UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

CURSO DE BIOTECNOLOGIA – FCBA

NATÃ VINICIUS DA SILVA MIRANDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DAS FOLHAS E CASCAS DE *Eugenia uniflora*

DOURADOS

2019

NATÃ VINICIUS DA SILVA MIRANDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DAS FOLHAS E CASCAS DE *Eugenia uniflora*

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito do curso de Biotecnologia para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais na Universidade Federal Da Grande Dourados.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

DOURADOS

2019

NATÃ VINICIUS DA SILVA MIRANDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS E CASCAS DE *Eugenia uniflora*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito do curso de Biotecnologia para obtenção do titulo de Bacharel em Biotecnologia – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos (Presidente)

Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira

Dr. José Tarcisio Giffoni Carvalho Júnior

Dourados/MS, 18 de Fevereiro de 2019.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M672a Miranda, Natã Vinicius Da Silva
Avaliação da Atividade Antioxidante e Citotóxica dos Extratos Hidroetanólicos das Folhas e Cascas de Eugenia uniflora / Natã Vinicius Da Silva Miranda -- Dourados: UFGD, 2019.
56f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Edson Lucas dos Santos
Co-orientador: David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados
Inclui bibliografia

1. Eugenia uniflora. 2. antioxidante. 3. citotoxidade. 4. melanoma. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Dedico esse trabalho a minha querida Eunice Pereira da Silva Miranda, por ser meu exemplo, meu alicerce, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio, minha mãe Eunice Pereira da Silva Miranda, meu pai Edenilson Rodrigues Miranda e meu irmão Weverthon da Silva Miranda.

Agradeço a Prof.ª Dr.ª Maria do Carmo Vieira por disponibilizar as estufas de ar circulante para o processo de secagem do material vegetal.

Agradeço ao Me. Emerson Pereira da Silva pela ajuda no preparo da exsicata e deposito no Herbário DDMS da Universidade Federal da Grande Dourados.

Agradeço a Prof.ª Dr.ª Zefa Valdivina Pereira por identificar a exsicata de *Eugenia uniflora* para posterior depósito no Herbário DDMS da Universidade Federal da Grande Dourados.

Agradeço ao Dr.° Carlos Alexandre Carollo, por ceder o laboratório e equipamentos para preparo dos extratos.

Agradeço aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro.

Agradeço ao grupo de pesquisa GEBBAM – Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo, em especial Daniel Ferreira Leite e Débora da Silva Baldivia. Esse é um trabalho de todo o grupo que possibilitaram a execussão deste estudo.

Agradeço ao meu coorientador David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro, por toda paciência, auxilio e ensinamento.

Agradeço ao meu orientador Edson Lucas dos Santos, por me aceitar no grupo de pesquisa, pelos conselhos, ensinamentos e orientações.

Agradeço a UFGD, aos professores, a equipe de técnicos, aos servidores, aos faxineiros e a toda a infraestrutura disponível.

Agradeço aos meus amigos que estiveram comigo na graduação, especialmente Evelyn Gabriela Santos Rosa, João Paulo Marques Lara, Juciano Rocha Professor, Luiz Guilherme Vieira de Carvalho, Markus Rafael Carvalho Eberhart e Rafaela Tambasco de Castro pelo companheirismo, conselhos e críticas construtivas.

Obrigado!

“O ser refutável não é o menor dos encantos de uma teoria.”.

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

A *Eugenia uniflora*, a pitangueira é uma planta nativa brasileira, pertencente à família Myrtaceae e usada popularmente para o tratamento de diversas doenças. Este trabalho teve como objetivos, determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos de *E. uniflora*, sua atividade antioxidante e analisar a sua citotoxidade contra células de câncer melanoma humano e em leucócitos para analisar a seletividade dos extratos em células tumorais e não tumorais. Para isto foram preparados o extrato hidroetanólico das folhas (EFEU) e o extrato hidroetanólico das cascas do caule (ECEU), os quais foram preparados utilizando extrator de fluido pressurizado com o solvente etanol 80%. Os dois extratos apresentaram alto teor de compostos fenólicos, contudo no extrato das cascas o teor de compostos fenólicos totais foi maior e as folhas demonstraram considerável teor de flavonoides. Ambos os extratos demonstraram atividade antioxidante ao inibir os radicais livres DPPH e ABTS, com destaque para o ECEU. Além disso, os extratos demonstraram citotoxidade para células de melanoma SK-MEL 28 e 103 e reduzida atividade citotóxica em leucócitos, demonstrando ser mais seletivo em células de melanoma em relação a células normais. Assim, conclui-se que os extratos de *E. uniflora* apresentam compostos fenólicos, bem como foi comprovada a atividade antioxidante do EFEU e ECEU, além de demonstrar atividade citotóxica contra melanoma.

Palavras chave: *Eugenia uniflora*, antioxidante, citotoxidade, melanoma.

ABSTRACT

Eugenia uniflora, the pitangueira is a Brazilian native plant, belonging to the family Myrtaceae and popularly used for the treatment of several diseases. This work aimed to determine the content of phenolic compounds and flavonoids of extracts of *E. uniflora*, its antioxidant activity and to analyze its cytotoxicity against human melanoma cancer cells, and in leukocytes to analyze the selectivity of extracts in tumor cells and not tumor. For this purpose, the hydroethanolic extract of the leaves (EFEU) and the hydroethanolic extract of the stem bark (ECEU) were prepared, using a pressurized fluid extractor with 80% ethanol solvent. Both extracts presented a high content of phenolic compounds, however in the extract of the barks the total phenolic compounds content was higher and the leaves showed a considerable content of flavonoids. Both extracts showed antioxidant activity by inhibiting free radicals DPPH and ABTS, with emphasis on ECEU. In addition, the extracts demonstrated cytotoxicity for SK-MEL 28 and 103 melanoma cells and reduced cytotoxic activity in leukocytes, demonstrating to be more selective in melanoma cells compared to normal cells. Thus, it was concluded that extracts of *E. uniflora* present phenolic compounds, as well as the antioxidant activity of EFEU and ECEU, as well as demonstrating cytotoxic activity against melanoma.

Keywords: *Eugenia uniflora*, antioxidant, citotoxity, melanoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Doação de elétron por antioxidante.....15

Figura 2. Redução do oxigênio molecular e formação das espécies reativas..17

Figura 3. Estágios de desenvolvimento do tumor.....21

Figura 4. Disposição dos melanócitos na epiderme.....22

Fotografia 1. Aspecto geral da *E. uniflora*.....26

Fotografia 2. Folhas (A), Cascas do caule (B) e Fruto (C) da *Eugenia uniflora* 27

Mapa 1. Distribuição geográfica da espécie *Eugenia uniflora*, representados pelos pontos vermelhos, no planeta Terra.....28

Gráfico 1. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelos extratos hidroetanólicos da folha e da casca de *E. uniflora* e pelos antioxidantes ácido ascórbico e BHT.....39

Gráfico 2. Porcentagem de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ pelos extratos hidroetanólicos da folha e da casca de *E. uniflora* e pelos antioxidantes ácido ascórbico e BHT.....39

Gráfico 3. Viabilidade celular de células de melanoma após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das cascas de *E. uniflora*.....41

Gráfico 4. Viabilidade celular de células de melanoma após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das folhas de *E. uniflora*.....42

Gráfico 5. Viabilidade celular de PBMC, após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das folhas e ao extrato das cascas do caule de *E. uniflora*..43

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das espécies reativas de oxigênio.....17

Tabela 2 - Características das espécies reativas de nitrogênio.....18

Tabela 3 - Concentração de compostos fenólicos e flavonoides identificados nos extratos da Casca do Caule e Folhas *da Eugenia uniflora*.....37

Tabela 4 - Atividade máxima e IC_{50} dos tratamentos com EFEU e ECEU, e dos antioxidantes Ácido ascórbico e BHT.....38

Tabela 5 - IC_{50} dos extratos de *E. uniflora* com as linhagens celulares no ensaio de viabilidade celular e seus respectivos índices de seletividade (IS).....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulphonic acid)

BHT – Butil Hidroxitolueno

CAT – Catalase

CTLA-4 – Cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAG – Equivalente ao ácido gálico

ECSOD – Extracelular Superóxido Dismutase

EFEU – Extrato hidroetanólico das folhas de *Eugenia uniflora*

ECEU – Extrato hidroetanólico das cascas de *Eugenia uniflora*

EQ – Equivalente à quercetina

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ERC – Espécies reativas de carbono

ERCl – Espécies reativas de cloro

ERN – Espécies reativas de oxigênio

ERS – Espécies reativas de enxofre

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Da Silva

IARC – International Agency for Research On Cancer

IL-2 – Interleucina - 2

LLA – Leucemia linfoide aguda

LLC – Leucemia linfocítica crônica

LMA – Leucemia mieloide aguda

LMC – Leucemia mieloide crônica

MDA – Malondialdeído

NO^+ – Óxido Nítrico

$O_2^{\bullet-}$ – Radical superóxido

$^{\bullet}OH$ – Radical hidroxila

$ONOO^{-}$ – Peroxinitrito

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

$ROO^{\bullet}$ – Radical peroxila

SOD – Superóxido dismutase

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1. Estresse oxidativo 17
2.1.1. Espécies Reativas de Oxigênio - EROs: 18
2.1.2. Espécies Reativas de Nitrogênio - ERNs 20
2.2. Antioxidantes 21
2.2.1. Enzimas Antioxidantes 21
2.2.2. Antioxidantes não enzimáticos 22
2.3. Câncer 22
2.3.1. Melanoma 24
2.4. Plantas Medicinais 26
2.5. Eugenia uniflora 28
3. OBJETIVOS 33
3.1. Objetivo Geral 33
3.2. Objetivos específicos 33
4. MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1. Coleta do material vegetal e preparação do extrato 34
4.2. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais 34
4.3. Avaliação da atividade antioxidante 35
4.3.1. Ensaio de inibição do radical livre $ABTS^{\cdot+}$ 35
4.3.2. Ensaio de inibição do radical livre DPPH 36
4.4. Cultivo celular 36
4.5. Avaliação da viabilidade celular 37
4.6. Análises estatísticas 37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
6. CONCLUSÕES 46
7. REFERÊNCIAS 47

1. INTRODUÇÃO

O câncer está entre as doenças que mais matam no mundo (WHO, 2018). O câncer se origina de um crescimento descontrolado de células, estas células podem se desprender de seu local de origem, invadindo outros tecidos e ocasionando metástases (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018).

Mutações no DNA são capazes de ocasionar o surgimento do câncer. Essas mutações podem ocorrer pela atuação de agentes oxidativos, estes advindos do estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre a atividade de antioxidantes e a geração de espécies oxidativas (KLAUNIG; WANG, 2018; VASCONCELOS et al., 2007). Uma produção exacerbada de espécies oxidativas como EROs e ERNs pode resultar na oxidação de proteínas, carboidratos, lipídios e no DNA causando malefícios ao organismo humano (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006)

O estresse oxidativo está intimamente relacionado ao surgimento e desenvolvimento do câncer (KLAUNIG; WANG, 2018). Dentre os tipos de câncer, temos o melanoma que origina a partir dos melanócitos, células especializadas na pigmentação, estando em maior quantidade na pele e nos olhos (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Estima-se que entre 2018 e 2019 haverá cerca de 6.260 casos de homens e mulheres com câncer melanoma no Brasil, apesar da incidência ser relativamente baixa, este tipo de câncer possui uma alta letalidade (BRASIL, 2017).

Para o tratamento do melanoma temos radioterapia, ressecção cirúrgica, imunoterapia e a quimioterapia, consideradas as principais medidas terapêuticas (BRASIL, 2014). Contudo a quimioterapia, utilizada no tratamento de melanomas apresenta efeitos colaterais severos como a citotoxidade em células normais (BECKER; KÄMPGEN; BRÖCKER, 2000), e assim busca-se compostos que atuem de forma mais seletiva nas células cancerígenas, minimizando efeitos adversos.

