



MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA  
DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS DE PLANTAS DA  
FAMÍLIA *MYRTACEAE* FRENTE AO MICRO-ORGANISMO *Escherichia  
coli*.**

Paula Bianchetti

Lajeado, fevereiro de 2014

Paula Bianchetti

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA  
DE EXTRATOS AQUOSOS E ETANÓLICOS DE PLANTAS DA  
FAMÍLIA *MYRTACEAE* FRENTE AO MICRO-ORGANISMO *Escherichia  
coli*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Eduardo Miranda Ethur

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Simone Stülp

Lajeado, fevereiro de 2014



“A morte do homem começa  
no instante em que  
desiste de aprender”

(Albino Teixeira)

## AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo apoio incondicional, amizade, paciência, compreensão, incentivo na busca pelos meus ideais, respeito e amor, virtudes que são o norte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur, que além de orientador e exemplo de profissional, foi sempre um grande amigo.

A minha co-orientadora Simone Stülp, pela disponibilidade, dedicação e exemplo de profissional, pela paciência e amizade.

Aos amigos do Núcleo de Eletrofotoquímica e materiais poliméricos e do Laboratório de Produtos Naturais que sempre estiveram presentes, me ouvindo durante este trabalho.

## RESUMO

*Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria enteropatogênica que ocorre naturalmente na microbiota intestinal, sendo que seus efeitos patogênicos ocorrem, principalmente, por inadequado tratamento dos alimentos, tanto no processo de cozimento como nos processos de higienização. Como resposta a infecção por esta bactéria ocorrem diarreias e desidratação que podem levar ao óbito. Na cultura popular é comum a utilização de plantas com fins medicinais para obter a cura de patologias, no entanto é necessário que sejam realizados estudos sobre as plantas a serem utilizadas, pois elas apresentam uma grande e diversificada gama de compostos. Entre eles se podem citar os compostos fenólicos que são os principais metabólitos secundários das plantas. As plantas da família *Myrtaceae* são muito conhecidas pela sua composição química, que envolve uma interessante quantidade de compostos fenólicos, estes estão relacionados a ação antimicrobiana de diversos extratos de plantas. O objetivo deste trabalho foi quantificar os compostos fenólicos por espectrofotometria, identificar a atividade antioxidante por voltametria cíclica avaliar o potencial antimicrobiano contra a bactéria *E. coli* de extratos aquosos e etanólicos das plantas *Eugenia anomala*, *Eugenia arenosa*, *Eugenia pitanga* e *Psidium salutare*, todas da família *Myrtaceae*. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos estudados de todas as plantas apresentam atividade antioxidante sobre o eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de Co-ftalocianina, sendo que os extratos aquosos e etanólicos da *E. pitanga* e *P. sautare* apresentaram ação antioxidante mais eficaz que as demais plantas. Enquanto que os melhores resultados obtidos para a atividade bacteriostática foi de 2,5 mg/mL para o extrato etanólico de *E. arenosa* e para o extrato aquoso de *E. pitanga*; e a menor concentração da atividade bactericida foi de 10 mg/mL para o extrato aquoso de *E. arenosa*.

Palavras-chave: *Myrtaceae*, *Escherichia coli*, atividade antimicrobiana, compostos fenólicos, voltametria cíclica.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* (*E. coli*) is an enteropathogenic bacterium that occurs naturally in the intestinal microbiota, and their pathogenic effects occur mainly by improper handling of food, both in the cooking process as in the process of cleaning. In response to infection by this bacterium diarrhea and dehydration which may lead to death occur. In popular culture is common to use of medicinal plant with purposes curing conditions, however it is necessary for studies on the plants to be used are made, since they have a wide and diverse range of compounds. Among them can be mentioned phenolic compounds that are the main secondary metabolites of plants. The plants of the *Myrtaceae* family are widely known by its chemical composition, which involves an interesting amount of phenolic compounds, these are related to antimicrobial action of various plant extracts. The objective of this study was to quantify the phenolic compounds by spectrophotometry to identify the antioxidant activity by cyclic voltammetry to evaluate the antimicrobial activity against *E. coli* bacteria from water and ethanol extracts of plants *Eugenia anomala*, *Eugenia arenosa* *Eugenia pitanga* and *Psidium salutare* all the *Myrtaceae* family. The results showed that the extracts of all studied plants have antioxidant activity on the glassy carbon electrode and Co-phthalocyanine electrode, and the water and ethanol extracts of *E. pitanga* and *P. sautare* showed more effective antioxidant than other plants. While the best results for bacteriostatic activity was 2.5 mg / mL for the ethanol extract of *E. arenosa* and the water extract of *E. pitanga*, and the lowest concentration of the bactericidal activity was 10 mg / mL for aqueous extract of *E. arenosa*.

Keywords: *Myrtaceae*, *Escherichia coli*, antimicrobial activity, phenolic compounds, cyclic voltammetry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bactéria <i>Escherichia coli</i> ampliada 10.000x.....	20
Figura 2 - Estrutura básica dos flavonoides.....	23
Figura 3 – Estrutura química da oenoteína, tanino presente nas folhas da pitangueira ( <i>Eugenia uniflora L.</i> ).....	24
Figura 4 – Folhas, flores (a) e fruto (b) da planta <i>Eugenia pitanga (O. Berg) Nied.</i> .....	31
Figura 5 – Folhas, fruto (a) e flor (b) da planta <i>Eugenia anomala D. Legrand.</i> .....	32
Figura 6 – Folhas (a) e flores (b) da planta <i>Eugenia arenosa Mattos.</i> .....	32
Figura 7 – Fruto, folhas (a) e folhas (b) da planta <i>Psidium salutare var. sericeum (Cambess) Landrum.</i> .....	32
Figura 8 – Célula eletroquímica, com eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência de Ag/AgCl e contra eletrodo de platina.....	40

Figura 9 – Eletro impresso DROPSENSE de Cobalto-ftalocianina, detector de peróxido de hidrogênio.....	
Figura 10 – Quantificação de polifenóis totais em extrato aquoso e etanólico de plantas da família <i>Myrtaceae</i> .....	44
Figura 11 – Quantificação de flavonoides totais em extrato aquoso e etanólico de plantas da família <i>Myrtaceae</i> .....	45
Figura 12 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo em tampão fosfato salino (PBS pH 6,4), $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ .....	47
Figura 13 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de <i>E. anomala</i> , no qual a linha continua representa o tampão PBS e a linha pontilhada representa os extrato de <i>E. anomala</i> , $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ .....	47
Figura 14 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas. Linha preta tampão PBS, linha vermelha <i>E. anomala</i> , linha azul <i>E. arenosa</i> , linha rosa <i>E. pitanga</i> e linha verde <i>P. salutare</i> , $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ .....	49
Figura 15 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas com adição de peróxido de hidrogênio e sulfato de ferro (Reação Fenton), $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ .....	51
Figura 16 - Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina do tampão (PBS pH 6,4), $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ .....	52
Figura 17 - Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina do tampão PBS com adição de peróxido de hidrogênio, $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ .....	53



Figura 18 - Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas. Linha preta tampão PBS, linha vermelha *E. anomala*, linha azul *E. arenosa*, linha verde *E. pitanga* e linha rosa *P. salutare*,  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$  ..... 54

Figura 19 - Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas com adição de peróxido de hidrogênio sobre eletrodo de Co-ftalocianina. Linha preta tampão PBS, linha vermelha *E. anomala*, linha azul *E. arenosa*, linha rosa *E. pitanga* e linha verde *P. salutare*,  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$  ..... 55

Figura 20 - Placas de Petry com o plaqueamento das concentrações que apresentaram inibição do micro-organismo estudado frente aos extratos das plantas estudadas, em que 1, 2, 3 e 4 refere-se aos extratos aquosos e 5, 6, 7 e 8 refere-se aos extratos etanólicos... 58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de rendimento dos extratos estudados.....	42
Tabela 2 – Apresentação dos resultados do screening fitoquímico, em que se demonstra a presença (+) ou ausência (-) do composto nos extratos aquoso (EA) e etanólico (ET).....	43
Tabela 3 – Resultados da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima frente a <i>E.coli</i> .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATTC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>"Clinical and Laboratory Standards Institute"</i>
DMSO	Dimetil-sufóxido
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica

FioCruz	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
TTC	Trifeniltetrazólio
UFC	Unidade formadoras de colônias
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Bactérias alimentares patogênicas.....	19
2.2 Compostos naturais.....	21
2.3 Metabólitos secundários.....	22

2.4 Família <i>Myrtaceae</i> .....	25
2.5 Antioxidantes.....	25
2.5.1 Reações Fenton.....	28
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Material Vegetal.....	31
4.1.1 Coleta e identificação.....	31
4.2 Obtenção dos extratos.....	32
4.2.1 Extrato etanólico.....	33
4.2.2 Extrato aquoso.....	33
4.2.3 Determinação do rendimento dos extratos.....	33

4.3 Screening fitoquímico.....	33
4.3.1 Compostos fenólicos.....	34
4.3.2 Taninos.....	34
4.3.3 Flavonoides.....	35
4.3.4 Cumarinas.....	35
4.3.5 Quinonas.....	35
4.3.6 Saponinas.....	36
4.3.7 Alcalóides.....	36
4.4 Atividade antimicrobiana.....	37
4.4.1 Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	37
4.4.1.1 Confirmação da Concentração Inibitória Mínima.....	38
4.4.1.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	38
4.5 Quantificação de polifenóis totais.....	38
4.6 Quantificação de flavonoides totais.....	39
4.7 Atividade antioxidante por voltametria cíclica.....	39

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Determinação do rendimento dos Extratos.....	42
5.2 Screening Fitoquímico.....	42
5.3 Quantificação de polifenóis e flavonoides totais.....	44
5.4 Atividade antioxidante por voltametria cíclica.....	46
5.4.1 Atividade eletroquímica dos extratos.....	46
5.4.2 Avaliação da atividade antioxidante com eletrodos impressos modificados.....	52
5.5 Teste antimicrobiano frente ao micro-organismo <i>E. coli</i> – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima.....	57
CONCLUSÃO.....	60
PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS.....	62
REFERENCIAS.....	63



## 1 INTRODUÇÃO

Conforme o relatório anual de desenvolvimento de 2013, no ano de 2012 mais de 1.600 crianças menores de cinco anos de idade foram a óbito diariamente por doenças diarreicas, sendo responsável por 9% das mortes de menores de 5 anos no mundo. Em 2012 representou uma perda de mais de 580 mil crianças (UNICEF, 2013). As causas mais sérias que acometem o quadro de diarreia são aquelas associadas à desidratação e a persistência dessa, que em casos de desnutrição pode exarcebar o quadro de desidratação, levando ao aumento da fragilidade do acometido e do período de convalescença (MARANHÃO et al., 2008).

Os micro-organismos são indicadores de condições higiênicas. A contagem de coliformes é muito utilizada nas análises de alimentos tratados termicamente, sendo que a presença de bactérias Gram-negativas é o indicativo de tratamentos térmicos inadequados ou provável contaminação posterior. Podendo ser dividido em coliformes totais, que avalia condições higiênicas e em termotolerantes que indica a deficiência de condições higiênico-sanitárias, sendo que a *E. coli* é o micro-organismo indicador de contaminação. Esta é uma bactéria de fácil isolamento em meios de cultura, apresenta-se mais resistente e está presente naturalmente na microbiota intestinal, sendo que a contaminação por *E. coli* tem causado graves problemas de saúde pública pelo mundo (NATARO e KAPER, 1998).

Esta bactéria apresenta diferentes sorotipos, sendo que a maioria das cepas são inofensivas, contudo algumas podem causar graves doenças. A contaminação pode ocorrer pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente leites e carnes crus ou que

passaram por processos inadequados de preparo. Boas práticas de higiene garantem o consumo seguro dos alimentos sem contaminação por *E. coli* (SES-RS, 2011). A contaminação em pequenas quantidades poderá levar a febre, vasodilatação, ativação de resposta imune e inflamatória, enquanto que em grandes contaminações ocorre exacerbação dos sintomas, septicemia, podendo levar o paciente ao choque (ALTERTHUM, 2002).

A utilização de plantas com fins curativos é uma prática comum e crescente, na busca por novos compostos que apresentem eficácia clínica e redução de efeitos colaterais. A contaminação alimentar por micro-organismos patogênicos afeta, principalmente, a população de países em desenvolvimento, a falta de serviços básicos a essa população, assim como a dificuldade de instrumentalização adequada dos alimentos e água a ser ingerida levam a contaminação (VIEIRA, 2001).

Assim, descobrir novos compostos, para auxiliar no controle de tais contaminações, pode trazer melhorias à qualidade de vida e redução de estados de morbidade e mortalidade causados por estes micro-organismos. Sendo que na composição química das plantas há presença de diversos metabólitos secundários que possuem ação antioxidante relevante, como é o caso dos compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante (BIANCHI E ANTUNES, 1999).

A ação antioxidante presente em vários produtos de origem vegetal possui o potencial de neutralizar ou inibir a ação dos radicais livres e compostos oxidantes. Os radicais livres possuem um elétron a menos na última camada, desestabilizando as reações normais do organismo, sendo assim os antioxidantes estão em constante ação no organismo humano, havendo a necessidade de quantidades suficientes para que se mantenha o equilíbrio eletrônico e não ocorra a existência de quadros patológicos (BIANCHI E ANTUNES, 1999; MORAIS et al., 2009).

Verifica-se que as membranas celulares são um dos componentes celulares mais atingidos pela ação de compostos oxidantes presentes no organismo (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). Sendo que a peroxidação lipídica e o crescimento de micro-organismos em alimentos resultam na rancidez e deterioração, tornando o alimento inadequado para o consumo humano, gerando diversos compostos que contribuem para a patogênese de algumas doenças, como câncer, aterosclerose e doenças alérgicas (IBRAHIM et al., 2011).

Por isso cuidados com a manutenção da qualidade dos produtos torna-se essencial. Assim as indústrias farmacêutica, cosméticas e alimentícia possuem grande interesse na produção de compostos antioxidantes, pois estes podem conferir estabilidade ao produto. Sendo ainda importante salientar que a população adquiriu uma cultura de automedicação, como o uso exacerbado de antibióticos, proporcionando assim resistência a diversos micro-organismos, logo há a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos que acabem com a proliferação dessas bactérias. Nos últimos anos a resistência microbiana a antibióticos tem sido um dos grandes problemas de saúde pública (GOODMAN E GILMAN, 2006).

Recentemente ocorreu na Alemanha a contaminação de uma fazenda orgânica de brotos de feijão por *E. coli*, surto este que afetou a infectou cerca de 3 mil pessoas em 12 países, havendo a morte de 31 pessoas. Houve um descompasso econômico até a descoberta da origem da contaminação, estima-se que o prejuízo em função das perdas passaram de 1 bilhão de euros (ESTADÃO, 2011). A contaminação ocorreu pela estirpe da bactéria, *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), que provoca diarreias hemorrágicas e outros sinais de infecção desta bactéria (G1, 2011).

Verifica-se que a contaminação de alimentos por micro-organismos patogênica ocorre com frequência. Em estudo realizado por Kumaram et al. (2010) foi possível verificar a presença da bactéria *E. coli* em locais de manipulação de peixes crus, havendo contaminação em frutas e verduras dos locais próximos, sendo que as colônias encontradas 56,25% eram resistentes a ampicilina. Outro estudo realizado em Fortaleza com 24 amostras de peixes crus, demonstrou que 62,5 % dos peixes estavam contaminados com coliformes termotolerantes (GASPAR et al, 1997).

Logo o estudo de novas plantas que demonstrem potencial terapêutico é de extrema importância para a descoberta de novos compostos que possam auxiliar no combate a intoxicações por micro-organismo patogênicos, ou ainda, que possam demonstrar diferentes potencialidades terapêuticas.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 Bactérias alimentares patogênicas

Várias patologias que afetam a saúde pública apresentam origem microbiana, em especial bacteriana, sendo que geralmente a aquisição da doença ocorre por contato direto, com objetos inanimados e /ou alimentos contaminados (YAMASHITA et al, 1993). A globalização permite que as contaminações se disseminem com muito mais facilidade e rapidez (BALBANI E BUTUGAN, 2001). A persistência e aumento da contaminação alimentar por agentes microbianos, pode ser associado ao fato de criadores fazerem uso de antimicrobianos para auxiliar no crescimento e engorda de aves e suínos, levando a uma maior resistência e variabilidade microbiana (SANDERS, 1999).

