

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**SABRINNA MAIA TEIXEIRA SOUTO**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Eugenia florida* (Myrtaceae)**

**ALFENAS-MG**

**2023**

**SABRINNA MAIA TEIXEIRA SOUTO**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Eugenia florida* (Myrtaceae)**

Defesa da dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Planejamento obtenção e avaliação de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva.

**ALFENAS-MG**

**2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Souto, Sabrina Maia Teixeira .  
Estudo químico e biológico de *Eugenia florida* (Myrtaceae) / Sabrina  
Maia Teixeira Souto. - Alfenas, MG, 2023.  
63 f. : il. -

Orientador(a): Marcelo Aparecido da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade  
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.  
Bibliografia.

1. Flavonoides. 2. Saponinas. 3. *Galleria mellonella*. I. Silva, Marcelo  
Aparecido da, orient. II. Título.

SABRINNA MAIA TEIXEIRA SOUTO

"ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Eugenia florida* (Myrtaceae)"

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 30 de Junho de 2023.

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Marcelo José Dias Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Aparecido da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 03/07/2023, às 08:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1026396** e o código CRC **51EA5D41**.

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me possibilitar oportunidades maravilhosas de aprimoramento pessoal e profissional ao longo do projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva, pela compreensão, conselhos, apoio, confiança, ensinamentos. Agradeço a orientação pautada por um elevado nível científico e visão crítica, características que contribuíram para enriquecer, com grande dedicação, passo por passo, todas as etapas do desenvolvimento do projeto.

Aos meus pais, Enio (*in memoriam*) e Soraya, por me proporcionarem todas as condições necessárias para estar aqui neste momento, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem em mim, e não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Sem vocês, nada seria possível. Vocês foram inspiração, equilíbrio e porto seguro nos momentos de tribulação. Obrigada por ensinar à nossa família os valores mais preciosos de um ser humano: a humildade, o amor e o respeito ao próximo. Meu amor por vocês é infinito!

À minha irmã, Samantha, pelos conselhos preciosos, parceria e encorajamento em todos os momentos da minha jornada.

Ao meu noivo Vinícius pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional, agradeço a enorme compreensão, contribuição, generosidade e alegria com que me brindou constantemente, contribuindo para chegar ao fim deste percurso.

Aos professores Dr. Geraldo Alves da Silva, Dr. Marcelo José e Dr<sup>a</sup> Amanda Latercia T. Dias da Universidade Federal de Alfenas pela colaboração e apoio, e ao professor Dr. Renan Gomes Bastos da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá. Ao professor Dr. Masaharu Ikegaki, em especial a colaboração da Rafaela Franco Dias Bruzadelli e a toda equipe do Laboratório de Bioprocessos.

Por fim, à Universidade Federal de Alfenas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas (PPGCF), por permitir esta valiosa experiência. O meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

O uso de plantas medicinais no Brasil tem como facilitadores a grande biodiversidade vegetal dos biomas do país. O Cerrado apresenta uma gama de plantas medicinais que são passíveis de serem exploradas cientificamente. O gênero *Eugenia* sp. apresenta algumas espécies que são pouco estudadas cientificamente, dessa forma o trabalho foi desenvolvido com o intuito de promover o estudo químico e biológico do extrato bruto seco e da fração acetato de etila da espécie *Eugenia florida*. As folhas coletadas foram submetidas à secagem em estufa de circulação e renovação de ar, seguido de uma divisão grosseira pela pulverização em moinho de facas e posterior padronização do tamanho da partícula. O preparo do extrato seco e da fração acetato de etila foi realizado pelo método de extração exaustiva de percolação simples e por partição líquido-líquido. Parte da solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador seguido de um processo de secagem por *Spray Dryer* com adição do adjuvante de secagem dióxido de silício coloidal para obtenção do extrato seco. Os resultados obtidos através da análise por perfil em espectrometria de massas possibilitou a verificação da presença de ácidos fenólicos, flavonoides e, fato que corrobora com dados presentes na literatura para o gênero *Eugenia* sp. Dentre os compostos identificados nos extratos, destacam-se: ácido piscídico, delfinidina-O-hexose, miricetina-O-pentose, ácido-*p*-cumárico-O-hexose, naringenina, canferol-O-desoxihexose-O-hexose, ácido betulínico heterosídeo, quercetina-O-hexose-O-galoihexose-O-galoidesoxihexose e catequina tetramérica. O ensaio *in vivo* foi conduzido com o modelo de larvas *Galleria mellonella*, os resultados obtidos demonstraram ausência de toxicidade possibilitando prosseguir com os ensaios biológicos. Com intuito de avaliação do potencial de atividade antimicrobiana foi realizado o método de CIM (concentração inibitória mínima). O ensaio microbiológico avaliou a atividade contra linhagens padrão de duas cepas bacterianas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e uma cepa fúngica (*Candida albicans* ATCC 10231). Frente à linhagem do *S. aureus* a inibição ocorreu na faixa entre 250 e 500 µg/mL para o extrato etanólico que é considerada atividade antimicrobiana moderada, para a fração acetato de etila o resultado apresentado para a inibição foi entre 500 e 1000 µg/mL para fração demonstrando atividade antimicrobiana ligeiramente ativa. Para a CIM referente a fração acetato de etila frente as cepas de *E. coli* e de *C. albicans* não apresentou resultados expressivos, porém para o extrato etanólico os resultados obtidos foram significativos e apresentaram-se na faixa de 500 a 1000 µg/mL demonstrando atividade antimicrobiana ligeiramente ativa. Dessa forma há indícios da correlação entre os compostos identificados no presente trabalho com os resultados encontrados através nos ensaios CIM ser decorrente do potencial de ação antimicrobiana atribuída aos flavonoides.

Palavras-chave: flavonoides; saponinas; *Galleria mellonella*

## ABSTRACT

The use of medicinal plants in Brazil is facilitated by the great plant biodiversity of the country's biomes. The Cerrado has a range of medicinal plants that can be scientifically explored. The genus *Eugenia* sp. presents some species that are little studied scientifically, so the work was developed with the aim of promoting the chemical and biological study of the dry crude extract and the ethyl acetate fraction of the *Eugenia florida* species. The collected leaves were subjected to drying in an oven with circulation and air renewal, followed by a rough division by spraying in a knife mill and subsequent particle size standardization. The preparation of the dry extract and the ethyl acetate fraction was carried out using the exhaustive method of simple percolation and liquid-liquid partition. Part of the extractive solution was concentrated in a rotary evaporator followed by a drying process using a Spray Dryer with the addition of colloidal silicon dioxide drying aid to obtain the dry extract. The results obtained through the analysis by profile in mass spectrometry allowed the verification of the presence of phenolic acids, flavonoids and, a fact that corroborates with data present in the literature for the genus *Eugenia* sp. Among the compounds identified in the extracts, the following stand out: piscidic acid, delphinidin-O-hexose, myricetin-O-pentose, p-coumaric acid-O-hexose, naringenin, kaempferol-O-deoxyhexose-O-hexose, betulinic acid heteroside, quercetin-O-hexose-O-galloylhexose-O-galoidesoxyhexose and tetrameric catechin. The in vivo test was conducted with the model of *Galleria mellonella* larvae, the results obtained demonstrated absence of toxicity, allowing to proceed with the biological tests. In order to evaluate the potential of antimicrobial activity, the MIC (minimum inhibitory concentration) method was performed. The microbiological assay evaluated activity against standard strains of two bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) and a fungal strain (*Candida albicans* ATCC 10231). Against the *S. aureus* strain, the inhibition occurred in the range between 250 and 500 µg/mL for the ethanolic extract, which is considered moderate antimicrobial activity, for the ethyl acetate fraction, the result presented for the inhibition was between 500 and 1000 µg/mL for fraction demonstrating mildly active antimicrobial activity. For the MIC referring to the ethyl acetate fraction against the strains of *E. coli* and *C. albicans*, it did not show expressive results, however for the ethanolic extract the results obtained were significant and presented in the range of 500 to 1000 µg/mL demonstrating Slightly active antimicrobial activity. Thus, there are indications that the correlation between the compounds identified in the present work and the results found in the CIM tests is due to the potential for antimicrobial action attributed to flavonoids.

Keywords: flavonoids; saponins; *Galleria mellonella*

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICO

Figura 1 - Espécie <i>Eugenia florida</i> . .....	18
Figura 2 - Espécie <i>Eugenia florida</i> com folhas e frutos. ....	19
Figura 3 - Diferentes estágios de desenvolvimento de <i>Galleria mellonella</i> . Ovos (1), larva de aproximadamente 10 dias (2), larva de aproximadamente 20 dias (3), larva de 25 a 35 dias (4 e 5), larva de aproximadamente 40 dias (último estágio larval) (6), pré-pupas (7,8 e 9).....	24
Figura 4 - Larvas de <i>Galleria mellonella</i> após inoculação. ....	24
Figura 5 - Exsicata referente a espécie <i>Eugenia florida</i> depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL -MG) sob o número de registro 2562.....	27
Figura 6 - Perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia florida</i> .....	39
Figura 7 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia florida</i> .....	40
Figura 8 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia florida</i> .....	40
Figura 9 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia florida</i> .....	40
Figura 10 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia florida</i> . ....	41
Figura 11 - Perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de <i>Eugenia florida</i> . ....	42
Figura 12 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de <i>Eugenia florida</i> . ....	42
Figura 13 - Espectros de UV-VIS obtido do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de <i>Eugenia florida</i> . ....	43
Figura 14 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de <i>Eugenia florida</i> . ....	43



Figura 15 - Espectro de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de <i>Eugenia florida</i> . .....	44
Figura 16 - Estrutura geral de um flavonoide, com os anéis A e B e seus sistemas benzoil e cinamoil. ....	45
Figura 17 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> do extrato seco de <i>Eugenia florida</i> no modo positivo. ....	46
Figura 18 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo <i>full-scan</i> da fração acetato de etila de <i>Eugenia florida</i> no modo positivo. ....	46
Figura 19 - Representação estrutural dos compostos identificados por espectrometria de massas, no extrato seco e na fração acetato de etila de <i>Eugenia florida</i> . ....	48
Figura 20 - A figura representa o núcleo fundamental e demonstra alguns exemplos de subclasses de flavonoides encontrados no gênero <i>Eugenia sp.</i> .....	50
Figura 21 - Demonstração de duas estruturas químicas referentes a saponinas isoladas de plantas do gênero de <i>Eugenia sp.</i> .....	52
Gráfico 1 - Teste de toxicidade em <i>Galleria mellonella</i> . Avaliação realizada com o extrato bruto (1 mg/mL) e fração acetato de etila (1 mg/mL) de <i>Eugenia florida</i> , controle com álcool etílico 55% e determinação pela contagem de larvas vivas ao longo de 72 horas (3 dias). ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de registro da <i>Eugenia florida</i> no herbário e localização geográfica do local de coleta da espécie. ....	27
Tabela 2 - Sistema de pontuação para avaliação das larvas de <i>Galleria mellonella</i> . ....	34
Tabela 3 - Perda percentual de água e/ou substância voláteis dos materiais vegetais de <i>Eugenia florida</i> , após tempo secagem. ....	36
Tabela 4 - Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de <i>Eugenia florida</i> . ....	37
Tabela 5 - Rendimentos do extrato seco obtido das folhas de <i>Eugenia florida</i> . ....	38
Tabela 6 - Rendimentos da fração acetato de etila obtida do extrato seco das folhas de <i>Eugenia florida</i> . ....	38
Tabela 7 - Compostos químicos identificados pela técnica de CLAE-ESI-IT-MSn (modos negativo e positivo) no extrato seco e fração acetato de etila de <i>Eugenia florida</i> . ....	47
Tabela 8 - Atividade antimicrobiana pelo método de CIM e CMM. ....	53
Tabela 9 - Resultado da avaliação da toxicidade do extrato espécie <i>Eugenia florida</i> realizado no modelo <i>in vivo</i> com o invertebrado <i>Galleria mellonella</i> . ....	54
Tabela 10 - Resultado da avaliação da toxicidade da fração acetato de etila obtida com a espécie <i>Eugenia florida</i> realizado no modelo <i>in vivo</i> com o invertebrado <i>Galleria mellonella</i> . ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Grau Celsius ou centígrado
%	Porcentagem
$\Sigma$	Somatório
$\mu\text{L}$	Microlitro
Mm	Micrômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
C <sub>18</sub>	Reversed-Phase Octadecylsilan (Fase Reversa Octadecilsilano)
ESI	Ionização por electrospray
et al.	Et alli (expressão em latim que significa “e outros”)
g	Grama
H <sub>2</sub> O	Água
HPLC (CLAE)	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography - Photo-Diode Array (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
mg	Miligrama
IT	<i>Ion Trap</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMM	Concentração Microbicida Mínima
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitro
mg/mL	miligramas por mililitro
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta visível
UPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
PDA	Detector de Arranjo de Fotodiodos
MeOH	Metanol
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1	Objetivos gerais .....	16
2.2	Objetivos específicos .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1	Plantas medicinais .....	17
3.2	<i>Eugenia florida</i> .....	18
3.3	Compostos fitoquímicos relatados para a <i>eugenia florida</i> .....	19
3.4	<i>Eugenia florida</i> e atividades biológicas relacionadas à espécie.....	20
3.5	Técnica de secagem por mini <i>spray drying</i> .....	21
3.6	Atividade antimicrobiana da família Myrtaceae .....	22
3.7	Avaliação da toxicidade em modelo sistêmico da espécie <i>Galleria mellonella</i> . 23	
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	Coleta do material vegetal .....	26
4.2	Depósito das exsicatas .....	26
4.3	Secagem e moagem do material vegetal.....	28
4.4	Determinação da perda por secagem .....	28
4.5	Determinação da granulometria.....	28
4.6	Obtenção do extrato vegetal e fração acetato de etila, e posterior secagem utilizando o processo de secagem por atomização .....	29
4.7	Obtenção da fração acetato de etila .....	30
4.8	Avaliação qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas.....	30
4.9	Avaliação da atividade antimicrobiana .....	32
4.10	Determinação da concentração inibitória mínima.....	32
4.11	Determinação da concentração microbicida mínima .....	33
4.12	Avaliação da toxicidade em modelo sistêmico da espécie <i>Galleria mellonella</i> 33	

4.13 Análise estatística.....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
5.1 Determinação da perda por secagem.....	36
5.2 Determinação da granulometria .....	37
5.3 Rendimentos do extrato seco e da fração acetato de etila após secagem ...	38
5.4 Resultados referentes ao <i>fingerprint</i> obtidos por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	39
5.5 Avaliação qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas.....	46
5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> <i>Eugenia florida</i> .....	52
5.7 Avaliação da toxicidade da espécie <i>Eugenia florida</i> .....	54
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em definição uma planta medicinal pode ser considerada toda e qualquer planta que apresente em uma de suas partes ou órgãos, substâncias que possam ser utilizadas na medicina alternativa para fins de tratamento ou prevenção de enfermidades (DE SOUZA, 2015; DIAS *et al.*, 2018).

As plantas medicinais abrangem estudos relacionados a etnobotânica e a farmacognosia. A etnobotânica é popular como um dos caminhos alternativos que mais evoluiu para a descoberta de produtos bioativos. A farmacognosia é a ciência que estuda a maneira como as substâncias químicas interagem com os sistemas biológicos concomitantemente aos princípios ativos naturais de origem vegetal ou animal (ANTONIAZZI *et al.*, 2016; ZAGO; MOURA, 2018).