Plantas medicinais são utilizadas há muito tempo para a prevenção e tratamento de doenças (FERRO, 2006). Há plantas que apresentam atividade anticâncer e alguns medicamentos utilizados para o tratamento de câncer são

originados de substâncias presentes nestas espécies (MANJU; JAT; ANJU, 2017).

Eugenia uniflora é conhecida popularmente como pitangueira (LIRA et al., 2007), pertence à família Myrtaceae composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies distribuídas entre arbustos e árvores (AURICCHIO; BACCHI, 2003). É nativa do Brasil podendo ser encontrada da Bahia até o Rio Grande do Sul (LORENZI, 2008) e em outras regiões do mundo (SILVA, 2006).

Popularmente, suas folhas são utilizadas na forma de chá por meio de infusão ou decocção (SCHAPOVAL et al., 1994), para o tratamento de diarreias (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), dor de barriga (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), cólicas (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), disenteria (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), febre (PINTO et. al, 2006), gota (BOSCOLO et. al., 2008), reumatismo (BOSCOLO et. al, 2008; FUCK et al., 2005), gripe (BOSCOLO et. al., 2008), tosse (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), e pressão alta (FUCK et al., 2005).

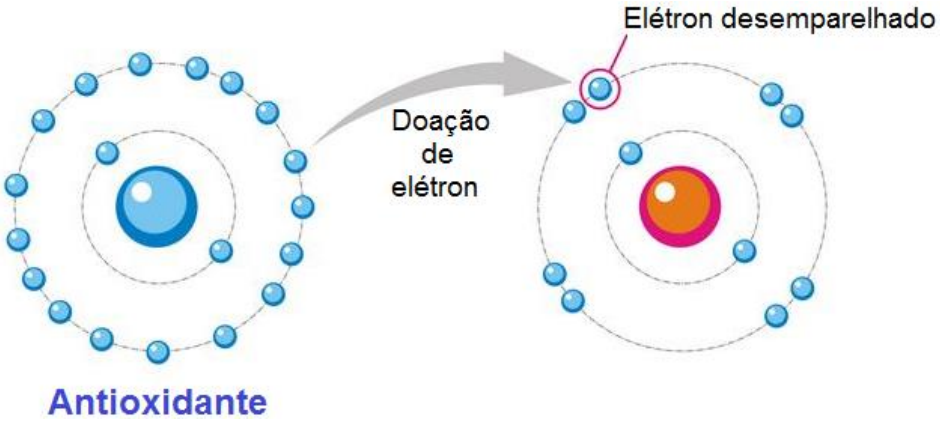
No entanto, para as cascas do caule existem poucos relatos das suas atividades biológicas, havendo a necessidade de estudar sua composição química e avaliar suas propriedades biológicas. Em virtude do amplo uso popular medicinal de *E. uniflora* para o tratamento de várias doenças e a busca de compostos bioativos mais seletivos e eficientes contra células tumorais, este estudo pretende contribuir para o entendimento do potencial terapêutico dos extratos da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estresse oxidativo

No organismo é comum a ocorrência de diversas reações metabólicas, entre elas processos de oxidação em estruturas e substâncias do corpo humano. Na oxidação, moléculas com elétrons desemparelhados de sua estrutura, sequestram elétrons de outras moléculas para se estabilizarem, contudo antioxidantes atuam neutralizando esses oxidantes ao doar elétrons (COTINGUIBA et al., 2015), como vemos ilustrado na figura 1.

Figura 1. Doação de elétron por antioxidante.



Fonte: Modificado de NWAKAUDU; NWAKAUDU; OWUAMANAM, 2015.

Esses processos oxidativos podem ser benéficos, como na sinalização celular do sistema imune contra infecções de organismos patogênicos, moléculas que atuam na produção de energia, na síntese de moléculas biológicas e na regulação do crescimento celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Porém os malefícios causados pelo estresse oxidativo, ocasionado pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, pode danificar macromoléculas essenciais a homeostase como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006),

A oxidação de lipídios pode afetar as membranas celulares, em um processo denominado de peroxidação lipídica, desencadeando uma cascata de reações oxidativas com a formação do radical peroxil, atacando a membrana, terminando com a decomposição de hidroperóxidos e formação de substâncias como o malondialdeído (MDA) que serve como marcador da peroxidação lipídica (RODRIGUES, 2007; VENKATACHALAM; NAYAK; JAYASHREE, 2012).

Entre os agentes oxidantes que atuam em sistemas biológicos, existem as espécies reativas, podendo ser radicalares (radicais livres) ou não radicalares (BIRBEN et al., 2012). Essas espécies reativas podem ser geradas tanto por meio de reações do metabolismo celular, quanto por substâncias externas. As substâncias externas incluem cigarros, poluentes no ar, xenobióticos e radiação. E no metabolismo celular, as principais fontes são: transporte de cadeia de elétrons nas mitocôndrias, na ativação de células inflamatórias e no peroxissomo (KLAUNIG; WANG, 2018; RAHMAN, 2005).

Os radicais livres (espécies reativas radicalares) são moléculas que por terem algum orbital eletrônico não pareado são altamente reativos e instáveis, e para se estabilizarem precisam receber ou doar elétrons de outra molécula, ou seja, cedem o elétron, oxidando-se, ou recebem, reduzindo-se, podendo assim causar alterações na estrutura das moléculas e consequente disfunções fisiológicas (COTINGUIBA et al., 2015; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Espécies reativas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não tem orbital desemparelhado, porém é quimicamente mais ativo que o oxigênio molecular (O_2) (LUSHCHAK, 2014).

As espécies reativas podem ser do metabolismo do oxigênio e assim denominadas EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), ou do nitrogênio e então chamadas de ERNs (Espécies Reativas de Nitrogênio), ou de outras substâncias como as ERSs (oriundas do enxofre), as ERCls (oriundas de cloro) e as ERCs (oriundas do carbono) (VASCONCELOS et al., 2007).

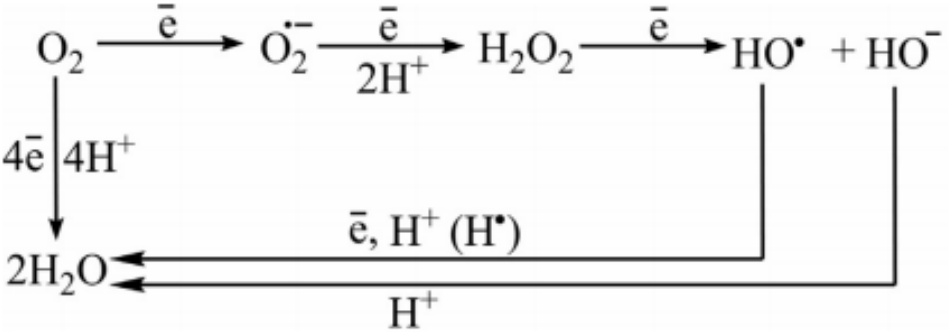
Há evidências que EROs e ERNs estão relacionadas a diversas doenças como a aterosclerose, hipertensão, doença de Alzheimer, artrite reumatoide, esclerose lateral amiotrófica, diabetes, câncer, entre outros. (COTINGUIBA et al., 2015; KUMAR et al., 2015)

2.1.1. Espécies Reativas de Oxigênio - EROs:

Em organismos que utilizam oxigênio no metabolismo, mais de 90% deste oxigênio é consumido na cadeia transportadora de elétrons e reduzido a água, com ou sem a liberação de espécies reativas (tabela 1). Entretanto os 10% restante sofre reduções por elétrons, transformando o oxigênio molecular (O_2) na espécie reativa superóxido ($O_2^{\bullet -}$), em que é estabilizado ao formar água pela

entrada de 4 elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LUSHCHAK, 2014), como vemos ilustrado na figura 2**.**

Figura 2. Redução do oxigênio molecular e formação das espécies reativas.



Fonte: Lushchak, 2014.

Tabela 1. Características das espécies reativas de oxigênio.

Espécie reativa de oxigênio	Características	Referências
Radical Superóxido - $O_2^{\bullet-}$	Gerado pela redução do oxigênio molecular (O_2), por elétrons desemparelhados, pela ação de enzimas como a xantina oxidase e NADPH oxidase ou pela ação de fatores externos como a ionização por radiação. O radical superóxido possui baixa solubilidade, não é altamente reativo.	(VASCONCELOS et al., 2007); (PISOSCHI; POP, 2015); (SILVA; GUERRA, 2010).
Peróxido de Hidrogênio - H_2O_2	Formado pela redução de 2 elétrons do oxigênio molecular, ou pela ação da enzima SOD no processo de dismutação do superóxido, Não é uma espécie reativa radicalar por não ter elétrons desemparelhados na última camada, porém quando reage com metais de transição como o ferro resulta na formação do radical Hidroxila. O peróxido de Hidrogênio apresenta alta permeabilidade nas membranas, contudo sozinho é fraco agente oxidante.	(VASCONCELOS et al., 2007); (FERREIRA; MATSUBARA, 1997); (LUSHCHAK, 2014).
Radical Hidroxila - $^{\bullet}OH$	Sua formação pode ocorrer pela reação de Fenton, com o peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) reagindo com o íon ferroso (Fe^{2+}) Reação de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH$	(BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006); (VASCONCELOS et al., 2007).

	O •OH é altamente reativo e deletério, pois reage oxidando aminoácidos, DNA (na ruptura da cadeia e alteração das bases nitrogenadas), RNA, lipídeos das membranas celulares causando modificações estruturais e funcionais.	
Radical Peroxila - ROO•	O radical peroxila forma-se na decomposição de peróxidos orgânicos, ou na oxidação pelo •OH nas membranas celulares. E atua principalmente na propagação da peroxidação lipídica	(BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006); (VASCONCELOS et al., 2007).

Adaptado de Vasconcelos et al., 2007.

2.1.2. Espécies Reativas de Nitrogênio - ERNs

As espécies reativas de nitrogênio são derivadas do radical óxido nítrico (DROGE, 2002). O aminoácido L- Arginina é convertido a óxido nítrico, em um processo catalisado pela família de enzimas óxido nítrico sintase (PIERINI; BRYAN, 2015) e pode ocorrer transformações do radical óxido nítrico em espécies reativas de nitrogênio, como vemos algumas delas descritas na tabela 2.

Tabela 2. Características das espécies reativas de nitrogênio.

Espécie reativa de Nitrogênio	Características	Referências
Óxido Nítrico - NO^+	Em sistemas biológicos a família de enzimas óxido nítrico sintase é responsável pela conversão do aminoácido L-arginina em óxido nítrico. Possui curta meia vida, pela sua acelerada oxidação a nitrito e nitrato. Também atua como vasodilatador e no relaxamento de células musculares. A partir do óxido nítrico, pode ocorrer sua transformação em outras espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito ($ONOO^-$).	(DROGE, 2002); (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009); (VASCONCELOS et al., 2007); (PIERINI; BRYAN, 2015).

Peroxinitrito ONOO$^-$	Formado pela interação do óxido nítrico e o radical superóxido. É uma espécie reativa instável, e forte oxidante. Causa danos a estruturas biológicas e pode estimular a formação de $^{\bullet}OH$. Quando protonado, se reestrutura em nitrato NO^{3-}. E quando o peroxinitrito reage com o CO_2, forma o peroxicarboxilato nitroso.	(MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009); (VASCONCELOS et al., 2007).

Adaptado de Vasconcelos et al., 2007.

2.2. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que previnem, inibem ou neutralizam a ação de oxidantes e podem ser encontrados em organismos ou oriundos de alimentos (COTINGUIBA et al., 2015).

