

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**Caracterização química e atividades biológicas de
Bauhinia rufa (Bong.) Steud. e *Schinus terebinthifolius* Raddi**

Paola dos Santos da Rocha
Doutora em Biotecnologia e Biodiversidade

DOURADOS
MS - BRASIL
2018

PAOLA DOS SANTOS DA ROCHA

**Caracterização química e atividades biológicas de
Bauhinia rufa (Bong.) Steud. e *Schinus terebinthifolius* Raddi**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para o processo de defesa para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade.

Orientadora e Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Kely de Picoli Souza

Prof^a. Dr^a. Maria Leticia Miranda F. Estevinho

Dourados
MS - BRASIL
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R672c Rocha, Paola Dos Santos Da
Caracterização química e atividades biológicas de Bauhinia rufa
(Bong.) Steud. e Schinus terebinthifolius Raddi / Paola Dos Santos Da
Rocha -- Dourados: UFGD, 2018.
138f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Kely de Picoli Souza
Co-orientador: Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) - Faculdade de
Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande
Dourados.
Inclui bibliografia

1. plantas medicinais. 2. fungos endofíticos. 3. estresse oxidativo. 4.
diabetes. 5. infecções bacteriana. 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.

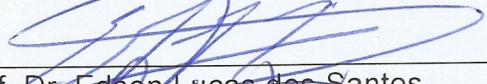


Termo de Aprovação

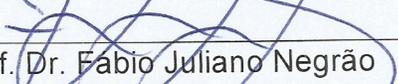
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer **APROVADO**, para a tese intitulada: “**Caracterização química e atividades biológicas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. e *Schinus terebinthifolius* Raddi**”, de autoria de **Paola dos Santos da Rocha**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.



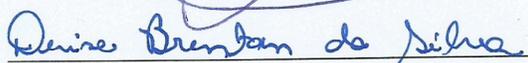
Prof^a. Dr^a. Kely de Picoli Souza
Presidente da banca examinadora



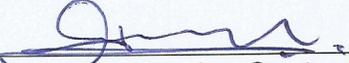
Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Fabio Juliano Negrão
Membro Examinador (UFGD)



Prof^a. Dr^a. Denise Brentan da Silva
Membro Examinador (UFMS)



Dr. Wilson Pereira dos Santos
Membro Examinador (HEMOSUL)

Dourados/MS, 26 de julho de 2018.

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho ao meu avô João Mendes, que participou das grandes vitórias da minha vida, mas não está mais aqui para celebrar esta... “Vovô queria que estivesse aqui... sua partida deixou uma eterna saudade...me lembro do senhor todos os dias!”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus**.

Aos meus pais, **José Alves da Rocha e Oraide dos Santos Mendes Rocha**, meus exemplos e alicerces da minha vida. Eu não seria a pessoa que sou hoje sem a educação e o amor de vocês. Vocês são tudo pra mim! O apoio de vocês foi essencial para o meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional! Amo muito vocês!

Ao meu esposo, **Wyllian Teixeira Wincler**, pela amizade, amor e companheirismo. Por esperar, acreditar, estar sempre ao meu lado, nas alegrias, tristezas, na saúde e na doença, todos os dias de nossas vidas!

Aos meus irmãos, **Pâmela Cristina dos Santos da Rocha e Pablo Antonio Santos da Rocha**, por todo o incentivo e apoio. Por simplesmente serem meus irmãos e tornarem esta família, ainda mais família!

À minha sobrinha, **Carolina dos Santos da Rocha Chaga**, luz dos meus dias, a alegria da minha vida! Senti muitas saudades! Amo muito minha Carolzinha!

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Kely de Picoli Souza**, pela amizade, conselhos, apoio, dedicação e confiança em todos os momentos. Ao tempo que gastou em minha orientação... e sei que não foi pouco tempo. Aprendi muito e espero sempre poder estar ao lado desta pessoa maravilhosa que a senhora é! Gostaria de agradecer por tudo e mais um pouco, mas não tenho palavras para descrever minha gratidão. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos**, pela contribuição, ensinamentos e conselhos. Ao estímulo em ensinar e pesquisar que me inspira e tenho certeza que é inspiração para todos os alunos que sabem aproveitar as oportunidades oferecidas! Obrigada!