A seleção de espécies vegetais para estudo farmacológico pode ser baseada no seu uso tradicional por sociedades tradicionais, no conteúdo químico e toxicidade, na seleção ao acaso ou pela combinação de vários critérios. Uma das estratégias mais comuns é o estudo da medicina tradicional e/ou popular em diferentes culturas, conhecida como etnofarmacologia. As estratégias de busca de medicamentos com base nessa linha de atuação têm sido aplicadas no tratamento de diferentes doenças (BRASIL, 2012).

Sendo assim as plantas medicinais desempenham um papel essencial contribuindo com um arsenal imensurável de produtos químicos, orgânicos e inorgânicos, com diversos potenciais para utilização. Comumente podem atuar como terapia complementar a tratamentos instituídos, por influência de práticas milenares ou por indicação popular, através de informações que se propagaram ao longo de gerações (DIAS *et al.*, 2018).

As plantas são importantes fontes de compostos bioativos, pois elas produzem metabólitos essenciais com diversificada utilização, estrutura química e propriedades biológicas, assim, a busca por extração desses metabólitos se faz muito importante para o avanço industrial. Alguns estudos já visam extrair e avaliar o potencial biológico de produtos naturais utilizados na medicina popular, com certo poder antimicrobiano, como óleos essenciais e extratos (CECHINEL FILHO; ZANCHET, 2020).

O uso de plantas medicinais é visto por grande parte da população como uma prática integrativa na utilização de medicamentos alopáticos sintéticos, considerando

que os últimos possuem maior valor agregado, sendo dessa forma menos acessíveis. A propagação da utilização de plantas medicinais, bem como da automedicação deve-se principalmente à facilidade de acesso (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). A utilização de plantas medicinais no Brasil, está relacionada com as práticas indígenas, que associadas com a cultura africana contribuíram para o conhecimento popular. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece e incentiva estas práticas que compõem a chamada Medicina Tradicional e Complementar. De acordo com a OMS, uma parte significativa da população dos países em desenvolvimento integra a medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas. Em 1978, durante a conferência de Alma-Ata, a OMS alertou para a necessidade de regulamentação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, que até então eram baseados em saberes empíricos e experiência popular (BRASIL, 2012).

Dentre as plantas que apresentam potenciais para utilização na prevenção e tratamento de doenças, destacam-se as espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* sp. da família Myrtaceae, que compreende quase 6.000 espécies em aproximadamente 140 gêneros presentes em todo o mundo, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, com centros de diversidade na Austrália, Sudeste Asiático e América do Sul e poucas espécies ocorrendo na África (HEYWOOD *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2018). O *Eugenia* sp. trata-se de um dos maiores gêneros pertencentes a família, com cerca de 1000 espécies distribuídas desde o México até a Argentina. As folhas, frutos e sementes das espécies de *Eugenia*, além dos óleos essenciais, avaliações realizadas em estudos anteriores detectaram esteróides, triterpenóides, flavonóides e taninos hidrolisáveis (BASTOS, *et al.*, 2016).

No Brasil o gênero *Eugenia* sp. pode ser encontrado em diversas vegetações, tais como o Cerrado e a Mata Atlântica, apresenta-se em abundância e variedade de espécies (APEL *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2018). Dentre algumas espécies relevantes do gênero, que estão presentes nos fragmentos de Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais, destaca-se a *Eugenia florida* DC.

Do ponto de vista farmacológico, o gênero *Eugenia* sp apresenta um vasto potencial, que abrange a atividade anti-inflamatória, antibacteriana, citotóxica, antioxidante, antitumoral, tripanocida, antiviral, hipoglicemiante e estimulante da liberação de insulina, entre outros (BRAGA *et al.*, 2007).

A presença de polifenóis, mono e sesquiterpenos em óleo essencial e ácidos triterpênicos e alguns de seus glicosídeos foram detectados em estudos químicos da composição das folhas (BASTOS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018).

É fundamental que haja pesquisas nas mais diversas áreas para que sejam agregados conhecimentos referentes às plantas medicinais, bem como, que sejam elucidadas informações como o mecanismo de ação, os seus efeitos adversos, suas interações com novos medicamentos e quais as estratégias mais apropriadas para o controle de qualidade e produção de fitoterápicos, considerando as normativas das agências reguladoras (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005; SANTOS; ALMEIDA, 2016).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a composição química, toxicidade e atividade antimicrobiana do extrato seco e da fração acetato de etila obtidos das folhas de *Eugenia florida*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos estabelecidos foram:

- a) obtenção da droga vegetal;
- b) obtenção do extrato seco;
- c) obtenção da fração acetato de etila;
- d) avaliar a toxicidade;
- e) avaliar a atividade antimicrobiana;
- f) avaliar a composição química por HPLC-PDA acoplada a espectrometria de massas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Plantas medicinais

Inúmeras doenças que acometem as populações ao redor do mundo, são passíveis de tratamento com o uso de plantas medicinais. O foco de pesquisas atualmente tem sido o tratamento alternativo através de plantas medicinais em decorrência da grande diversidade química e biológica, bem como variedade de compostos com atividades biológicas promissoras que elas apresentam. As plantas medicinais representam uma ampla fonte para aquisição de moléculas ativas e insumos fitofarmacêuticos e devem ser analisadas terapêuticamente, para que seja possível a elaboração de grande número de medicamentos, e possibilitem tratamento para um vasto número de doenças. (ESTEVAM, 2006; YANG *et al.*, 2017).

As plantas medicinais são caracterizadas como vegetais que possuem substâncias com ação terapêutica. Dessa forma a fitoterapia pode ser definida como parte essencial de nossa cultura (MESSIAS *et al.*, 2015; ASSIS; MORELLI; PIMENTA, 2015).

Os medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, que possuem seus efeitos comprovados, baseadas em evidência clínica e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade, bem como seus riscos. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (ANVISA, 2020).

O uso terapêutico de plantas com fins medicinais é uma das mais remotas formas empregadas pelo homem na cura de patologias. A humanidade recorre aos vegetais para fins terapêuticos com o objetivo de melhorar suas condições de vida. Desde os tempos mais remotos os povos chineses, utilizam plantas medicinais para prevenção e tratamento de enfermidade, preservando sua cultura medicinal tradicionalista até os dias atuais (DE SOUZA, 2015).

O uso de plantas medicinais e de fitoterápicos tem como finalidade profilática, curativa e paliativa, desde então a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a reconhecer as plantas medicinais e a fitoterapia, e tem expressado sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito

sanitário, em função de que 80% da população mundial dependem dessas espécies, no que se refere à atenção primária à saúde (IBIAPINA *et al.*, 2014).

### 3.2 *Eugenia florida*

A espécie *Eugenia florida* é pertencente à família Myrtaceae, a qual é considerada mundialmente como uma das famílias de plantas de maior relevância, sendo apresentada como a oitava maior família de plantas que possuem flores. Inclui inúmeros gêneros de extrema importância ecológica e econômica distribuídos por todo o mundo (SABER *et al.*, 2023). As espécies da família Myrtaceae, pertencentes ao gênero *Eugenia* sp. constituem a maior fração de uso de plantas para fins medicinais no Brasil, o que representa 71,4% do total empregado (DE QUEIROZ, 2015).

A espécie *Eugenia florida* é caracterizada por apresentar uma pequena fruta preta, devido a essa particularidade ela é popularmente conhecida como pitanga-preta ou guamirim. Pode ser encontrada em todo o território brasileiro, em especial em biomas de Cerrado.

As figuras a seguir apresentam a espécie *Eugenia florida* demonstrando o fruto, e folhas características dessa planta.

Figura 1 - Espécie *Eugenia florida*.



Fonte: Adaptado de BASTOS, 2019.

Figura 2 - Espécie *Eugenia florida* com folhas e frutos.



Fonte: Do autor (Figura 2B); adaptado de DONATO; MORRETES, 2009 (Figura 2A).

Legenda: 2A = Espécie com frutos maduros;

2B = Espécie com folhas e frutos verdes.

### 3.3 Compostos fitoquímicos relatados para a *Eugenia florida*

Estudos referentes ao gênero *Eugenia* sp. demonstraram a presença de altos níveis de compostos fenólicos dentre os quais podemos citar flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, bem como outras classes de compostos, incluindo saponina e terpenóides (BASTOS, *et al.*, 2016).

Avaliando a composição química da espécie *Eugenia florida* o estudo realizado por Santos *et al.* (2018), detectou em folhas os compostos betulinaldeído, diidroquercetina e canferol, além de quatorze triterpenóides e dezoito compostos polifenólicos identificados com base em seus padrões de fragmentação de massa por UFLC-DAD-ESI-Ion Trap-MSn e comparação, em ambos os casos, com padrões ou dados relatados na literatura. Ocorreu também a caracterização de frações em que se obtiveram ácidos graxos (C14, C16, C18, C18:1), vários sesquiterpenos e ácidos fenólicos (2-hidroxibenzoico ácido, ácido protocatecólico, ácido p-cumárico, ácido gálico e ácido ferúlico).

A caracterização fitoquímica por espectrofotometria no massas, no modo negativo, dos compostos presentes no extrato de *Eugenia florida*, foi descrita em um estudo publicado na literatura, dentre os compostos encontrados, o trabalho constatou

a presença de ácidos fenólicos e heterosídeos, flavonoides e taninos condensados corroborando com os achados presentes na literatura (BASTOS *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos apresentam ampla distribuição entre as plantas, demonstrando múltiplas atividades farmacológicas, incluindo prevenção e tratamento de inúmeras doenças, além de dados de eficácia contra infecções microbianas. Em sua constituição química os compostos fenólicos caracterizam-se heterogeneamente, e a maioria deles são solúveis em solventes polares, como misturas de água e etanol (FANG *et al.*, 2015). Entre os compostos fenólicos naturalmente presentes nas plantas, os flavonoides são de extrema importância, pois propiciam capacidade de proteção contra radiação ultravioleta. A presença de anéis aromáticos associados às hidroxilas em suas estruturas químicas é o que propicia aos flavonoides a capacidade de capturar e estabilizar a radiação evitando danos ao DNA. (WU, *et al.*, 2015).

#### 3.4 *Eugenia florida* e atividades biológicas relacionadas à espécie

Segundo Dexheimer *et al.*, as 81 espécies de plantas pertencentes a família Myrtaceae apresentam diversas atividades biológicas tais como antidiarreico, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, antirreumático e anti-inflamatório. Essas informações relevantes sobre a família Myrtaceae bem como para discussões sobre possíveis fontes de moléculas bioativas oriundas de plantas com potencial farmacológico que podem vir a ser utilizados na terapêutica de diversas doenças.

Em relação as folhas da espécie *Eugenia florida*, elas são utilizadas na medicina popular como hipotensor, hipoglicêmico, antipirético, anti-inflamatório entre outros (BASTOS, *et al.*, 2016).

O gênero *Eugenia* sp. possui grande número de espécies e estudos de potencialidades bioativas e medicinais. Entre as atividades biológicas relatadas na literatura para o gênero podemos citar antioxidante, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória que são as que apresentaram destaque (SILVEIRA *et al.*, 2021).

Em um estudo de revisão bibliográfica realizado por Ribeiro *et al.* identificou-se que para o gênero *Eugenia* sp. que as propriedades mais relatadas foram: antioxidante, antifúngico, antibacteriano e acaricida. No mesmo estudo, foram identificadas as seguintes propriedades farmacológicas para o gênero *Eugenia* sp.: citotoxicidade, inseticida, anticâncer, antifúngico, antibacteriano, antinociceptivo, antioxidante, antidiarreico, neuroprotetor, antiolesterásica, hipotensivo, regeneração celular,

gastroprotetor, regulação do fluxo intestinal, citoproteção, quimioprotetora, antiviral, antimelanogênese, clareador da pele, antilipidêmico, antiproliferativo, preservação da contratilidade miocárdica, cicatrizante, anti-inflamatória, alelopática, antitumoral, bioherbicida, proliferador celular, antimicoplasma, acaricida, antidiabetes melittus tipo II, vasopressor, leishmanicida, moluscida, facilitador de neurotransmissão, citostático, antienzimática, antiglicante, tripanocida.

As atividades biológicas citadas apenas reforçam as múltiplas propriedades relatadas na literatura para espécies da família Myrtaceae. Há relato do uso do gênero *Eugenia* sp. também no tratamento da diabetes, utilização como antimicrobianos e anti-inflamatórios, bem como antioxidantes, antinociceptivos, anti-hemorragicos, hipoglicêmicos, sendo utilizados também para o tratamento de doenças na faringe e estomacais (CASCAES *et al.*, 2015).

O cerrado apresenta riqueza florística e diversidade biológica do seu bioma, dessa forma há a necessidade cada vez intensa de se identificar e conhecer as potencialidades e as propriedades que suas plantas apresentam, pois há uma gama inestimável que pode ser pesquisada e possibilitar diversos usos, e que necessita ser identificada (FILHO *et al.*, 2019).

### 3.5 Técnica de secagem por mini *spray drying*

A técnica de secagem por atomização (*spray drying*) tem sido muito empregada com intuito de se obter extratos com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas, como a redução significativa na higroscopicidade dos produtos secos, possibilitando prevenir a formação de aglomerados (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

A secagem por *spray drying* envolve a atomização de um líquido que contém sólidos em solução, suspensão ou emulsão. O líquido é atomizado através de um sistema centrífugo ou de alta pressão, no qual as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto. O processo de secagem por aspersão consiste em três etapas fundamentais. Na primeira fase, o fluido é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato

destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida.

Para a preparação de extratos secos, a adição de adjuvantes à solução extrativa melhora o rendimento e as características farmacotécnicas do pó obtido durante a secagem. Entre os fatores relacionados às características do material de entrada, o uso de adjuvantes na técnica de secagem por aspersão é uma prática muito comum. São utilizados como adjuvantes neste processo: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina entre outros (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Os adjuvantes devem caracterizar-se pela inércia, por isso a seleção e o uso adequado deles no processo de spray dryer é de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e a qualidade dos extratos. O dióxido de silício coloidal, é um adjuvante que possui elevada superfície específica e alto poder adsorvente, dessa forma tem sido amplamente empregado, demonstrando resultados expressivos durante a obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais, visto que possibilita redução significativa na higroscopicidade dos produtos secos, contribuindo para a não formação de aglomerados no pó (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

### 3.6 Atividade antimicrobiana da família Myrtaceae

Plantas que possuem em sua fitoquímica compostos aromáticos são amplamente empregadas de modo tradicional na medicina popular, na indústria farmacêutica, na indústria de alimentos contribuindo na biotecnologia, demonstrando inibição de bactérias e fungos (SARTORATTO *et al.*, 2004).

Em decorrência da atividade metabólica secundária apresentada pelos vegetais, são produzidas substâncias como mecanismo de defesa para atuar no combate a microorganismos, insetos e herbívoros que possam representar algum tipo de ameaça a espécie vegetal (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

Plantas da família Myrtaceae apresentam em sua composição grande concentração de terpenos, ressaltando que há uma variação qualitativa e quantitativa dos referidos compostos nas folhas dos vegetais dependendo da espécie avaliada (KESZEI *et al.*, 2010).

Geralmente, são utilizadas na medicina popular para o tratamento ou auxílio no combate a distúrbios gastrintestinais, doenças infecciosas e hemorrágicas, tendo como partes comumente utilizadas as cascas, folhas e frutos (CRUZ; KAPLAN, 2004; DE QUEIROZ, 2015).