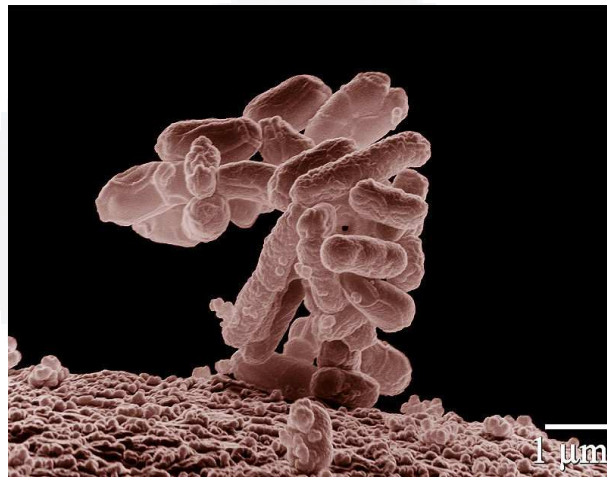
As principais bactérias que contaminam alimentos são divididas em subgrupos pela sua ação, produtoras de toxinas pré-formadoras: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*; produtoras de toxinas na luz intestinal: *Vibrio spp*, *E. coli produtora de toxina Shiga*, *E. coli enterotoxigênica*; invasoras do epitélio intestinal: *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Yersinia spp*, *Shigella spp*, *E. coli enteroinvasiva*, *Listeria monocytogenes* (BALBANI E BUTUGAN, 2001).

O grupo das enterobactérias compreende os bastonetes Gram-negativos, não esporulados, móveis por flagelos peritríquios ou imóveis, capsulados ou não, que vegetam nos meios comuns, reduzem os nitritos e nitratos e fermentam rapidamente a glicose com ou sem produção de gás. Seu habitat é o intestino normal ou patológico, sendo que no homem doente pode ocorrer fora do intestino, como por exemplo, no sangue, na urina, entre outros. As

enterobactérias se dividem em grupos de interesse médico, que são: coliforme, paracoli, tifílico paratíflico-disentérico e proteus (BIER, 1975).

A bactéria *E. coli* (figura 1) da família das enterobacterias, gênero escherichia e espécie *Escherichia coli*, foi descrita em 1885, por Theodor von Escherich, sob a denominação de *Bacterium coli commune*. Apresenta-se como bastonete Gram-negativo, apresentando ocasionalmente formas filamentosas, podendo ser móveis ou imóveis. Tem a capacidade de rápida fermentação da glicose e manitol, com produção de ácido e gás (BIER, 1975).

Figura 1 – Bactéria *Escherichia coli* ampliada 10.000x



Fonte: <http://emu.arsusda.gov/default.html>

Esta bactéria apresenta fácil cultivo em laboratório, é empregada como indicador de contaminação termotolerante, facilita a digestão por produzir vitamina K no intestino grosso, apresenta duas enterotoxinas, uma lábel ao calor que leva a desregulação dos íons cloro do intestino e outra termoestável que contribui para a doença diarreica (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996; ACTOR, 2007). *E. coli* apresenta 4 doenças etiologicamente diferentes que são definidas pelos sintomas clínicos; *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) esta relacionada com a “diarreia do viajante”, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) relacionada com a diarreia infantil, em que há destruição das microvilosidades sem invasão do patógeno, apresenta sintomas como: febre, diarreia, vômito, náuseas e sem fezes sanguinolentas, *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) causa disenteria indistinguível da shingelose (bacilo patogênico) e a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), causa colite hemorrágica caracterizada por diarreia copiosa

sanguinolenta com poucos leucócitos e sem presença de febre (ACTOR, 2007). Encontrada normalmente na flora intestinal, atua como micro-organismo comensal, impedindo a proliferação de organismos patógenos, estando assim em um contexto benéfico ao organismo humano, no entanto a *E. coli* apresenta-se como um micro-organismo oportunista que causa doença em hospedeiros suscetíveis, sendo que as infecções podem ser disseminadas por todo o organismo (SOUZA, 2006; NATARO E KAPER, 1998).

Conforme a Secretaria Estadual de Saúde (2011), o controle de contaminação por *E. coli* é realizado através da desinfecção de vegetais e alimentos que são consumidos na forma crua, através de solução clorada e pelo devido cozimento dos alimentos a 70 °C. As boas práticas de higiene em locais de manipulação de alimentos também deve ser observadas, como:

- lavagem adequada das mãos antes de preparar, servir ou tocar os alimentos, após o uso do banheiro, contato com animais e após manipular alimentos crus;
- pessoas que apresentarem sinais de contaminação, como diarreia ou vômito, não devem tocar em alimentos;
- seleção do alimento, retirando partes do produto deteriorado e sem condições adequadas;
- lavagem adequada dos alimentos;
- enxágue dos alimentos com água potável.

## **2.2 Compostos naturais**

Várias pesquisas são realizadas com plantas, a fim de avaliar as suas propriedades químicas e biológicas, no entanto, este ainda é um campo que apresenta deficiência de estudos, considerando que a diversidade molecular em plantas é em torno de 40% maior do que em fontes sintéticas, assim este se torna um campo de pesquisa bastante promissor (YUNES E CALIXTO, 2001).

A utilização de plantas nativas pode ser uma alternativa economicamente viável e de fácil acesso a populações locais e de renda restrita. Várias plantas possuem utilização popular, no entanto algumas deixam de ser utilizadas por falta de conhecimento de seus potenciais

terapêuticos. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% das pessoas dos países em desenvolvimento dependem de plantas com fins medicinais para suas necessidades básicas e cerca de 85% da medicina tradicional envolve a utilização de plantas ou extratos (BRASIL, 2006).

A utilização de plantas é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, sendo que no Brasil, as plantas da flora nativa necessitam de estudos sobre a comprovação de suas propriedades farmacológicas, considerando que sua utilização está fortemente vinculada ao uso popular (VEIGA et al., 2005).

Estima-se que em torno de 80% dos fármacos são provenientes direta ou indiretamente de produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Pode-se citar como fármacos advindos da natureza o analgésico morfina e o antibiótico penicilina. As terapias medicamentosas anti-câncer tem em torno de 60% de seus fármacos originados de plantas com fins medicinais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Um fator de extrema relevância para a ocorrência de compostos ativos da planta é a época de coleta, considerando o fato de que seus constituintes ativos não são constantes durante todo o ano, ou seja, podem ocorrer variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, influenciados pelo estágio de desenvolvimento, exposição a diferentes temperaturas, radiação UV, disponibilidade de água, composição atmosférica, sazonalidade, ritmo circadiano, nutrientes presentes no solo, ataque de insetos e micro-organismos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

### **2.3 Metabólitos secundários**

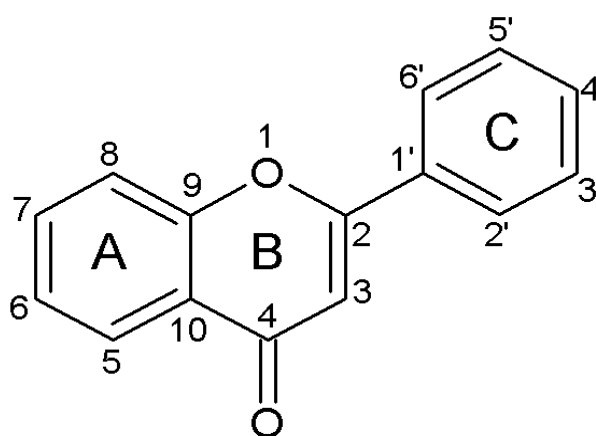
Os metabólitos secundários são respostas do metabolismo vegetal a interação com o meio ambiente o qual as plantas estão expostas, e como resultado há a produção de diferentes compostos que em geral propiciam proteção a planta (KUTCHAN, 2001).

As reações que formam esses metabólitos ocorrem através de rotas metabólicas, pois há o aproveitamento de nutrientes celulares, assim como a ação de enzimas específicas (NELSON E COX, 2011). Os metabólitos secundários possuem estrutura molecular complexa e apresentam baixo peso molecular, tem funções importantes, tanto no metabolismo vegetal, como quando utilizado em outros organismos, sendo que geralmente ocorrem em pequenas

concentrações nas plantas (BERG et al., 2004).

Os flavonoides são uma importante classe de metabólitos secundários e já foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo. Como demonstrado na Figura 2, apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono (C6-C3-C6)(ROBBERS et al., 1997).

Figura 2 - Estrutura básica dos flavonoides



Os compostos se diferem pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B, C, além da presença ou não da dupla ligação da carbonila do anel C, podendo ainda ser encontrados derivados glicosados, metilados, acetilados, prenilados ou sulfatados (SIMÕES et al., 2004). Apresentam variação da ação biológica entre elas anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, antitrombótica, antiviral e atividade anticarcinogênica (GARCIA-LAFUENTE et al., 2009).

Um exemplo da variabilidade deste grupo ocorre pela oxidação da cadeia heterocíclica do pirano, sendo que a ocorrência deste evento leva a diversas classes de flavonoides, como: antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas (ARAUJO, 2008; YUNES E CALIXTO, 2001).

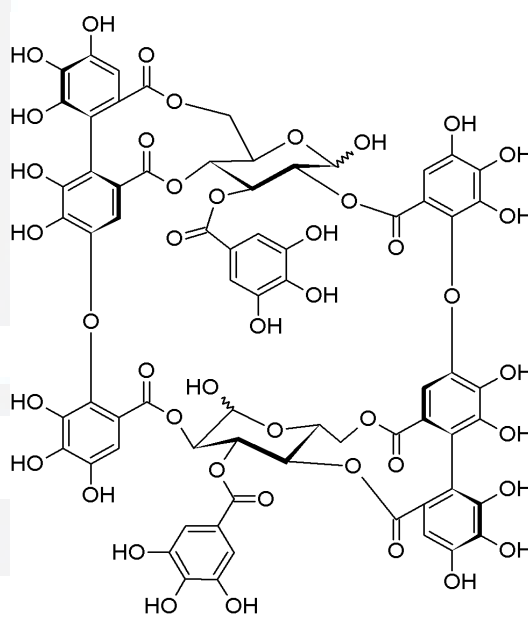
Assim diversos metabólitos secundários importantes são derivados de grupos fenólicos, como as antocianinas, que são glicosídeos que apresentam em sua estrutura química um resíduo de açúcar no carbono 3, sendo que a hidrólise gera um glicídio e a aglicona (antocianidina). São responsáveis pela coloração de frutas vermelhas e vegetais



verdes escuros (PEREIRA E CARDOSO, 2012).

Outra classe importante de compostos fenólicos são os taninos, na Figura 3 demonstrada a oenoteína, tanino presente nas folhas da pitangueira, estes compostos são responsáveis pelo sabor adstringente dos alimentos, são hidrossolúveis, mas possuem a habilidade de formar compostos insolúveis em água quando associados a alcalóides, gelatinas e outras proteínas. Sua ação está relacionada a três propriedades: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante sequestradora de radicais livres e capacidade de complexação com macromoléculas como as proteínas (OKUDA E ITO, 2011; SIMÕES et al., 2004).

Figura 3 - Estrutura química da oenoteína, tanino presente nas folhas da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)



As saponinas apresentam propriedades detergentes e surfactantes, nas plantas tem ação no crescimento e defesa contra insetos e patógenos. No organismo humano tem ação antioxidante, sendo que se ligam a sais biliares e colesterol, impedindo a absorção, possuem ainda ação citotóxica agindo nas células tumorais (PEREIRA E CARDOSO, 2012).

Assim os metabólitos secundários das plantas são uma importante classe de bioprodutos, apresentando em geral, ações de proteção ao organismo humano.

## 2.4 Família Myrtaceae

A família das *Myrtaceae* são as mais importantes e abundantes encontradas no Brasil, especificamente na mata Atlântica. Apresenta 1000 espécies no Brasil, sendo encontradas 109 espécies que ocorrem de forma natural em solo gaúcho (SANTOS, 2012).

Uma das grandes dificuldades para o estudo dessa família de plantas está relacionado com o grande número de identificações genéricas das plantas, o que acaba desencorajando vários pesquisadores (LAMDRUM E KAWASAKI, 1997) há inúmeras alterações nas classificações internas dessas plantas demonstrando assim a variabilidade das mesmas (SANTOS, 2012).

As plantas nativas pertencem à subfamília Myrtoideae, constituída apenas pelas Myrteae, dividida em três subtribos: Eugeniinae, Myciinar e Myrtinae. No Brasil, os gêneros mais importantes são: *Psidium*, *Myrciaria*, *Martierea*, *Campomanesia*, *Paivaea*, *Syzigium* e *Eugenia* (CONSOLINI et al, 1999).

O gênero *Eugenia* é composto por 400 espécies, um dos maiores da família *Myrtaceae*, sendo um gênero com muitos compostos fenólicos, como os taninos e flavonóides, apresentando assim uma interessante ação antioxidante. É encontrada no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. (EINBOND et al, 2004; FISCHER et al., 2005; CONSOLINI et al, 1999). O gênero *Psidium* tem entre 110 a 130 espécies, por toda América tropical, tendo um maior número de espécies desde a Amazônia até o Sul do México (FRANZON et al., 2009).

## 2.5 Antioxidantes

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente tendo como objetivo primordial a preservação da sua espécie. O organismo produz intracelularmente moléculas bioativas com capacidade oxidativa, estas dependentes do oxigênio (O<sub>2</sub>). Logo a presença de O<sub>2</sub> torna-se vital para o desenvolvimento de organismos e para a continuidade das espécies, estas

dependentes do oxigênio, produzindo assim reações de oxi-redução nos organismos vivos (OHARA, 2006).

Essas reações causam lesões celulares variadas, levando a diversas consequências, como: inativação enzimática, mutações, ruptura de membranas, morte celular, podendo provocar doenças, envelhecimento precoce e falta de proteção dos organismos (WINTENBOURN, 2008; MIELNIK et al., 2008).

O organismo produz seus próprios antioxidantes, denominados endógenos, no entanto o crescente aumento de situações que ativam situações oxidantes no organismo faz com que esses não sejam suficientes, sendo assim, a suplementação torna-se um bom mecanismo de ação contra as possíveis lesões causadas pelos radicais livres no nosso organismo (BARREIROS et al, 2006; CERQUEIRA et al, 2007).

O oxigênio no estado fundamental é um agente oxidante, ele reage lentamente com compostos que não possuem elétrons desemparelhados, logo ele não reage com a maioria dos componentes celulares. No entanto a reação com íons de metal de transição resulta em uma variada produção de reações oxidativas, estas podem iniciar reações em cadeia e atacar biomoléculas (FERREIRA E ABREU, 2007).

A utilização de agentes antioxidantes para a preservação e manutenção da qualidade de um produto é uma prática crescente, estudos demonstram a utilização de produtos para amenizar a oxidação de carne de frango, como o orégano, sálvia e alecrim (SYMEON, 2010)

Os polifenóis são constituintes de um grupo heterogêneo de antioxidantes (VARGAS et al., 2008), apresentando uma potente ação na prevenção de reações oxidativas, apresentam propriedades anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiaterogênica, antitrombótica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora (WOLLGAST E ANKLAM, 2000).

Há diversas técnicas de avaliação antioxidante, variando conforme a especificidade do composto estudado, o método de redução do radical DPPH é muito difundido, por apresentar praticidade, facilidade metodológica e estabilidade nas reações. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação, é uma técnica que apresenta vantagens na utilização de solventes orgânicos (PRADO, 2009).