A minha orientadora do exterior, **Prof^a. Dr^a. Maria Leticia Fernandes Miranda Estevinho**, pelo acolhimento, generosidade, ensinamentos, paciência e amizade! Muito obrigada por tudo professora!

As minhas grandes amigas da vida e do laboratório, **Jaqueline Ferreira Campos e Priscilla Pereira de Toledo Espíndola** pela amizade, companheirismo em todas as horas e em qualquer lugar. Espero que nossa amizade sempre prevaleça! Irmãs que a vida me deu!

A uma grande amiga que ganhei no exterior, **Vanessa Marina Branco Paula**, pela amizade, conselhos, ensinamentos, risadas, por todo apoio durante e após essa pesquisa. Uma amizade que vou levar para sempre! Obrigada por tudo!

Ao **grupo do exterior** que me acolheu em sua família Ana Paula, Ananias e as técnicas Dona Arminda e Fátima. Obrigada pessoal, foi maravilhoso estar com vocês durante este período!

Aos membros do grupo de pesquisa em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo- **GEBBAM**.

Aos membros da banca, pela presença e apoio.

À UFGD e agências de fomento CAPES, FUNDECT e CNPq.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	02
1. INTRODUÇÃO	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Plantas medicinais	05
2.2. Fungos endofíticos	08
2.3. Metabolitos secundários.....	08
2.4. Aplicações biológicas	10
2.4.1. Estresse oxidativo e controle do balanço redox.....	10
2.4.2. Diabetes e controle glicêmico	14
2.4.3. Infecções e controle bacteriano	17
2.5. <i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	19
2.6. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Gerais	23
3.2. Específicos	23
4. REFERÊNCIAS	24
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS	36
5.1. Efeitos de <i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud no estresse oxidativo e controle glicêmico: estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	37
5.2. Qualidade microbiológica, perfil químico e atividade antioxidante e antidiabética de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	73
5.3. Compostos químicos, atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de <i>Schinus teribinthifolius</i> Raddi	114

Caracterização química e atividades biológicas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. e *Schinus terebinthifolius* Raddi

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de diversas doenças, dentre elas, o diabetes e as infecções, as quais são fatores determinantes no aumento dos gastos em saúde pública e redução da qualidade de vida. Nesta perspectiva, foi criada uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) para estimular o desenvolvimento de novas drogas. *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. e *Schinus terebinthifolius* Raddi são plantas medicinais cujos gêneros integram a RENISUS. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e atividades biológicas de *B. rufa* e *S. terebinthifolius*. O perfil químico e as atividades biológicas do extrato metanólico das folhas de *B. rufa* (MEBr), dos extratos metanólicos das raízes, cascas do caule e folhas (MESL) de *S. terebinthifolius* e, dos extratos de acetato de etila dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raízes de *S. terebinthifolius* foram avaliados. As atividades biológicas avaliadas incluem o controle do balanço redox, glicêmico e bacteriano. Em resumo, os principais resultados apontam que todos os extratos caracterizados apresentaram compostos fenólicos e atividade antioxidante. O MEBr e MESL apresentaram potencial sobre o controle glicêmico, adicionalmente não foram tóxicos nas concentrações avaliadas. O extrato do fungo endofítico *Ochrocladosporium elatum* dos frutos de *S. terebinthifolius* apresentou atividade antibacteriana contra bactérias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enteritidis*. Em conclusão, os resultados deste estudo indicam atividades biológicas de diferentes extratos de *B. rufa*, de *S. terebinthifolius* e do fungo endofítico *Ochrocladosporium elatum* isolado dessa planta, indicando recursos naturais promissores no controle do balanço redox, glicêmico e bacteriano. Por fim, destacamos que esta tese será apresentada por meio de uma breve introdução, revisão de literatura e três artigos científicos gerados pelos dados obtidos.