Houve significativo aumento no número de patentes, principalmente a aplicação de extratos de Myrtaceae na área farmacêutica. As aplicações de plantas que são compostas por ceratina (*Pimenta dioica*, *Melaleuca alternifolia*, óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* ou extrato de casca de *Myrciaria cauliflora*) na área de alimentos (na forma livre ou encapsulada) também mostraram resultados interessantes na limitação da deterioração microbiana de carne e peixe frescos, retardando a degradação oxidativa em produtos cárneos e inibindo a produção de aflatoxina no milho (SABER *et al.*, 2023).

### 3.7 Avaliação da toxicidade em modelo sistêmico da espécie *Galleria mellonella*

O inseto *Galleria mellonella* possui um ciclo de vida de sete semanas, nas quais cinco semanas são para o desenvolvimento do ovo até o último estágio larval, e duas semanas referentes ao último estágio culminando na evolução do invertebrado à mariposa adulta. Os machos adultos dessa espécie medem de 10 a 15 mm e possuem cor bege e marcas escuras, enquanto as fêmeas adultas medem em torno de 20 mm e possuem cor marrom ou cinza e são mais escuras que os machos. Para reprodução em laboratório, as mariposas adultas devem ser colocadas em um recipiente com tampa e papéis para deposição dos ovos. As fêmeas realizam a deposição dos ovos nas bordas dos papéis, após dois dias. Posteriormente, os ovos são retirados e devem ser colocados em um recipiente plástico com tampa perfurada para possibilitar a entrada de ar. O ciclo se inicia, após 3 dias os ovos eclodem, e as larvas são alimentadas com pólen e cera de abelha ou uma dieta artificial, que pode ser composta por mel líquido, glicerina e uma mistura de farinhas, como farinha de milho, de trigo, levedo de cerveja e leite em pó. As larvas alimentam-se e crescem até atingirem o sexto estágio, no qual param de se alimentar para construir o casulo de seda e passar à fase de pupa. A *Galleria mellonella* permanece no estágio de pupa por uma a duas semanas e, então, transforma-se em mariposa adulta (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).



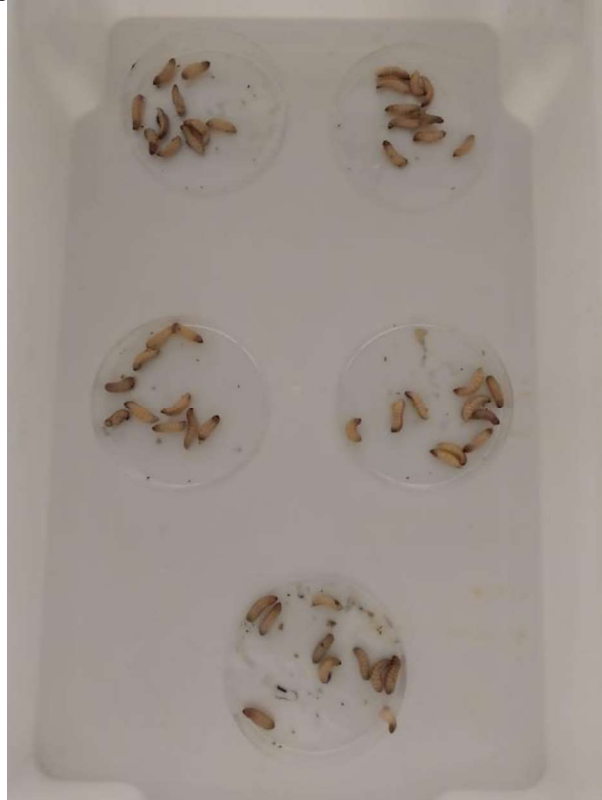
Figura 3 - Diferentes estágios de desenvolvimento de *Galleria mellonella*. Ovos (1), larva de aproximadamente 10 dias (2), larva de aproximadamente 20 dias (3), larva de 25 a 35 dias (4 e 5), larva de aproximadamente 40 dias (último estágio larval) (6), pré-pupas (7,8 e 9).



Fonte: JORJÃO *et al.*, 2018.

Em modelos de toxicidade sistêmica aguda, a avaliação é realizada com larvas de *G. mellonella*, através da administração de doses da substância objeto de estudo por meio de injeção nas larvas. O monitoramento é realizado por 72 horas. Durante esse período, é verificada qual é a dose letal capaz de matar 50% das larvas, representando uma importante informação sobre a toxicidade do composto (DA NÓBREGA ALVES *et al.*, 2020).

Figura 4 - Larvas de *Galleria mellonella* após inoculação.



Fonte: Da autora, 2023.

Os primeiros trabalhos utilizando larvas de *G. mellonella*, foram publicados no final da década de 1950 e na década de 1960. Artigos científicos publicados nesse período avaliaram a possibilidade de imunização de *G. mellonella* contra a bactéria gram-negativa, *Pseudomonas aeruginosa* (CHADWICK; VILK, 1969; STEPHENS, 1959). A utilização da espécie *Galleria mellonella* atraiu atenção como modelo para estudos de infecção em meados do ano de 2010. Atualmente, as larvas do referido invertebrado vem sendo utilizado como hospedeiro experimental para estudar o efeito de bactérias probióticas na patogênese microbiana. Uma das principais vantagens desse modelo é o fato de a larva poder ser incubada a 37°C, o que mimetiza a temperatura do corpo humano (KÖHLER, 2015).

A *G. mellonella* tem sido utilizada em estudos que envolvem patofisiologia e virulência de bactérias e fungos, visto que o seu sistema imunológico apresenta mecanismos semelhantes aos que existem em mamíferos, o que possibilita a obtenção de excelentes resultados. Este sistema imune inato é constituído pela resposta celular e humoral. Diferentes peptídeos que auxiliam na neutralização e eliminação de um patógeno fazem parte da resposta imune humoral, dentre os peptídeos citados anteriormente estão presentes a melanina, responsável pelo processo de melanização do patógeno e da cicatrização do inseto, moléculas do tipo complemento e peptídeos antimicrobianos. Enquanto a resposta imune celular alia-se com vários tipos de hemócitos, células semelhantes aos fagócitos de mamíferos, e que possuem função de fagocitose, encapsulamento, nodulação e coagulação da hemolinfa. Pode-se citar como uma das vantagens do uso da *G. mellonella* é a manutenção da larva a 37 °C, temperatura na qual normalmente ocorre as infecções fúngicas nos seres humanos (ANDREA; KROGFELT; JENSSEN, 2019; DJAINAL *et al.*, 2020).

*Galleria mellonella* é um modelo de inseto bem aceito para o estudo de interações patógeno-hospedeiro e compostos antimicrobianos. As principais vantagens deste modelo incluem o baixo custo de manutenção, o ciclo de vida rápido, a possibilidade de usar grande número de larvas e a imunidade inata do sistema, que é evolutivamente conservado em relação aos mamíferos. Devido a essas vantagens, diferentes grupos de pesquisa têm trabalhado para implementar a criação de *Galleriamellonella* em laboratório (ANDREA *et al.*, 2019).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do material vegetal

As folhas da espécie *Eugenia florida* foram coletados entre 08 e 09 horas, do dia 02 de dezembro de 2020, no sul do Estado de Minas Gerais, próximo à Fazenda Cachoeirinha, município de Alfenas, em uma área de cultivo de café, sob as coordenadas geográficas W045°56'07.8" e S21°33'51.7". Os dados de coleta e as coordenadas do local foram fornecidos pelo Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

### 4.2 Depósito das exsicatas

A exsicata da espécie *Eugenia florida* foi depositada e registrada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas, campus Alfenas-MG, sob o número de registro 2562. A espécie já havia sido identificada anteriormente pelo professor Dr. Geraldo Alves da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNIFAL-MG), e confirmada pelo professor Dr. Marcos Eduardo Guerra Sobral, da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus DCNAT (UFSJ).

Figura 5 - Exsicata referente a espécie *Eugenia florida* depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL -MG) sob o número de registro 2562.



Fonte: Da autora, 2023.

O presente trabalho foi cadastrado (nº A5C2B19) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) – Ministério do Meio Ambiente, Brasil – em concordância com os termos da Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Tabela 1 - Dados de registro da *Eugenia florida* no herbário e localização geográfica do local de coleta da espécie.

Material vegetal	Registro no herbário UNIFAL – MG	Coordenadas geográficas
Folha e caule	2562	W045°56'07.8" S21°33'51.7"

Fonte: Da autora, 2023.

### 4.3 Secagem e moagem do material vegetal

As folhas coletadas da espécie vegetal foram previamente divididas, separadas e dispostas em camadas finas, sendo submetidas à secagem em estufa de circulação e renovação de ar (Solab<sup>®</sup> SL 102), a 45°C, durante 42 horas ou até peso constante. A temperatura da estufa foi controlada por meio de termostato e de termômetro, os quais garantiram a homogeneidade no processo de secagem.

Após a secagem, o material vegetal passou por uma divisão grosseira, seguida pela pulverização em moinho de facas (Cróton<sup>®</sup> TE-625-TECNAL). O pó obtido foi pesado e armazenado em frascos de vidro âmbar devidamente vedado, identificado e rotulado.

### 4.4 Determinação da perda por secagem

Cerca de 4 g do material vegetal fresco obtido foi colocado para secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 45°C. A perda de água foi monitorada por pesagens consecutivas, até que o peso ficou constante. O resultado encontrado foi expresso em perda de substâncias voláteis e/ou de água percentual, pela média de três determinações. A amostra foi pesada em um tempo pré-estabelecido, de 6 em 6 horas (MELLO; PETROVICK, 2000).

### 4.5 Determinação da granulometria

O pó obtido, após a moagem, foi padronizado quanto ao seu tamanho médio de partícula, segundo os critérios especificados pela Farmacopeia Brasileira, 6<sup>a</sup> edição (BRASIL, 2019). Para isto, foram utilizados tamises de malhas 250, 355, 500, 710 e 850 µm, do menor para o maior diâmetro, e um agitador eletromagnético Bertel<sup>®</sup>.

Com a vibração já pré-selecionada, 100 g de amostra foi transferida para o tamis de malha 850 µm e submetidos à vibração por 15 minutos. Após o término do tempo, a amostra retida em cada tamis foi removida, transferida para um papel impermeável e pesada.

Em seguida, os tamanhos médios das partículas foram mensurados e a distribuição das partículas foi expressa pela referência à abertura nominal da malha

dos tamises utilizados. Para o cálculo do tamanho médio das partículas ( $T_m$ ) foi utilizada a seguinte expressão, dada por Ansel, Popovich e Allen Jr (2000):

$$T_m = [\sum (\% \text{ retida}) \times (\text{abertura média})] / 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

#### 4.6 Obtenção do extrato vegetal e fração acetato de etila, e posterior secagem utilizando o processo de secagem por atomização

Para obtenção do extrato bruto submeteu-se 152,22 g da droga vegetal obtida ao método de extração exaustivo de percolação simples desenvolvido segundo Prista, Alves e Morgado (2008). O processo teve início com o intumescimento prévio do pó com o solvente de escolha para extração (etanol 70% (v/v)), até que atingisse a textura suficientemente ideal para compactar sem saturar. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura de pó + etanol 70% v/v da forma mais homogênea possível. Evitando a formação de bolhas ou de caminhos alternativos dentro do percolador. A mistura hidroetanólica foi adicionada aos poucos, até cobrir a superfície do pó. A mistura foi deixada em maceração por 48 horas. Após este período, procedeu-se a percolação com o gotejamento na frequência de vazão de 1-2 mL/min. Obteve-se aproximadamente 454 mL de solução extrativa (percolado) após o processo de percolação.

A solução extrativa obtida foi concentrada em rotaevaporador (Fisatom<sup>®</sup> 801), à temperatura de 50°C, sendo adicionados 2,8 g (28,0%) do agente carreador dióxido de silício coloidal em cada 100 mL de extrato concentrado.

Posteriormente, foram submetidos ao processo de secagem por atomização que foi realizada através de um Mini *Spray Dryer* (Buch B-290). Equipamento este que apresenta a capacidade máxima de secagem de 1,0 litro de água por hora e bico atomizador integrado de duplo fluido com 0,7 milímetro de diâmetro. Os ensaios foram realizados a temperatura de entrada do ar de secagem de 130°C e temperatura de saída 75 – 80°C, com vazão de alimentação de 10 mL/h (controlado por bomba peristáltica) e aspiração de 80%, com adição de dióxido de silício coloidal, usado como agente adjuvante.

O rendimento do extrato seco foi calculado pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (M_{\text{es}}/M_{\text{mv}}) \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

Onde  $M_{\text{es}}$  é a massa de extrato seco ao final do processo (g) e  $M_{\text{mv}}$  é a massa de tomada de ensaio do extrato bruto (g).

Após a obtenção do extrato seco, ele foi armazenado de maneira hermética em frascos âmbar, e mantidos em geladeira, para posterior uso nos ensaios de caracterização química e avaliação da atividade farmacológica.

#### 4.7 Obtenção da fração acetato de etila

Para obtenção da fração acetato de etila 30,2 g do extrato seco foi dividida em três partes de 10,07 g, sendo que, cada parte foi dissolvida em água (300 mL) e particionada com 200 mL de acetato de etila por cinco vezes. Após o procedimento, o solvente volátil foi submetido à evaporação por rotaevaporador (Fisatom® 801), à temperatura de 40°C e posterior eliminação total do solvente em capela de exaustão sobre aquecimento em chapa na temperatura de 35°C.

O rendimento da fração acetato de etila obtido do extrato seco foi calculado pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (M_{\text{facet}}/M_{\text{es}}) \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Onde  $M_{\text{facet}}$  é a massa da fração acetato de etila obtida do extrato seco ao final do processo (g) e  $M_{\text{es}}$  é a massa de tomada de ensaio do extrato seco (g).

Após a obtenção da fração acetato de etila, os produtos foram armazenados de maneira hermética em frascos âmbar, e mantidos em geladeira, para posterior uso nos ensaios de caracterização química e avaliação da atividade farmacológica.

#### 4.8 Avaliação qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas

A avaliação qualitativa da composição química do extrato seco e da fração acetato de etila obtidos das folhas da espécie *Eugenia florida* foi realizada através da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O detector de arranjo de fotodiodos (PDA) foi utilizado acoplado ao sistema CLAE, o que possibilitou o

processamento dos dados cromatográficos obtidos permitindo a análise dos resultados na forma de cromatogramas. O detector de arranjo de fotodiodos é um tipo de detector de comprimento de onda variável que opera na região do ultravioleta, e torna possíveis análises em diferentes comprimentos de onda simultaneamente, pois possibilitam uma “varredura” na região do UV-Vis em uma única corrida cromatográfica. Neste tipo de detector a grade de refração é alternada e colocada depois da cela da amostra, sendo adicionado um conjunto de fotodiodos onde os comprimentos de onda resultantes são focalizados. Este realiza a varredura do espectro o qual os dados são captados e armazenados em um computador. Com este detector, o computador pode produzir um cromatograma a partir de um dado comprimento de onda ou uma série de espectros em intervalos de tempo fixo.

As amostras para avaliação do extrato seco e da fração acetato de etila obtido das folhas da espécie *Eugenia florida* foram preparadas em pequena escala para análise da composição química. As amostras foram submetidas à etapa de *clean up* por extração em fase sólida (SPE) em cartucho de fase reversa C<sub>18</sub> com 500 mg 6 mL<sup>1</sup> (45 µm, Chromabond®). O cartucho foi previamente ativado com MeOH (4,5 mL) e equilibrado com H<sub>2</sub>O (4,5 mL) e MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15, v/v) (4,5 mL). As amostras (10 mg) foram previamente solubilizadas em 1,5 mL da solução MeOH/H<sub>2</sub>O (85:15, v/v), carregado no cartucho e eluído com a mesma proporção de fase móvel. Após a secagem, 2 mg de amostra foi ressuspensa em 2 mL de uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) fornecendo uma solução com uma concentração de 1 mg/mL. Ao fim, a solução foi filtrada em filtro PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm.