Os antioxidantes podem ser substâncias enzimáticas e/ou não enzimáticas. As enzimas podem ser representadas pela superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e os agentes não enzimáticos representados pelo o ácido úrico, a transferrina (atua no transporte do ferro), ceruloplasmina (proteína que transporta o cobre), vitamina E (α-tocoferol) (VASCONCELOS et al., 2007; BIRBEN et al., 2012). Além do ácido ascórbico (vitamina C) encontrado em frutas cítricas, vegetais frescos, sucos de frutas e entre outros, e o β-caroteno que é um pigmento vegetal que tem a capacidade de ser convertido em vitamina A (retinol) no fígado e é encontrado em vegetais, leite integral, queijo e entre outros (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007).

2.2.1. Enzimas Antioxidantes

Superóxido dismutase (SOD): É uma metaloenzima que atua sobre o radical superóxido no qual cataliza a reação de dismutação (reduzido e oxidado ao mesmo tempo) do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (M^{n+}-SOD + $O_2^{\bullet-}$ + $2H^+$ / $M^{(n+1)}$ + -SOD + H_2O_2) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). A superóxido dismutase necessita de um cofator, desse modo assumindo diferentes formas no organismo, quando o cofator é o cobre (Cu) e zinco (Zn), ela atua na forma de Cu/ZnSOD no citoplasma, e com o manganês (Mn) ela atua nas mitocôndrias com a forma de MnSOD, a outra forma age como ECSOD (Extracelular Superóxido Dismutase) que também possui cobre e zinco em sua estrutura, porém age no meio extracelular (DA SILVA; GONÇALVES, 2010; BIRBEN et al., 2012)

Catalase (CAT): A catalase é encontrada nos peroxissomos e tecidos que utilizam oxigênio e como a SOD também possui cofatores (Ferro e Manganês), e a sua função é catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 (AGUILAR; NAVARRO; PÉREZ, 2016; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

2.2.2. Antioxidantes não enzimáticos

Vitamina C (ácido ascórbico): O ácido ascórbico tem como precursor a glicose, sendo gerado naturalmente em plantas e em muitos animais, contudo não é sintetizado pelo ser humano (VASCONCELOS et al., 2007). Atuando como antioxidante nos organismos biológicos na forma de ascorbato, eliminando espécies reativas como o radical hidroxila (•OH), o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e age em sinergismo com o α-tocoferol (vitamina E) nas membranas celulares, impedindo a peroxidação lipídica (PISOSCHI; POP, 2015; VASCONCELOS et al., 2007). Porém pode se tornar um pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta a metais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

Vitamina E (α-tocoferol): é uma substância presente no interior das membranas celulares com ação antioxidante, no qual age interceptando o radical peroxila ($ROO^{\bullet}$), e assim bloqueando a propagação da peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007). Ele impede a propagação da peroxidação doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, tornando-se uma espécie reativa radicalar menos reativa que a peroxila, chamando-se tocoferila, que é transformada por ação do ácido ascórbico em tocoferol novamente (BIRBEN et al., 2012; DA SILVA; GONÇALVES, 2010).

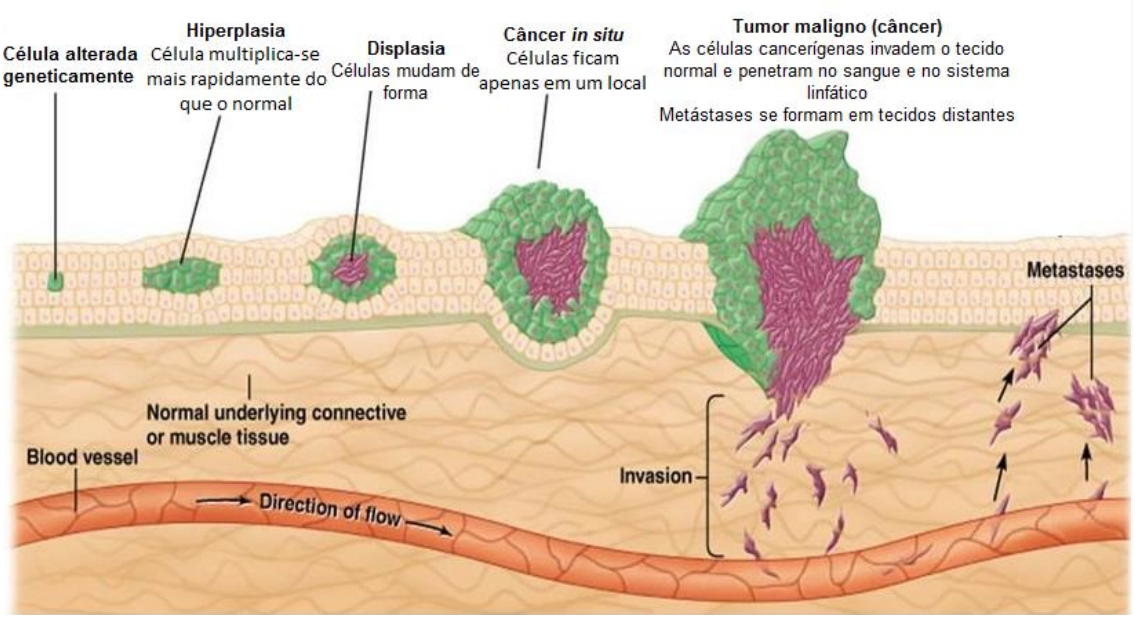
2.3. Câncer

De acordo com o INCA (Instituto Nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva), o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que ocorre um crescimento desequilibrado de células que podem desprender e invadir outros órgãos e tecidos. Sendo esta doença responsável por mais de 9,6 milhões de mortes no mundo em 2018 (WHO, 2018).

Conforme ilustrado na figura 3, no desenvolvimento de um tumor, inicia-se com uma célula alterada geneticamente, que cresce e multiplica-se de forma

rápida e descontrolada, fase chamada de hiperplasia, alterando sua estrutura e forma e se distinguindo do tecido original (Displasia). Essas células permanecem no mesmo local de origem (Câncer *in situ*) ou podem invadir tecidos distantes por meio do sistema linfático ou circulação sanguínea e instalando-se nesses tecidos, ocorrendo desse modo as metástases (KANWAL, 2013).

Figura 3. Estágios de desenvolvimento do tumor.



Fonte: Modificado de Kanwal, S. 2013. (Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells).

O câncer origina por mutações acumuladas na célula, ocorrendo alterações nas sequências de bases nitrogenadas do DNA (BIRBEN et al., 2012). Estas mutações modificam basicamente duas classes de genes, os proto-oncogenes e os supressores tumorais. Os proto-oncogenes estimulam o crescimento celular, mutações os convertem em oncogenes, que ativam demasiadamente o crescimento da célula, e os genes supressores tumorais limitam o crescimento das células e impedem que se transformem em células malignas (KARP; WAKO, 2005). Entre os fatores que são capazes de induzir mutações e a formação de uma célula cancerígena estão as substâncias químicas, espécies reativas, participação de vírus e agentes físicos como a radiação UV (DÜSMAN et al., 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

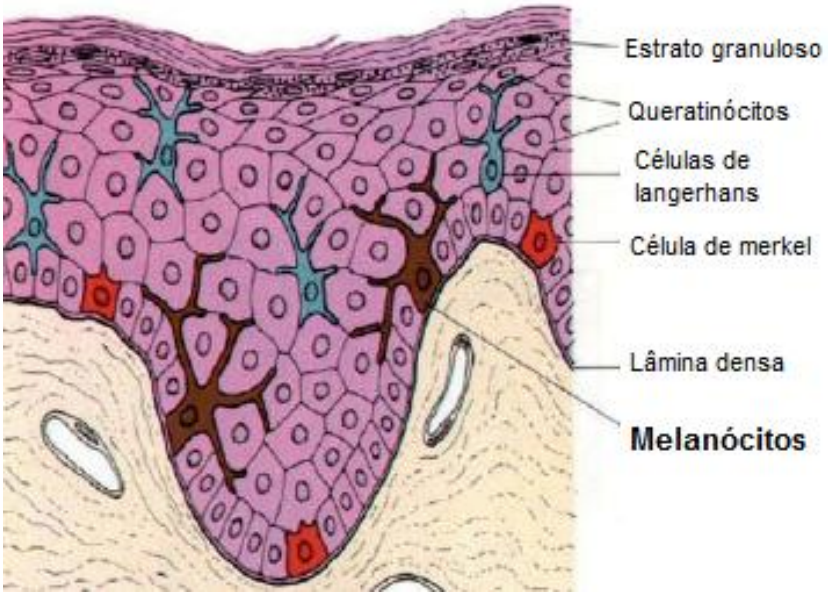
Os cânceres são categorizados quanto ao tipo celular e tecido do qual se originaram. São chamados de sarcomas quando oriundos de células

musculares, e denominadas carcinomas quando derivada de células epiteliais de revestimento, leucemias quando oriundas do tecido hematopoiético, e melanoma são derivadas das células especializadas na pigmentação da pele. (ALBERTS et al., 2010).

2.3.1. Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele, que advém dos melanócitos (figura 4), os quais são células especializadas na pigmentação produzindo melanina (pigmentos encarregados da coloração), estas células estão predominantemente presentes na pele e nos olhos (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Figura 4. Disposição dos melanócitos na epiderme.



Fonte: Modificado de Miot et al., 2009 (Physiopathology of melasma).

No Brasil estima-se que em 2018-2019, em homens 2.920 e em mulheres 3.340 estarão com câncer de pele melanoma, e apesar da incidência ser baixa, a letalidade é alta, quando comparada, por exemplo, ao câncer de pele não melanoma que se estima 85.170 novos casos entre homens e 80.410 entre mulheres (INCA, 2018). Como demonstra os dados de mortalidade por câncer de pele no Brasil em 2015 divulgados pelo ministério da saúde, o câncer de pele melanoma apresentou 1.012 óbitos em homens e 782 em mulheres, e o câncer de pele não melanoma apesar da alta incidência de casos, ocorreu 1.137 óbitos em homens e 821 nas mulheres em 2015 (BRASIL, 2017).

Existem 4 subtipos de melanoma, o melanoma extensivo superficial (MES) que é o mais comum, ocorre no tronco e membros inferiores, apresenta várias colorações, e após meses e anos pode surgir nódulos elevados e sangramento. Melanoma nodular (MN) é o segundo mais frequente acontece mais comumente em homens, apresenta nódulos elevados de cor negra, azul ou castanha e ocorre sangramento e ulcerações. Melanoma lentiginoso acral (MLA) ocorre com maior frequência em não brancos do que em brancos, surge em regiões como as solas dos pés, palmas da mão e extremidades digitais. Melanoma lentigo maligno (MLM) é mais frequente em idosos, e surge em áreas de exposição crônica ao sol, apresenta-se de forma nítida em forma de manchas na face, mão e membros inferiores, tendo as colorações castanha ou negra. (FERNANDES et al., 2005)

O principal fator para incidência de melanoma e cânceres de pele não melanoma (carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular) é a exposição demasiada a radiação solar ultravioleta. Entre os outros fatores estão o histórico familiar, ou seja, a herança genética, o sistema imune debilitado, a cor dos olhos, cabelos e pele, entre outros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016b; IARC, 1986; INCA, 2016).

Dentre as mutações gênicas frequentes do melanoma, a mutação no gene B-RAF é a mais encontrada nos pacientes, entre 50 a 70% dos melanomas, sendo mais comum a substituição de valina por ácido glutámico no codón 600 (V600E) (DAVIES et al. 2002). Outra mutação comum é no gene N-RAS, com a substituição de glutamina por leucina na posição 61 (Q61L) ou glutamina por arginina (Q61R) (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; LEE; CHOI; KIM, 2011).

Em seu estágio inicial, é possível curar o melanoma por meio de ressecção cirúrgica, porém quando em estágio metastático é de difícil tratamento não reagindo bem às terapias convencionais (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). De acordo com o Ministério da Saúde, divulgado nos protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia em 2014, a radioterapia não é uma terapia muito efetiva no tratamento desse tipo de câncer, sendo aconselhado sua utilização após a ressecção cirúrgica, caso esta não for eficiente (BRASIL, 2014).