Técnicas eletroanalíticas (técnicas eletroquímicas) têm aplicação em diferentes áreas do conhecimento, como: medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química (TODD et al, 1998; ALEXIOU E LEVER; 2001), pois propicia informações das propriedades da substância a ser analisada. Logo, as técnicas eletroanalíticas se apresentam como uma ferramenta importante para análise de compostos orgânicos e inorgânicos. Apresenta tempo reduzido para realização das análises, baixo custo de instrumentalização, assim como a sensibilidade das técnicas eletroanalíticas, em relação a interferentes, possibilitam boas aplicações da técnica em ciências ambientais, biológicas e de alimentos (GIROTTI E PAOLI, 1999).

A voltametria cíclica é utilizada em diversas áreas para estudos de processos de redução e oxidação em vários meios, de adsorção em superfícies de eletrodos quimicamente modificados (SKOOG et al, 2002), é uma técnica que verifica a oxi-redução de soluções, quando submetida a uma variação contínua e cíclica de potencial (BARD E FAULKNER, 1980).

Estudos antioxidantes com técnicas eletroanalíticas, em que, é possível monitorar a presença de peróxido de hidrogênio, tem demonstrado que a utilização de eletrodos impressos modificados de cobalto-ftalocianina, apresentam adequada leitura do analito (SERGEYEVA et al, 1999; CHAVE et al, 2003; ÇEKEN et al, 2012). A técnica de determinação antioxidante apresenta a capacidade de verificar a oxi-redução de substratos, a utilização de eletrodos específicos pode auxiliar na verificação de tal potencial, como o eletrodo de colbalto-ftalocianina que possui a capacidade de captar a presença de peróxido de hidrogênio presente em determinada amostra.

Eletrodos modificados são utilizados para a detecção de composto específico, sendo assim possível avaliar diferentes potencialidades de diferentes materiais, como demonstrados no estudo da avaliação da atividade antioxidante de *Arnica montana* com eletrodos de colbalto-ftalocianina, neste estudo observou-se a redução dos níveis de peróxido com a utilização do ultrassom terapêutico, logo a planta apresenta ação de captura deste radical (BIANCHETTI E STULP, 2011).

Hilgemann et al (2013) estudaram a utilização da voltametria cíclica para a verificação da atividade antioxidante. Utilizaram eletrodos de carbono para a avaliação de três infusões (chás), verificaram que a voltametria cíclica pode fornecer informações sobre os constituintes

do substrato estudado assim como informações relevantes sobre a capacidade antioxidante. Demonstram que a utilização de eletrofotocímica para a detecção desta atividade apresenta suas vantagens e desvantagens, assim como outras técnicas de detecção que existem, entre as vantagens a rapidez do teste, a utilização de pouca quantidade de amostra e verificação da ação antioxidante, mesmo que o extrato esteja turvo.

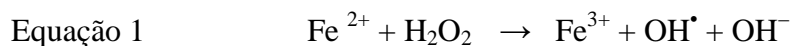
Eletrodos modificados de ouro apresentam boa estabilidade, no entanto podem ser facilmente atacados pelo oxigênio livre dos radicais livres, logo podem ser utilizados para a avaliação antioxidante por reação Fenton. Observa-se uma relação cinética de ação do extrato em relação a sua concentração, quanto maiores as concentrações mais estáveis as reações, menos ataques ocorrem (HILGEMANN et al, 2010).

Carvalho et al (2013) demonstram que a utilização de métodos que se baseiam em reação direta de antioxidantes são importantes e vantajosas pois demonstram a ação exclusiva do composto, sem que ocorra ação de reações secundárias ou paralelas observadas no organismo. O que pode ser visto como uma vantagem para verificação da ação antioxidante total do composto frente a determinado radical.

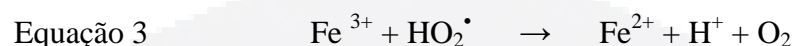
Assim a presença de compostos antioxidantes no organismo ou sua utilização para a proteção de alimentos que venham a ser consumidos, é de extrema importância, evitando possíveis contaminações por micro-organismos ou auxiliando no combate a estas.

### 2.5.1 Reações Fenton

No fim do século XIX Henry John Horstman Fenton desenvolve ensaios que atualmente são conhecidos com reações Fenton, a partir destes estudos foi concluído que o peróxido de hidrogênio e sais de ferro poderiam oxidar compostos orgânicos, ácidos tartárico e málico (FENTON, 1894), conforme segue a equação 1, em que, a resposta a reação Fenton e a formação de radical hidroxila.



Essa reação resulta em um elevado potencial de oxi-redução, que ataca grande parte das espécies presentes em um soluto, essas reações são rápidas e inespecíficas. O excesso de peróxido de hidrogênio combinado a utilização de  $\text{Fe}^{3+}$  gera outros radicais com potencial oxidante, como a hidroperoxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), como seguem as equações 2 e 3 respectivamente (AGUIAR et al., 2007).



Em organismos humanos os metais, ferro e cobre, estão relacionados com a formação de radicais hidroxila, que estão diretamente ligados a importantes doenças (BARREIROS et al., 2006). Logo, reações de metais de transição são denominadas pseudo-fentons, elas seguem padrões semelhantes as reações Fenton (SILVA, 2010), sendo que em organismos vivos ocorrem de forma muito rápida, pois há disponibilidade de íons superóxido e peróxido de hidrogênio, formando radicais hidroxila. Quando há a disponibilidade desses metais de transição ocorrem reações como descritas nas equações 2 e 3.

Grande parte do ferro encontrado em organismos humanos esta ligado a hemoglobina, no entanto uma pequena quantidade deste metal fica disponível no citoplasma o que pode favorecer uma reação Fenton e assim favorecer a formação de hidroxilas (YOUNG E WOODSIDE, 2001).

Logo e necessária a presença de antioxidantes que promovam a redução destes íons que agridem o organismo, sejam eles endógenos, ou exógenos. Os compostos antioxidantes podem apresentar diversas funções no organismo como: proteção seja do organismo vivo ou à deterioração de produtos de origem animal, assim como promover a facilitação de combate a doenças e micro-organismos presentes no organismo humano.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos aquoso e etanólico de plantas da família *Myrtaceae* frente ao micro-organismo *E. coli*.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliação qualitativa das principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos aquoso e etanólico de plantas da família *Myrtaceae*, por screening fitoquímico
- Quantificar polifenóis totais nos extratos etanólico e aquoso de plantas da família *Myrtaceae* nativas do RS.
- Avaliar quantidade total de flavonoides nos extratos etanólico e aquoso de plantas da família *Myrtaceae* nativas do RS.
- Avaliar atividade antioxidante nos extratos etanólico e aquoso de plantas da família *Myrtaceae* nativas do RS, por voltametria cíclica.
- Avaliar atividade antimicrobiana das amostras de extratos etanólico e aquoso das plantas estudadas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Material Vegetal

#### 4.1.1 Coleta e identificação

O material vegetal foi coletado no município de Alegrete/RS, no mês de setembro de 2012, levando-se em consideração os fatores que possam interferir na coleta, como estação do ano e clima, foram utilizadas plantas do mesmo período de coleta, levando em consideração que este trabalho não visa avaliar a sazonalidade e possíveis interferências que épocas diferentes possam interferir na amostra final. O material vegetal foi identificado pela bióloga Prof. Dra. Elisete Maria de Freitas, e o material *voucher* foi depositado no herbário do Centro Universitário Univates.

As plantas utilizadas no estudo foram *Eugenia anomala* D. Legrand (HVAT4083), *Eugenia arenosa* Mattos (HVAT4173), *Eugenia pitanga* (O. Berg) Nied (HVAT4052) e *Psidium salutare* var. *sericeum* (Cambess) Landrum (HVAT4051), nas figuras 4, 5, 6 e 7 detalhes das plantas utilizadas, como flor, fruto e folhas.

Figura 4 – Folhas e flores (a) e fruto (b) da planta *Eugenia pitanga* (O. Berg) Nied.





Figura 5 – Folhas e fruto (a) e flor (b) da planta *Eugenia anomala* D. Legrand

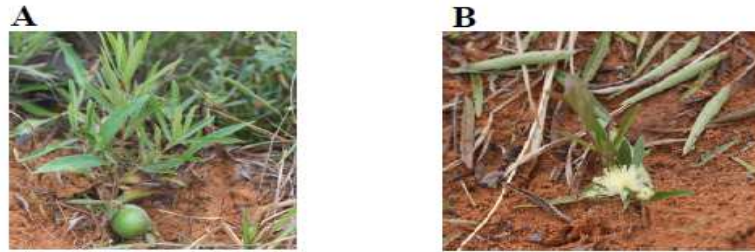


Figura 6 – Folhas (a) e flores (b) da planta *Eugenia arenosa* Mattos

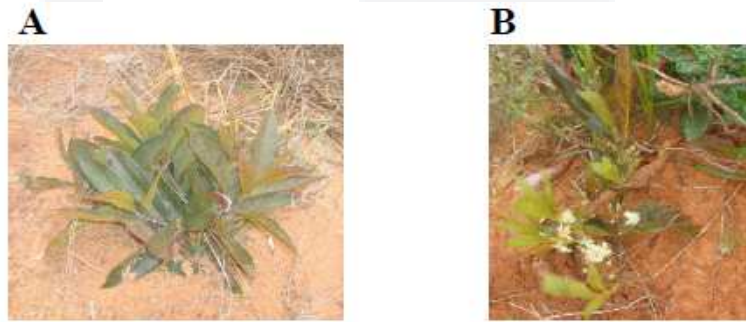
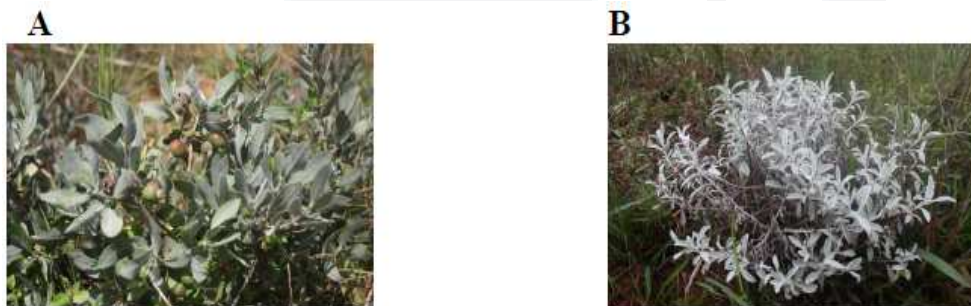


Figura 7 – Fruto e folhas (a) e folhas da planta *Psidium salutare* var. *sericeum* (Cambess) Landrum



#### 4.2 Obtenção dos extratos

A obtenção dos extratos segue metodologia realizada pelo laboratório de pesquisa em que os estudos estão sendo realizados.

#### **4.2.1 Extrato etanólico**

O extrato etanólico foi obtido por maceração estática (à frio). Como solvente foi utilizado álcool etílico 90%. As folhas da espécie vegetal foram reduzidas a fragmentos de pequena dimensão, utilizando tesoura. Este procedimento foi realizado para aumentar a superfície de contato do vegetal com a solução extratora. Após foi solubilizado com o solvente etanólico, acondicionado em um frasco âmbar e mantido em temperatura ambiente num período de 7 dias. Decorrido o período de extração, foi realizada a filtração a vácuo e posterior a remoção do solvente com auxílio de um rota evaporador, em banho termostatizado em temperatura de 40 °C.

#### **4.2.2 Extrato aquoso**

O extrato aquoso foi obtido pelo método de decocção. Como solvente utilizou-se água e a solução foi levada a ebulição por 3h. As folhas da espécie vegetal foram reduzidas a fragmentos de pequena dimensão, utilizando tesoura. Este procedimento foi realizado para aumentar a superfície de contato do vegetal com a solução extratora. Em seguida, foi adicionado 100 g de folhas em 1000 mL de água destilada fervente (90 °C), repousando durante 30 minutos. Após o material ser filtrado e acondicionado em um frasco âmbar, foi armazenado em um refrigerador para posterior remoção da água com auxílio de um rota evaporador, em banho termostatizado em temperatura de 40 °C.

#### **4.2.3 Determinação do rendimento dos Extratos**

Após remoção completa dos solventes dos extratos etanólico e aquoso, foi calculado o rendimento, em %, e armazenados em congelador em frascos âmbar fechados.

#### **4.3 Screening fitoquímico**

O screening fitoquímico foi realizado como uma avaliação preliminar das classes de

compostos presentes na planta. Os testes são utilizados para caracterizar a constituição química das substâncias de origem vegetal, através de um conjunto de análises qualitativas realizadas com os extratos da espécie de escolha. A detecção dos grupos foi feita através de reações químicas que apresentam desenvolvimento de cor ou de precipitado (SIMÕES et al., 2004).

A metodologia empregada para a realização das análises do *screening* fitoquímico, foi realizada a partir de Harborne (1998), Simões et al. (2004).

#### 4.3.1 Compostos fenólicos

Para este teste, extraiu-se cerca de 0,5 g dos extratos vegetais com 20 mL de água em banho-maria fervente. Após esfriamento, filtrou-se e o conteúdo foi dividido em 3 tubos de ensaio (tubos A, B e C). No tubo A foram adicionadas algumas gotas de uma solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração verde ou azul escura é indicativo da presença de compostos fenólicos. No tubo B foram adicionadas algumas gotas de uma solução aquosa de hidróxido de potássio 3%. O aparecimento ou intensificação da cor amarela ou laranja é indicativo da presença destes compostos. O tubo C foi o controle para verificação da coloração inicial do extrato.

#### 4.3.2 Taninos

Para o desenvolvimento deste teste, extraiu-se por aquecimento cerca 0,1 g dos extratos vegetais em 20 mL de água por 30 minutos. Após resfriamento, filtrou-se e dividiu-se em 3 tubos de ensaio (A, B, C).

**Técnica de detecção:** técnica baseada na propriedade dos taninos de precipitar a gelatina. Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de gelatina 1%. Aos tubos denominados A, já contendo os extratos, foi adicionado 1 mL da solução aquosa de gelatina. Na presença de taninos houve formação de turvação ou precipitado.

**Técnica de caracterização:** Esta é uma reação geral para substâncias fenólicas onde há complexação de hidroxilas com o íon  $Fe^{++}$  levando ao desenvolvimento de substâncias de

coloração azulada ou esverdeada, conforme estrutura da molécula. Primeiramente foi preparada uma solução aquosa de  $\text{FeCl}_3$  a 1%, após foram adicionadas três gotas desta solução de  $\text{FeCl}_3$ , aos tubos denominados B, contendo os extratos. Na presença de taninos hidrolisáveis ocorreu o desenvolvimento de coloração azulada, e na presença de taninos condensados a coloração verde. O tubo C foi usado como controle para verificação da coloração inicial do extrato.

#### 4.3.3 Flavonoides

Para este teste extraiu-se cerca de 0,2 g de cada extrato em aproximadamente 50 mL de água em banho-maria fervente. Esfriou-se, filtrou-se, e extraiu-se em funil de separação com 2 vezes de 10 mL de *n*-butanol. Evaporou-se a fração butanólica à secura em cápsula de porcelana, e retomou-se o extrato em metanol (cerca de 10 mL). Transferiu-se para 2 tubos de ensaio (A e B). No tubo A adicionou-se 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado, e após 0,1 g de magnésio metálico. O desenvolvimento da coloração laranja indica a presença de flavonas, a coloração violácea indica flavanonas e a cor vermelha à presença de flavonóis. O tubo B foi usado como controle para a verificação da coloração inicial do extrato.

#### 4.3.4 Cumarinas

Para verificação de cumarinas, aqueceu-se, em tubo de ensaio, cerca de 0,1 g dos extratos em banho-maria fervente. O tubo foi tampado com papel filtro previamente impregnado e seco com uma solução metanólica de hidróxido de potássio 5%. Após 10 minutos, expôs-se os papéis à luz ultravioleta (UV) de 365 nm. O desenvolvimento da fluorescência azul e amarela indica a presença de cumarinas voláteis.

#### 4.3.5 Quinonas

Para o teste de quinonas extraiu-se em banho-maria fervente durante 10 minutos, 0,2 g dos extratos vegetais com 5 mL de hidróxido de potássio 5%. Após resfriamento, filtrou-se o extrato e acidificou-se com ácido acético. Em seguida extraiu-se com 5 mL de tolueno em

funil de separação. Separou-se em um béquer a fase orgânica e adicionou-se 2 mL de solução de hidróxido de potássio 3%. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas, a coloração violácea indica a presença de naftoquinóides e o surgimento de coloração azul indica a presença de benzoquinóides.