Palavras-chave: plantas medicinais, fungos endofíticos, compostos fenólicos, estresse oxidativo, diabetes, infecções bacterianas

Chemical characterization and biological activities of *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. and *Schinus terebinthifolius* Raddi

ABSTRACT

Medicinal plants are used to treat various diseases, including diabetes and infections, which are determining factors in increasing public health expenditures and reducing the quality of life of these people. In this perspective, was created a National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System (RENISUS) for to stimulate the development of new drugs. *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. and *Schinus terebinthifolius* Raddi are medicinal plants whose genus are part of RENISUS list. In this context, the objective of this study was to evaluate the chemical composition and the biological activities of *B. rufa* and *S. terebinthifolius*. The chemical profile and the biological activities of the methanolic extract of the leaves of *B. rufa* (MEBr), the methanolic extracts from roots, stem bark and leaves (MESL) of *S. terebinthifolius* and the ethyl acetate extracts of isolated endophytic fungi of fruits, stem bark and roots of *S. terebinthifolius* were evaluated. The biological activities evaluated include control of redox balance, glycemic and bacterial. In summary, the main results indicate that all the extracts characterized presented phenolic compounds and antioxidant activity. MEBr and MESL presented potential on glycemic control, additionally they were not toxic at the concentrations evaluated. The extract of the endophytic fungus *Ochrocladosporium elatum* of the fruits of *S. terebinthifolius* showed antibacterial activity against bacteria *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* and *Salmonella enteritidis*. In conclusion, the results of this study indicate biological activities of different extracts of *B. rufa*, *S. terebinthifolius* and the endophytic fungus *Ochrocladosporium elatum* isolated from this plant, indicating promising natural resources in the control of redox balance, glycemic and bacterial. Finally, we emphasize that this thesis will be presented through a brief introduction, literature review and three scientific articles generated by the data obtained.

Key words: medicinal plants, endophytic fungi, phenolic compounds, oxidative stress, diabetes, bacterial infections

INTRODUÇÃO

Bauhinia rufa (Bong.) Steud. e *Schinus terebinthifolius* Raddi são espécies vegetais nativas presentes no Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, as quais representam gêneros integrantes da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde brasileiro (RENISUS), para o desenvolvimento de pesquisas que visam identificar sua eficácia biológica e, segurança microbiológica e toxicológica (Brandão et al., 2006; RENISUS, 2009; Caffaro et al., 2015).

As propriedades biológicas das plantas medicinais e/ou produtos naturais são atribuídas aos seus metabólitos bioativos, alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos (Heras et al., 2003; Matsuura e Fett-Neto, 2015; Amiot et al., 2016). Adicionalmente, as atividades terapêuticas observadas pelas plantas medicinais podem estar relacionadas aos metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos (Aly et al., 2011). Desta maneira, as plantas medicinais e os fungos endofíticos são fontes alternativas para obtenção de metabólitos bioativos para a prevenção e tratamento de doenças (Aly et al., 2011; Sofowora et al., 2013).

Nas últimas décadas, o diabetes e as doenças infecciosas se tornaram problemas de saúde pública globais, devido ao aumento dos gastos e redução da qualidade de vida que geram (Revelas, 2012; Al-Lawati, 2017). O diabetes é caracterizado principalmente pela hiperglicemia, a qual está diretamente relacionada ao aumento dos níveis de radicais livres, que desencadeiam ou agravam o quadro de estresse oxidativo e, proporcionam anormalidades estruturais e funcionais do endotélio e outros tecidos, contribuindo para o desenvolvimento das complicações diabéticas (Giacco e Brownlee, 2010).

As alterações dos sistemas antioxidantes em indivíduos diabéticos podem facilitar o desenvolvimento de infecções bacterianas (Vairamon et al., 2009). As infecções mais comuns em indivíduos diabéticos envolvem a derme (Vairamon et al., 2009; Hobizal e Wukich, 2012). Os indivíduos diabéticos são mais susceptíveis a infecções e, as lesões no pé, comumente caracterizadas como pé diabético, resultante da neuropatia e/ou vasculopatia, considerada uma complicação que determina sofrimento e piora na qualidade de vida, é um importante fator de predisposição para o desenvolvimento de infecções por *Staphylococcus aureus* (Vairamon et al., 2009; Hobizal e Wukich, 2012).

Nesta perspectiva, as buscas por compostos antioxidantes, antidiabéticos e antimicrobianos se fazem necessárias para a obtenção de metabólitos bioativos e geração de novos fármacos que melhorem parâmetros relacionados ao diabetes, infecções bacterianas e, proporcionem qualidade de vida. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram avaliar a composição química e atividades biológicas de *B. rufa* e *S. terebinthifolius*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de doenças desde o início das civilizações, sendo o método terapêutico mais antigo que se conhece (Petrovska, 2012). Atualmente, na perspectiva de promover qualidade de vida, as plantas medicinais e/ou produtos de origem natural são utilizadas como alternativa terapêutica, na prevenção e tratamento de doenças, redução de efeitos colaterais de tratamentos alopáticos e também para a obtenção de novas moléculas bioativas (Sofowora et al., 2013).