A imunoterapia também é utilizada no tratamento de melanoma, que se baseia na aplicação de agentes farmacológicos que induzem ou substituem diretamente a imunidade do hospedeiro para combater as células cancerígenas (KAUFMAN et. al, 2013). Entre os imunoterápicos destaca-se o Ipilimumab, um anticorpo IgG1 que bloqueia o CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4) que é uma molécula que regula negativamente a ativação dos linfócitos T (HODI et. al, 2010). Outro imunoterápico utilizado é a Interleucina 2 (IL-2), uma citocina que estimula a proliferação de linfócitos T e células NK (JIANG; ZHOU; REN, 2016).

Outros método terapêutico aplicado é a quimioterapia, utilizada principalmente para o tratamento de melanomas em estágio metástase quando a neoplasia espalhou-se pelo corpo (BRASIL, 2014). Utilizando medicamentos para combater as células tumorais. Entre os quimioterápicos utilizados para tratar o melanoma estão o dacarbazina, temozolomida e o nitrosureias (BRASIL, 2014). Porém os quimioterápicos podem atuar matando células normais provocando efeitos adversos no paciente e restringindo a progressão da terapia (BECKER; KÄMPGEN; BRÖCKER, 2000).

A dacarbazina é o quimioterápico mais usado no tratamento de melanoma metastático (BRASIL, 2014), e como outros medicamentos, possui efeitos colaterais como náusea, vomito e diminuição de células sanguíneas como leucófilos e plaquetas (BECKER; KÄMPGEN; BRÖCKER, 2000). Assim há uma constante busca por substâncias que podem atuar seletivamente contra tumorais, com menor ocorrência de efeitos adversos sobre células saudáveis.

2.4. Plantas Medicinais

Plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos. Os estudos com essas plantas têm por finalidade a busca de novos compostos isolados para indústria farmacêutica ou de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2006).

São utilizadas há a muito tempo, pela observação de animais que procuravam plantas para curar suas enfermidades. A observação da natureza fez com que estudassem as espécies vegetais e suas propriedades como, por exemplo, Teofrasto (370 -286 a.C) que era um filósofo e cientista e investigou particularidades e atributos medicinais de algumas ervas como a Beladona e

mentrasto. No Brasil os indígenas utilizavam plantas para rituais de cura, e vem sendo utilizadas para tratamento de doenças e enfermidades até hoje (FERRO, 2006).

As plantas sintetizam substâncias químicas os chamados metabólitos secundários, seja para defesa contra predadores e microrganismos, para atração de insetos, para proteção dos efeitos deletérios da irradiação UV solar ou formação de espécies reativas nos tecidos pela utilização de oxigênio, entre outros. Dentre as características dos metabólitos secundários, eles são normalmente produzidos em pequena quantidade, são principalmente influenciados pelo ambiente, e cada espécie é diferente quimicamente (CALIXTO; YUNES, 2001; FERRO, 2006).

Entre as principais classes químicas dos metabólitos secundários temos os compostos fenólicos, que possuem diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante, antibacteriano, antiviral, e entre outras. Sendo que os compostos fenólicos podem ser simples ou complexos, e dentro das suas classes estão os flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, cumarinas, lignanas, ser derivado do ácido benzóico como, por exemplo, o ácido gálico, ou derivados do ácido cinâmico (FERRO, 2006; SOUSA et al., 2007).

Os flavonoides são um grupo de polifenóis que tem por característica possuir uma estrutura composta por dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico oxigenado dispondo de subgrupos composto por flavonas, antocianidinas, flavonóis, flavononas, isoflavonas, chalconas e demais. Os flavonoides são antioxidantes, anti-inflamatórios e apresentam atividade vasodilatadora (CALIXTO; YUNES, 2001).

Taninos são polifenóis ligados a outros componentes aromáticos, tem como propriedade a adstringência, podendo ser classificados em taninos hidrossolúveis e taninos condensados. As cumarinas são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico, e além de ser encontradas em vegetais, são encontradas em fungos e bactérias. Outra classe de compostos químicos são os alcalóides, que possuem nitrogênio amínico que concede a propriedade alcalina, e esses compostos atuam no sistema nervoso central humano como sedativos, calmantes, estimulantes analgésicos e anestésicos (FERRO, 2006).

2.5. Eugenia uniflora

A *Eugenia uniflora* é conhecida popularmente como pitangueira. A origem do nome pitanga vem do tupi “pi'tãg”, que significa vermelho, devido a cor do seu fruto (LIRA et al., 2007). Essa planta pertence à família Myrtaceae composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies distribuídas entre arbustos e árvores (AURICCHIO; BACCHI, 2003). A floração ocorre entre agosto e setembro e a maturação dos frutos ocorre em novembro (DANNER et al., 2010).

Esta espécie pode ter de 4 a 10 metros de altura e possui tronco liso de cor pardo clara, conforme mostrado na fotografia 1. As folhas (Fotografia 2A) são simples, verde-escuras, opostas de 3 a 7 cm de comprimento e ovais. As flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas e nas extremidades dos ramos. Os frutos (Fotografia 2C) é uma drupa de 1,5 a 3 cm de diâmetro, globosos, de cor vermelha ou amarela, com polpa carnosa e agridoce (FIUZA et al., 2008; LORENZI, 2008; SILVA, 2006).

Fotografia 1. Aspecto geral da *E. uniflora.*

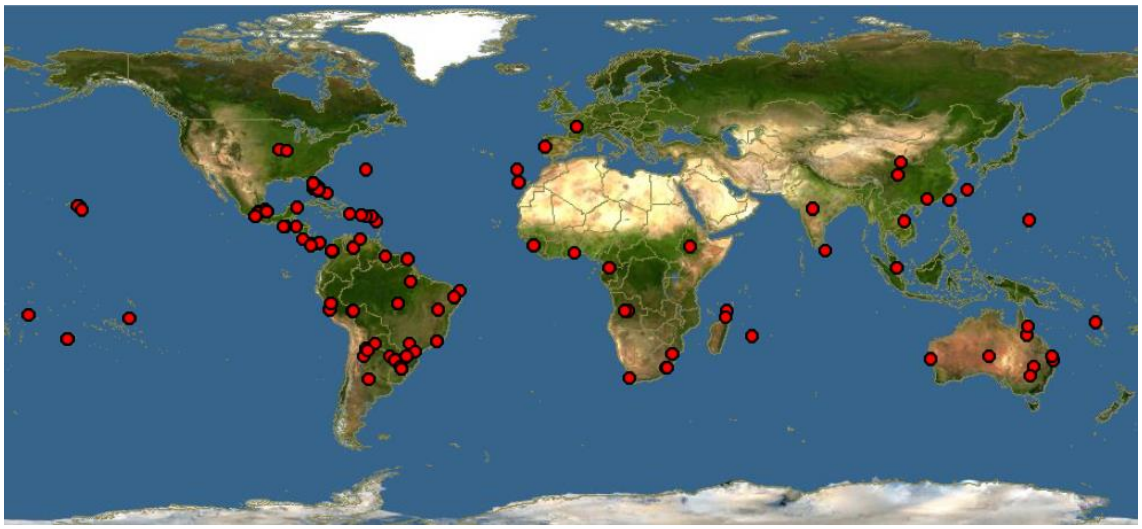
Fonte: O Autor (2018).

Fotografia 2. Folhas (A), Cascas do caule (B) e Fruto (C) da *Eugenia uniflora*.

Fonte: O Autor (2018).

A pitangueira é nativa do Brasil podendo ser encontrada da Bahia até o Rio Grande do Sul (Mapa 1), é uma planta semidecídua, heliófita (necessita exposição solar), seletiva higrófita (prefere ambientes bastante úmidos), estando em maior frequência nos planaltos do sul e nos solos aluviais da faixa litorânea do país (LORENZI, 2008). E devido à facilidade de cultivo e adaptabilidade a diferentes solos e climas, *Eugenia uniflora* pode ser encontrada em várias regiões do mundo (Mapa 1) (SILVA, 2006).

Mapa 1. Distribuição geográfica da espécie *Eugenia uniflora*, representados pelos pontos vermelhos, no planeta Terra.



Fonte: www.discoverlife.org.

Popularmente as folhas são utilizadas na forma de chás por infusão ou decocção (SCHAPOVAL et al., 1994). Os frutos são utilizados pela indústria alimentícia para a produção de refrescos em pó, sucos, licores, polpa congelada e sorvete (BORGES, 2015).

O uso da *E. uniflora* na medicina popular ocorreu empiricamente pelos índios guaranis no século XV(ALONSO, 1998; FIUZA et al., 2008) e desde então, seu uso se estendeu a toda comunidade não indígena, para o tratamento de diarréias (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), dor de barriga (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), cólicas (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), disenteria (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), febre (PINTO et. al, 2006), gota (BOSCOLO et. al., 2008), reumatismo (BOSCOLO et. al, 2008; FUCK et al., 2005), gripe (BOSCOLO et. al., 2008), tosse (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2015), e hipertensão (FUCK et al., 2005).

Estudos científicos dos extratos aquosos das folhas de *E. uniflora*, demonstram atividades antidiarreica (ALMEIDA et al., 1995), antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética em camundongos (SCHUMACHER et al., 2015), anti-hipertensivo, diurético (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999). O extrato metanólico das folhas de *E. uniflora* apresentou atividade antioxidante *in vitro* (GUPTA et al., 2009) e atividade leishmanicida *in vitro* em *Leishmania amazonenses* (BRAGA et al., 2007).

Extrato etanólico das folhas apresentou atividade antioxidante (DA CUNHA et al., 2016), atividade leishmanicida *in vitro* em *Leishmania braziliensis* (SANTOS et al., 2013), antitrypanosoma (SANTOS et al., 2012), antifúngica em *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* (SOUZA et al., 2002) e efeito anti-inflamatório em camundongos (SCHAPOVAL et al, 1994).

Outros estudos demonstram que o extrato hidroetanólico das folhas apresentam efeito inibidor da enzima xantina oxidase, sugerindo efeito antigota (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987), atividade antimicrobiana contra algumas variedades de *Salmonella* (VOSS-RECH et al., 2011), em *Staphylococcus aureus, Candida krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (HOLETZ et al., 2002), atividade antioxidante *in vitro pela* inibição da peroxidação lipídica em homogenato de cérebro de ratos (AURICCHIO et al., 2007), atividade leishmanicida *in vitro* em *L. amazonensis* (LUIZE et al., 2005), e antitrypanosoma (PIZZOLATTI et al., 2003).

Além dessas atividades, foi relatado que o óleo essencial das folhas apresentou efeito antinociceptivo e hipotérmico em ratos albinos suíços (AMORIM et al.; 2009), efeito antimicrobiano na *Candida dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis, C. Krusei*, *Cryptococcus grubii*, *C. gattii, Saccharomyces cerevisiae, Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus equi* (LAGO et al., 2011). Apresentou atividade antioxidante *in vitro* (VICTORIA et al., 2012), além de proteger contra a peroxidação lipídica em estruturas como o córtex, cerebelo e o hipocampo de camundongos (VICTORIA et al., 2013), atividade leishmanicida *in vitro* em *L. amazonensis* (RODRIGUES et al., 2013), e efeito hepatoprotetor (VICTORIA; ANVERSA et al., 2013).

Existem poucos estudos na literatura sobre a casca do caule de *E. uniflora.* Até o presente, os trabalhos encontrados relatam a anatomia da casca (SOFFIATTI; ANGYALOSSY-ALFONSO, 1999), a atividade citotóxica em células tumorais: HCT-8 (human colon carcinoma), SF-295 (glioblastoma) e MDA-MB-435 (melanoma) (MAHMOUD et al., 2011) e atividade antiparasitária *in vitro* em *Trypanosoma brucei, Leishmania donovani* e *Trichomonas vaginalis* do extrato aquoso (DESRIVOT et al., 2007).