Ferveu-se em banho-maria cerca de 0,1 g dos extratos vegetais com 10 mL de ácido clorídrico 10% durante 15 minutos. Após resfriamento, filtrou-se, e adicionou-se 5 mL de tolueno ao extrato. Separaram-se as fases, e na fase orgânica adicionou-se 2 mL do reagente de Bornträger. O aparecimento da coloração vermelha na fase aquosa indica a presença de quinonas glicosídicas.

#### **4.3.6 Saponinas**

Esta análise foi baseada na propriedade das saponinas de formar espuma após agitação enérgica. Extraíu-se cerca de 0,1 g dos extratos vegetais com 20 mL de água em banho-maria fervente por 15 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se e colocou-se em um tubo de ensaio. O tubo foi agitado rigorosamente durante 15 segundos, e a altura da coluna de espuma formada, foi medida com o auxílio de uma régua. O desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistência de espuma após repouso de 15 minutos e adição de ácido clorídrico 10% indica a presença de saponinas.

#### **4.3.7 Alcalóides**

Foram diluídos aproximadamente de 0,1 g dos extratos vegetais em 20 mL de metanol. Após esta solução foi dividida igualmente em 3 tubos de ensaio. Na sequência foram adicionados em cada tubo, 5 mL de ácido clorídrico 10%. Estes foram aquecidos em banho-maria (40 °C) durante 30 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se e transferiu-se uma parte deste para um vidro de relógio, onde foram adicionados gota a gota os seguintes reagentes de detecção: Mayer, Dragendorff, Wagner e reagente de Bertrand. O aparecimento de um precipitado indica a presença de alcalóides.

#### 4.4 Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram empregadas linhagens padrão ATCC (American Type Culture Collection) de *E. coli* (ATCC 25922). O micro-organismo apresenta-se na forma liofilizada, lote 1207033 e seu código do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é 00033. Os micro-organismos liofilizados foram cedidos pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

A partir das linhagens bacterianas liofilizadas, reidrataram-se as culturas, ressuspensando o sedimento com 0,3 a 0,5mL do meio líquido recomendado, Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C por 18 horas; Após determinou-se a fase estacionária contendo uma população de  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias UFC/mL, determinadas por espectrofotômetro. Como padrão antimicrobiano será utilizado cloranfenicol 0,2 µg/µL.

##### 4.4.1 Concentração Inibitória Mínima – CIM

A determinação da concentração inibitória mínima dos extratos foi realizada segundo o método de diluição em caldo (microdiluição). Conforme as normas descritas pelo "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) (NCCLS document M7-A6, 2003), foram utilizadas placas de acrílico com 96 poços. Em cada placa foram aplicados os extratos, o antimicrobiano (cloranfenicol) e o diluente (DMSO), todos em triplicata. Também foram feitos controles negativos (meio sem adição de inóculo) e controles positivos (meio com adição de inóculo).

A microdiluição em caldo foi realizada em capela de fluxo laminar. Inicialmente foram transferidas alíquotas de 200 µL do inóculo padronizado a tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo caseína de soja (200 µL em cada) deixando alguns tubos sem inóculo (controle negativo).

#### 4.4.1.1 Confirmação da Concentração Inibitória Mínima

Como os extratos possuem coloração, a confirmação de crescimentos nos poços foi realizada por meio da aplicação da solução aquosa estéril de cloreto de trifeniltetrazólio 0,5% (TTC). Essa solução revela o crescimento bacteriano por meio do desenvolvimento de uma coloração vermelha, pois forma um complexo vermelho com a enzima que é resultado da respiração celular dos organismos vivos. Assim, nos poços em que houve crescimento bacteriano, há o desenvolvimento dessa cor.

#### 4.4.1.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima dos extratos aquoso e etanólico foram realizadas semeaduras em placas contendo o meio de crescimento do micro-organismo, Mueller Hilton, de todos os poços em que o extrato estivesse límpido, para que se pudesse afirmar a ação do extrato. Essas placas foram incubadas a 36 °C +/- 1 °C por 24 horas.

Para interpretação dos resultados foram considerados os seguintes critérios:

- Crescimento do micro-organismo no meio de cultura, apresenta ação bacteriostática;
- Ausência de crescimento do cíclico-organismo no meio de cultura, apresenta ação bactericida.

#### 4.5 Quantificação de polifenóis totais

Foi quantificada a concentração de polifenóis totais através de espectrofotometria Vis com a utilização de Folin-Ciocalteu, conforme Souza et al (2007) e Singleton e Rossi (1965). Foi utilizado para a determinação da concentração do composto, solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 75%, solução aquosa de Folin-Ciocalteu 1N (Sigma-Aldrich) (1:1), água de osmose reversa, metanol, como padrão foi utilizado ácido gálico (Merck). Para a solução padrão foi construída uma curva de calibração de 50, 100, 150, 250 e 500 µg/mL. A avaliação do extrato ocorreu com a substituição do ácido gálico pela amostra na concentração de 500 µg/mL. Após preparo da solução final, esta é agitada em vórtex por 15 segundo e após

permanecer em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 765 nm.

#### **4.6 Quantificação de flavonoides totais**

A avaliação de flavonoides totais foi realizada com a utilização de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), como descrito por Woisky,(1996) e Woisky e Salatino (1998) sendo que este se liga ao grupamento flavonoide presente, propiciando assim coloração amarelada a solução à ser avaliada. Conforme Marques et al (2012) esta é uma determinação de flavonoides por diluição direta, sem hidrólise, a avaliação ocorre através de espectrofotometria Vis.

Para a determinação da concentração de flavonoides totais na amostra foi utilizado 0,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, os extratos na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente, após foi realizada leitura em espectrofotômetro Vis no comprimento de onda de 415 nm. A curva padrão foi realizada com rutina nas concentrações de 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$  em solução metanólica.

O controle da amostra foi realizado não adicionando o cloreto de alumínio, não ocorrendo assim as complexações entre os grupos de fenóis presentes na amostra.

#### **4.7 Atividade antioxidante por voltametria cíclica**

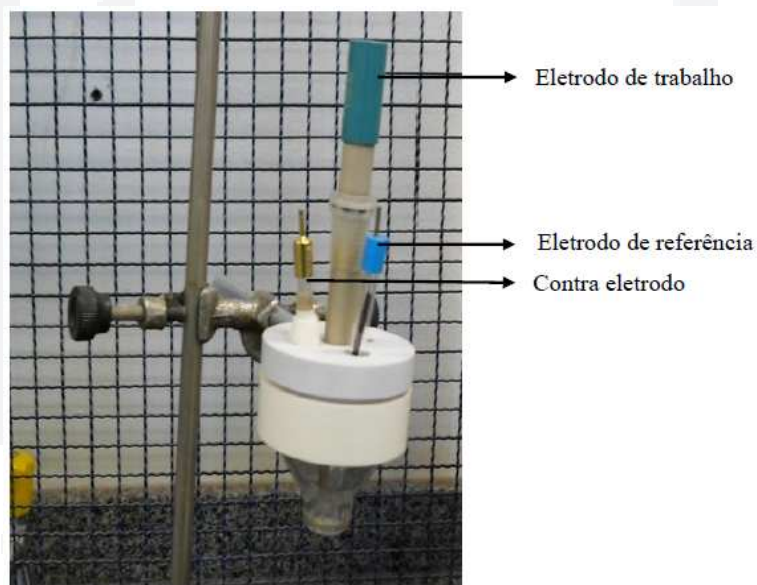
Existem diferentes técnicas de determinação de capacidade antioxidante, a determinação destes compostos por voltametria cíclica é um método novo que está sendo estudado, em que estão sendo determinadas quais as melhores condições de trabalho, tanto dos eletrodos, como soluções e potenciais. Em trabalho paralelo o grupo de pesquisa realiza o estudo dos potenciais antioxidantes dos extratos aquoso e etanólico destas plantas por meio da técnica de redução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).

Foram determinadas espécies constituintes dos extratos estudados através da avaliação de voltamogramas cíclicos. As análises foram realizadas em Gaiola de Faraday para que não ocorressem interferências durante a avaliação das amostras. Foram realizadas voltametrias



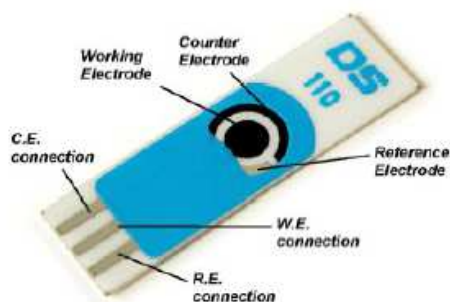
cíclico com eletrodo de trabalho de Carbono Vítreo (3,14mm<sup>2</sup>), eletrodo de referência de Ag/AgCl e o contra eletrodo de platina em célula eletroquímica convencional (FIGURA 8). Foi adicionado 5 mL das amostras dos extratos aquosos e etanólicos das plantas estudadas, 250 µL de peróxido de hidrogênio e 500 µL de sulfato de ferro 0,1M, proporcionando assim uma reação Fenton no sistema. Na amostra dos extratos sem adição de peróxido de hidrogênio e sulfato de ferro, foi adicionado 750 µL de solução do tampão PBS pH 6,4 para que estivesse na mesma proporção de solubilidade. Os parâmetros de varredura utilizados serão: velocidade de varredura de 10 mV.s<sup>-1</sup>, com potencial de -600 mV até 1000 mV.

Figura 8 - Célula eletroquímica, com eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência de Ag/AgCl e contra eletrodo de platina.



Para a determinação da atividade antioxidante através da avaliação de peróxido de hidrogênio foram realizados ensaios de voltametria cíclica com eletrodo impresso “Screen Printed Electrode” (DropsSense, DS410) de cobalto-ftalocianina, sendo que a partir deste é possível mensurar as concentrações de peróxido de hidrogênio presente nas amostras estudadas. O potenciostato utilizado é de modelo PGSTAT128N da marca AUTOLAB/Ecochemie, foi utilizado um eletrodo impresso de cobalto-ftalocianina (FIGURA 9), este é composto de: eletrodo de trabalho de cobalto-ftalocianina/carbono (4 mm diâmetro), contra-eletrodo de carbono e eletrodo de referência de prata, sendo denominado eletrodo de quase-referência.

Figura 9 - Eletrodo impresso DROPSENSE de colbato-ftalocianina, detector de peróxido de hidrogênio



Fonte: [www.dropsens.com](http://www.dropsens.com)

Os parâmetros utilizados para os experimentos de voltametria cíclica foram: velocidade de varredura de 10 mV.s<sup>-1</sup>, com potencial de varredura de -600 mV até 1000 mV. Foram utilizadas amostras de extrato aquoso e etanólico das plantas da família *Myrtaceae* na concentração de 500 µg/mL, diluídos em tampão fosfato salino (PBS) pH 6,4, este apresenta adequada condutividade (~6,85 mS.cm<sup>-1</sup>) com e sem adição de peróxido de hidrogênio P.A. (100 µL por amostra). O peróxido de hidrogênio é um dos agentes oxidantes mais versáteis, além de ser um metabolito celular, quando decomposto há a geração de oxigênio molecular e água (DAVID et al., 2010).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação do rendimento dos Extratos

O processamento das plantas para obtenção de extratos apresentou rendimento conforme resultados apresentados na tabela 1

Tabela 1 - Percentual de rendimento dos extratos estudados.

<b>Planta</b>	<b>Extrato aquoso % de rendimento</b>	<b>Extrato etanólico % de rendimento</b>
<i>Eugenia pitanga</i>	3,17	10,24
<i>Eugenia anomala</i>	5,99	15,80
<i>Eugenia arenosa</i>	3,89	6,46
<i>Psidium salutare</i>	3,67	13,79

Observa-se que os extratos etanólicos apresentam maior rendimento que os aquosos, sendo que a planta *Eugenia anomala* apresentou maior rendimento nas duas formas de preparação do extrato.

### 5.2 Screening fitoquímico

O screening fitoquímico permite avaliar qualitativamente qual a composição dos extratos estudados. Na tabela 2 verifica-se os diferentes componentes fitoquímicos testados em relação aos extratos aquosos e etanólicos das plantas estudadas, indicando presença ou

ausência do composto.

Tabela 2 - Apresentação dos resultados do screening fitoquímico, em que se demonstra a presença (+) ou ausência (-) do composto nos extratos, aquoso (EA) e etanólico (ET)

Componentes fitoquímicos testados	Plantas							
	<i>E. pitanga</i>		<i>E. anomala</i>		<i>E. arenosa</i>		<i>P. salutare</i>	
	EA	ET	EA	ET	EA	ET	EA	ET
Compostos fenólicos	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóides*	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas (depois de 15 min)	+	-	+	+	+	+	+	+
Saponinas (depois de add HCl)	+	-	+	-	+	+	-	-

O teste demonstrou o desenvolvimento da coloração verde no tubo A (cloreto ferrico 1%), conforme previsto quando há presença de compostos fenólicos em geral, e a intensificação da cor amarela no tubo B (hidróxido de potássio 3%), que também é indicativa da presença destes compostos em todos os extratos.

No teste para detecção de taninos ocorreu o desenvolvimento de um precipitado no tubo A (gelatina 1%), conforme previsto quando há a presença deste composto. No tubo B, observou-se a presença de taninos condensados, devido ao surgimento da cor verde após adição do cloreto de ferro 1% para o extrato etanólico, e a presença de taninos hidrolisáveis, devido ao surgimento da cor azul após a adição do cloreto de ferro 1% em todos os extratos estudados.

Na reação para detecção de flavonoides, obteve-se o desenvolvimento da coloração alaranjada, indicando a presença de flavonoides do tipo flavonas, nos extratos aquosos de todas as plantas e no extrato etanólico de *P. salutare* o desenvolvimento da coloração violácea que indica flavanonas no extrato etanólico de *E. pitanga* e a coloração vermelha, indicativo de flavonóis nos extratos etanólicos de *E. anomala* e *E. arenosa*.

Na detecção de saponinas, obteve-se a formação de espuma com altura superior a 1 cm e persistência de espuma após repouso de 15 minutos em todos os extratos com exceção do extrato etanólico de *E. pitanga*, e após a adição de ácido clorídrico 10%, ocorreu a presença

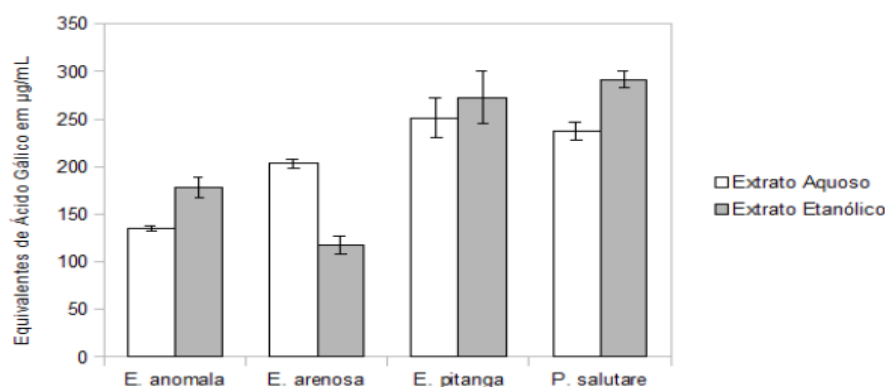
de saponinas em todos os extratos aquosos com exceção da planta *P. salutare*, sendo que nos extratos etanólicos ocorreu a formação de espuma apenas no extrato da planta *E. arenosa*.

### 5.3 Quantificação de polifenóis totais e flavonoides totais

Para avaliação de polifenóis totais foi utilizado o padrão ácido gálico (Merck) nas concentrações de 500, 250, 150, 100, 50  $\mu\text{g/mL}$ , obteve-se a equação da reta  $Y=0,001x+0,012$ , com  $R^2= 0,996$ . Os extratos foram utilizados na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Na Figura 10 verifica-se a presença de polifenóis totais em equivalente de ácido gálico em  $\mu\text{g/mL}$ , nos extratos aquosos e etanólicos das plantas da família *Myrtaceae* utilizadas neste estudo.