Apesar dos avanços da medicina moderna, o uso da medicina tradicional permanece como opção viável para grande parte da população mundial (Rakotoarivelo et al., 2005; Boer e Cotingting, 2014). Boer e Cotingting (2014) levantaram no Sudeste da Ásia e países próximos, um quantitativo de cerca de 2000 diferentes plantas, com mais de 5000 combinações, utilizadas por mulheres para o tratamento de diversas doenças. Estudos de Giovannini et al. (2016) e Wet et al. (2013), mostram a utilização da medicina tradicional para o tratamento de diabetes e infecções cutâneas por populações da América Central e África, respectivamente.

A utilização de plantas medicinais leva a necessidade de estudos que comprovem sua eficácia e segurança de uso, incluindo análises microbiológicas e estudos de toxicidade (Ratajczak et al., 2015). Na busca por contribuir para a assistência farmacêutica sobre a promoção da segurança de uso e eficácia de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos, o Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, criou uma lista incluindo espécies utilizadas na medicina popular brasileira (Tabela 1).

As plantas medicinais podem ser fornecidas pelo SUS sobre diferentes formas que incluem plantas medicinais frescas ou secas e, fitoterápicos. As plantas medicinais são vegetais que apresentam eficácia biológica que podem

ser indicadas pelo conhecimento tradicional e, geralmente são utilizadas como infusão, decocto, dentre outros (Sofowora et al., 2013). A partir delas, podem ser gerados fitoterápicos, que são medicamentos obtidos a partir de extratos, tinturas, óleos essenciais, dentre outros (Sofowora et al., 2013). O processo de produção dos fitoterápicos garante a qualidade microbiológica e a eficácia no uso do produto natural (Ratajczak et al., 2015).

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais são atribuídas aos seus metabólitos bioativos, os quais são responsáveis pela manutenção da planta no ambiente, e possuem importante função na adaptação do vegetal e contribuem para o funcionamento dos processos ecológicos (Pavarini et al., 2012). Estes metabólitos bioativos são provenientes diretamente do metabolismo secundário dos vegetais (Wink, 2015) ou da atividade metabólica de fungos endofíticos presentes em diversas espécies.

Tabela 1. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.