Estudos fitoquímicos revelaram que em extratos das folhas de *E. uniflora* apresentam flavonoides, taninos, triterpenos, antraquinonas, alcaloides, esteroides e heterosídeos saponínicos (LIMA; SILVA, 2016; FIUZA et al, 2008).

Nas folhas foram identificados flavonoides, como quercetina e miricetina (RATTMANN et al., 2012), e taninos, como eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2 que são taninos macrocíclicos hidrolisáveis (Lee et al., 1997). Nos óleos essenciais das folhas, já foram detectados diversos constituintes, destacando curzereno, a selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (OGUNWANDE et al., 2005), atractilona (LAGO et al., 2011), β-cariofileno (SILVA et al., 2012) e germacreno-B (VICTORIA; ANVERSA et al., 2013) e nas frutas foi encontrado taninos, alcalóides, cumarinas, e triterpenos (LIMA; SILVA, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antioxidante e citotóxica das folhas e cascas do caule dos extratos hidroetanólicos de *Eugenia uniflora.*

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais.
- Avaliar a atividade antioxidante pelos métodos de inibição dos radicais livres ABTS E DPPH.
- Avaliar a atividade citotóxica do extratos das folhas e das cascas em linhagens tumorais e células não tumorais através do método de MTT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do material vegetal e preparação do extrato

O material vegetal (folhas e cascas do caule) de *Eugenia uniflora* foi coletado no centro urbano da cidade de Dourados, MS, Brasil (22°13'13.5"S e 54°49'04.4"W). A identificação da espécie foi realizada pela Prof.ª Dr.ª Zefa Valdivina Pereira da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA, UFGD), e uma exsicata foi depositada no Herbário DDMS da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD com a numeração 5730.

As Folhas e as cascas foram lavadas, sanitizadas e secas em estufa de circulação de ar a 40°C até obter peso constante. Em seguida, o material vegetal foi triturado em moinho de facas para a obtenção do pó, o qual foi submetido a um extrator de fluido pressurizado (Dionex®, modelo ASE 150) com uma célula de extração de 5 mL, onde, o material foi extraído com etanol 80%, sob os seguintes parâmetros: temperatura de 125 °C, durante 5 minutos, seguido da lavagem da célula com 100% do volume de sua capacidade e limpeza de 60 segundos.

Posteriormente, o extrato foi concentrado em um rotaevaporador para retirada do solvente, e então liofilizado para obtenção do extrato bruto. Os rendimentos foram obtidos através da seguinte fórmula:

Rendimento da extração (%) = (M_{ES} / M_{MF}) x 100; onde: M_{ES} = massa do extrato seco (g) e M_{MF} = massa do material fresco (g).

4.2. Determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais

Conforme o método colorimétrico Folin-Ciocalteau descrito por Meda et al. (2005), com modificações, foi determinado a concentração de compostos fenólicos dos extratos das cascas e das folhas. Foi utilizado 0,5 mL dos extratos na concentração de 100 µg/mL em etanol 80% e misturados com 2,5 mL do reagente Folin–Ciocalteau, diluído na proporção 1:10, v/v em água destilada. Logo após ser homogeneizado, a solução ficou em repouso por 5 minutos, para então ser adicionados 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 14 % em água destilada. Homogeneizou-se novamente, e a mistura ficou incubada durante 2 h protegida da luz e em temperatura ambiente. Logo após, a absorbância foi lida

a 760 nm em espectrofotômetro e usado o etanol 80% como branco. E com intuito de preparar uma curva de calibração, o padrão utilizado foi o ácido gálico nas concentrações de 4 a 200 µg/ml. Foram realizados em duplicata e a média das leituras foi utilizada para determinar a concentração de compostos fenólicos, que foi expressa em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/ g de *E. uniflora*.

De acordo o método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito por Libério et al. (2011) determinou-se a concentração de flavonoides totais dos extratos. Utilizou-se 0,5 mL dos extratos na concentração de 100 µg/mL em metanol e misturado com 4,5 mL de cloreto de alumínio hexahidratado ($AlCl_3.6H_2O$) a 2%. Homogeneizou-se e a mistura ficou incubada durante 30 min protegida da luz e em temperatura ambiente. Logo após, a absorbância foi lida a 415 nm em espectrofotômetro e o metanol foi utilizado como branco. Com intuito de preparar uma curva de calibração, o padrão utilizado foi a quercetina nas concentrações de 4 á 200 µg/ml. Foram realizados em duplicata e a média das leituras foi utilizada para determinar a concentração de flavonoides totais, sendo expressa em mg equivalente de quercetina (EQ)/ g de *E. uniflora*.

4.3. Avaliação da atividade antioxidante

4.3.1. Ensaio de inibição do radical livre $ABTS^{\cdot+}$

Conforme o método descrito por Re et al. (1999), com modificações, foi efetuado o ensaio de inibição do 2,2´- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). A solução do radical $ABTS^{\cdot+}$ foi preparada, misturando 5 mL de ABTS (7 mM) e 88 µL de persulfato de potássio (140 mM) e incubada de 12-16 horas protegida da luz e em temperatura ambiente. Logo após, essa solução foi diluída em etanol PA até obter a absorbância de 0,70 nm ± 0,05 unidades a 734 nm em espectrofotômetro. Seguidamente, 20 µL do extrato nas concentrações de 0,1 até 125 µg/mL foram adicionados com 1980 µL da solução do radical $ABTS^{\cdot+}$ e então homogeneizada e incubada durante 6 min à temperatura ambiente e protegida da luz. A absorbância foi lida a 734 nm em espectrofotômetro e o etanol PA. utilizado como branco. O ácido ascórbico e o BHT foram utilizados como antioxidantes de referência. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. A porcentagem de inibição do ABTS

foi determinada de acordo com a seguinte equação, onde a $Abs_{controle}$ é a absorbância do radical $ABTS^{\bullet+}$ sem amostra testada.

$$Inibição\ do\ radical\ ABTS^{\bullet+}\ (\%) = (1\text{-}Abs_{amostra}\ /Abs_{controle}) \times 100$$

4.3.2. Ensaio de inibição do radical livre DPPH

De acordo com o método descrito por Gupta & Gupta (2011) com pequenas modificações, foi efetuado o ensaio de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Em vista disso, adicionou-se 200 µL do extrato nas concentrações de 0,1 até 125 µg/mL com 1,8 mL da solução de DPPH (0,11 mM) e diluído em etanol 80 %. Homogeneizou-se essa solução e incubou por 30 min a temperatura ambiente e protegida da luz. Logo após, a absorbância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro e o etanol 80% utilizado como branco. O ácido ascórbico e o BHT foram utilizados como antioxidantes de referência. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. A porcentagem de inibição do DPPH foi determinada de acordo com a seguinte equação, onde a $Abs_{controle}$ é a absorbância do radical DPPH (0,11 mM) e sem a amostra testada.

$$Inibição\ do\ radical\ DPPH\ (\%) = (1\text{-}Abs_{amostra}\ /Abs_{controle}) \times 100$$

4.4. Cultivo celular

Neste estudo, as linhagens celulares de melanoma humano maligno, SK-MEL 28 e 103 foram cultivadas em meio DMEM alta glicose suplementado com 24 nM de bicarbonato de sódio, HEPES, 10 % de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de *estreptomicina*.

Células monucleares de sangue periférico humano, foram coletadas após aprovação do conselho de ética, sob o parecer n°: 3.061.854. Coletou 8 mL de sangue em tubo cônico de 15 mL contendo citrato de sódio, então adicionou 2,5 mL de contendo solução fisiológica 0,9% e diluiu com Ficoll-paque na proporção 3:1 (Sangue/ Ficoll-paque), centrifugou a 2000 rpm por 2 minutos e em seguida aspirou a camada de leucócitos e transferiu para um tubo contendo solução fisiológica 0,9%. Foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o conteúdo foi descartado e a camada de leucócitos ressuspendidos em meio RPMI. Estas células foram cultivadas em meio RPMI contendo 20% de soro fetal bovino

(SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de *e*streptomicina. As linhagens celulares foram mantidas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37 ºC.

4.5. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada pelo ensaio colorimétrico utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Células não tumorais e tumorais foram plaqueadas em microplacas placas de 96 poços de acordo com sua respectiva densidade e em seguida tratadas com diferentes concentrações do extrato (25 a 400 µg/mL) e incubadas durante 24 e 48 horas em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37 ºC. Após cada período de tratamento, o meio foi removido e em seguida adicionado 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço, seguido de incubação por 4 h a 37 ºC. Após este período, o sobrenadante foi removido e em seguida adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi determinada a 630 nm em leitor de microplacas. A inibição da viabilidade foi calculada com a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (Abs_{\text{células tratadas}}/Abs_{\text{controle}}) \times 100$$

4.6. Análises estatísticas

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) e foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste Newman-Keuls para os ensaios de inibição dos radicais ABTS e DPPH, e utilizou o pós teste Dunnett no ensaio de viabilidade celular comparando o tratamento com o controle. Os resultados foram considerados significantes quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas medicinais são usadas na medicina popular, despertando interesse pelas suas propriedades terapêuticas. As substâncias presentes nas espécies vegetais são oriundas dos metabólitos secundários, os quais são produzidos pelas plantas para proteção, reprodução e atração de insetos polinizadores (FERRO, 2006).

Dentre os metabólitos secundários, destacam-se os compostos fenólicos, estando presente em sua estrutura química um anel aromático ligado a hidroxilas. Dependendo da localização e quantidade de hidroxilas, pode atuar doando elétrons e estabilizando espécies reativas (PODSĘDEK, 2007; SUCUPIRA et al., 2015).

Dos compostos fenólicos derivam-se outras classes de compostos, como os flavonoides que são responsáveis por diversas atividades biológicas, sendo notáveis antioxidantes (CALIXTO; YUNES, 2001). Podendo agir diretamente na captura do radical livre (espécie reativa radicalar), no qual o flavonoide reage com a espécie reativa estabilizando-a pela presença da hidroxila, e gerando nesse flavonoide um radical menos reativo e mais estável (KORKINA; AFANAS', 1996; NIJVELDT, et al., 2001).

O rendimento do EFEU foi de 23,4% e o rendimento do ECEU foi de 15,08%. Na tabela 3, é demonstrado o teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides presente nos extratos de *E. uniflora*. Os resultados experimentais mostram que o ECEU apresenta uma alta quantidade de compostos fenólicos totais (191,13 ± 2,99 mg EAG/ g), apesar de que possua uma baixa quantidade de flavonoides (4,74 ± 0,67 mg EQ/ g). Isto indica que outras classes de substâncias derivadas dos compostos fenólicos estejam presentes também nas cascas. Embora na literatura não tenha estudos relatando compostos bioativos na casca de *E. uniflora*, Burkill (1997) relatou a presença de taninos nas cascas do caule de *Psidium guajava*, pertencente a Myrtaceae, a mesma família de *E. uniflora*.

Tabela 3. Concentração de compostos fenólicos e flavonoides identificados nos extratos da Casca do Caule e Folhas *da Eugenia uniflora*.

Amostra	Fenóis totais (mg EAG)	Flavonoides (mg EQ)
EFEU	97,84 ± 0,90	36,46 ± 0,89
ECEU	191,13 ± 2,99	4,74 ± 0,67

Os valores foram expressos como média ± SEM. EFEU: Extrato Hidroetanólico das Folhas de *E. uniflora.* ECEU: Extrato Hidroetanólico das Cascas do caule de *E. uniflora.* EAG: equivalente ao ácido gálico. EQ: equivalente a quercetina;

O EFEU apresentou menor quantidade de compostos fenólicos que o extrato das cascas, e apresentando elevada quantidade de flavonoides (36,46 ± 0,89 mg EQ/ g), quando comparada com o ECEU (4,74 ± 0,67 mg EQ/ g). Floegel et al. (2011) verificou maior correlação da capacidade antioxidante de frutas e vegetais com os compostos fenólicos totais em comparação com flavonoides, sugerindo que os compostos fenólicos são um dos principais contribuintes para a capacidade antioxidante nestes alimentos, devido não apenas aos flavonoides, mas também aos fenólicos não flavonoides.