Figura 10 - Quantificação de polifenóis totais em extrato aquoso e etanólico de plantas da família *Myrtacea*



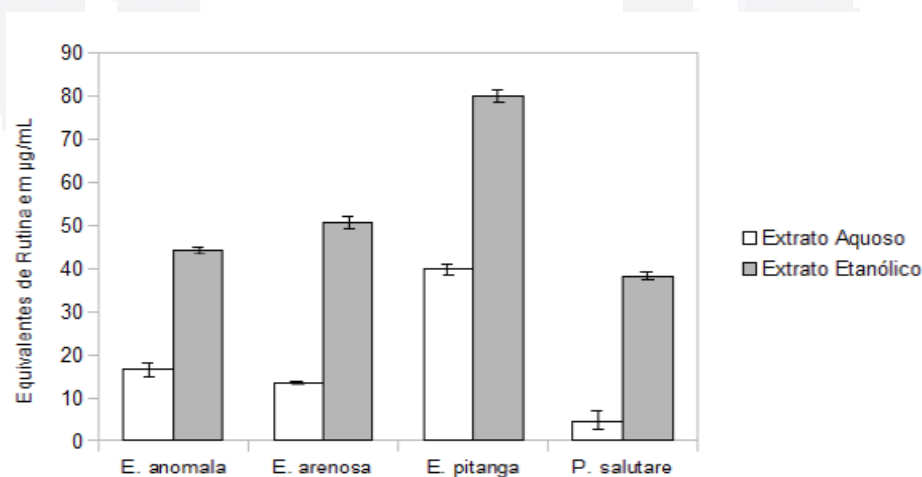
Foi verificado que para os extratos etanólicos, a planta *P. salutare* apresentou maior quantidade de polifenóis totais, e para os extratos aquosos a planta *E. pitanga* apresenta maior quantidade do composto, sendo que o extrato aquoso de *P. salutare* apresentou maior quantidade do composto em relação a todos os extratos estudados. Observa-se que os extratos etanólicos apresentaram maiores quantidades de polifenóis totais do que os extratos aquosos, com exceção do extrato aquoso de *E. arenosa* que apresentou maior quantidade que o extrato etanólico.

Neste estudo foi analisada a quantidade total de flavonoides nas amostras, sendo que os flavonoides são um subgrupo dos polifenóis amplamente encontrados em frutas, vegetais e cereais, apresentam potencial antioxidante, são quelantes de metais e inibidores da peroxidação lipídica (LEOPOLDINI et al., 2006).

Para a realização da quantificação de flavonoides totais utilizou-se como padrão rutina (Sigma-Aldrich), em uma curva de padronização com as concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$ , em que se obteve a equação da reta  $Y = 0,003x + 0,052$ , apresentando  $R^2 = 0,996$ , os extratos foram utilizados na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Observa-se na Figura 11 as concentrações de flavonoides totais dos extratos estudados por equivalentes de rutina em  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 11 - Quantificação de flavonoides totais em extrato aquoso e etanólico de plantas da família *Myrtaceae*



Os extratos aquoso e etanólico de *E. pitanga* apresentaram maiores concentrações de fenóis totais em comparação com as demais plantas estudadas, com concentração de polifenóis totais de 251,40  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato aquoso e de 272,75  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato etanólico e de flavonoides totais de 39,89  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato aquoso e 80  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato etanólico. Assim a planta *E. pitanga* apresenta uma boa quantidade de substâncias antioxidantes, essas que possuem a capacidade de proteger o organismo contra a ação oxidativa, evitando assim diversas ações no organismo, favorecendo a proteção do mesmo (ARTS E HOLLMAN, 2005).

Estes compostos em sua maioria são produtos de metabolismo secundário das plantas, que em geral ocorrem como um subproduto de interações da planta com o meio ambiente (CROTEAU et al., 2000), este resultado indica que a planta *E. pitanga* possui a mecanismos de defesa e possíveis condições de manutenção de sua espécie, mais adequadas que as demais, por apresentar maior produção de compostos fenólicos.

## **5.4 Atividade antioxidante por voltametria cíclica**

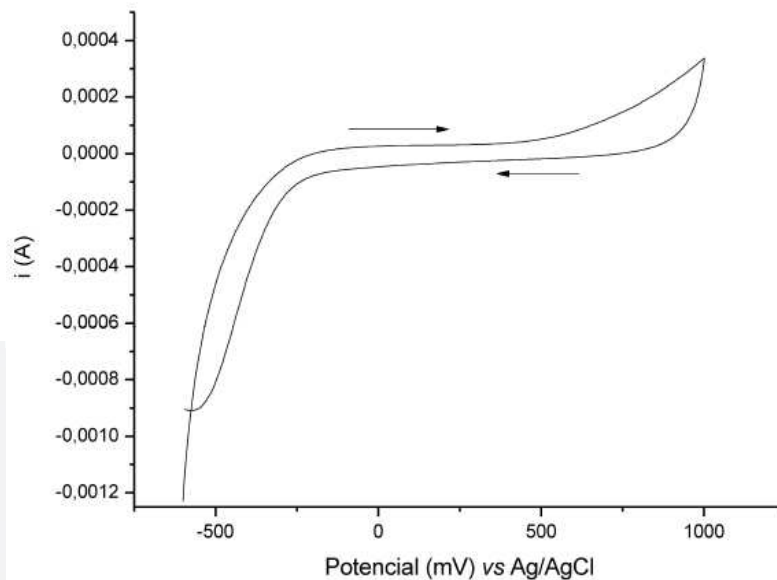
### **5.4.1 Atividade eletroquímica dos extratos**

A determinação da atividade antioxidante por voltametria cíclica, apresenta-se como uma interessante forma de avaliação desta ação, apresenta como uma vantagem a reduzida quantidade de amostra a ser utilizada, quando se leva em consideração o baixo rendimento dos extratos obtidos das plantas.

A seguir, são apresentados os dados obtidos a partir da avaliação eletroquímica dos extratos aquosos e etanólicos das plantas *E. arenosa*, *E. pitanga*, *E. anomala* e *P. salutare*. Como solvente foi utilizado tampão fosfato salino (PBS pH 6,4) e as leituras foram realizadas em eletrodo de trabalho de carbono vítreo.

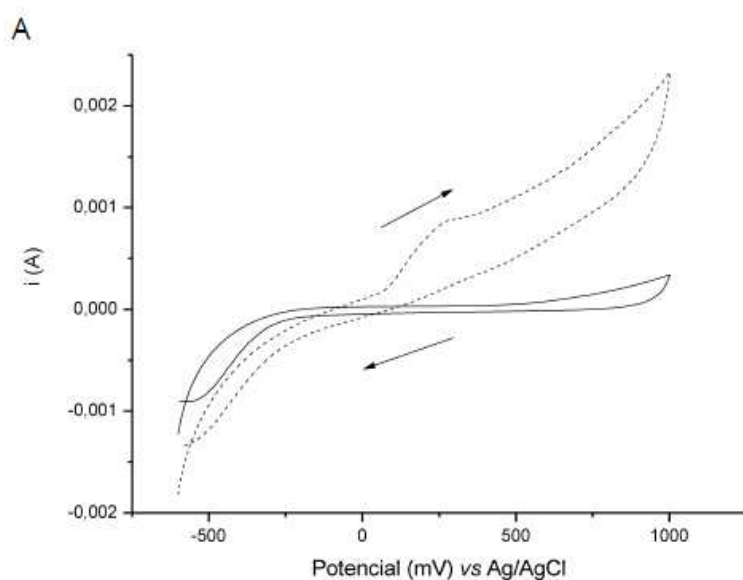
Na Figura 12 tem-se o voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo em tampão fosfato salino (PBS pH 6,4) utilizado nos experimentos, a Figura demonstra o comportamento característico do tampão PBS quando exposto a correntes a uma varredura de potenciais (FERREIRA et al., 2011).

Figura 12 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo em tampão fosfato salino (PBS pH 6,4),  $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$

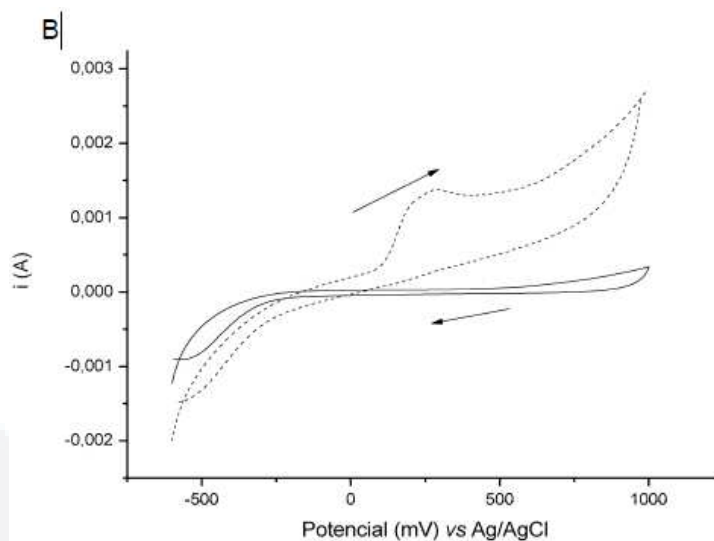


A Figura 13 demonstra o comportamento eletroquímico característico de compostos fenólicos com pico de oxidação em torno de 400 e 600 mV. Nesta faixa de potencial é possível avaliar flavonoides e ácidos fenólicos com dois grupos hidróxi na posição orto (YAKOVLEVA et al., 2007).

Figura 13 – Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo dos extratos aquoso (A) e etanólico (B) de *E. anomala*, em que a linha contínua representa o tampão PBS e a linha pontilhada representa os extrato de *E. anomala*,  $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$



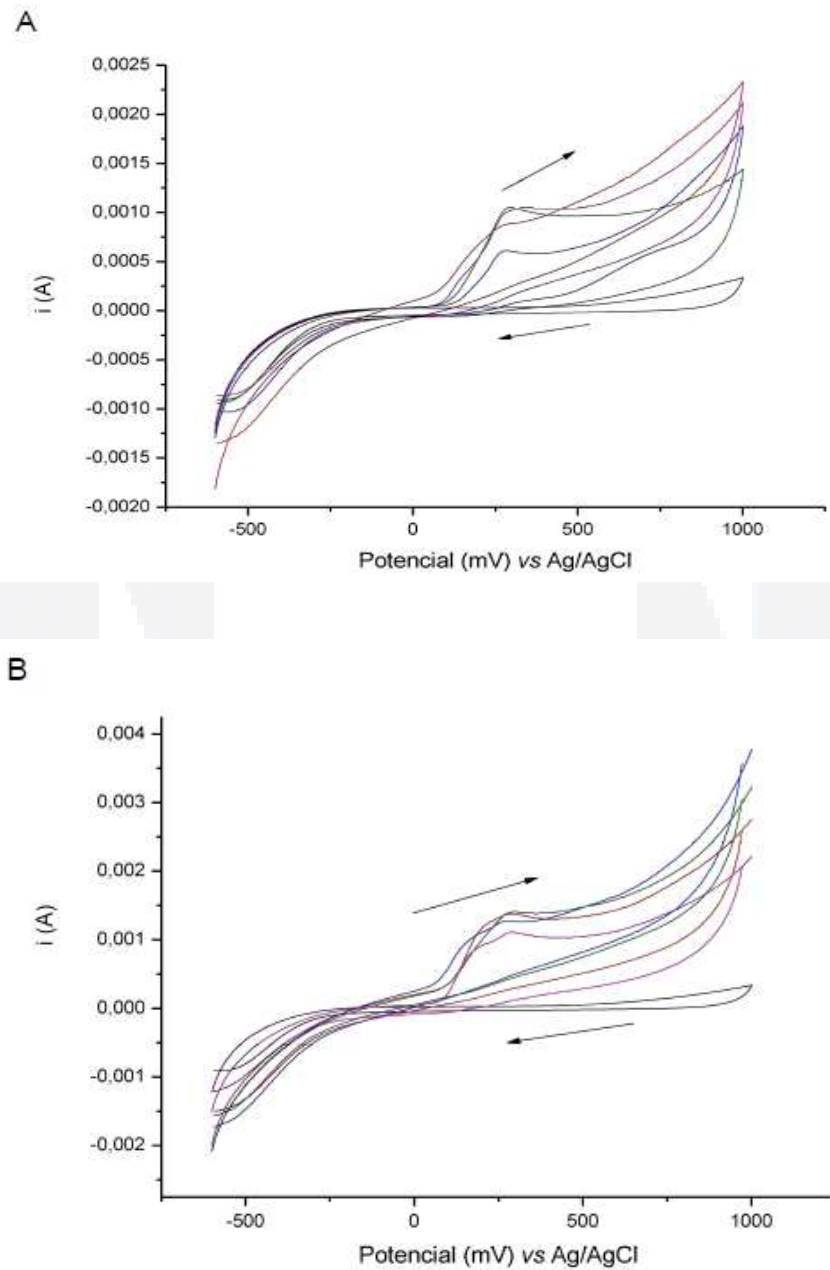




Observa-se que ambos os extratos aquoso e etanólico da mesma planta (*E. anomala*) apresentam picos de oxidação na região de 400 mV, sendo que o extrato etanólico apresenta um maior valor de corrente, com isso, sugere-se que este apresenta maior quantidade de compostos fenólicos que o extrato aquoso. Como os métodos e solventes para extração não são os mesmos, e possível que diferente grupos fenólicos e quantidades sejam extraídas das mesmas plantas.

Na Figura 14 observa-se que todos os extratos aquosos e etanólicos estudados tiveram comportamento semelhante, apresentaram pico em torno de 400 mV, demonstrando assim a presença de compostos fenólicos. Para verificação da composição dos extratos aquosos e etanólicos das plantas estudadas foi realizada avaliação qualitativa, através de *screening* fitoquímico, indicando ou não a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, alcaloides e quinonas, sendo que nestes testes foi verificado a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, logo todos esses compostos proporcionam atividade antioxidante aos extratos, o que foi evidenciado através das voltametrias cíclico.