O perfil químico cromatográfico das amostras foi realizado em um sistema LCQ FLEET, Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA. Sistema Accela, acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema quaternário de bomba e injetor automático com detector de arranjo de diodos e a um espectrômetro de massas íon com uma fonte de ionização por *electrospray* em modo positivo e negativo.

As separações em CLAE foram conduzidas em uma coluna Hypersil Gold™ de fase reversa C<sub>18</sub> (50 mm x 2 mm i.d., 2 µm). O volume de injeção foi de 5 µL e a vazão de 1 mL/min. Para a eluição das amostras foi utilizado um gradiente linear com uma fase móvel composta por água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B), de 5 a 40% (B) em 8 min e 40 a 100% (B) em 3 min. A voltagem



de ionização foi de 4,5 kV, do capilar foi ajustada para 11 V e a temperatura do capilar para 275°C.

Os experimentos de fragmentação foram realizados por dissociação induzida por colisão (CID) e foram executados no modo auto MSn (fragmentação inteligente) usando o modo *UltraScan* para aquisição de MS/MS e um aumento de energia de colisão com a máxima amplitude de fragmentação definida para 60%. A faixa de aquisição foi de  $m/z$  100-1500. Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo e negativo, e processados no *software Data Analysis*.

#### 4.9 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para os testes de determinação da atividade antimicrobiana foram utilizados microrganismos cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) que foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Microbiologia Básica da UNIFAL/MG pela professora doutora Amanda Latércia Tranches Dias.

#### 4.10 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o protocolo M07-A11 para bactérias (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2018) e M27 para leveduras (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2017), desenvolvidos pelo *Clinical Laboratory Standardization Institute*.

O experimento foi realizado com cepas da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 e de levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Foram reativadas a partir das culturas estoque em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 h a 35°C, e posteriormente suspensas em solução de NaCl 0,9 % estéril. A turbidez desta suspensão foi avaliada de acordo com a escala 0,5 de *MacFarland*, padronizando em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660 nm, 75 % de transmitância, o que equivale a  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Depois foi realizada uma diluição de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de  $1-2 \times 10^5$  UFC/mL.

Em microplacas estéreis de 96 poços, o volume final de cada poço foi de 200 µL, de uma mistura composta por 160 µL de caldo *Mueller-Hinton*, 20 µL da amostra diluída de forma seriada (iniciando em 10.000 µM) e 20 µL da suspensão do

microrganismo. A microplaca foi incubada em estufa a 37°C por 24h. Após a incubação, a leitura foi realizada com o revelador resazurina, adicionando-se 20 µL/poço.

Alguns poços da microplaca foram utilizados para controles, como: Esterilidade do caldo *Mueller Hinton* (branco do meio de cultivo), do inóculo (branco do crescimento bacteriano), do solvente utilizado para o preparo da amostra (branco da amostra) e como controle positivo foi utilizado Estreptomicina para bactérias e Nistatina para a levedura.

O teste foi realizado em triplicata e a leitura foi feita pelo método visual (colorimétrico).

#### 4.11 Determinação da concentração microbicida mínima

Levando em consideração os resultados obtidos do teste de concentração inibitória mínima, as suspensões dos poços das microplacas nas quais não houve crescimento microbiano foram utilizadas para a determinação da concentração microbicida mínima (CMM). Portanto, após a leitura do resultado do teste anterior, 10 µL dessas suspensões foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar *Mueller-Hinton*, em triplicata, e incubadas a 37°C por 24 horas.

As concentrações microbicidas mínimas (CMM) foram consideradas como a menor concentração das amostras testadas que não permitiram crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

#### 4.12 Avaliação da toxicidade em modelo sistêmico da espécie *Galleria mellonella*

O efeito de toxicidade aguda foi avaliado usando o modelo de larvas de *Galleria mellonella*, conforme descrito por Sardi *et al.* (2017), com modificações. Foram testadas o extrato bruto na concentração de 1 mg/mL e a fração acetato de etila na concentração de 1 mg/mL para determinar a toxicidade das larvas ao longo do tempo. Para cada grupo foram selecionadas aleatoriamente 10 larvas, pesando entre 0,25 e 0,3 g, sem sinais de melanização. Dez microlitros da amostra ou do controle (álcool etílico 50%) foram injetados na hemocele de cada larva através da última proleg direita

usando uma Seringa Hamilton de 25  $\mu$ L. As larvas foram incubadas a 30°C e analisadas em intervalos de 12, 24, 48 e 72 horas.

Para avaliação do ensaio de toxicidade, foi utilizado o sistema de pontuação proposto por Loh *et al.*, 2013, que se encontra na Tabela 2. Quatro parâmetros foram avaliados: Atividade, produção de cera (formação de casulo), melanização e sobrevivência. Uma larva saudável e sem infecção geralmente pontua entre 9 e 10. Se com infecção grave pontua entre 1 e 2 e morta não pontua. Apenas as larvas sem movimentos ao toque foram consideradas mortas.

Tabela 2 - Sistema de pontuação para avaliação das larvas de *Galleria mellonella*.

Categoria	Descrição	Pontuação
Atividade	Sem atividade	0
	Baixa atividade c/ estímulo	1
	Atividade com estímulo	2
	Atividade sem estímulo	3
Casulo	Sem casulo	0
	Casulo parcial	0,5
	Casulo completo	1
Melanização	Completa melanização (preta)	0
	Mais de 3 pontos pretos	2
	Menos de 3 pontos pretos	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

Fonte: LOH *et al.*, 2013, p. 09.

#### 4.13 Análise estatística

Para o estudo *in vivo*, os grupos tratados e não tratados foram comparados por meio do teste de Log-rank (Mantel-Cox). Os resultados foram considerados significativos em  $P \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da perda por secagem

O ensaio de determinação de perda por secagem se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas para cada material (ANVISA, 2019). A determinação da perda percentual de água e/ou substância voláteis em um extrato vegetal representa um parâmetro de auxílio na sua conservação (COSTA *et al.*, 2009).

Para a *Eugenia florida* o ensaio foi conduzido segundo Bastos *et al.* (2019), utilizando-se cerca de 4 g do material vegetal para realização da secagem em estufa a 45°C sendo a massa total monitorada em balança analítica, com avaliação de 6 em 6 horas, até folhas adquirirem peso constante, após 3 pesagens consecutivas.

Os resultados obtidos para a determinação da perda por secagem estão especificados na Tabela 3.

Tabela 3 - Perda percentual de água e/ou substância voláteis dos materiais vegetais de *Eugenia florida*, após tempo secagem.

Material vegetal	Massa inicial (g) Tempo 0 horas	Massa final (g) Tempo 42 horas	Perda percentual (%)
Folha <i>Eugenia florida</i>	4,23	1,99	47,04%

Fonte: Da autora, 2023.

Após o tempo de 42 horas, obteve-se um peso constante do material vegetal de 1,99 g. A perda percentual de massa, por secagem, foi igual a 47,04%, o que indica uma redução significativa do peso inicial das folhas.

A secagem é o processo usado para reduzir o teor de umidade pós-colheita de plantas medicinais e aromáticas (70% a 85% em base úmida) para o nível de umidade adequado (10% a 15% em base úmida) para armazenamento seguro (ALTAY *et al.*, 2019).

A importância da secagem é possibilitar prolongar a vida útil do material vegetal, retardando o crescimento de microorganismos e minimizando os requisitos de embalagem. Durante a secagem, muitas mudanças podem ocorrer dependendo do método e das condições nas quais foi realizada. Algumas reações bioquímicas são evitadas ou retardadas, porém podem ocorrer alterações nas propriedades sensoriais e perdas em alguns compostos, especialmente compostos voláteis, dessa forma no

momento da escolha do método de secagem deve-se considerar a estabilidade química dos materiais (YAZAR; DEMIRAY, 2023).

## 5.2 Determinação da granulometria

Os resultados da análise granulométrica realizada com os pós obtidos das folhas de *Eugenia florida* estão apresentados abaixo no Gráfico e na Tabela 4.

Tabela 4 - Cálculo do tamanho médio das partículas das folhas pulverizadas de *Eugenia florida*.

Material vegetal	Abertura do tamis (µm)	Abertura média (µm)	Teor de amostra retido (%)	% retida x abertura média / 100
	0**	125,00	45,22	56,53
	250	302,50	30,45	92,11
Folha <i>Eugenia florida</i>	355	427,50	18,53	79,22
	500	605,00	4,78	28,92
	710	780,00	0,69	5,38
	850	850,00	0,33	2,81
<b>Tm = <math>[\sum (\%retida \times abertura \text{ média})] / 100</math></b>				<b>264,97 µm</b>

Fonte: Da autora, 2023.

Legenda: Tm – tamanho médio de partícula. \*Média de três determinações. \*\*Fundo coletor.

Os dados presentes na tabela 4 foram obtidos com o cálculo de tamanho médio da partícula, através da equação de Ansel, Popovich e Allen Jr (2000) e os resultados demonstrados indicam que, para as folhas de *Eugenia florida*, o tamanho médio encontrado para as partículas do pó vegetal foi de 264,97 µm.

A granulometria de pós causa impacto na qualidade do processo extrativo e do produto. Os pós grossos, moderadamente grossos e semifinos são considerados, de acordo com a literatura, como os ideais para a produção de extratos. Isto se deve exclusivamente às características das partículas formadas a partir da moagem do material vegetal. Os pós que foram citados, apresentam tamanho de partícula intermediário e perfil homogêneo, favorecendo uma melhor penetrabilidade do solvente dentro da célula vegetal e, por conseguinte, um maior rendimento extrativo. Além disso, apresentam menor retenção de umidade, diminuindo a formação de aglomerados (MENDEZ *et al.*, 2011).

### 5.3 Rendimentos do extrato seco e da fração acetato de etila após secagem

Os rendimentos do extrato seco e da fração acetato de etila obtida do extrato seco estão apresentados nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

Tabela 5 - Rendimentos do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia florida*.

Material	Quantidade inicial do material vegetal	Quantidade de extrato seco (g)	Rendimento (%)
Folha	152,22	45,41	29,83

Fonte: Da autora, 2023.

Tabela 6 - Rendimentos da fração acetato de etila obtida do extrato seco das folhas de *Eugenia florida*.

Material	Quantidade inicial de extrato seco (g)	Quantidade de fração acetato de etila (g)	Rendimento (%)
Folha	30,20	3,91	12,95

Fonte: Da autora, 2023.

O preparo do extrato seco foi realizado método de percolação, e, em comparação com o preparo da fração acetato de etila apresentou um maior rendimento totalizando 29,83%. Isso sugere que os compostos majoritários presentes nesse extrato sejam os mais polares, já que o solvente utilizado (etanol 70%) apresenta um grau de polaridade suficiente para extrair tais compostos.

O solvente acetato de etila, utilizado para a obtenção da fração acetato de etila apresenta uma polaridade intermediária, ou seja, oferece uma polaridade intermediária, favorecendo dessa forma a extração de compostos como ácidos fenólicos de baixo peso molecular, terpenos e agliconas de flavonoides. (PATEL *et al.*, 2016).

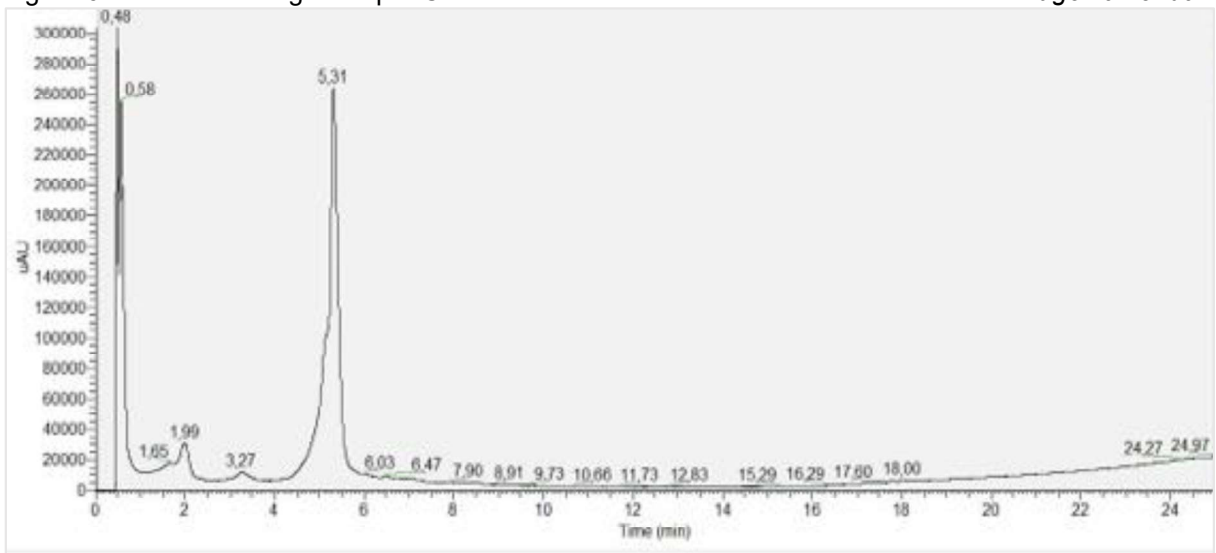
O pH do líquido extrato pode interferir na extração de determinadas substâncias, dessa forma para escolha do solvente ideal deve levar, também, em consideração a sua toxicidade, riscos, a disponibilidade e o custo do solvente. O método extrativo e o solvente extrator estão diretamente relacionados ao rendimento do extrato final, e, também aos metabólitos extraídos. Dessa forma é preciso levar em consideração o que se deseja extrair, pois muitas substâncias são termossensíveis. Enquanto outras

podem sofrer modificações estruturais irreversíveis em altas temperaturas (COSTA; HOSCHEID, 2018).

#### 5.4 Resultados referentes ao *fingerprint* obtidos por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A triagem fitoquímica para a espécie *Eugenia florida* foi realizada através da técnica de "*fingerprint*" visando a caracterização química do extrato seco e da fração acetato de etila obtidos das folhas da referida espécie.

Figura 6 - Perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia florida*.

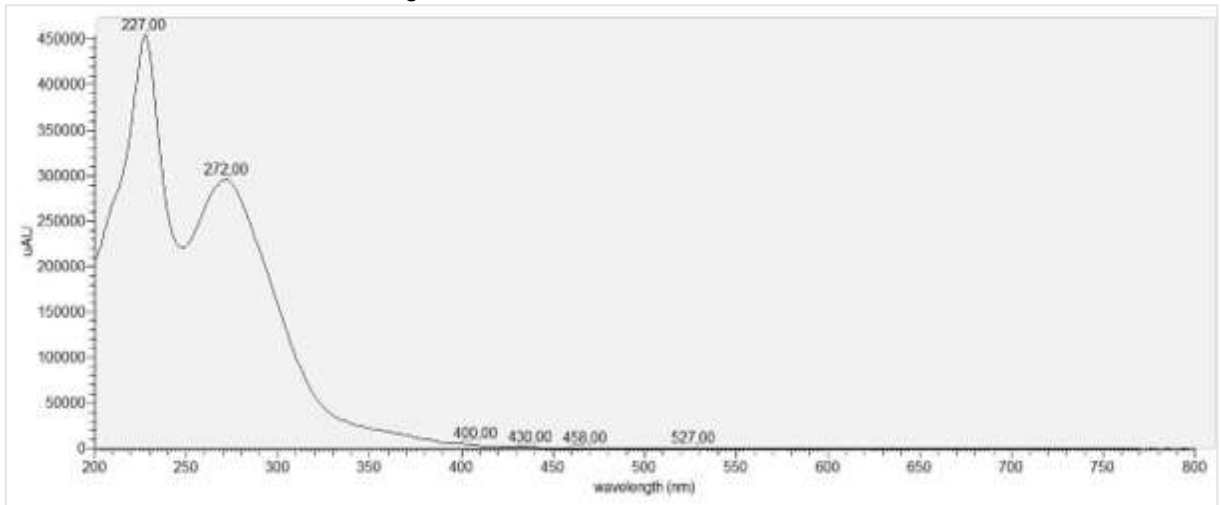


Fonte: Da autora, 2023.