Espécie	Nome popular
<i>Achillea millefolium</i>	Mil-folhas
<i>Allium sativum</i>	Alho
<i>Aloe spp (A. vera ou A. barbadensis)</i>	Babosa
<i>Alpinia spp (A. zerumbet ou A. speciosa)</i>	Colônia
<i>Anacardium occidentale</i>	Caju
<i>Ananas comosus</i>	Abacaxi
<i>Apuleia ferrea</i>	Pau-ferro
<i>Arrabidaea chica</i>	Cipó-cruz
<i>Artemisia absinthium</i>	Losna
<i>Baccharis trimera</i>	Carqueja
→ <i>Bauhinia spp (B. affinis, B. forficata ou B. variegata)</i>	Pata-de-vaca
<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto
<i>Calendula officinalis</i>	Calêndula
<i>Carapa guianensis</i>	Andiroba
<i>Casearia sylvestris</i>	Guaçatonga
<i>Chamomilla recutita</i>	Camomila
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Erva-de-santa-maria
<i>Copaifera spp</i>	Copaíba
<i>Cordia spp (C. curassavica ou C. verbenacea)</i>	Erva-baleeira
<i>Costus spp (C. scaber ou C. spicatus)</i>	Cana-do-brejo
<i>Croton spp (C. cajucara ou C. zehntneri)</i>	Sacaca
<i>Curcuma longa</i>	Açafrão-da-terra
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra
<i>Dalbergia subcymosa</i>	Verônica
<i>Eleutherine plicata</i>	Marupazinho
<i>Equisetum arvense</i>	Cavalinha
<i>Erythrina mulungu</i>	Mulungu
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga
<i>Foeniculum vulgare</i>	Funcho
<i>Glycine max</i>	Soja
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Garra-do-diabo
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Pinhão-roxo
<i>Justicia pectoralis</i>	Anador
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Folha-da-fortuna
<i>Lamium album</i>	Urtiga-branca
<i>Lippia sidoides</i>	Alecrim-pimenta
<i>Malva sylvestris</i>	Malva
<i>Maytenus spp (M. aquifolium ou M. ilicifolia)</i>	Espinheira-santa
<i>Mentha pulegium</i>	Poejo
<i>Mentha spp (M. crispa, M. piperita ou M. villosa)</i>	Hortelã
<i>Mikania spp (M. glomerata ou M. laevigata)</i>	Guaco
<i>Momordica charantia</i>	Melão-de-são-caetano
<i>Morus spp</i>	Amora
<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca
<i>Orbignya speciosa</i>	Babaçu
<i>Passiflora spp (P. alata, P. edulis ou P. incarnata)</i>	Maracujá
<i>Persea spp (P. gratissima ou P. americana)</i>	Abacate
<i>Petroselinum sativum</i>	Salsa
<i>Phyllanthus spp (P. amarus, P. niruri, P. tenellus)</i>	Quebra-pedra
<i>Plantago major</i>	Tanchagem
<i>Plectranthus barbatus</i>	Boldo-brasileiro
<i>Polygonum spp (P. acre ou P. hydropiperoides)</i>	Erva-de-bicho
<i>Portulaca pilosa</i>	Amor-crescido
<i>Psidium guajava</i>	Goiaba
<i>Punica granatum</i>	Romã
<i>Rhamnus purshiana</i>	Cáscara-sagrada
<i>Ruta graveolens</i>	Arruda
<i>Salix alba</i>	Salgueiro-branco
→ <i>Schinus terebinthifolius</i>	Pimenta-rosa
<i>Solanum paniculatum</i>	Jurubeba
<i>Solidago microglossa</i>	Arnica-do-mato
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Barbatimão
<i>Syzygium spp (S. jambolanum ou S. cumini)</i>	Jambolão
<i>Tabebuia avellanedeae</i>	Ipê-roxo
<i>Tagetes minuta</i>	Cravo-de-defunto
<i>Trifolium pratense</i>	Trevo-dos-prados
<i>Uncaria tomentosa</i>	Unha-de-gato
<i>Vernonia condensata</i>	Boldo-da-bahia
<i>Zingiber officinale</i>	Gengibre

Adaptada de RENISUS, 2009. Fonte: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/06/renisus.pdf>

2.2. Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são organismos que colonizam os tecidos vegetais e, em simbiose utilizam os metabólitos primários produzidos pelas plantas, auxiliando na proteção, manutenção e crescimento da planta hospedeira, a partir da produção de metabólitos secundários (Aly et al., 2011; Rajamanikyam et al., 2017).

Os fungos endofíticos de plantas medicinais são fontes alternativas e promissoras para obtenção de metabólitos bioativos e, são alvos de estudos tendo em vista a pesquisa e detecção de novos compostos com atividade biológica para geração de novos fármacos de origem natural (Aly et al., 2011).

Os metabólitos bioativos obtidos dos fungos endofíticos apresentam diferentes aplicações biológicas que incluem as atividades imunossupressora, antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, antidiabética, anti-inflamatória e antioxidante, além disso, podem ser produzidos em grande escala após seu isolamento (Sudha et al., 2016).

A penicilina foi o primeiro metabólito bioativo isolado de um fungo, conhecido como *Penicillium notatum*, sendo o primeiro antibacteriano disponível (Strobel et al., 2014). Desde a sua descoberta inúmeros estudos científicos sobre a atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados de várias fontes vegetais são demonstradas (Sudha et al., 2016).

Os metabólitos bioativos com atividade antineoplásica, taxol e vincristina foram isolados pela primeira vez das plantas medicinais *Taxus brevifolia* e *Catharanthus roseus* e, posteriormente de seus fungos endofíticos *Taxomyces andreanae* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente (Kumar et al., 2013).

2.3. Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são responsáveis por diversas atividades de manutenção e defesa das plantas medicinais (Demain e Fang, 2000; Pavarini et al., 2012). Esses metabólitos são produzidos a partir do metabolismo da glicose, por meio das vias do ácido chiquímico, acetato e, combinação de ambas as vias para a produção de alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (Figura 1) (Demain e Fang, 2000).