Figura 14 – Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas. Linha preta tampão PBS, linha vermelha *E. anomala*, linha azul *E. arenosa*, linha rosa *E. pitanga* e linha verde *P. salutare*,  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$



Em torno de 400 mV, ocorrem os picos que representam os compostos fenólicos presentes nos extratos das plantas estudadas, sendo que no extrato aquoso (FIGURA 14A) as plantas *P. salutare* e *E. pitanga* apresentaram picos de oxidação maiores indicando maior quantidade destes compostos e nos extratos etanólicos (FIGURA 14B) as plantas *P. salutare* e

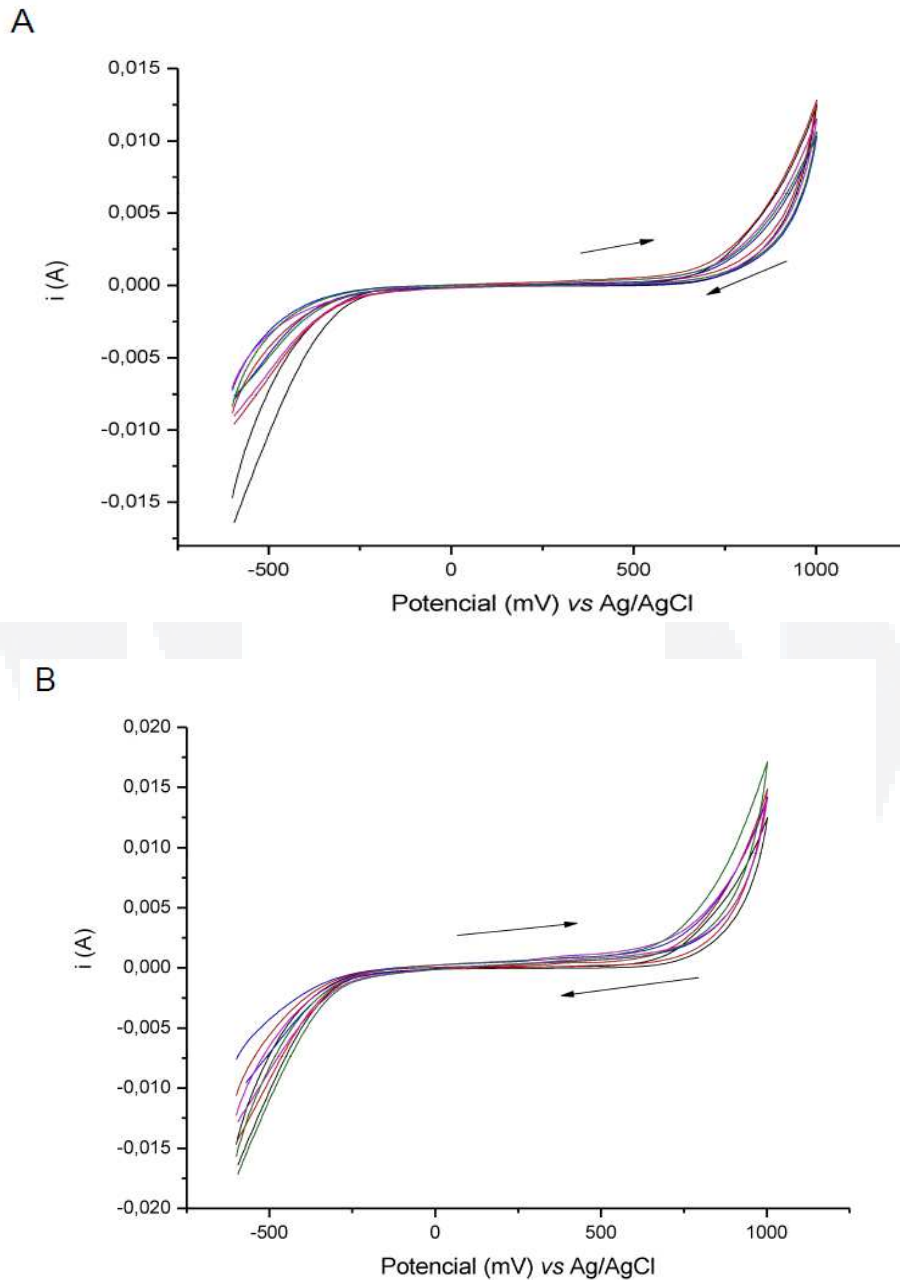
*E. arenosa* apresentaram os maiores picos, dados estes que corroboram com a quantificação de polifenóis e flavonoides totais realizados neste estudo, na qual foram observados maior quantidade de polifenóis e flavonoides totais no extrato aquoso de *E. pitanga* e *P. salutare*, no entanto nos extratos etanólicos a planta *E. pitanga* apresentou maior quantidade total destes compostos, logo e preciso avaliar a presença de outros compostos que possivelmente estão presentes na amostra, como os taninos que foram avaliados qualitativamente no screening fitoquímico.

Estudo realizado através de voltametria cíclica, com eletrodos de carbono vítreo em solução aquosa contendo rutina, demonstrou a oxidação da molécula na região de 200 mV. Esta se refere à oxidação de hidroxilas, ligadas ao carbono 3' e 4' do anel aromático B da molécula de rutina (BIANCHETTI et al., 2009). Considerando que a rutina se apresenta como um flavonoide glicosilado da classe dos flavonóis (BRUNETON, 2001), classe esta encontrada na avaliação qualitativa por screening fitoquímico nos extratos etanólicos das plantas *E. arenosa* e *E. anomala*, a comparação com o presente estudo é possibilitada. Logo esta ação pode estar relacionada ao mecanismo de eletro-oxidação apresentado pelos extratos das plantas utilizadas no presente estudo, pois nestas ocorre o pico de oxidação em regiões próximas a 200 mV, sendo que o deslocamento pode estar relacionado, inclusive, com a complexidade da matriz contendo os extratos.

Após a realização destas avaliações, nas mesmas condições experimentais foi realizado estudo com a adição de reação Fenton (peróxido de hidrogênio + sulfato de ferro), podendo assim avaliar a atividade dos compostos fenólicos dos extratos aquosos e etanólicos das plantas estudadas.

A Figura 15 demonstra os extratos aquosos e etanólicos das plantas da família *Myrtaceae* quando o substrato foi submetido a uma reação Fenton.

Figura 15 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas com adição de peróxido de hidrogênio e sulfato de ferro (Reação Fenton),  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$



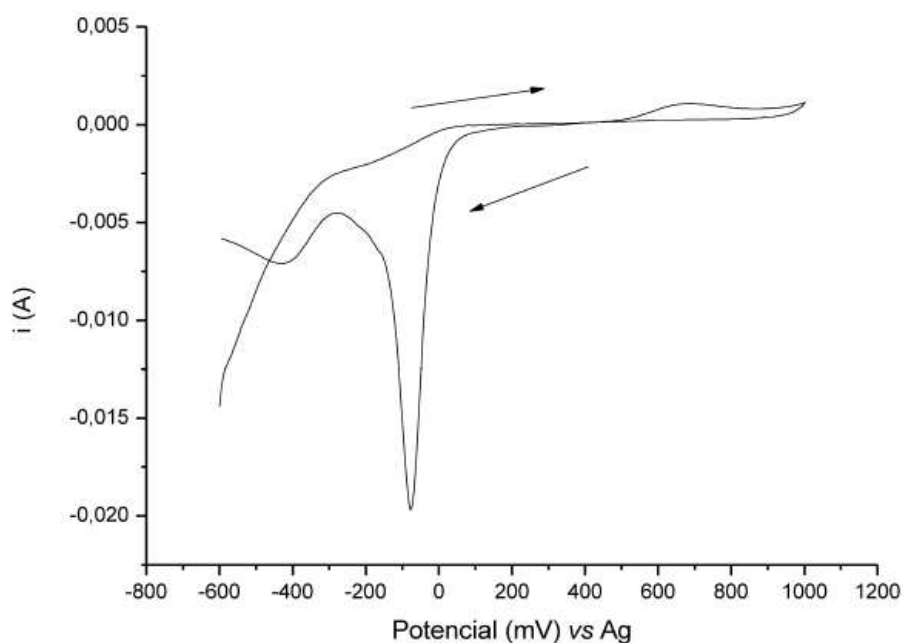
Com a reação Fenton ocorre a redução da capacidade antioxidante devido a presença desta reação que promove a degradação dos compostos antioxidantes presentes, devido a formação de radicais hidroxila (BODINI et al., 2001), não sendo mais visualizados os picos característicos dos compostos fenólicos inicialmente presentes nos extratos analisados.

#### 5.4.2 Avaliação da atividade antioxidante com eletrodos impressos modificados

Para a realização dos estudos da atividade antioxidante por voltametria cíclica foram utilizados eletrodos modificados de Co-ftalocianina, para detectar a presença de peróxido de hidrogênio nas amostras, assim a redução ou aumento das correntes avaliadas podem definir a possível atividade antioxidante, e também é possível verificar a evolução de oxigênio presente na amostra.

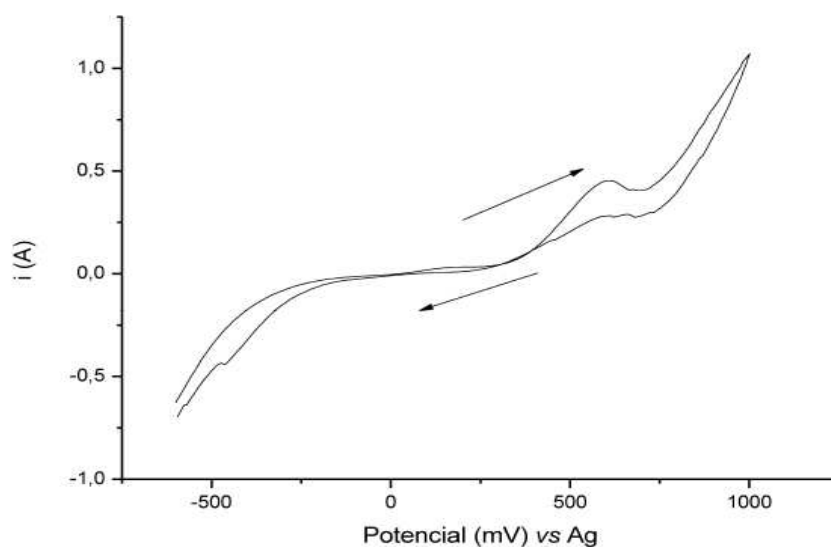
A Figura 16 demonstra a varredura por voltametria cíclica do tampão fosfato salino (PBS pH 6,4) sobre o eletrodo de Cobalto-ftalocianina (Co-ftalocianina), pode-se observar o comportamento característico de sistema que contém o tampão utilizado sobre este tipo de eletrodo, aonde é verificado um pico em  $-77,5$  mV, comportamento devido a processos redox que ocorrem no filme de Co-ftalocianina (SANTOS et al., 2010).

Figura 16 - Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina do tampão (PBS pH 6,4),  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$



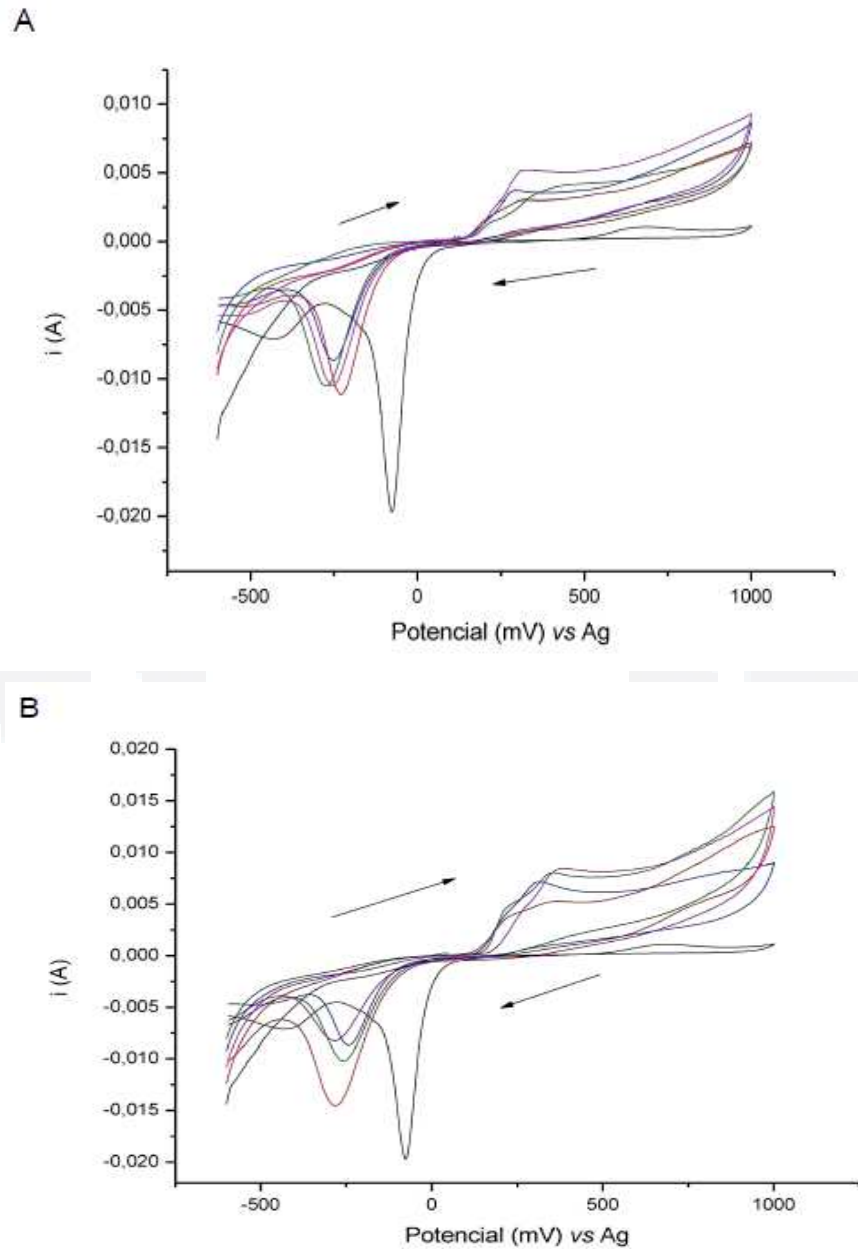
A Figura 17 demonstra o voltamograma cíclico característico de soluções contendo peróxido de hidrogênio sobre eletrodos modificados com Co-ftalocianina, nele se observa o pico característico do peróxido de hidrogênio ( $50 \mu\text{L/mL}$ ) em torno de  $600$  mV (SERGEYEVA et al., 1999; CHAVE et al., 2003; ÇEKEN et al., 2012).

Figura 17 – Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina do tampão PBS com adição de peróxido de hidrogênio,  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$



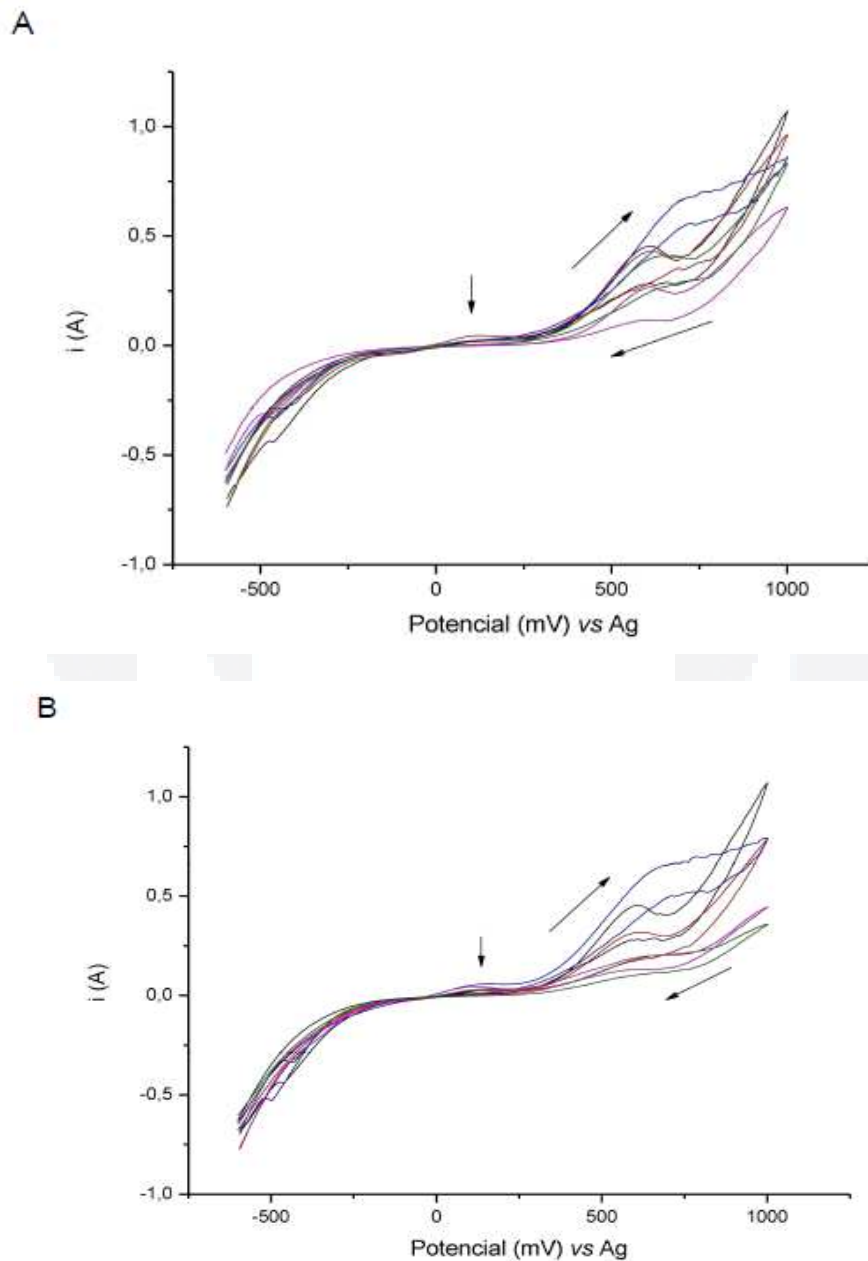
A Figura 18 apresenta os voltamogramas cíclicos dos extratos aquosos e etanólicos das plantas estudadas, utilizado como solvente tampão fosfato salino (PBS pH 6,4), em eletrodo de Co-ftalocianina, se verificam os picos correspondentes aos compostos fenólicos presentes nas amostras, em torno de 400 mV. Observa-se a ocorrência do deslocamento do pico de redução característico do tampão PBS sobre o eletrodo de Co-ftalocianina (Figura 16) e consequente diminuição do mesmo, o que pode significar que espécies não condutoras se depositem sobre o substrato, devido a complexidade da matriz dos extratos, podendo caracterizar assim um efeito adsortivo (SANTOS et al., 2010).