A figura 6 demonstra o cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no extrato seco obtido das folhas de *Eugenia florida*.

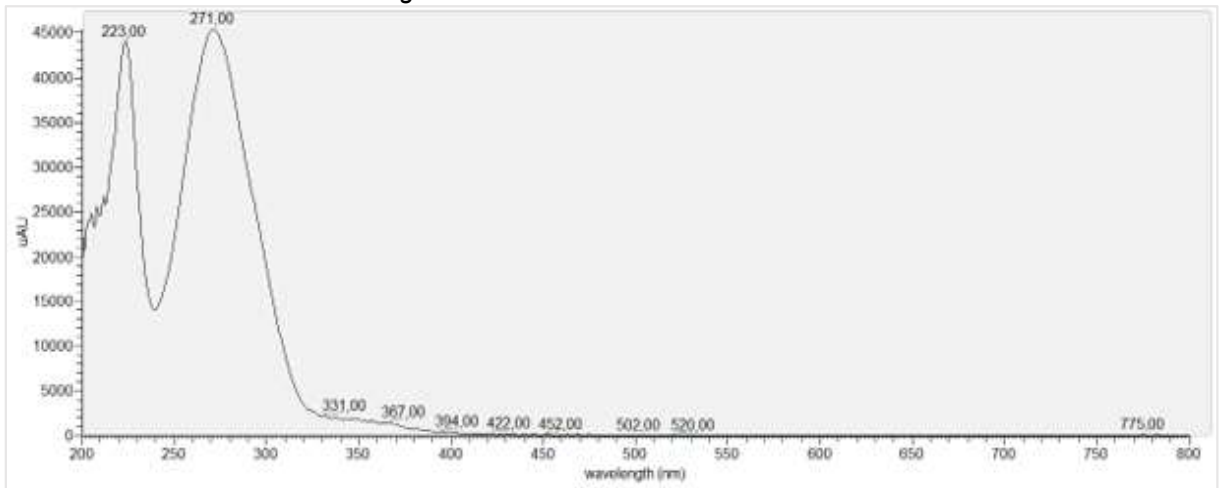


Figura 7 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia florida*.



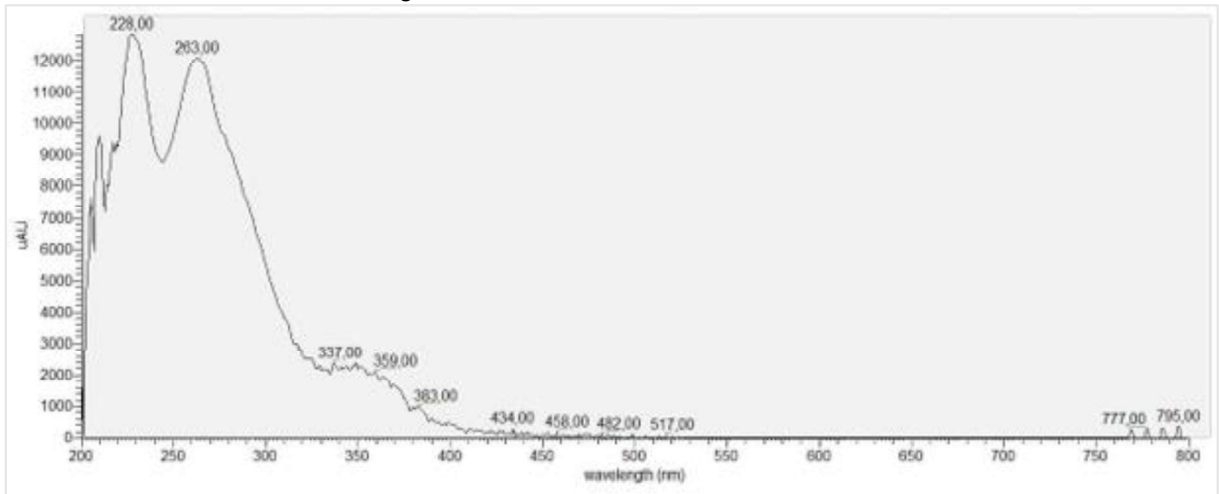
Fonte: Da autora, 2023.

Figura 8 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia florida*.



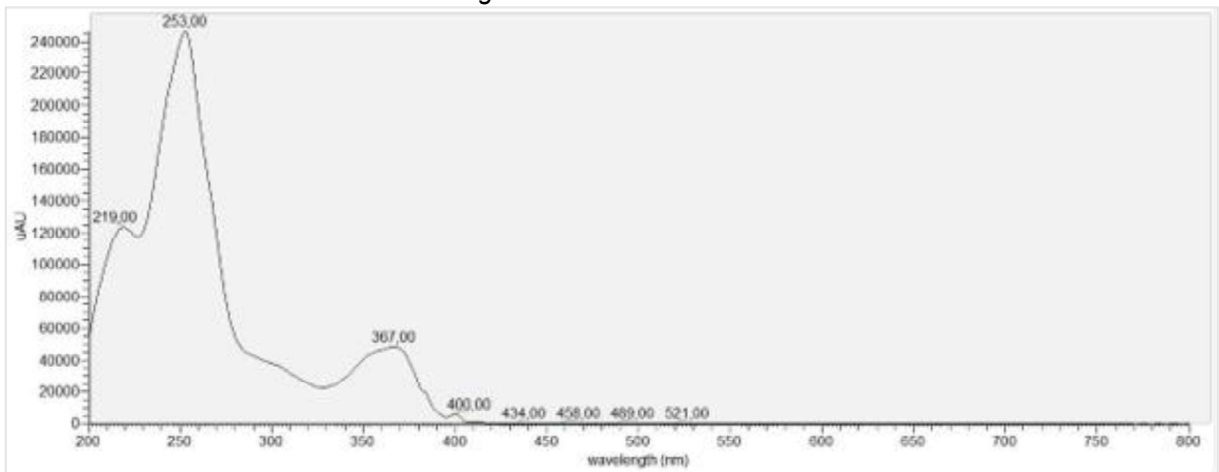
Fonte: Da autora, 2023.

Figura 9 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia florida*.



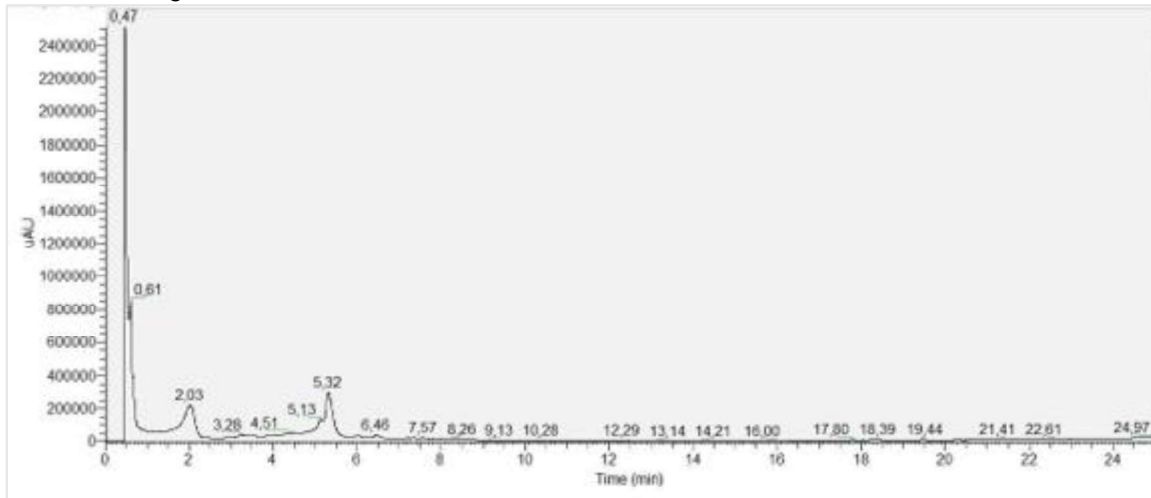
Fonte: Da autora, 2023.

Figura 10 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA do extrato seco obtido das folhas de *Eugenia florida*.



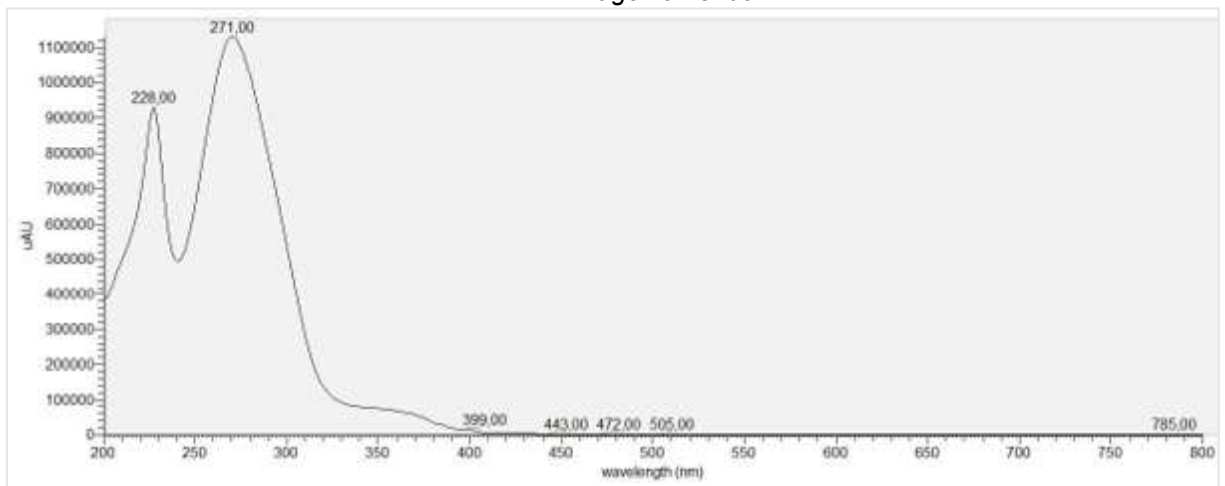
Fonte: Da autora, 2023.

Figura 11 - Perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de *Eugenia florida*.



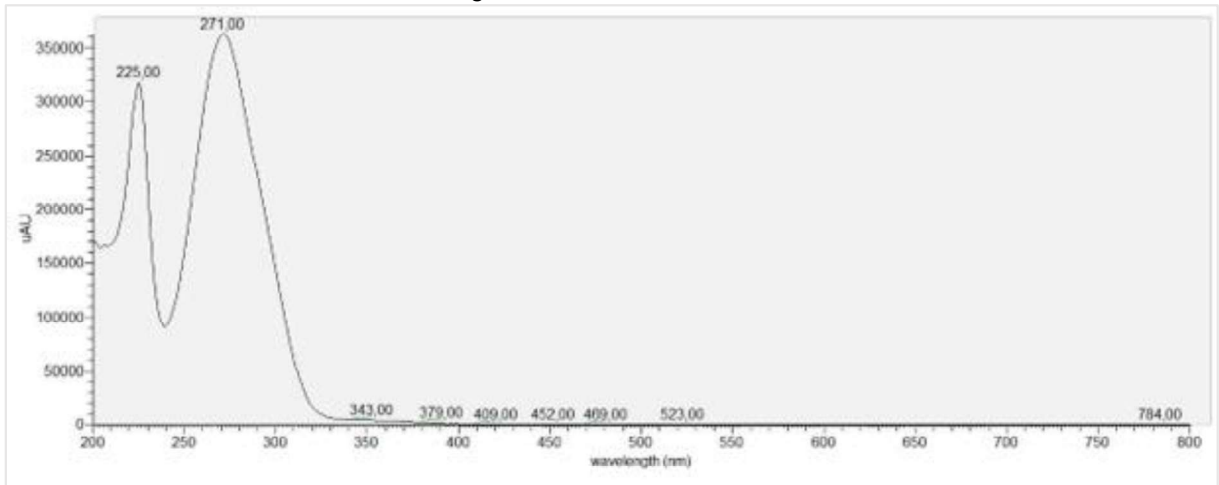
Fonte: Da autora, 2023.

Figura 12 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de *Eugenia florida*.



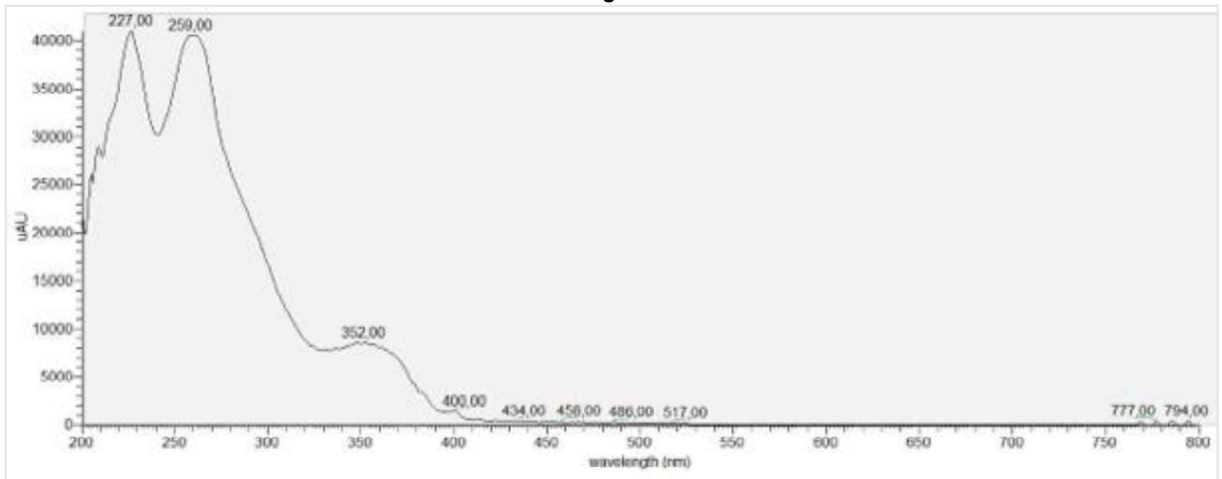
Fonte: Da autora, 2023.

Figura 13 - Espectros de UV-VIS obtido do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de *Eugenia florida*.