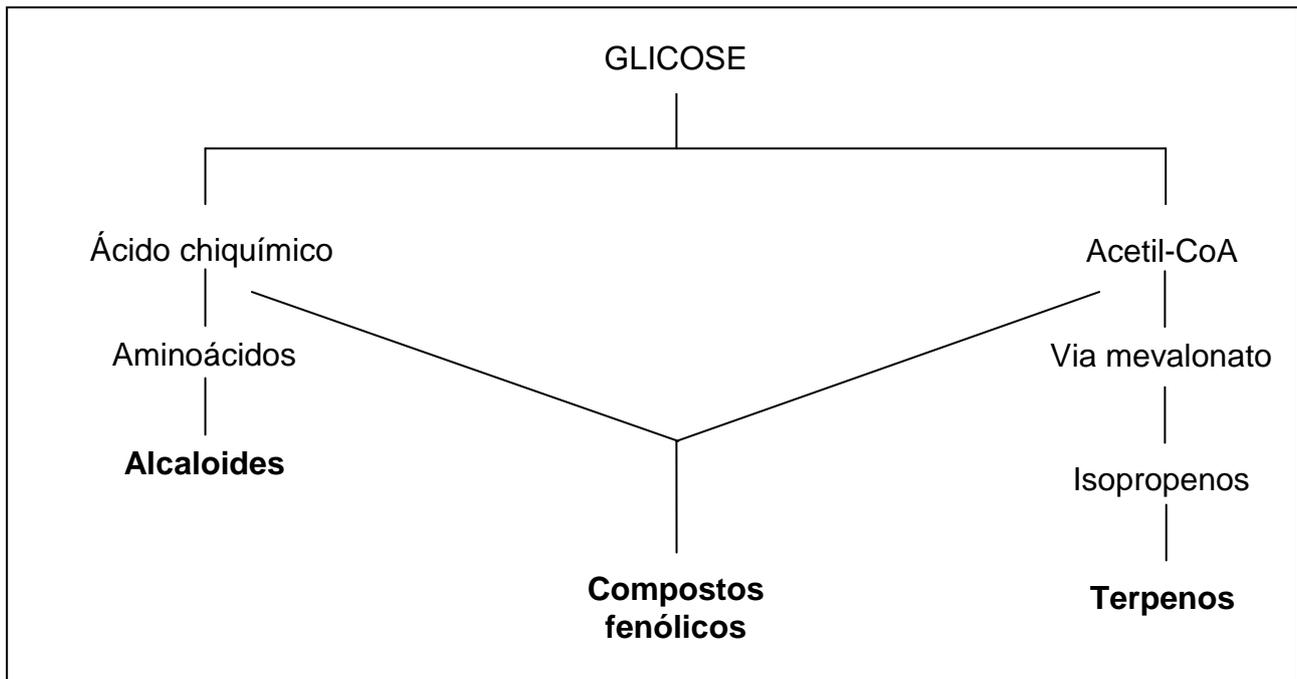


Figura 1. Rota biossintética (simplificada) dos metabólitos secundários.

Os alcaloides constituem um grupo heterogêneo de substâncias nitrogenadas (Matsuura e Fett-Neto, 2015). Em sistema biológico, os alvos moleculares de alcaloides incluem neuroreceptores ou a modulação de outras etapas na transdução de sinal neuronal incluindo canais iônicos ou enzimas, que absorvem ou metabolizam neurotransmissores ou segundos mensageiros. Adicionalmente, vários alcaloides interferem no DNA, telômeros, telomerase, topoisomerase, citoesqueleto ou biossíntese de proteínas que ocasionam mutagênese ou induzem a apoptose (Matsuura e Fett-Neto, 2015). Mecanismos por meio dos quais muitos alcaloides são utilizados como agentes quimioterápicos e antimicrobianos (Cushnie et al., 2014; Matsuura e Fett-Neto, 2015).