O alto teor de compostos fenólicos relatado nos EFEU e ECEU possivelmente está relacionado ao solvente utilizado na extração. Pois os extratos avaliados neste trabalho foram preparados e extraídos com os solventes água e etanol, o qual aumenta a margem de extração por polaridade, extraindo com eficiência compostos fenólicos. Contudo alguns compostos fenólicos com alto peso molecular são altamente insolúveis em água e solventes com uma menor polaridade extraem compostos com maior peso molecular (ANDREO; JORGE, 2006). Como demonstrado por Martinez-Correa et al. (2011), o extrato etanólico de *Eugenia uniflora* comparado com o extrato aquoso apresentou maior atividade antioxidante. Desse modo a mistura desses dois solventes com diferentes polaridades deve extrair diversos compostos.

Na determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais, compostos isolados e demais substâncias, alguns métodos se baseiam na captura de radicais livres, entre eles está o método de ABTS e o de DPPH. No ensaio de ABTS, o ABTS (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) reage com o persulfato de potássio, e ausência de luz, ocorre uma oxidação química desse sal em um tempo estimado de 12 a 16 horas. Então

com a formação do radical $ABTS^{\cdot+}$ é possível realizar o ensaio, adicionando o extrato vegetal, ou substância antioxidante que gerará a redução do radical. Esse ensaio permite analisar tanto amostras lipossolúveis como hidrossolúveis (SUCUPIRA et al., 2015).

Outro método muito utilizado para avaliar a atividade antioxidante é o ensaio de sequestro do radical DPPH, que se baseia na capacidade de uma substância, seja um composto isolado ou não, em capturar o radical livre DPPH. Neste ensaio o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), que possui uma cor violeta e sua absorção é medida entre 517 e 520 nm, a redução do DPPH é observada pela diminuição da absorbância. A solução de DPPH é reduzida pela amostra analisada, ou seja, essa amostra estará doando átomos de hidrogênios e elétrons, ocorrendo redução a hidrazina, mudando a coloração da solução de violeta para amarela (COTINGUIBA et al., 2015; SUCUPIRA et al., 2015).

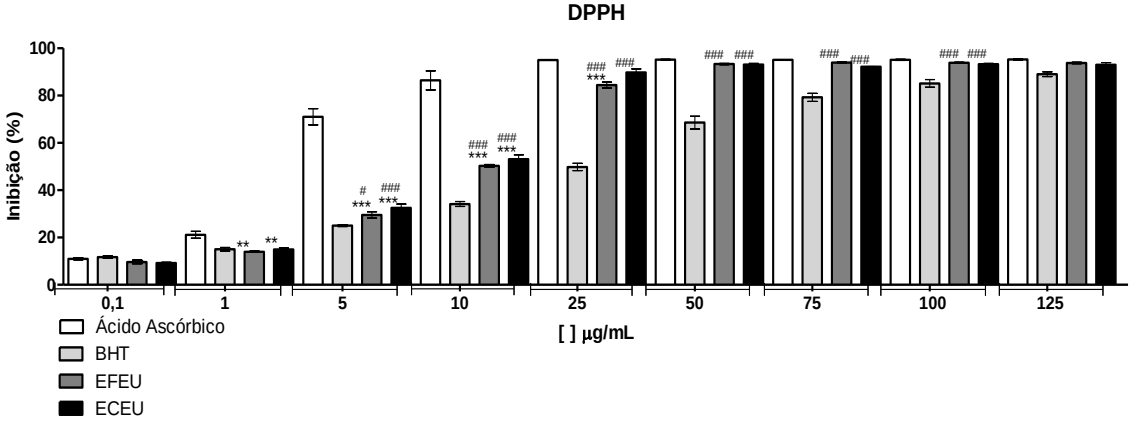
A atividade antioxidante foi mensurada pelo método de captura do radical livre DPPH e do ABTS e os resultados foram expressos em IC_{50} para os ECEU e EFEU conforme mostrado na tabela 4. Os ECEU e EFEU e os antioxidantes padrão ácido ascórbico e BHT inibiram os radicais DPPH e ABTS de forma concentração dependente (Gráfico 1 e Gráfico 2). Em que o EFEU e ECEU foram melhores na inibição dos radicais que o antioxidante BHT quando observado o ensaio de DPPH (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade máxima e IC_{50} dos tratamentos com EFEU e ECEU, e dos antioxidantes Ácido ascórbico e BHT.

Amostras	DPPH			ABTS		
	IC_{50} (µg/mL)	Atividade Máxima		IC_{50} (µg/mL)	Atividade Máxima	
		%	µg/mL		%	µg/mL
Ácido ascórbico	3,17 ± 0,50	94,64 ± 0,16	15	1,70 ± 0,34	98,85 ± 0,58	6,67
BHT	20,73 ± 1,10	84,49 ± 6,39	87,5	5,39 ± 0,44	97,05 ± 0,43	25
EFEU	9,74 ± 0,42	93,30 ± 0,58	50	7,58 ± 0,67	98,08 ± 0,09	25
ECEU	8,94 ± 0,72	92,89 ± 1,41	33,33	5,94 ± 0,63	97,91 ± 0,06	25

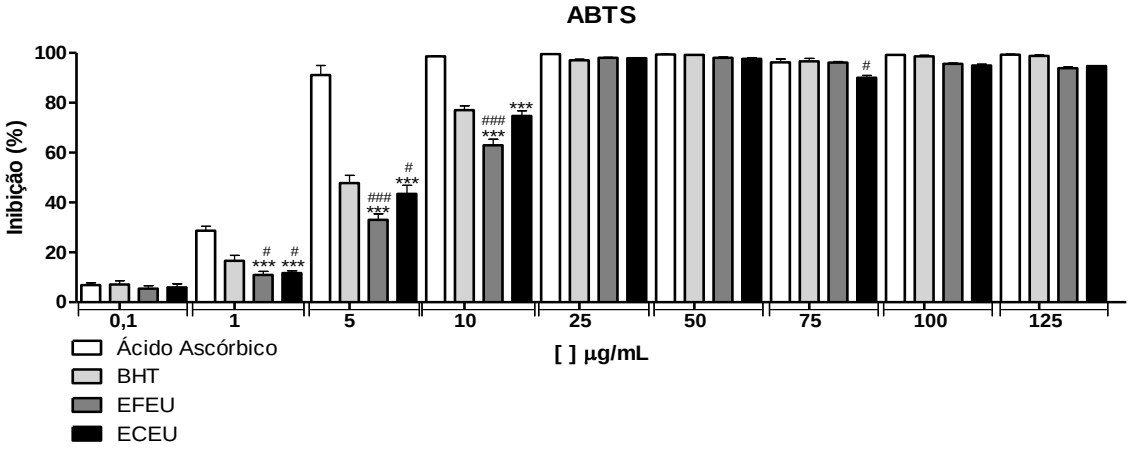
Os valores foram expressos como média ± SEM.

Gráfico 1. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelos extratos hidroetanólicos da folha e da casca de *E. uniflora* e pelos antioxidantes Ácido ascórbico e BHT.



Fonte: O Autor (2019). Os resultados foram considerados significativos quando p (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.01) comparado com o ácido ascórbico e p (# p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.01) comparado com o BHT.

Gráfico 2. Porcentagem de inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ pelos extratos hidroetanólicos da folha e da casca de *E. uniflora* e pelos antioxidantes ácido ascórbico e BHT.



Fonte: O Autor (2019). Os resultados foram considerados significativos quando p (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.01) comparado com o ácido ascórbico e p (# p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.01) comparado com o BHT.

O ECEU apontou uma concentração baixa de atividade máxima (25 e 33,33 µg/mL) para inibição do radical $ABTS^{\bullet+}$ e DPPH respectivamente, além de demonstrar melhor atividade antioxidante que o extrato das folhas (EFEU) nos dois ensaios (DPPH e ABTS), sendo semelhante ao BHT no ensaio de ABTS. Possivelmente a quantidade superior de compostos fenólicos no ECEU (191,13 ± 2,99 mg EAG/ g), ou outras substâncias com ação antioxidante, explica o ECEU ter sido mais eficiente na captura dos radicais que o EFEU.

Os extratos demonstraram potencial antioxidante, visto que foram mais eficazes na inibição em 50% do radical DPPH comparado com o BHT. O BHT é um antioxidante sintético utilizado na indústria para conservação de alimentos

(YEHYE et al., 2015). Embora os extratos de *E. uniflora* tenham sido menos eficazes que o ácido ascórbico na eliminação dos radicais ABTS e DPPH, Da Cunha et al. (2016) verificou que o extrato etanólico de *E. uniflora* apresentou menor capacidade antioxidante que o ácido ascórbico no ensaio de DPPH.

As substâncias responsáveis pela atividade antioxidante possivelmente estão relacionadas com os compostos fenólicos, visto que são descritos com propriedades antioxidantes e neste trabalho os extratos apresentaram acentuada quantidade dessas substâncias. Bagetti et al. (2011) relatou que nos extratos metanólicos das polpas de pitanga roxa, vermelha e laranja tiveram alta correlação da atividade antioxidante com o conteúdo fenólico total. Contudo considerando que um extrato natural é composto por vários constituintes químicos, o efeito antioxidante do extrato hidroetanólico das cascas e folhas pode estar ligada a efeitos sinérgicos entre os diferentes compostos, incluindo os compostos fenólicos (MARTINEZ-CORREA et al., 2011; WU et al., 2009).

Neste trabalho, foi avaliado a citotoxidade do extrato das folhas e das cascas do caule de *E. uniflora* em linhagens cancerígenas de melanoma (SK-MEL, 28, 103) e em células não tumorais PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell* / células mononucleares do sangue periférico), analisados em 24 e 48 horas.

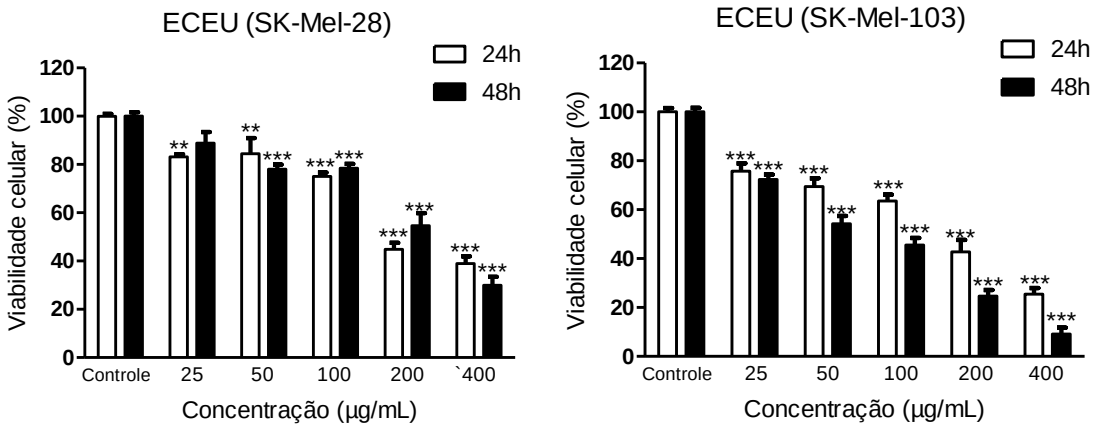
Para avaliar a citotoxidade *in vitro* utilizou o ensaio de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) que se baseia na conversão por células vivas do MTT em cristais de formazan. Esta conversão é realizada pela clivagem do anel de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase dentro da mitocôndria. O que resulta na alteração da coloração de amarelo para violeta e então analisada a coloração em leitor de microplacas ou espectrofotômetro e por consequente a viabilidade das células, pois a geração de formazan é proporcional ao número de células. A redução só é possível se a célula estiver viável, se a substancia analisada não foi tóxica para a célula e a mitocôndria (MOSMANN, 1983).