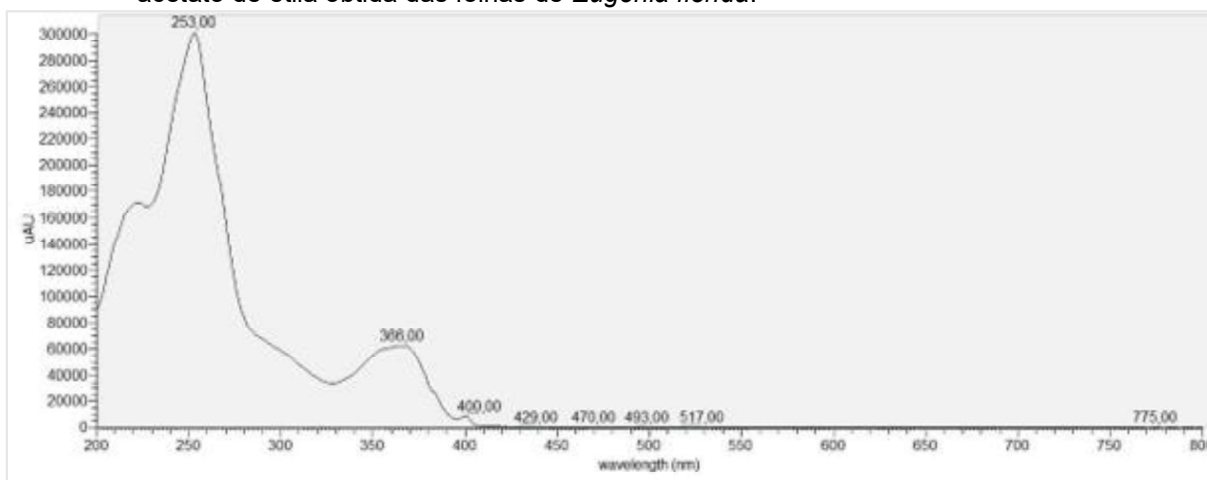
Fonte: Da autora, 2023.

Figura 14 - Espectros de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de *Eugenia florida*.



Fonte: Da autora, 2023.

Figura 15 - Espectro de UV-VIS obtido a partir do perfil cromatográfico por CLAE – PDA da fração acetato de etila obtida das folhas de *Eugenia florida*.



Fonte: Da autora, 2023.

As figuras 6 e 11 mostram os cromatogramas da composição química da matriz obtido pela análise por HPLC-PDA, avaliada pelo número de picos eluídos ao longo da corrida cromatográfica.

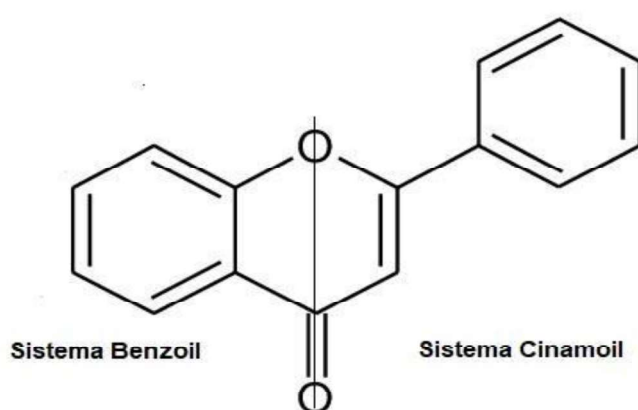
A partir da análise dos picos obtidos nos espectros no ultravioleta há a constatação de compostos flavonoides e ácidos fenólicos pela presença de espectros com bandas características dessas classes em todas as amostras analisadas. A análise dos espectros de absorção no ultravioleta forneceu informações importantes para sinalizar o perfil químico do extrato seco e da fração acetato de etila das folhas de *Eugenia florida*.

Os compostos com tempo de retenção em aproximadamente 0,6 minutos, apresentaram espectros UV com máximo de absorção em 272 nm (Figura 7) e 271 nm (Figura 12) correspondendo respectivamente aos resultados do extrato seco e da fração acetato de etila. Os resultados obtidos são característicos da classe de compostos fenólicos (FRANCO *et al.*, 2016).

Conforme demonstrado na figura 10, e figura 15 através da avaliação dos espectros UV obtidos dois máximos de absorção, entre 240-290 nm e 300-390 nm indicando a presença de flavonoides. Os flavonoides devido a sua estrutura química apresentam duas bandas de absorção do espectro eletromagnético na região visível correspondentes aos dois sistemas aromáticos presentes em agliconas, sendo que a banda II, com máximo na faixa espectral de 240-290 nm, é atribuída ao anel A do flavonoide que possui o sistema benzoil com menor extensão da conjugação eletrônica. Enquanto a banda I apresenta máximo na faixa espectral de 300-390 nm

atribuída ao anel B que possui o sistema cinamoil com maior extensão das ligações conjugadas (Figura 16). Flavonas, flavonóis e flavonóis glicosilados são usualmente detectados em comprimento de onda de 270 nm, 365 nm ou 370 nm, embora detecções em 280 e 350 nm tem sido usada. Quanto maior a extensão da conjugação eletrônica, menor será a energia absorvida pelo sistema e, portanto, maior será o comprimento de onda absorvido (HUBER; RODRIGUES-AMAYA, 2008).

Figura 16 - Estrutura geral de um flavonoide, com os anéis A e B e seus sistemas benzoil e cinamoil.



Fonte: Da autora, 2023.

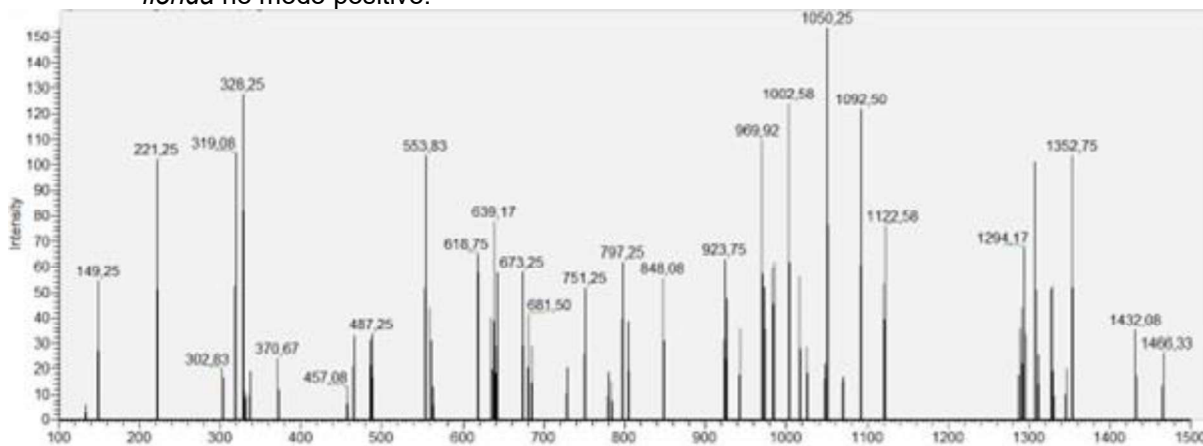
Para as análises por CLAE-PDA de flavonoides as variações nas faixas de absorção irão depender do número de hidroxilas e do grau de substituição destas. Alterações na absorção da banda II correspondem a diferentes substituições causadas no anel A enquanto as alterações nos anéis B e C tendem a modificar a absorção da Banda I (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Para a espécie *Eugenia florida* foi adotada a análise por espectrometria de massas devido ao conhecimento prévio da presença de compostos fenólicos e flavonoides em sua composição (SILVA, 2018). O potencial de ação antimicrobiana relatado na literatura para extratos hidroetanólicos de folhas do gênero *Eugenia* sp. pode estar correlacionado com o teor de compostos fenólicos e principalmente flavonoides presentes, a explicação se concentra no fato de tanto compostos fenólicos quanto os flavonoides serem capazes de formar complexos com íons metálicos, proteínas e polissacarídeo, tal complexação provoca a degradação da membrana proteica, causando o extravasamento do conteúdo intracelular, a ruptura celular apresenta como resultado a inativação dos micro-organismos (GAMA *et al.*, 2022).

## 5.5 Avaliação qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas

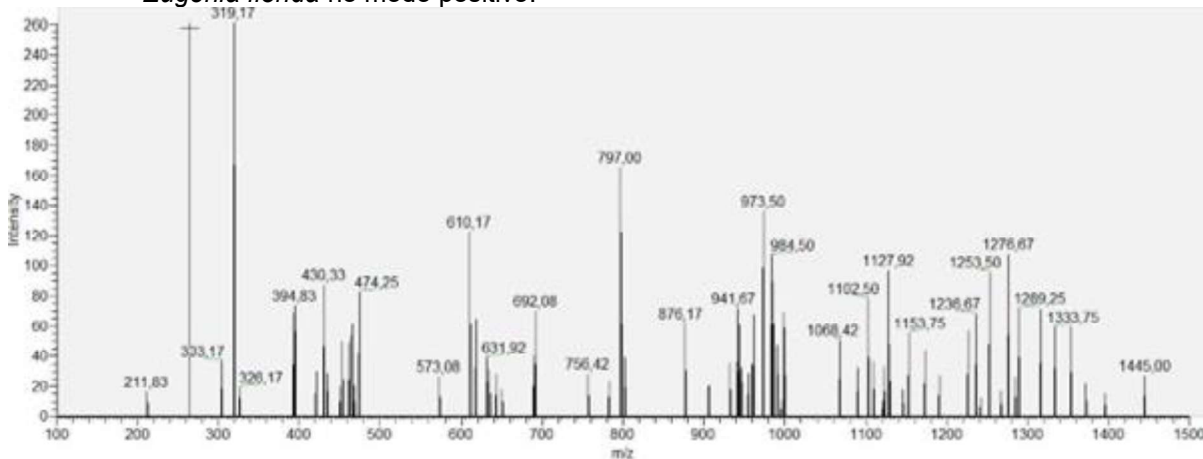
As figuras 17 e 18 demonstram os espectros de massas em *full scan* do extrato seco e fração acetato de etila respectivamente, evidenciando os íons precursores das moléculas desprotonadas ( $[M-H]^-$ ). As fragmentações para cada um dos íons levaram a identificação dos metabólitos. Para estes íons, fragmentos em múltiplos estágios ( $MS^n$ ) foram obtidos, o que permitiu a identificação das estruturas químicas de algumas moléculas, propostas de acordo com os mecanismos de fragmentação observados nos espectros e comparados com a literatura.

Figura 17 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* do extrato seco de *Eugenia florida* no modo positivo.



Fonte: Da autora, 2023.

Figura 18 - Espectro de massas de primeira-ordem, em modo *full-scan* da fração acetato de etila de *Eugenia florida* no modo positivo.



Fonte: Da autora, 2023.

Tabela 7 - Compostos químicos identificados pela técnica de CLAE-ESI-IT-MSn (modos negativo e positivo) no extrato seco e fração acetato de etila de *Eugenia florida*.

[M-H] <sup>-</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>n</sup> (m/z)	Sugestão de nome para a estrutura	Referência
255	---	211, 167, 149	Ácido piscídico	KRUSE <i>et al.</i> , 1999
---	465	303	Delfinidina-O-Hexose	FARIA; MARQUES; MERCADANT E, 2011
449	---	317,275	Miricetina-O-Pentose	BASTOS <i>et al.</i> , 2019
325	---	163, 119	Ácido- <i>p</i> -cumárico-O-hexose	SÁNCHEZ-RABANEDA <i>et al.</i> , 2003
271	---	243, 227, 211	Naringenina	BASTOS <i>et al.</i> , 2019
593	---	431, 285	Canferol-O-desoxihexose-O-hexose	DINI <i>et al.</i> , 1991
---	619	457, 413, 395	Ácido betulínico heterosídeo	BARRETO <i>et al.</i> , 2013
475	---	301, 259, 217	Ácido elágico-4-acetilpentose	MULLEN <i>et al.</i> , 2003
---	926	780, 634, 488, 444, 400	Ácido melalêucico heterosídeo	BRANDÃO <i>et al.</i> , 1992
1075	---	923, 777, 625, 463, 301	Quercetina-O-hexose-O-Galoihexose-O-galoidesoxihexose	SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013
1153	---	1027, 1001, 865, 739, 713	Catequina tetramérica	BASTOS <i>et al.</i> , 2019

Fonte: BASTOS *et al.*, 2019.

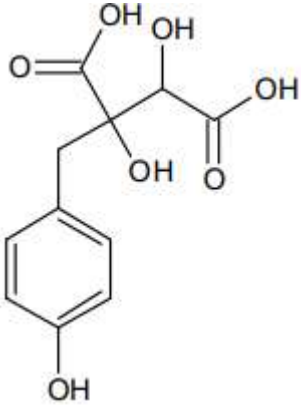
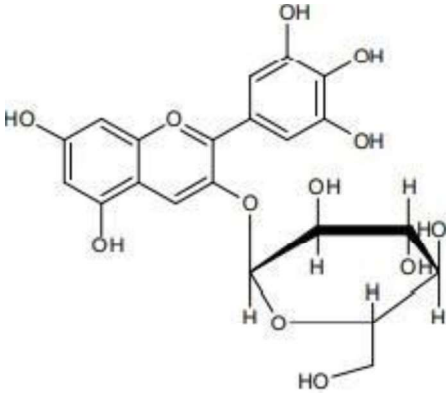
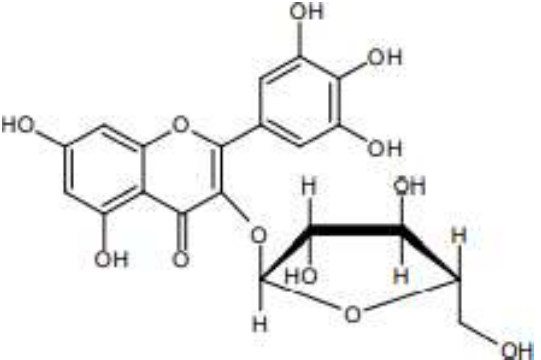
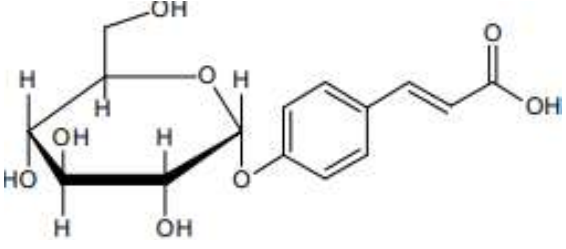
Legenda: MS<sup>n</sup> = fragmentações em múltiplos estágios; m/z = razão massa-carga.