Os terpenos são constituídos por unidades isoprênicas, subdivididos em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos ou carotenoides (Heras et al., 2003). Em sistema biológico, pela sua natureza lipofílica, os terpenos apresentam a capacidade de interagir com a membrana celular, aumentando a fluidez e a permeabilidade das mesmas pela modulação da atividade de proteínas e receptores de membrana, podendo inclusive ocasionar morte celular (Heras et al., 2003). Em geral, os terpenos apresentam atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (Heras et al., 2003; Zacchino et al., 2017). Além disso, os carotenoides são descritos por seu potencial antioxidante

devido à especificidade da sua estrutura molecular que permite a ressonância da molécula e reestabilização (Grassmann, 2005).

Os compostos fenólicos apresentam anéis aromáticos e grupos hidroxila em sua molécula (Foti, 2007; Alov et al., 2015). Em sistema biológico, os compostos fenólicos apresentam a capacidade de eliminar e estabilizar radicais livres, inibir reações de peroxidação lipídica, quelar ou se complexar com metais (Foti, 2007; Alov et al., 2015). Em estudos científicos, os compostos fenólicos têm se destacado por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas, principalmente antioxidante, além de contribuir com a prevenção e/ou tratamento de diversas doenças (Amiot et al., 2016).

2.4. Aplicações biológicas

2.4.1. Estresse oxidativo e controle do balanço redox

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante do organismo (Sies, 1997). As EROs são produzidas, durante a respiração celular na mitocôndria e, em condições fisiológicas, participam da manutenção dos sistemas biológicos como mensageiros de sinalização e proliferação celular (Sena et al., 2012). No processo de fosforilação oxidativa, o oxigênio sofre reações de oxi-redução formando EROs radicalares e não-radicalares (Sena et al., 2012).

As EROs radicalares consistem em moléculas que apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada de valência, proporcionando instabilidade química e alta capacidade reativa e, incluem ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e radical hidroxila ($\cdot OH$) (Lushchak, 2014). As EROs não-radicalares são quimicamente mais estáveis, entretanto, altamente reativas, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Lushchak, 2014).

As EROs são formadas a partir da redução do oxigênio a $O_2^{\cdot-}$ ou HO_2^{\cdot} (forma protonada do $O_2^{\cdot-}$) (Fridovich, 1997). O $O_2^{\cdot-}$ pode atuar como agente oxidante ou redutor e originar outras EROs, entretanto, é considerado pouco reativo (Fridovich, 1997). Em sequência, a enzima superóxido dismutase (SOD) dismuta duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Bray et al., 1974).

O H_2O_2 é uma EROs altamente reativa, podendo promover danos à membrana lipídica, por reagir com lipídeos e proteínas (Kanner et al., 1983). O

H_2O_2 pode oxidar íon ferroso a íon férrico por meio da Reação de Fenton, gerando o OH^\bullet (Winterbourn, 1995). O OH^\bullet é considerado a EROs mais reativa em sistemas biológicos, para o qual não há sistema enzimático de defesa (Lipinski, 2011). Normalmente a reatividade do H_2O_2 é neutralizada na mitocôndria pela atuação das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), que convertem o H_2O_2 em uma molécula de água e uma molécula de oxigênio (Alfonso-Prieto et al., 2009; Heverly-Coulson e Boyd, 2010).

Os componentes celulares, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, são altamente susceptíveis aos danos oxidativos gerados pelo excesso de EROs (Salvi et al., 2001; Stark, 2005). A membrana celular é a organela mais atingida em decorrência da peroxidação lipídica e, nesse processo, o OH^\bullet é a principal EROs que estimula a lipoperoxidação (Stark, 2005; Ayala et al., 2014). A reação de peroxidação lipídica se inicia com a oxidação do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular, pela redução do OH^\bullet e, conseqüente formação do radical lipídico (L^\bullet), que reage com o oxigênio, originando o radical peroxila (LOO^\bullet) (Stark, 2005; Ayala et al., 2014). O LOO^\bullet pode reduzir outro OH^\bullet e formar novamente o L^\bullet , acarretando alterações na estrutura e permeabilidade da membrana, pela geração de hidroperóxido lipídico que pode ser fragmentado a aldeídos, tais como malondialdeído (MDA) (Stark, 2005; Ayala et al., 2014). O MDA é um subproduto importante na resposta inflamatória, entretando, em excesso pode participar do processo de desenvolvimento de doenças e aumento de complicações em um quadro patológico (Thiele et al., 2004; Sugiura et al., 2010).