Figura 18 - Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas. Linha preta tampão PBS, linha vermelha *E. anomala*, linha azul *E. arenosa*, linha verde *E. pitanga* e linha rosa *P. salutare*,  $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ .



A Figura 19 demonstra as voltametrias cíclicas dos extratos aquosos e etanólicos das plantas estudadas, utilizado como solvente tampão fosfato salino (PBS pH 6,4), com a adição de peróxido de hidrogênio sobre o eletrodo de Co-ftalocianina. Ocorre a formação de um novo pico em potenciais positivos (em torno de 600 mV), sendo que este pico é característico do peróxido de hidrogênio sobre o eletrodo de Co-ftalocianina.

Figura 19 - Voltamograma cíclico de eletrodo de Co-ftalocianina dos extratos aquosos (A) e etanólicos (B) das plantas estudadas com adição de peróxido de hidrogênio sobre eletrodo de Co-ftalocianina. Linha preta tampão PBS, linha vermelha *E. anomala*, linha azul *E. arenosa*, linha rosa *E. pitanga* e linha verde *P. salutre*,  $v = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$



Deve-se considerar que os diferentes extratos apresentaram diferentes valores de corrente no pico atribuído ao peróxido de hidrogênio. Estas alturas de pico podem indicar o potencial antioxidante dos extratos, pois se percebe que para alguns extratos o pico referente ao peróxido de hidrogênio tem sua corrente de pico reduzida, como e o caso do extrato aquoso



de *E. pitanga* e dos extratos etanólico de *E. pitanga* e *P. salutare*. Enquanto que o extrato aquoso e etanólico de *E. arenosa* apresentam picos com maior valor de corrente, indicando menor ação antioxidante, sendo assim comprovada a análise de determinação de compostos fenólicos nos diferentes extratos estudados, sendo que estes apresentam a seguinte ordem decrescente de compostos fenólicos, extratos aquosos: *E. pitanga*, *P. salutare*, *E. arenosa* e *E. anomala*; e os extratos etanólicos em ordem crescente: *E. arenosa*, *E. anomala*, *E. pitanga* e *P. salutare*.

Importante salientar que os efeitos adsorptivos podem ser observados, mas é interessante que este efeito não ocorra para que não interfira na avaliação da amostras (Hilgemann et al., 2013), assim como a presença de metais nos extratos pode ser um fator interferente, pois eles reduzem a disponibilidade de peróxido de hidrogênio no meio (MATTOS et al., 2003).

O comportamento característico do tampão PBS sobre eletrodo de Co-ftalocianina não pode mais ser observado como na Figura 18, pela interação do peróxido de hidrogênio com o eletrodo de Co-ftalocianina. Ainda mesmo após a adição de peróxido de hidrogênio é possível verificar a presença de correntes correspondentes aos compostos fenólicos, na faixa de 400 mV (FIGURA 19). As voltametrias cíclicas dos extratos aquosos (FIGURA 19A) não apresentaram pico de oxidação característico dos compostos fenólicos em presença de peróxido, exceto o extrato aquoso de *E. anomala*, enquanto que as varreduras dos extratos etanólicos (FIGURA 19B), todos apresentaram o pico correspondente aos compostos fenólicos, exceto o extrato etanólico de *E. anomala*, demonstrando que os extratos etanólicos das plantas estudadas apresentam atividade antioxidante mais intensa que os extratos aquosos, confirmando as análises de quantificação de compostos fenólicos realizados no presente estudo.

Logo, foi possível inferir sobre a atividade antioxidante através de metodologia eletroquímica, tanto na utilização do eletrodo de carbono vítreo como com o eletrodo modificado com Co-ftalocianina, apresentando possibilidade de complementação na forma de avaliação dos compostos fenólicos presentes nas amostras por meio de técnica eletroquímica.

A comparação da determinação da atividade antioxidante por meio da utilização da técnica de voltametria cíclica com a técnica de inibição por DPPH (PRADO, 2009), destes mesmos extratos das plantas estudadas, inferem resultados semelhantes (dados não

apresentados), sendo que o IC<sub>50</sub> dos extratos aquosos seguem a mesma sequência de ação demonstrada na atividade antioxidante por voltametria cíclica, em que a planta *E. pitanga*, apresentou melhor atividade.

Em relação aos extratos etanólicos, a avaliação de IC<sub>50</sub> pelo método de redução de DPPH demonstra que o extrato de *E. arenosa* apresentou melhor atividade, sendo que quando avaliada a ação antioxidante por voltametria cíclica sobre eletrodo de modificado de Co-ftalocianina, verifica-se que a planta *E. arenosa* possui menor ação antioxidante após a adição do peróxido de hidrogênio. Logo outras classes de antioxidantes, ou diferentes mecanismos de ação oxidante/antioxidante podem estar envolvidos.

### **5.5 Teste antimicrobiano frente ao micro-organismo *E. coli* – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima**

A atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólicos das plantas da família *Myrtaceae*, foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, possibilitando a determinação da concentração Inibitória Mínima (CIM) e a concentração Bactericida Mínima (CBM).

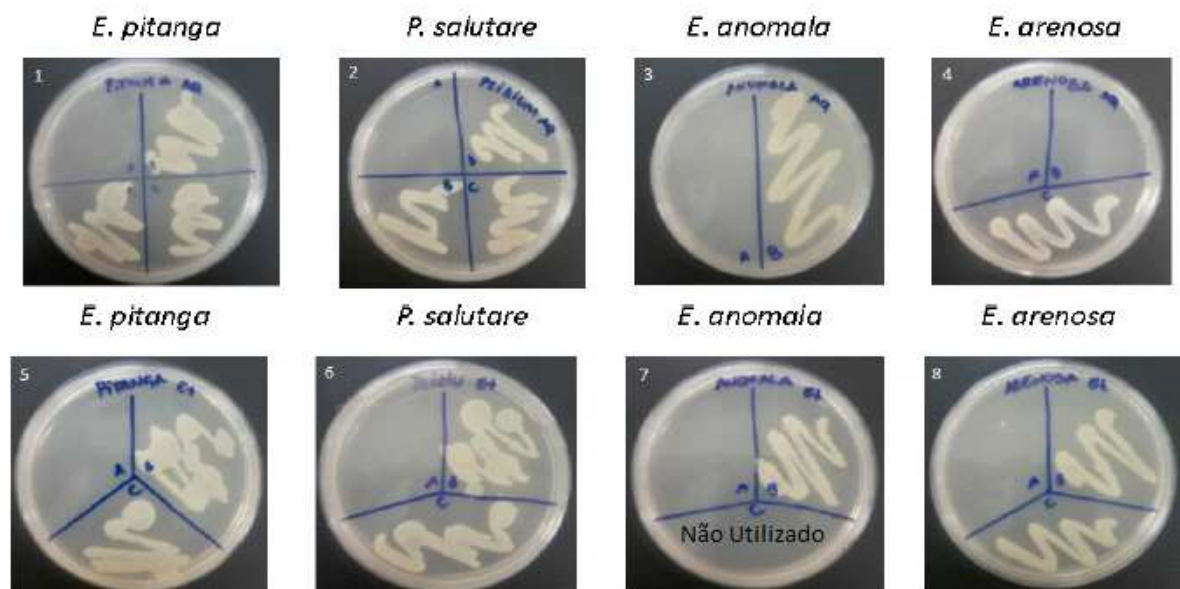
Na tabela 3, se verifica a CIM e CBM dos extratos aquosos e etanólicos das diferentes plantas estudadas, sendo que para os extratos aquosos a planta *E. arenosa*, apresentou ação bactericida, na concentração de 10 mg/mL, os demais apresentaram eficácia na concentração de 20 mg/mL, nos extratos etanólicos todas as plantas estudadas apresentaram ação bactericida na concentração de 20 mg/mL. A ação concentração, em que há a inibição da bactéria, porém não a morte, foi verificada com menor concentração nos extratos aquosos de *E. pitanga* e *P. salutare* e no extrato etanólico de *E. arenosa*, na concentração de 2,5 mg/mL.

Tabela 3 - Resultados da concentração Inibitória Mínima e concentração Bactericida Mínima frente a *E. coli*

Planta	Extrato aquoso (mg/mL)		Extrato etanólico (mg/mL)		Padrão (mg/mL)
	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>E. pitanga</i>	2,5	20	5	20	0,1
<i>E. anomala</i>	10	20	10	20	0,1
<i>E. arenosa</i>	5	10	2,5	20	0,1
<i>P. salutare</i>	2,5	20	5	20	0,1

A verificação da ação bactericida dos extratos foi realizada através do plaqueamento das amostras de CIM que não apresentaram turbidez nos poços, a Figura 20 demonstra o plaqueamento dos extratos aquosos e etanólico, a placa foi dividida de forma que todos as concentrações pudessem constar na mesma placa, sendo que A corresponde a concentração de 20 mg/mL, B a 10 mg/mL, C a 5 mg/mL e D a 2,5 mg/mL.

Figura 20 - Placas de petry com o plaqueamento das concentrações que apresentaram inibição do micro-organismo estudado frente ao extratos das plantas estudadas, em que 1,2,3 e 4 refere-se aos extratos aquosos e 5,6,7 e 8 refere-se aos extratos etanólicos



Estudo realizado por Cos et al. (2006) sugere uma classificação para os resultados de uma atividade antimicrobiana. As atividades podem ser consideradas “relevantes” para concentrações de 100 µg/mL para extratos (misturas) e de 25 µM para substâncias puras,

utilizando 105 UFC/mL de bactérias no ensaio de CIM. Os resultados encontrados para extratos aquosos e etanólicos aqui estudados apresentaram uma inibição na ordem de 10 e 20 mg/mL utilizando,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Assim temos uma concentração final de extratos mais elevada, mas também há maior número de bactérias a serem inibidas.

Os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro* (SOUSA et al., 2007). Os flavonoides são uma das classes de antioxidantes que possuem a capacidade de inibir ou inativar micro-organismos, sendo que esta atividade pode apresentar baixa toxicidade em células animais (HAVSTEEN, 2002), logo a utilização de antioxidantes naturais torna-se interessante, pois eles apresentam ação redutora de radicais livres, podendo agir por diferentes vias, tanto isolados, como em sinergismo com outros compostos (CANTERLE, 2005). Estudo realizado com 6 flavonoides diferentes, demonstrou que todos apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria *K. pneumoniae* (OZCELIK et al., 2008).

Estudo recente realizado por Wu et al. (2013) indica que a presença de compostos lipofílicos, na posição 8, da molécula do flavonoide, melhora sua ação antibacteriana, corroborando com os dados encontrado no estudo realizado, em que as plantas da família *Myrtaceae* apresentaram adequada quantidade de compostos fenólicos. Importante salientar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *E. arenosa* frente a *E.coli*, na concentração de 10 mg/mL, assim como a presença de maior quantidade de polifenóis totais do que o extrato etanólico da mesma planta, sendo assim possível a presença de compostos fenólicos específicos que auxiliem na ação bactericida deste extrato.

Logo o potencial antimicrobiano pode estar relacionado com a ação dos compostos fenólicos presentes, pois em estudo realizado por Donatini et al. (2009) foi verificada a presença de 1,2% de flavonoides no extrato de folhas da planta *Syzygium jambos* (L.) Alston da família *Myrtaceae*, o que pode ser utilizado como um tratamento antiulcera, sendo que os flavonoides presentes no extrato facilitam o aumento do conteúdo local de prostaglandinas e reduzem a secreção de histamina, inibindo a bomba de prótons e agindo na bactéria *H. pylori* (BORELLI E IZZO, 2000).

## CONCLUSÃO

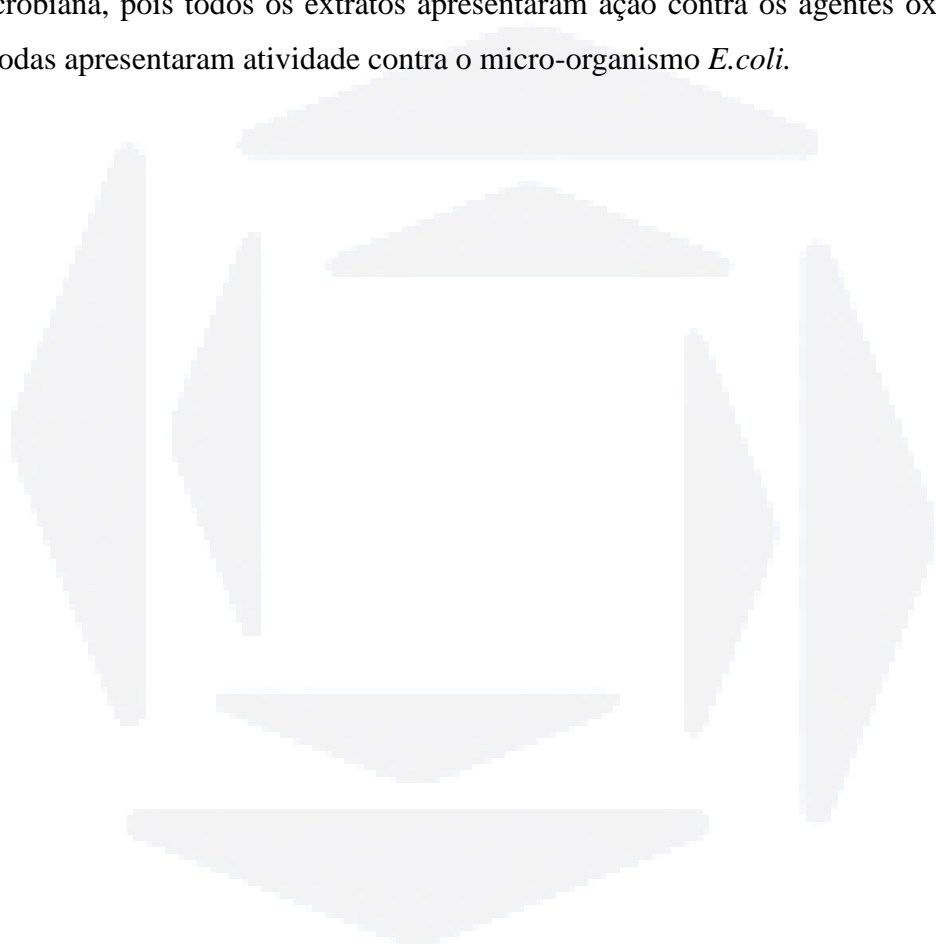
O estudo do potencial terapêutico de plantas da flora local é importante para a manutenção das espécies e do ecossistema em que estas estão inseridas, assim como a possibilidade de encontrar princípios ativos para o tratamento de patologias, favorecendo a acessibilidade ao tratamento.

Logo, nesta pesquisa identificou-se nos extratos das plantas estudadas uma atividade antimicrobiana contra o micro-organismo *E. coli*, sendo que a concentração bacteriostática mínima foi de 2,5 mg/mL nos extratos aquosos (planta) e a ação bactericida ocorreu na concentração de 20 mg/mL de todos os extratos, com exceção do extrato aquoso de *E. arenosa* que apresentou ação bactericida na concentração de 10 mg/mL, a avaliação de polifenóis totais demonstrou que os extratos etanólicos em geral apresentam maior quantidade de polifenóis, sendo que a planta *E. arenosa* apresentou maior quantidade de polifenóis totais no extrato aquoso.