Os extratos das folhas de *E. florida* demonstraram após avaliação fitoquímica qualitativa a presença de uma variabilidade de metabólitos secundários. Os resultados apresentaram presença de flavonoides, polifenóis e saponina. A caracterização por MS do extrato das folhas de *E. florida*, revelou a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e saponina triterpênica, de acordo com a literatura relatada para o gênero *Eugenia* sp., baseando-se nos padrões e mecanismos de fragmentação para cada molécula obtida. Dentre as moléculas identificadas nos extratos, destacam-se: ácido piscídico, delfinidina-O-hexose, miricetina-O-pentose, ácido-*p*-cumárico-O-hexose, naringenina, canferol-O-desoxihexose-O-hexose, ácido betulínico heterosídeo,



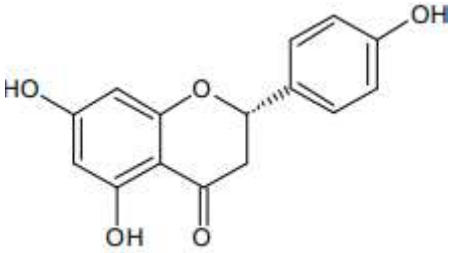
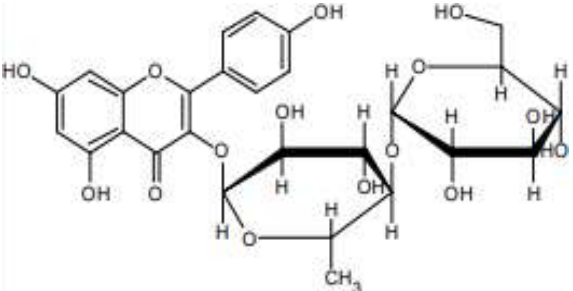
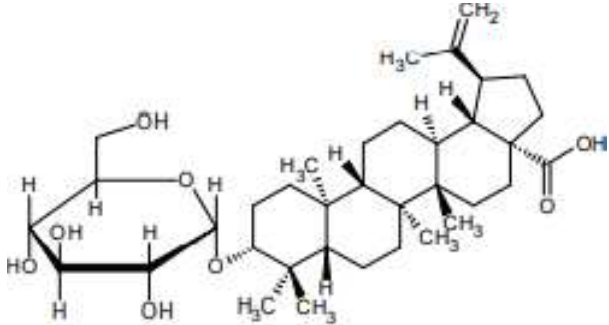
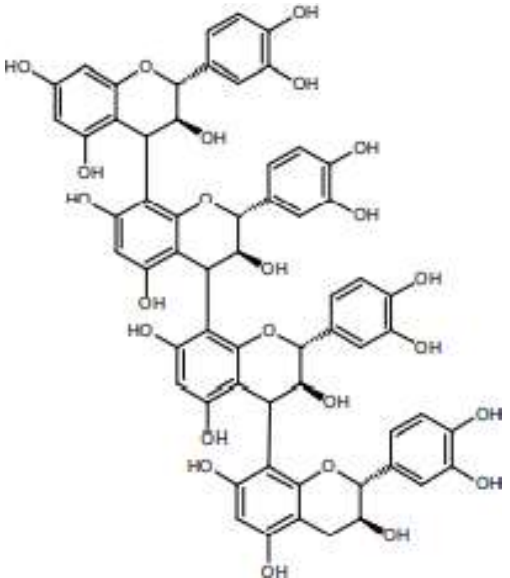
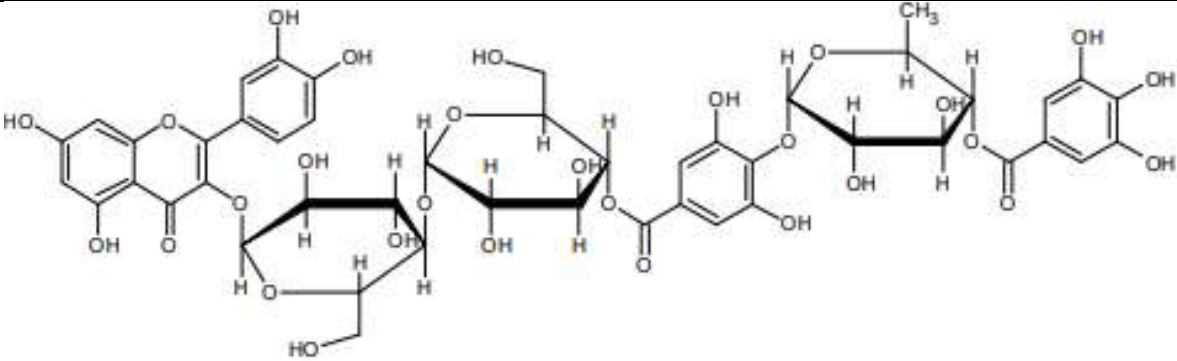
quercetina-O-hexose-O-galoihexose-O-galoidesoxihexose e catequina tetramérica (Figura 19).

Figura 19 - Representação estrutural dos compostos identificados por espectrometria de massas, no extrato seco e na fração acetato de etila de *Eugenia florida*. (continua)

Ácido piscídico	Delfinidina-O-hexose
	
Miricetina-O-pentose	Ácido-p-cumárico-O-hexose
	

Fonte: Da autora, 2023.

Figura 19 - Representação estrutural dos compostos identificados por espectrometria de massas, no extrato seco e na fração acetato de etila de *Eugenia florida*. (conclusão)

Naringenina	Canferol-O-desoxihexose-O-hexose
	
Ácido betulínico heterosídeo	Catequina tetramérica
	
Quercetina-O-hexose-O-galoihexose-O-galoidesoxihexose	
	

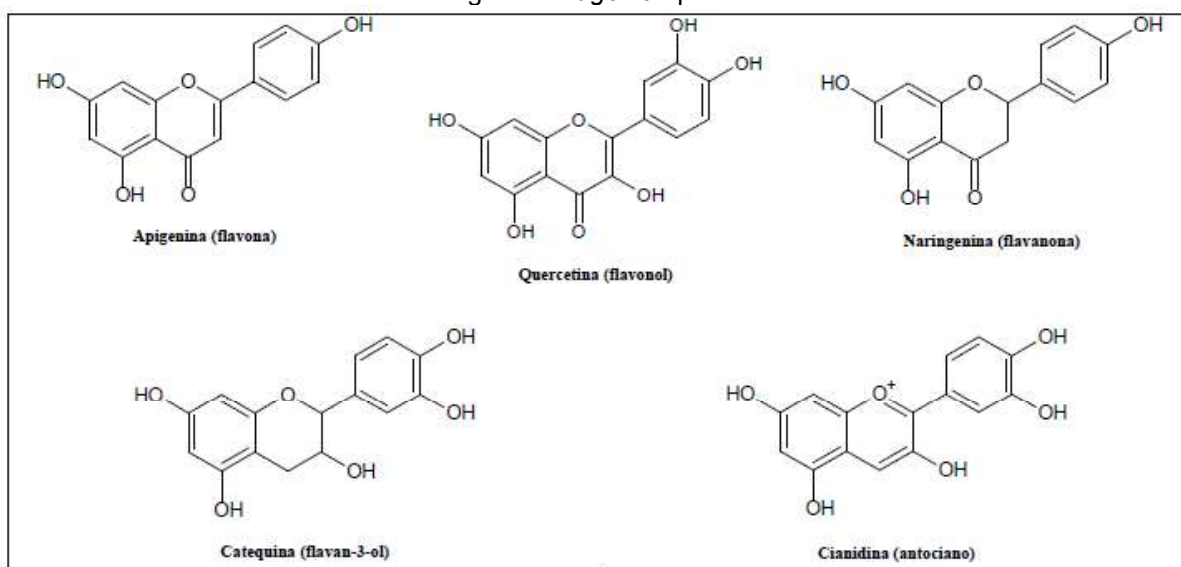
Fonte: Da autora, 2023.

Os compostos identificados quercetina-O-hexose-O-galoihexose-O-galoidesoxihexose, naringenina, catequina tetramétrica, miricetina-O-pentose, canferol-O-desoxihexose-O-hexose e delphinidina-O-hexose tratam-se de flavonóides, os quais fazem parte de um grande grupo de compostos polifenólicos, cujas atividades biológicas são diretamente dependentes de suas estruturas químicas, que, por sua vez, podem se diferenciar quanto à classe estrutural, ao grau de hidroxilação e às substituições (KUMAR; PANDEY, 2013; VEZZA *et al.*, 2016).

Estes compostos podem ser subdivididos em uma variedade de classes químicas diferentes quanto ao esqueleto básico. No caso do gênero *Eugenia* sp., as subclasses mais comuns de flavonoides biossintetizados pelas espécies são flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-óis e antocianos (Figura 10). Estes flavonoides podem apresentar-se na forma livre (aglicona) ou então conjugados com açúcares do tipo glicose, arabinose, ramnose, xilose ou ácido glicurônico, normalmente presentes na conformação beta (heterosídeos). As formas O-heterosídicas são as mais comuns no gênero *Eugenia* sp., enquanto os C-heterosídeos são raros neste gênero vegetal (ALIPOUR *et al.*, 2014).

Na literatura há muitos relatos sobre os flavonoides possibilitarem um aumento na atividade de antibióticos, contribuindo para a redução da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos agindo contra diferentes bactérias (SILVA, 2020).

Figura 20 - A figura representa o núcleo fundamental e demonstra alguns exemplos de subclasses de flavonoides encontrados no gênero *Eugenia* sp.



Fonte: Adaptado de BASTOS, 2019.

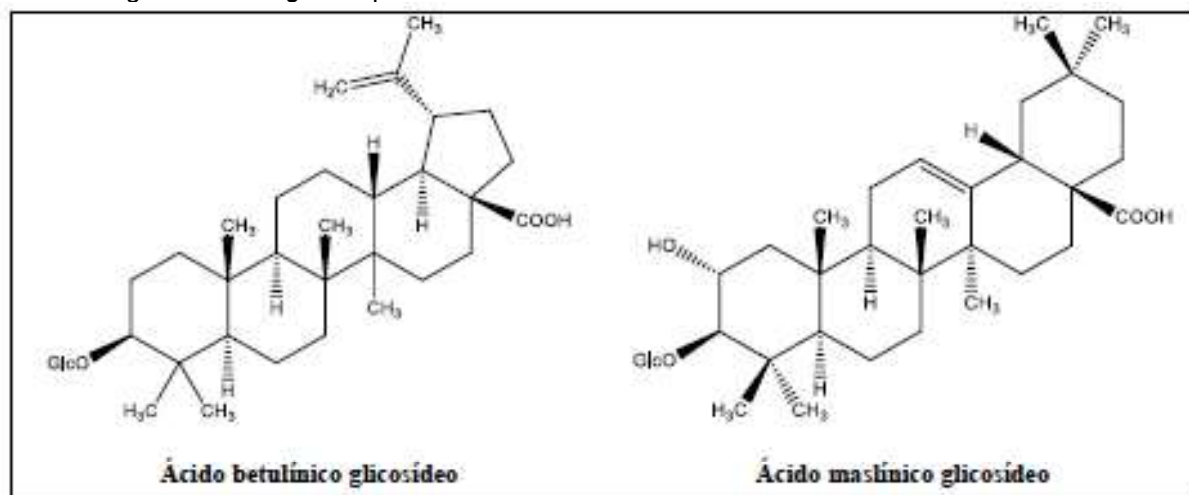
As subclasses flavonas e os flavonóis possuem o esqueleto que se apresenta mais simples quando comparados aos demais tipos de flavonoides. Isso pode ser justificado pelo fato de apresentarem origens biossintéticas semelhantes entre si, sendo assim estas duas classes são classificadas juntas. As características das flavonas são baseadas na presença dos açúcares ligados em posição diferente da dos flavonóis, sendo que, neste último, as moléculas de açúcar se ligam preferencialmente no C3, no caso das espécies do gênero (HOSTETLER *et al.*, 2017; PHIE *et al.*, 2017).

As subclasses das flavanonas e os flavan-3-óis são caracterizadas por uma ligação simples entre os carbonos das posições 2 e 3 do anel C em seu núcleo fundamental. As flavanonas não apresentam átomos de oxigênio ligados ao C3, enquanto os flavan-3-óis contêm uma ligação OH, em decorrência desse fato, os flavan-3-óis apresentam centros de assimetria em suas moléculas. Os flavan-3-óis são moléculas precursoras da formação de uma outra classe de metabólitos secundários, denominada de taninos condensados, sendo estes oligômeros e polímeros (PHIE *et al.*, 2017).

O composto ácido betulínico heterosídeo pertence a classe denominada saponina, que são caracterizados como metabólitos secundários de elevada massa molecular e que são heterosídeos de moléculas de esteroides ou de triterpenos. A estrutura das saponinas apresenta uma parte com característica apolar (triterpeno ou esteroide) e outra parte polar (açúcares), o que as classificam como redutoras da tensão superficial da água, detergentes e emulsificantes. Nas saponinas esteroidais, a aglicona é formada por um esqueleto de 27 carbonos dispostos num sistema tetracíclico, que, no caso de *Eugenia* sp., é do subtipo furostano (16,22-epoxicolestano). Nas saponinas triterpênicas, que são mais abundantes no gênero, a aglicona possui um esqueleto de 30 carbonos. Normalmente, são estruturas muito complexas, com número variado de açúcares e grupamentos químicos ligados às moléculas de aglicona, por meio de ligações estereoquímicas do tipo R ou S, sendo variáveis dentro do gênero *Eugenia* sp. As cadeias de açúcares podem ser lineares ou ramificadas. Com relação ao número de cadeias de açúcares ligados à aglicona, as saponinas do gênero são classificadas como monodesmosídicas, ou seja, possuem uma única cadeia ligada, preferencialmente, ao C3. Em relação à conformação espacial das saponinas esteroidais e triterpênicas, a fusão dos anéis A/B, B/C e C/D é do tipo trans, enquanto os anéis D/E têm junção do tipo cis. Os

carbonos das posições 19 e 20 podem ou não estar metilados, caracterizando-as como oleananos (duas metilas em C20) ou ursanos (uma metila em C19 e outra em C20) (AHMAD; ATHAR, 2017).

Figura 21 - Demonstração de duas estruturas químicas referentes a saponinas isoladas de plantas do gênero de *Eugenia* sp.



Fonte: Adaptado de BASTOS, 2019.

Legenda: Glc = glicose.

Os compostos identificados ácido-p-cumárico-O-hexose e o ácido piscídico são ácidos fenólicos, também designados por compostos fenólicos, possuem dois ou mais anéis aromáticos em suas estruturas químicas, com substituintes hidroxila, e são derivados do metabolismo secundários das plantas. Trata-se de um grupo quimicamente heterogêneo, em que a maioria dos compostos é solúvel em solventes polares, como água e etanol, porém muitos deles solubilizam-se apenas em solventes orgânicos de média polaridade, como o acetato de etila (MAQSOOD *et al.*, 2014).

## 5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* *Eugenia florida*

A tabela 8 demonstra os resultados referentes aos ensaios de CMM (Concentração microbicida mínima) e CIM (Concentração inibitória mínima) para a espécie *Eugenia florida*, frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana pelo método de CIM e CMM.

Cepas	<i>Eugenia florida</i>			
	Extrato etanólico		Fração acetato de etila	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMM( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMM( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	250-500	> 1000	500-1000	> 1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	500-1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	500-1000	> 1000	> 1000	> 1000

Fonte: Da autora, 2023.

Legenda: CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CMM (Concentração Microbicida Mínima).

Os extratos com CIM inferior a 100  $\mu\text{g/mL}$  são considerados de excelente atividade antimicrobiana, entre 100-500  $\mu\text{g/mL}$  são considerados de atividade moderada, aqueles com CIM entre 500-1000  $\mu\text{g/mL}$  são ligeiramente ativos e aqueles que apresentam CIM maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$  estão inativos.

Para a avaliação do CIM referente a cepa do *S. aureus* a inibição ocorreu na faixa entre 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato etanólico que é considerada atividade antimicrobiana moderada, para a fração acetato de etila o resultado apresentado para a inibição foi entre 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  para fração demonstrando atividade antimicrobiana ligeiramente ativa.

Na avaliação do ensaio CIM para as cepas de *E. coli* e de *C. albicans* não foram obtidos resultados expressivos para a fração acetato de etila, porém para o extrato etanólico os resultados obtidos foram significativos e apresentaram-se na faixa de 500 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  demonstrando atividade antimicrobiana ligeiramente ativa.

Avaliando os dados referentes a concentração microbicida mínima (CMM) não houve resultado significativo para o extrato etanólico bem como para a fração acetato de etila, e para nenhum dos microrganismos testados no ensaio.

Os resultados demonstrados no CIM podem estar relacionados a presença de flavonoides tanto no extrato quanto na fração acetato de etila, visto que conforme relatado na literatura os compostos flavonoides podem ser responsáveis pela capacidade de inibição do crescimento bacteriano, que pode ocorrer por meio de mecanismos diferentes, dentre eles podemos citar a alteração da permeabilidade de membrana e parede celular, inibição da síntese de ácidos nucléicos, neutralização dos fatores de virulência, inibição de urease ou pela atividade sinérgica com antibióticos. Sendo assim podemos evidenciar a importância da avaliação de

potenciais medicamentos fitoterápicos antimicrobianos, visto que extratos que tenham predominância de composição de flavonoides podem ser candidatos promissores (SILVA, 2020). Dessa forma correlação entre os compostos identificados no presente trabalho com os resultados encontrados através nos ensaios CIM pode ser decorrente do potencial de ação antimicrobiana atribuída aos flavonoides.