Conforme mostrado no gráfico 3, o ECEU demonstrou efeito citotóxico nas linhagens de células de melanoma SK-MEL-28 e SK-MEL-103 de forma concentração dependente, ou seja, conforme a concentração do ECEU

aumentava, menor foi a viabilidade celular das linhagens e observou redução da viabilidade celular na SK-MEL-103 no tempo de 48 horas em relação a 24 horas.

A citoxidade do ECEU em células de melanoma já tinha sido demonstrada por Mahmoud et al. (2011) que constatou em seus experimentos que a casca do caule *de E. uniflora* na concentração de 100 µg/mL, apresentou 84,85% de redução da viabilidade em HCT-8 (Human Colon carcinoma), 75,24% em SF-295 (glioblastoma) e 95,60% em MDA-MB-435 (melanoma).

Gráfico 3. Viabilidade celular de células de melanoma após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das cascas de *E. uniflora*.



Fonte: O Autor (2019*).* Viabilidade celular de células de melanoma (SK-MEL 28 e SK-MEL 103) após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das cascas de *E. uniflora* nas concentrações de 25 a 400 µg/mL pelo ensaio de MTT. Os resultados foram considerados significativos quando p (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.01$) comparado com o controle.

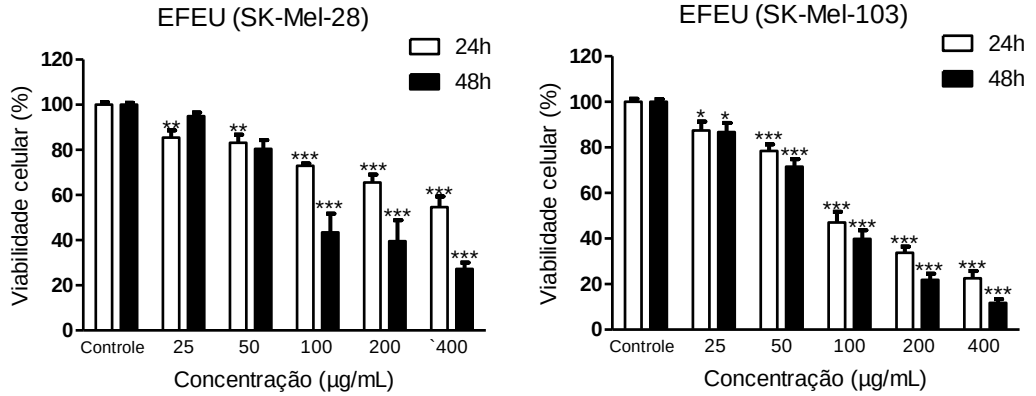
Esse é o primeiro trabalho avaliando a citoxidade EFEU em células tumorais. O EFEU apresentou citotoxidade nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 e SK-MEL-103 de forma concentração dependente, como mostrado no gráfico 4. E foi mais eficiente na inibição da viabilidade da SK-MEL-28 em 48 horas (gráfico 4), e apresentou menor citotoxidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) como vemos na gráfico 5.

No tratamento do melanoma, o principal quimioterápico aplicado para esse câncer é a dacarbazina, porém apresenta diversos efeitos colaterais entre eles a diminuição de leucócitos, ou seja, o sistema imune fica comprometido acarretando diversos outros problemas ou até mesmo interrompendo a continuidade do tratamento (BECKER; KÄMPGEN; BRÖCKER, 2000).

Portanto para avaliar a seletividade do extrato foi testada a citotoxidade dos extratos em células não tumorais, nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC), tendo demonstrado baixa citoxidade, reduzindo a viabilidade celular somente nas maiores concentrações, conforme demonstrado no gráfico 5. Sendo que esses resultados corroboram com Da Cunha et al. (2016) que constatou que não houve citotoxidade do extrato etanólico das folhas em leucócitos humanos nas concentrações de 1-480 µg/mL, indicando que os extratos da *E. uniflora* são seletivos a células tumorais em relação a células não tumorais.

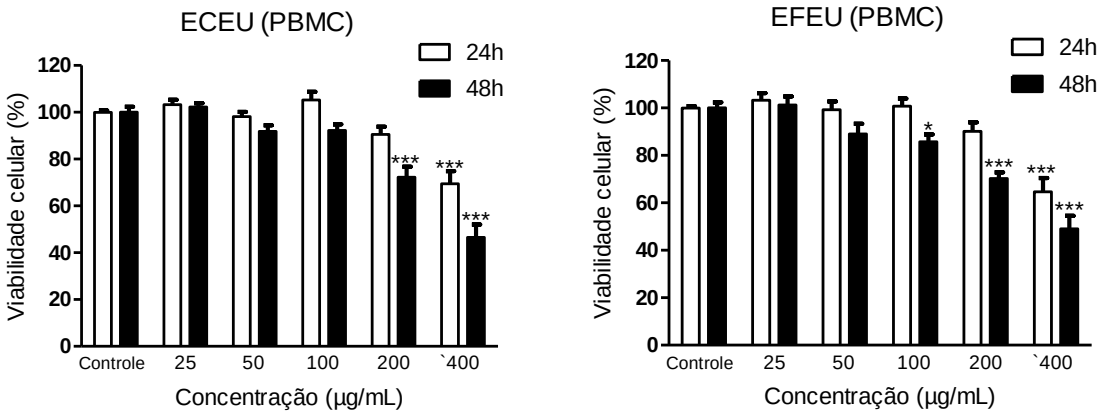
A citotoxicidade para PBMC e para linhagens de melanoma foram comparadas utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre o IC_{50} de PBMC e IC_{50} das linhagens SK-MEL-28 e 103 considerando o tempo de exposição dos tratamentos. Os resultados de índice de seletividade foram considerados significativos quando (IS ≥ 2,0) e conforme apresentados na tabela 5 o EFEU foi mais seletivo a linhagem SK-MEL-103 em 24 e 48 horas de exposição do extrato e o ECEU mais seletivo na linhagem SK-MEL-103 em 48 horas de exposição, comparados com as células não tumorais PBMCs. Jin et al. (2011) mostrou que a dacarbazina apresenta IC_{50} de 380± 29.8 µM em SK-MEL-5. Comparando com os valores de IC_{50} de PBMCs apresentado nesse estudo, o IS seria em torno de 0,5, demonstrando que os EFEU e ECEU atuam de forma mais seletiva as linhagens de melanoma que a dacarbazina.

Gráfico 4. Viabilidade celular de células de melanoma após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das folhas de *E. uniflora*.



Fonte: O Autor (2019). Viabilidade celular de células de melanoma (SK-MEL -28 e SK-MEL-103) após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das folhas de *E. uniflora* nas concentrações de 25 a 400 µg/mL pelo ensaio de MTT. Os resultados foram considerados significativos quando p (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.01$) comparado com o controle.

Gráfico 5. Viabilidade celular de PBMC, após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das folhas e ao extrato das cascas do caule de *E. uniflora.*



Fonte: O Autor (2019). Viabilidade celular de células mononucleares do sangue periférico (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cell) após 24 e 48 horas de exposição ao extrato das folhas e ao extratro das cascas do caule de *E. uniflora* nas concentrações de 25 a 400 µg/mL pelo ensaio de MTT. Os resultados foram considerados significativos quando p (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.01$) comparado com o controle.

Tabela 5. IC_{50} dos extratos de *E. uniflora* com as linhagens celulares no ensaio de viabilidade celular e seus respectivos índices de seletividade (IS).

		ECEU		**EFEU**	
Linhagens	**Tempo** (h)	**IC_{50}** (µg/mL)	**IS**	**IC_{50}** (µg/mL)	**IS**
SK-MEL-28	24	126,1 ± 5,87	1,45	167,2 ± 18,75	1,32
	48	165,0 ± 8,54	1,11	92,9 ± 33,47	1,73
SK-MEL-103	24	136,4 ± 3,85	1,34	75,8 ± 9,22	2,91
	48	87,6 ± 7,52	2,09	72,2 ± 10,55	2,22
PBMC	24	183,0 ± 10,85	-	220,4 ± 4,73	-
	48	183,5 ± 16,01	-	160,3 ±15,55	-

Os valores foram expressos como média ± SEM.

As linhagens celulares SK-MEL apresenta mutações presentes em pacientes com melanoma, a linhagem SK-MEL-28 apresenta mutação no proto-oncogene B-RAF ocorrendo substituição de valina por ácido glutâmico no códon 600 e SK-MEL-103 mutação no proto-oncogene N-Ras com alteração no códon 61, resultando na substituição de glutamina por arginina (KAUFMANN et. al, 2008; LEE; CHOI; KIM, 2011). A citotoxidade apresentada pelos extratos pode estar relacionado com a inibição de N-RAS e B-RAF. Visto que a proteína N-Ras está envolvida em processos de proliferação e migração celular (DROSTEN et al., 2010), e B-RAF em estudo recente demonstrou que promove a invasão e metástase em melanoma (AROZARENA et al., 2011).

Pelo ensaio de MTT realizado neste trabalho não foi possível afirmar qual tipo de morte os constituintes químicos presente no extrato da *E. uniflora* induziu nas linhagens de células tumorais testadas. Porém estudos anteriores já relacionaram compostos fenólicos na indução da morte de células cancerígenas por apoptose, como o ácido gálico (YOU, et al., 2010), o [10]-gingerol (BERNARD; MCCONNERY; HOSKIN, 2017), e o ácido cafeico (MURAD et al., 2015). Assim, compostos fenólicos presentes na *E. uniflora* podem estar relacionados com a citotoxidade apresentada pelo extrato em células de melanoma.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que neste trabalho foi constatada a presença de compostos fenólicos e flavonoides nos ECEU e EFEU, bem como foi comprovada a atividade antioxidante do extrato das folhas e o das cascas de *E. uniflora*. Adicionalmente, este estudo demonstrou pela primeira vez a atividade antioxidante das cascas de *E. uniflora* na captura direta dos radicais $ABTS^{\cdot+}$ e DPPH. As folhas e as cascas de *E. uniflora* além de confirmar a sua ação antioxidante também demonstrou atividade citotóxica contra melanoma. Assim, esses resultados apontam a presença de substâncias que podem estar relacionadas a atividade antioxidante de *E. uniflora*, sugerindo que a *E. uniflora* poderia ser um potencial aliado no tratamento de doenças relacionados ao câncer de pele bem como naquelas relacionadas com o estresse oxidativo. Contudo, são necessários outros estudos como a determinação dos constituintes químicos presente e estudos referentes ao mecanismo de morte em células tumorais tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR, T. A. F.; NAVARRO, B. C. H.; PÉREZ, J. A. M. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. In: **A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2**. InTech, 2016.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; HUNT, T. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Publica**, v. 29, n. 6, p. 428-433, 1995.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. Skin cancer facts. Atlanta, 2016. Disponível em:http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/sunanduvexposure/skin cancer-facts. Acesso em: 10 out. 2018.

AMORIM, A. C.; LIMA, C. K.; HOVELL, A. M.; MIRANDA A. L.; REZENDE C.M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L.(Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. do CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

AROZARENA, I.; SANCHEZ-LAORDEN, B.; PACKER, L.; HIDALGO-CARCEDO, C.; HAYWARD, R.; VIROS, A.; MARAIS, R. Oncogenic BRAF Induces Melanoma Cell Invasion by Downregulating the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE5A. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 45-57, 2011

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, p. 55-61, 2003.