Todos os extratos etanólicos apresentaram maior quantidade total de flavonoides do que os extratos aquosos, foi observado uma quantidade adequada quando relacionados aos valores de polifenóis, já que os flavonoides são uma subclasse dos polifenóis, no entanto outros compostos fenólicos podem estar presentes nas amostras estudadas, pois no estudo foram utilizadas amostras de extratos brutos destas plantas. Assim, torna-se importante seguir com a verificação dos demais compostos presentes, para a possível identificação de mecanismos de inibição bacteriana dos extratos destas plantas, ou isolamento de compostos para melhorar a eficácia de tratamento.

Ainda, em relação a ação antioxidante das plantas estudadas, pode-se inferir que, por meio das diferentes metodologias testadas, os extratos aquosos apresentaram a seguinte ordem decrescente, em termos de presença de compostos que conferem atividade antioxidante: *E. pitanga*, *P. salutare*, *E. arenosa* e *E. anomala*; já para os extratos etanólicos tem-se a seguinte ordem crescente: *E. arenosa*, *E. anomala*, *E. pitanga* e *P. salutare*.

Logo, foi possível identificar a interação entre a atividade antioxidante e antimicrobiana, pois todos os extratos apresentaram ação contra os agentes oxidantes, assim como todas apresentaram atividade contra o micro-organismo *E.coli*.



## PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

- Quantificar outras classes de compostos fenólicos
- Identificar compostos fenólicos ativos.
- Testar os extratos aquosos e etanólicos das plantas frente a outras bactérias, Gram positivas, por exemplo, para verificar se contra essas apresentam, maior eficácia.
- Isolar compostos químicos da planta.
- Verificar diferença de produção dos metabolitos secundários, acompanhando com extratos de colheitas sazonais.

## REFERÊNCIAS

- ACTOR, J.K. **Imunologia e microbiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- ALEXIOU, C.; LEVER, A. P. L. Tuning metalloporphyrin and metallophthalocyanine redox potentials using ligand electrochemical (E L) and Hammett ( $\delta\rho$ ). **Coordination Chemistry Reviews**. 216-217:45-54, 2001.
- ALTERTHUM, F. **Fatores de Virulência Microbiana**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. . Tratado de Infectologia, ed. 2a, Atheneu, São Paulo, 2002.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRIGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**. 30(3):623-628, 2007.
- ARAUJO, J.M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2008.
- ARTS, I.C.W.; HOLLMANN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American Journal Clinical Nutrition**. 81(1): 3175- 3255, 2005.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods Fundamentals and Applications**. New York: J. Wiley, 1980.
- BARREIROS, A. L. B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 29(1):113-123, 2006.
- BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**. 1;23(4):320-8, 2001.



BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BIANCHETTI, P.; TASSINARY, J.A.F.; CERUTTI, D.G.U.; BARNES, D.; ETHUR, E.M.; STÜLP, S. Avaliação eletroquímica e espectrofotométrica de soluções de rutina submetidas a ultrassom terapêutico. **Revista Liberato**. 10(14):139-148, 2009.

BIANCHETTI, P.; STULP, S. Estudo eletroquímico da atividade antioxidante do extrato glicólico de *Arnica montana*. **Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**. 2011.

BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**. 12(2):123-130, 1999.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações a medicina e a higiene**. 16. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1975.

BRASIL. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.

BONDII, M.E.; DEL VALLE, M.A.; TAPIA, R.; LEIGHTON, F.; GONZALEZ, L. Study of the iron catechin complexes in dimethy sulphoxide. Redox chemistry and interaction with superoxide radical anion in this medium. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, 46 (3), 2001.

BORELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a souce of anti-ulcer remedies, **Phytoterapy Research**, 14:581-591, 2000.

BRUNETON, J.; VILLAR DEL FRESNO, A.; CARRETERO ACCAME, E. **Farmacognosia: fitoquímica, plantas, plantas medicinales**. 2. ed. Saragoça: Acribia, 2001.

CANTERLE, L.P. Erva-mate e atividade antioxidante. **Dissertação de Mestrado**, UFSM, Santa Maria, RS, 2005.

CARVALHO, L.M.; MONSERRAT, J.M.; SCHOLZ, F.; LIMA, O.L.; ROSA, M.B.; HILGEMANN, M.; MULLER, L.S.; FACCIN, H.; RAMOS, P.B; VIANA, C. Substrate-free Determination of the Radical Scavenging Activity of Phenolic Compounds by Photochemical Generation of Hydroxyl Radicals and HPLC-UV Detection. **Sepration Science and**

**Technology.** 48: 1123–1131, 2013.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; OHARA, A. Antioxidantes dietéticos: controversias e perspectivas. **Química Nova.** Vol. 30, No. 2, 441-449, 2007.

CHAVE, J.A.P.; ARAUJO, M.F.A.; VARELA-JUNIOR, J.J.G.; TANAKA, A.A. Eletrocatalise da reação de redução de oxigênio sobre eletrodos de grafite modificados com ftalocianina tetracarboxilada de ferro. **Eclética Química.** 28:9-19, 2003.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia Uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal Ethnopharmacology.** 66(1):33-39, 1999.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A. MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química.** 2(1):47-59, 2010.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico& perspectivas. **Química Nova.** 32(3): 703-716, 2009

COS, P. ; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. **Journal of Ethnopharmacology**, 106:290–302, 2006.

CROTEAU, R.; KUTCHAN. T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). *In.* Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, eds, **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 2000.

ÇEKEN, B.; KANDAZ, M.; KOCA, A. Electrochemical hydrogen peroxide sensor based on cobalt phthalocyanine captured in polyaniline film on a glassy carbon electrode. **Journal Porphyrins Phtalocyanines.** 16:380-389, 2012.

DAVID, Q.A.; DAVID, J.M; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Metodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova.** 33(10):2202-2210, 2010.

DONATINI, R.S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividades antiúlcera e

antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19:89-94, 2009.

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

ESTADÃO. Fazenda organica de brotos de feijao na Alemanha seria a origem de "E. coli". 11 de junho de 2011. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/impreso,fazendaorganica-de-brotos-de-feijao-na-alemanha-seria-a-origem-de-e-coli,730944,0.htm>. Acesso em: 16/10/2013

ESTEVEZ, M.; CAVA, R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**. 72: 348-355, 2006.

FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal Chemical Society**, 65(65): 899-911, 1894.

FERREIRA, I.C.R.F.; ABREU, R. M.V. Strees oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálises**. 2:32-39, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.M. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43(1): 61-68, 1997.

FERREIRA, A.A.P., RIBEIRO, S.J.L.; FUGIVARA, C.S.; CAIUT, M.A.; SARGENTELLI, V.; BENEDETTI, A.V. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade de contato solido. **Eclética química**, 36(2): 183-204, 2011.

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

FORSBERG, B. C.; PETZOLD, M. G.; TOMSON, G.; ALLEBECK, P. Diarrhoea case management in low and middle-income countries — an unfinished agenda. **Bulletin of the World Health Organization**. 85:42-48, 2007.

FRANZON, R.; CAMPOS, L.Z. De O.; PROENCA, C.E.B.; SILVA, J.C.S. **Araçás do**

**Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos.** Brasília/DF: Embrapa Cerrados, 2009.

G1. Alemanha confirma que brotos de feijão são a origem do surto de 'E.coli'. 10 de junho de 2011. Disponível em: <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2011/06/alemanha-confirma-que-brotos-de-feijao-sao-origem-do-surto-de-ecoli.html>. Acesso em: 16/10/2013.

GASPAR, J.; VIEIRA, R.; TAPIA, M. Aspectos Sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira de Gentilandia, Fortaleza, Ceara. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 11, 1997.

GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTINEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**. 58(9):537-552, 2009.

GIROTTI, M. E.; PAOLI, M.A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: importância, técnicas e modelos teóricos. **Química Nova**. 22(3)358-368, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**. 30(2):374-381, 2007.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Ed. Mc Graw Hill Interamericana do Brasil. ISBN 85-7726-001-1. Ed. 11a. 2006.

GOMES, T.A.T.; RASSI, V.; MAC DONALD, K.L., RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.F.; BLAKE, P.A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **Journal Infectology Diseases**. 164: 331-337. 1991.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**. 3aed. London: Chapman & Hall, 1998

HASSAN, Y.I.; BULLERMAN, L.B. Cell-surface binding of deoxynivalenol to *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from sourdough started culture. **Journal of Microbiology and Food Science**, 2(5): 2323-2325, 2013.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, 96(1-2): 67-202, 2002.

HILGEMANN, M.; BASSETTO, V.C.; KUBOTA, L.T. Electrochemical Approaches Employed for Sensing the Antioxidant Capacity Exhibited by Vegetal Extracts: A Review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 16:1386-2073, 2013.

HILGEMANN, M.; SCHOLZ, F. KAHLERT, H.; CARVALHO, L.M.; ROSA, M.B.LINDEQUIST, U.; WURSTER, M.; NASCIMENTO, P.C.; BOHRER, D. Electrochemical Assay to Quantify the Hydroxyl Radical. **Electroanalysis**. 22( 4):406 – 412, 2010.

IBRAHIM, H. M., ABOU-ARAB, A. A., SALEM, F. M. A. Antioxidant and antimicrobial effects of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. **Grasas y aceites**. 62 (2):139-148, 2011.

KUMARAN, S.; DEIVASIGAMANI, B.; ALAGAPPAN, K.; SAKTHIVEL, M.; KARTHIKEYAN, R. Antibiotic resistant *Escherichia coli* strains from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 3(12):977-981, 2010.

KUTCHAN, T.M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**. 125(1): 58-60, 2001.

LAMDRUM, L. R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **The New York Botanical Garden**. 49 (4):508-536, 1997.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; CHIODO, S.; TOSCANO, M. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 54:6343-6351, 2006.

LU, J.; PAPP, L. V.; FANG, J.; RODRIGUEZ-NIETO, S.; ZHIVOTOVKY, B.; HOLMGREN, A. Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity. **Cancer Research**. 66:4410-4418, 2006.

MARANHÃO, H.S.; MEDEIROS, M.C.; SCALETSKY, I.C.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M.B. The epidemiological and clinical characteristics and nutritional development of infants with acute diarrhoea, in north-eastern. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. 102(4):357–365, 2008.

MARQUES, G.S.; MONTEIRO, R.P.M.; LEAO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; ROLIM-NETO, P.J.; XAVIER, H.S.; SOARES, L.A.L. Avaliacao de procedimentos para quantificacao espectrofotometrica de flavonoides totais em folhas de Bauhinia forficata Link. **Química Nova**, 35(3), 517-522, 2012.

MATTOS, I.L.; SHIRAISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDES, J.R. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química nova**. 26(3):373-380, 2003.

MIELNIK, M. B.; SIGNE, S.; BJORG, E., GRETE, S. By-products from herbs essential oil production as ingredient in marinade for turkey thighs. **Food Science Technology**. 41, 93-100, 2008.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B; COSTA, S.M.O; AGUIAR, L.A. Acao antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 19(1b):315-320, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**. 11:142-201, 1998.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. NCCLS document M7-A6. 32(2), 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre Artmed, 2011.

OHARA, A. **Radicais Livres: Bons, maus e naturais**. Oficina de Textos: São Paulo, 2006.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. **Molecules**, 16: 2191-2217, 2011.

OZCELIK, B.; ORHAN, D.D.;OZGEN, S.; ERGUN, F. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ES $\beta$ L)-Producing *Klebsiella pneumonia*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 7(4): 1151:1157, 2008.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2 ed., Makron Books LOCAL , 1996.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabolitos secundários vegetais e benefícios

antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. (3(4):146-152. 2012.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade de São Paulo, 2009.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. Sao Paulo: Editorial Premier, c1997.

SANDERS, T.A.B. Food production and food safety. **British Medical Journal**. 318:1689-1693, 1999.

SANTOS, S. R. **Contribuição ao estudo anatômico das Mytaceae nativas no Rio Grande do Sul**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal – UFSM. 2012

SANTOS, A.C.; LUZ, R.A.S.; FERREIRA, L.G.F.; SANTOS JUNIOR, J.R.; SILVA, W.C.; CRESPILO, F.N. Organização supramolecular da ftalocianina de cobalto(II) e seu efeito na oxidação do aminoácido cisteína. **Química nova**, 33(3), 2010.

SES-RS - SECRETARIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, Cuidados com água e alimentos para a prevenção da contaminação por E. coli. 2011. Disponível em: [http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337978259\\_Cuidados%20com%20%C3%A1gua%20%20alimentos%20para%20a%20preven%C3%A7%C3%A3o%20da%20contamina%C3%A7%C3%A3o%20por%20E%20coli.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1337978259_Cuidados%20com%20%C3%A1gua%20%20alimentos%20para%20a%20preven%C3%A7%C3%A3o%20da%20contamina%C3%A7%C3%A3o%20por%20E%20coli.pdf), acesso em: 01/07/2013.

SERGEYEVA, T.A.; LAVRIK, N.V.; RACHKOV, A.E.; KAZANTSEVA, Z.I.; PILETSKY, S.A.; EL'SKAYA, A.V. Hydrogen peroxide-sensitive enzyme sensor based on phthalocyanine thin film. **Analytica Chimica Acta**. 391: 289-297, 1999.

SILVA, V.O. Estudos cinéticos da Catalise da Reação de Fenton por 3,5-Di-terc-Butil-Catecol. **Tese de doutorado**. Instituto de química da Universidade de São Paulo. 2010.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P; GOSMAN, G; MELLO, J. C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre. 5 ed. 2004.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic**, 16:144-158, 1965.

SKOOG, D.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre, 5ed, 2002.

SOUSA, C.M.M; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C; COSTA, C.L.S; ARAUJO, D.S. CAVALCANTE, L.C.D; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, B.P.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30(2): 351-355, 2007.

SOUZA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**. 9(1):83-88, 2006.

SYMEON, G. K.; ZINTILAS, C.; DEMIRIS, N.; BIZELIS, I. A; DELIGEORGIS, S. G. Effects of oregano essential oil dietary supplementation on the feeding and drinking behaviour as well as the activity of broilers. *International Journal of Poultry Science*. 9 (4): 401-405, 2010.

TODD, W. J.; BAILLY, F.; PAVEZ, J.; FAGUY, P.W.; BALDWIN, R.P.; BUCHANAN, R.M. Electrochemically induced metalation of polymeric phthalocyanines. **Journal of the American Chemical Society**. 120(19):4887-4888,1998.

TORRES, A.R.; OLIVEIRA, R.A.G.; DINIZ, M.F.F.M.. ARAÚJO, E.C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 15(4): 373-380, 2005.

UNICEF. Committing to child survival: a promise renewed. **Progress Report**, 2013.

VARGAS, P.N.; HOELZEL, S.C.; ROSA, C.S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição**. 19(1):11-15, 2008  
72

VEIGA, J. V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. 28(3): 519-528, 2005.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; GONCALVEZ, F. A.; MENEZES, F. G. R.; ARAGAO, J.S.; SOUZA, O.V. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* LINN and *Carica papaya* LINN.) upon bacteria isolated from fish muscle and known



to induce diarrhea in children. *Rev. Inst. Med. trop.* 43 (3):145-148, 2001.

YAMASHITA, Y. ; BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; KURAMITSU, H. K. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infection and Immunity.* 61(9):3811-3817, 1993.

YAKOVLEVA, K.E.; KURZEEV, S.A.; STEPANOVA, E.V.; FEDOROVA, T.V.; KUZNETSOV, B.A.; KOROLEVA, O.V. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 43(6):661-668, 2007.

YOUNG, I.S., WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical pathology**, 1(54):176-186, 2001

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

WINTENBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, 4(5):278-86, 2008.

WOISKY, R.G. Métodos de controle químico de amostras de própolis **Dissertação de mestrado**, USP, Sao Paulo, 1996.

WOISKY, R.G; SALATINO, A. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultura Research**, 37(2):99-105, 1998

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International.** 33(6):423-447, 2000.

WU, T.; HE, M.; ZANG, X.; ZHOU, Y.; QIU, T.; PAN, S.; XU, X. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1(828): 2751-2756, 2013.