### 5.7 Avaliação da toxicidade da espécie *Eugenia florida*

Para a avaliação da toxicidade aguda referente ao extrato bruto e fração acetato de etila foi realizado um modelo *in vivo* com o invertebrado *Galleria mellonella* em alternativa ao modelo tradicional com mamíferos. Os resultados apresentados no teste de avaliação de toxicidade indicam que na concentração testada tanto para o extrato bruto (1mg/mL) quanto para a fração acetato de etila (1mg/mL) não são tóxicos para as células de larvas do inseto, uma vez que a viabilidade está acima de 80%, conforme valores apresentados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Resultado da avaliação da toxicidade do extrato espécie *Eugenia florida* realizado no modelo *in vivo* com o invertebrado *Galleria mellonella*.

	Extrato etanólico			
	12h	24h	48h	72h
Sem atividade	0	0	0	0
Baixa atividade c/ estímulo	0	0	0	0
Atividade com estímulo	0	0	0	0
Atividade sem estímulo	10	10	10	10
Sem casulo	9	4	0	0
Casulo parcial	1	0	0	0
Casulo completo	0	6	10	10
Melanização completa	0	0	0	0
Mais de 3 pontos pretos	0	0	0	0
Menos de 3 pontos pretos	0	0	0	0
Sem melanização	10	10	10	10
Morte	0	0	0	0
Viva	10	10	10	10
Pontuação:	90,5	96	100	100

Fonte: Da autora, 2023.

Tabela 10 - Resultado da avaliação da toxicidade da fração acetato de etila obtida com a espécie *Eugenia florida* realizado no modelo *in vivo* com o invertebrado *Galleria mellonella*.

	Fração acetato de etila			
	12h	24h	48h	72h
Sem atividade	0	0	0	1
Baixa atividade c/ estímulo	0	0	0	0
Atividade com estímulo	0	1	0	1
Atividade sem estímulo	10	9	10	8
Sem casulo	10	1	0	1
Casulo parcial	0	3	1	0
Casulo completo	0	6	9	9
Melanização completa	0	0	0	0
Mais de 3 pontos pretos	0	1	0	0
Menos de 3 pontos pretos	1	0	0	0
Sem melanização	9	9	10	10
Morte	0	0	0	1
Viva	10	10	10	9
<b>Pontuação:</b>	<b>89</b>	<b>94,5</b>	<b>99,5</b>	<b>93</b>

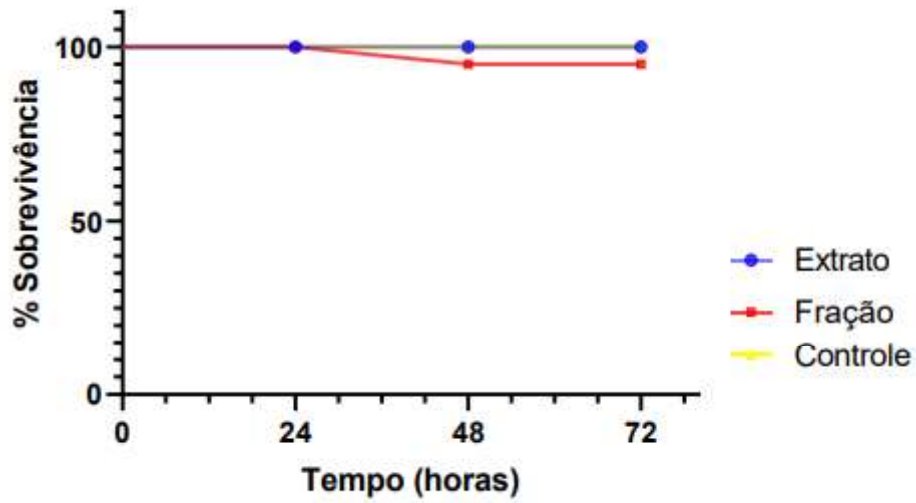
Fonte: Da autora, 2023.

Conforme demonstrado nas tabelas 9 e 10, na leitura realizada 12 horas após a inoculação pode-se notar uma pontuação mais baixa do que as pontuações encontradas para as demais leituras, isso ocorre devido a avaliação ser realizada pouco tempo após o estresse, os invertebrados ainda não se recuperaram bem e não tiveram tempo para produzir casulo. Na avaliação realizada 72 horas após a inoculação foi verificado que a pontuação obtida para o extrato etanólico foi de 100 enquanto a obtida para a fração acetato de etila foi de 93, ambas são pontuações ideais esperadas para resultados de baixa toxicidade, visto que a faixa de pontuação de 90 a 100 determina um excelente resultado. Pode-se observar que nas avaliações realizadas após 72 horas de inoculação os resultados tiveram algumas mortes, mas nada que causasse impacto no resultado da leitura, visto que mesmo ocorrendo as mortes houve uma pontuação para a fração acetato de etila que é considerada ideal.

De acordo com os resultados obtidos podemos considerar que a espécie *Eugenia florida* apresentou resultados satisfatórios referente ao teste de toxicidade para tanto para o extrato etanólico como para a fração acetato de etila, porém conforme o gráfico o extrato demonstrou taxa de 100% sendo equivalente ao controle, enquanto a fração apresentou 93% de taxa de sobrevivência.



Gráfico 1 - Teste de toxicidade em *Galleria mellonella*. Avaliação realizada com o extrato bruto (1 mg/mL) e fração acetato de etila (1 mg/mL) de *Eugenia florida*, controle com álcool etílico 55% e determinação pela contagem de larvas vivas ao longo de 72 horas (3 dias).



Fonte: Da autora, 2023.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As determinações referentes aos resultados apresentados para as técnicas de perda por secagem e análise granulométrica das folhas da *Eugenia florida*, bem como o rendimento obtido para os extratos, possibilitou corroborar com a reprodutibilidade dos estudos subsequentes.

Os resultados obtidos através da análise por MS do extrato seco e fração acetato de etila advindos das folhas de *E. florida*, baseando-se nos padrões e mecanismos de fragmentação para cada molécula obtida possibilitaram a verificação da presença de ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos, o que corrobora com dados presentes na literatura para o gênero *Eugenia* sp.

Os resultados obtidos demonstraram que pelo modelo utilizado não houve toxicidade na concentração testada, sendo assim pode-se constatar a viabilidade dos extratos de *Eugenia florida* para prosseguir com testes mais precisos visando avaliar o potencial biológico da espécie.

Com intuito de avaliação do potencial de atividade antimicrobiana foi realizado o método de CIM (Concentração inibitória mínima), no ensaio microbiológico foi avaliada a atividade contra linhagens padrão de duas cepas bacterianas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e uma cepa fúngica (*Candida albicans* ATCC 10231). Frente à linhagem do *S. aureus* a inibição ocorreu na faixa entre 250 e 500 µg/mL para o extrato etanólico que é considerada atividade antimicrobiana moderada, para a fração acetato de etila o resultado apresentado para a inibição foi entre 500 e 1000 µg/mL para fração demonstrando atividade antimicrobiana ligeiramente ativa. Para a CIM referente a fração acetato de etila frente as cepas de *E. coli* e de *C. albicans* não apresentou resultados expressivos, porém para o extrato etanólico os resultados obtidos foram significativos e apresentaram-se na faixa de 500 a 1000 µg/mL demonstrando atividade antimicrobiana ligeiramente ativa. Diante dos resultados apresentados, o extrato demonstrou ação antimicrobiana ligeiramente ativa, demonstrando a necessidade da realização de ensaios complementares para corroborar com a avaliação do potencial de atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, K.; ATHAR, F. Phytochemistry and pharmacology of *Callistemon viminalis* (Myrtaceae): a review. **The Natural Products Journal**, Netherlands, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- ALIPOUR, G. *et al.* Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. **Phytotherapy Research**, United Kingdom, v. 28, n. 8, p. 1125-1136, 2014.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids**: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press LLC, 2006. Cap. 1-2.
- ANDREA, A. *et al.* Methods and challenges of using the greater wax moth (*Galleria mellonella*) as a model organism in antimicrobial compound discovery. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 85, 2019.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2000.
- ANTONIAZZI, C. A. *et al.* Estudo etnobotânico de *Croton urucurana baill* (Euphorbiaceae) na comunidade Salobra Grande, Porto Estrela - MT. **Revista Biodiversidade**, Rondonópolis, v.15, n. 2, p. 40- 52, 2016.
- APEL, M. A. *et al.* Composição química do óleo volátil de Myrcianthes nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 402-407, 2006.
- ASSIS, M. A; MORELLI, A. V. F; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n.1, p. 1-72, 2015.
- BARRETO, A. S. *et al.* Analysis of the presence of the betulinic acid in the leaves of *eugenia florida* by using the technique GC/MS, GC/FID and HPLC/DAD: a seasonal and quantitative study. *In*: MARTIN, D. F.; MARTIN, B. B. **Column chromatography**. London: IntechOpen, 2013.
- BASTOS, R. G. *et al.* Chemical characterization and antimicrobial activity of hydroethanolic crude extract of *Eugenia florida* DC (Myrtaceae) leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 110-115, 2016.
- BASTOS, R. G. *et al.* Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, Netherlands, v. 123, n. 1, p. 317-332, 2019.
- BRANDÃO, M. G. *et al.* Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 31, n. 1, p. 352-354, 1992.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília, 2019. v. 1, p. 113.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2012.

CASCAES, M. M. *et al.* Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n. 10, 2015.

CHADWICK, J. S.; VILK, E. Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 13, n. 3, p. 410-415, 1969.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 11th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. 4th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COSTA, R. S. *et al.* Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

COSTA, J. C. D.; HOSCHEID, J. Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 175-185, 2018.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DA NÓBREGA, A. D. *et al.* Docking prediction, antifungal activity, anti-Biofilm effects on *Candida spp.*, and toxicity against human cells of cinnamaldehyde. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5969-5969, 2020.

DEXHEIMER, G.; POZZOBON, A. Atividade biológica de plantas da família Myrtaceae: revisão sistemática de artigos entre 1989 e 2015. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 2, 2017.

DIAS, E. C. M. *et al.* Uso de fitoterápicos e potenciais riscos de interações medicamentosas: reflexões para prática segura. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 41, n.2, p. a2306, 2018.

DINI, A. *et al.* Minor components in food plants – Note I. Flavonol glycosides from *Ullucus tuberosus*. **Bollettino Della Societa Italiana di Biologia Sperimentale**, v. 67, n. 12, p. 1053-1058, 1991.

DJAINAL, W. A. S. *et al.* Larva of greater wax moth *Galleria mellonella* is a suitable alternative host for the fish pathogen *Francisella noatunensis subsp. orientalis*. **Bmc Microbiology**, v. 20, n. 1, p.1-14, 2020.

DONATO, A. M., MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farm**, v.19, n. 3, p. 759–770, 2009.

ESTEVAM, C. S. **Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. f. 189. Dissertação (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2006.

FANG, X. *et al.* Simultaneous extraction, identification and quantification of phenolic compounds in *Eclipta prostrata* using microwave-assisted extraction combined with HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Chem**, v.188, p. 36-527, 2015.

CECHINEL FILHO, V.; ZANCHET, C. C. C. **Fitoterapia Avançada: uma abordagem química, biológica e nutricional**. Porto Alegre: Artmed, 2020.

MENEZES FILHO, A. C. P. *et al.* Atividade antioxidante e compostos bioativos em espécies de um fragmento de Cerrado goiano tipo Cerradão. **Colloquium Agrariae**, v.15, n.1, 2019.

FRANCO, D. M. *et al.* Seasonal variation in allelopathic potential of the leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, n. 2, p. 157–165, 2016.

GAMA, L. C., *et al.* Caracterização do extrato hidroalcoólico de folhas da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) de cultivo hidropônico quanto à capacidade antioxidante e potencial antimicrobiano. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.1, p. 4316-4331, 2022.

HEYWOOD, V. H. *et al.* **Flowering plant families of the world**. Buffalo: Firefly Books, 2007.

HOSTETLER, G. L. *et al.* Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 423-435, 2017.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19 n.1, p. 97-108, 2008.

IBIAPINA, W. V. *et al.* Inserção da Fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. **Revista Ciência Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 58-68, 2014.

KESZEI, A. *et al.* Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 844–852, 2010.

KÖHLER, G. Probiotics research in *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 3-5, 2015.

KRUSE, S. O. *et al.* Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the *in vitro* estrogenic activity of fukinolic acid. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 763-764, 1999.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. e162750, 2013.

LOH, J. M. S. *et al.* *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A *Streptococcus*. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, 2013.

MAQSOOD, S. *et al.* Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: a detailed review.

**Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1125-1140, 2014.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hidroalcoholic extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MENDEZ, A. S. L. *et al.* Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 105-111, 2011.

MESSIAS, M. C. T. B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

MULLEN, W. *et al.* Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MS<sup>n</sup>. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 617-624, 2003.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Spray drying of plant extracts: Basic remarks and application. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Traditional medicine**: definitions. Washington, 2008. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine#tab=tab_1). Acesso em: 1 jul. 2022.

PATEL, S. M. *et al.* Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40-41, p. 100-115, 2016.

PHIE, J. *et al.* Flavonols reduce aortic atherosclerosis lesion area in apolipoprotein E deficient mice: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0181832, 2017.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 70, p. 1-17, 2012.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS<sup>(n)</sup> and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402-8416, 2013.

- SÁNCHEZ-RABANEDA, F. *et al.* Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1008, n. 1, p. 57-72, 2003.
- SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. **Plantas medicinais fitoterapia: uma ciência em expansão**. Brasília: Editora IFB, 2016.
- SANTOS, P. F. P. *et al.* Polyphenol and triterpenoid constituents of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. **Quim. Nova**, v. 41, n. 10, p. 1140-1149, 2018.
- SARDI, J. C. O. *et al.* Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* sp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280-287, 2017.
- SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.
- SILVA, D. S. *et al.* Atividade antimicrobiana de flavonoides: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020.
- SILVA, M. J. D. *et al.* The anti-inflammatory potential of *Mimosa caesalpinifolia* following experimental colitis: role of COX-2 and TNF-alpha expression. **Drug Research**, v. 68, n. 4, p. 196-204, 2018.
- SILVEIRA, R. M. *et al.* Diversidade da composição química dos óleos essenciais de *Eugenia* – Myrtaceae: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, 2021.
- DE SOUZA, N. M. Plantas hipoglicemiantes presentes na RENISUS: uma abordagem etnofarmacológica, **FACIDER Revista Científica**, n. 7, p. 16, 2015.
- STEPHENS, J. M. Immune responses of some insects to some bacterial antigens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 203-228, 1959.
- VASCONCELOS, E. A. F. *et al.* Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius raddi* (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VEZZA, T. *et al.* Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 211, 2016.
- WU, P. *et al.* Investigation of in vitro and in vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. **Food Chem**, v.173, p. 194-202, 2015.

YANG, R. *et al.* The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharm Biol.**, v. 55, p. 5-18, 2017.

YAZAR, J. G.; DEMIRAY, E. Degradation kinetics of bioactive compounds in dried mistletoe leaves during storage. **Food Bioscience**, v. 52, p. 102-477, 2023.

ZAGO, L. M. S.; MOURA, M. E. P. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, n. 1, p. 257-173, 2018.