AURICCHIO. M. T.: BUGNO. A.: BARROS. S. B. M.: BACCHI. E. M. Antimicrobial and antioxidant activities and toxicity of *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2007.

BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; PICCOLO, J.; HIRSCH, G. E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KOBORI, C. N.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 147-154, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BECKER, J. C.; KÄMPGEN, E.; BRÖCKER, E. B. Classical chemotherapy for metastatic melanoma: Clinical dermatology• Review article. **Clinical and**

Experimental Dermatology: Clinical dermatology, v. 25, n. 6, p. 503-508, 2000.

BERNARD, M. M.; MCCONNERY, J. R.; HOSKIN, D. W. [10]-Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **Experimental and molecular pathology**, v. 102, n. 2, p. 370-376, 2017.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.

BRAGA F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M.; MOREIRA, F. O.; SCIO E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de informações sobre mortalidade.** Brasília, DF, 2017. Disponível em: http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=19465. Acesso em: 10 out. 2018

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BORGES, K. C. **Pitanga (*Eugenia uniflora*) desidratada por atomização e liofilização:** Características físico-químicas, compostos bioativos e efeito sobre longevidade, estresse oxidativo e neurotoxicidade induzida em modelos in vivo *Caenorhabditis elegans*. 2015. 212f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

BOSCOLO, O. H.; DE SENNA VALLE, L. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 263-278, 2008.

BURKILL, H. M. **The Useful Plants of West Tropical Africa.** Royal Botanic Gardens Kew, v. 4. 2 ed., p. 89–93, 1997.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna:** métodos de estudo: fitoterápicos e fitofármacos: biotecnologia; patente. Chapecó, SC: Argos, 2001.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev Bras Farm**, v. 88, n. 3, p. 113-8, 2007.

CONSOLINI, A. E; BALDINI, A. O.; AMAT, A. G**.** Pharmacologicalbasis for theempirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39, 1999.

COTINGUIBA, G. G., Do NASCIMENTO SILVA, J. R., De SÁ AZEVEDO, R. R., ROCHA, T. J. M., DOS SANTOS, A. F. 2 Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015.

DA CUNHA, F. A. B.; WACZUK, E. P.; DUARTE, A. E.; BARROS, L. M.; ELEKOFEHINTI, O. O.; MATIAS, E. F. F.; SOUZA, D. O. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine&Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614-621, 2016.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R.; AMBRÓSIO, R. Fenologia da floração e frutificação de mirtáceas nativas da floresta com araucária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, 2010.

DA SILVA, A. A.; GONCALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, 2010.

DAVIES, H.; BIGNELL, G. R.; COX, C.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; CLEGG, S.; DAVIS, N. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949, 2002.

DESRIVOT, J.; WAIKEDRE, J.; CABALION, P.; HERRENKNECHT, C.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 7-12, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DROSTEN, M.; DHAWAHIR, A.; SUM, E. Y.; UROSEVIC, J.; LECHUGA, C. G.; ESTEBAN, L. M.; BARBACID, M. Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. **The EMBO journal**, v. 29, n. 6, p. 1091-1104, 2010.

DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L. C.; VICENTINI, V. E. P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, 2012.

FERNANDES, N. C.; CALMON, R.; MACEIRA, J. P.; CUZZI, T.; DA SILVA, C. S. C. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos Cutaneous melanoma: prospective study of 65 cases. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 1, p. 25-34, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doencas relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRO, D. **Fitoterapia:** conceitos clínicos. São Paulo: Atheneu, 2006.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae)**. Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, 2008.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of food composition and analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

FUCK, S. B.; ATHANÁZIO, J. C.; DE LIMA, C. B.; MING, L. C. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por moradores da área urbana de Bandeirantes, PR, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 291-296, 2005.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851, 2007.

GUPTA, D.; GUPTA, R. K., 2011. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 13, 2011.

GUPTA, A. D.; PUNDEER, V.; BANDE, G.; DHAR, S.; RANGANATH, I. R.; KUMARI, G. S. Evaluation of antioxidant activity of four folk antidiabetic medicinal plants of India. **Pharmacology online**, v. 1, p. 200-208, 2009.

HODI, F. S.; O'DAY, S. J.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W.; SOSMAN, J. A.; HAANEN, J. B.; AKERLEY, W. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711-723, 2010.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation, v. 40. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, 1986.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em: 10 ago. 2018

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva**, Rio de Janeiro, 2018.

INCA. Monitoramento das ações de controle do câncer de pele. Informativo Detecção Precoce, ano 7, n. 3. **Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva**, Rio de Janeiro, 2016.

JIANG, T.; ZHOU, C.; REN, S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 6, p. e1163462, 2016.

JIN, J. L.; GONG, J.; YIN, T. J.; LU, Y. J.; XIA, J. J.; XIE, Y. Y.; NOTEBORN, M. H. PTD4-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma in vitro and in vivo. **European journal of pharmacology**, v. 654, n. 1, p. 17-25, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular.** 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2000.

KANWAL, S. **Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells**. 2013. Tese de Doutorado. Paris 5.

KARP, G.; WAKO, A.P. **Biologia celular e molecular:** conceitos e experimentos. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2005.

KAUFMAN, H. L.; KIRKWOOD, J. M.; HODI, F. S.; AGARWALA, S.; AMATRUDA, T.; BINES, S. D.; GONZALEZ, R. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 10, n. 10, p. 588, 2013.

KAUFMANN, W. K.; NEVIS, K. R.; QU, P.; IBRAHIM, J. G.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; THOMAS, N. E. Defective cell cycle checkpoint functions in melanoma are associated with altered patterns of gene expression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 1, p. 175-187, 2008.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z. Oxidative stress in carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 116-121, 2018.

KORKINA, L. G.; AFANAS' EV, I. B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. In: **Advances in pharmacology**. Academic Press, p. 151-163, 1996.

KUMAR, V.; KHAN, A. A.; TRIPATHI, A.; DIXIT, P. K.; BAJAJ, U. K. Role of oxidative stress in various diseases: relevance of dietary antioxidants. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 4, p. 126-132, 2015.

LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M. A.; MARTINS, R. C. C.; SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and Plinia trunciflora (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9827-9837, 2011.

LEE, J. H.; CHOI, J. W.; KIM, Y. S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **British Journal of Dermatology**, v. 164, n. 4, p. 776-784, 2011.

LEE, M. H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L. L.; YEN, K. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.

LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A.; DUTRA, R. P.; REIS, A. S.; ARAÚJO, M. J. A. M.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N.; NASCIMENTO, F. R.; GUERRA, R. N.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee Melipona fasciculata Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.

LIMA, R. A.; SILVA, A. C. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **REGET**, v. 20, n. 1, 2016.

LIRA, J. J. S.; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA, J. J. F. Pitangueira. **Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA**, p.87, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, v.1, 2008

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. D. Ó.; LOTUFO, L. V.; MAGALHÃES, H. I.; MORAES, M. O. D.; OLIVEIRA, J. E. D. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts**. Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456-464, 2011.

MANJU, K.; JAT, R. K.; ANJU, G. A review on medicinal plants used as a source of anticancer agents**. International Journal of Drug Research and Technology**, v. 2, n. 2, p. 6, 2017.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves: influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 3, p. 998-1006, 2011.

MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 3, p. 669-702, 2009.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G. D.; MARQUES, M. E. A. Physiopathology of melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623-635, 2009.

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

MURAD, L. D.; SOARES, N. D. C. P.; BRAND, C.; MONTEIRO, M. C.; TEODORO, A. J. Effects of caffeic and 5-caffeoylquinic acids on cell viability and cellular uptake in human colon adenocarcinoma cells. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 3, p. 532-542, 2015.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E. L. S.; VAN HOORN, D. E.; BOELENS, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NWAKAUDU, A. A.; NWAKAUDU, M. S.; OWUAMANAM, C.I. The Use of Natural Antioxidant Active Polymer Packaging Films for Food Preservation. **AppliedSignals Reports**, v. 2, n. 4, p. 38-50, 2015.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, n. 3, p. 147-152, 2005.

PIERINI, D.; BRYAN, N. S. Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. In: **Advanced Protocols in Oxidative Stress III**. Humana Press, New York, NY, p. 63-71 2015.

PINTO, E. D. P. P.; AMOROZO, M. C. D. M; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 751-762, 2006.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 422-426, 2003.

PODSĘDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2007.

RAHMAN, I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD. **Treatments in respiratory medicine**, v. 4, n. 3, p. 175-200, 2005.

RATTMANN, Y. D.; DE SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Analysis of flavonoids from

Eugenia uniflora leaves and its protective effect against murine sepsis**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUES, K. A. D. F.; AMORIM, L. V.; OLIVEIRA, J. M. G. D.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; ANDRADE, E. H. D. A.; CARVALHO, F. A. D. A. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-Leishmania agent: effects on Leishmania amazonensis and possible mechanisms of action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

RODRIGUES, N. R. D. **Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SANTOS, K. K.; MATIAS, E. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E.; BRAGA, M. F.; GUEDES, G. M.; MENEZES, I. R. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology,** v. 131, n. 1, p. 130-132, 2012.

SANTOS, K. K. A.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ROJAS DE ARIAS, A.; COSTA, J. G. M. D.; COUTINHO, H. D. M. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 47-50, 2013.

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

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; DE ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183-186, 1987.

SCHUMACHER, N. S. G.; COLOMEU, T. C.; DE FIGUEIREDO, D.; CARVALHO, V. D. C.; CAZARIN, C. B. B.; PRADO, M. A.; ZOLLNER, R. D. L. Identification and antioxidant activity of the extracts of *Eugenia uniflora* leaves. characterization of the anti-inflammatory properties of aqueous extract on diabetes expression in an experimental model of spontaneous type 1 diabetes (NOD Mice**). Antioxidants**, v. 4, n. 4, p. 662-680, 2015.

SILVA, E. C. B., GUERRA, M. M. P. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozóides. **Ciênc Vet Tróp**, v. 13, p. 9-16, 2010.

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

SILVA, S. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p.1-1, 2006.

SOFFIATTI, P.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Estudo anatômico comparativo do lenho e da casca de duas espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 175-184, 1999.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. D.; MIRANDA, A. T. B.; SILVA, M. D. R. R. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 247-249, 2002.

SUCUPIRA, N. R.; DA SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; DA COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, SP, v. 15, n. 4, p. 361-372, 2005.

VENKATACHALAM, H.; NAYAK, Y.; JAYASHREE, B. S. Evaluation of the antioxidant activity of novel synthetic chalcones and flavonols**. International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 3, n. 3, p. 216, 2012.

VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; DA SILVA NASCENTE, P. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

VICTORIA, F. N.; ANVERSA, R. G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. **Food Bioscience**, v. 4, p. 50-57, 2013.

VICTORIA, F. N.; DE SIQUEIRA BRAHM A.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E.J. Involvement of serotoninergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience letters**, v. 544, p. 105-109, 2013.

VOSS-RECH, D.; KLEIN, C. S.; TECHIO, V. H.; SCHEUERMANN, G. N.; RECH, G.; FIORENTIN, L. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of Salmonella. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 314-320, 2011.

WHO - **World Health Organization**. Disponível em: http://www.who.int/cancer/en/. Acesso em: 07 out. 2018.

WU, N.; FU, K.; FU, Y. J.; ZU, Y. G.; CHANG, F. R.; CHEN, Y. H.; GU, C. B. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp.] leaves. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1032-1043, 2009.

YEHYE, W. A.; RAHMAN, N. A.; ARIFFIN, A.; HAMID, S. B. A.; ALHADI, A. A.; KADIR, F. A.; YAEGHOOBI, M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 101, p. 295-312, 2015.

YOU, B. R.; MOON, H. J.; HAN, Y. H.; PARK, W. H. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1334-1340, 2010.