.

ATIVIDADE SINÉRGICA
(ANF + EXTRATOS - *C. glabrata*)



(A): Extrato ETOH; (B): Extrato DIC; (C): Extrato ACET; (D): Extrato N-BUT; (+): Controle +; (-): Controle -; (Rosa): crescimento do fungo; (Azul): inibição do fungo.