A manutenção do equilíbrio redox no organismo ocorre pela atuação do sistema de defesa antioxidante endógeno associado aos antioxidantes exógenos, substâncias capazes de reduzir ou inibir o processo oxidativo (Birben et al., 2012). O sistema de defesa endógeno é constituído por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. O sistema enzimático inclui a ação das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e glutathiona redutase (GR) e, o sistema não-enzimático inclui a glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) (Bhattacharya, 2015) (Tabela 2).

Os antioxidantes exógenos consistem em substâncias naturais e sintéticas provenientes da alimentação (Pokorny, 2007). Dentre os antioxidantes exógenos naturais estão minerais (zinco, cobre, manganês, ferro

e selênio), vitaminas E e C (tocoferol e ácido ascórbico, respectivamente), terpenos (carotenoides) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos) e, dentre os antioxidantes sintéticos estão o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) (Tabela 2).

Tabela 2. Características e mecanismos de ação dos antioxidantes endógenos e exógenos.

Antioxidantes	Características	Mecanismo de ação	Referência
Endógenos			
Enzimáticos			
SOD	Metaloenzima; Co-fator: Cu, Zn e Mn	Dismutar: $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 .	Perry et al. (2010)
CAT	Hemeproteína; Co-fator: Fe^{3+} -protoporfirina	Catalisar: H_2O_2 em H_2O e O_2 .	Alfonso-Prieto et al. (2009)
GPx	Co-fator: Se; Substrato: GSH	Catalisar: H_2O_2 em água e oxigênio. Oxidar: GSH a GSSH.	Heverly-Coulson e Boyd (2010)
GR	Flavoproteína	Reduzir: NADPH em $NADP^+$. Reduzir: GSSH a GSH.	Heverly-Coulson e Boyd (2010)
Não-enzimáticos			
GSH	Tripeptídeo: glicina, ácido glutâmico e cisteína	Substrato de GPx.	Heverly-Coulson e Boyd (2010)
GSSG	Forma pontes dissulfeto (-SS-)	Produto de GPx.	Heverly-Coulson e Boyd (2010)
Exógenos			
Sintéticos			
BHA e BHT	Lipofílicos	Doar elétrons.	Yehye et al. (2015)
Naturais			
Minerais	Co-fatores de enzimas antioxidantes	Auxiliar nos processos de oxi-redução.	Perry et al. (2010) Alfonso-Prieto et al. (2009) Heverly-Coulson e Boyd (2010)
Vitaminas E	Lipofílico	Proteger membrana contra a lipoperoxidação; atuar diretamente em $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ e LOO^{\cdot} .	Traber e Atkinson (2007)
Vitamina C	Hidrofílico	Inibir radicais livres; restaurar a vitamina E.	Bendich et al. (1986)
Carotenoides	Tetraterpeno lipofílico	Inibir a ação de radicais livres e a peroxidação lipídica, eliminando LOO^{\cdot} .	Stahl e Sies (2003)
Flavonoides e taninos	Compostos fenólicos hidrofílicos	Doar hidrogênio ou elétrons; inibir radicais livres e reações de peroxidação lipídica; quelar ou se complexar com metais; atuar sobre $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$.	Heim et al. (2002) Riedl et al. (2002)

SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; Cu: cobre; Zn: zinco; Mn: manganês; Fe^{3+} : íon férrico; $O_2^{\cdot-}$: ânion radical superóxido; $\cdot OH$: radical hidroxila; LOO^{\cdot} : radical peroxila; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; H_2O : água; O_2 : oxigênio; NADPH e $NADP^+$: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; BHA: hidroxianisol butilado; BHT: hidroxitolueno butilado.

2.4.2. Diabetes e controle glicêmico

O diabetes mellitus é uma doença multifatorial caracterizada pela hiperglicemia, resultante da deficiência da secreção de insulina ou resistência das células à ação desse hormônio (American Diabetes Association, 2010). A exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia contribui para o estresse oxidativo e ocasiona danos aos tecidos, pelo aumento do fluxo de glicose através da via do poliol, ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Chung et al., 2003; Geraldles e King, 2010; Singh et al., 2014).

Na via dos polióis em quadro hiperglicêmico, o aumento do estresse oxidativo é ocasionado pela redução da disponibilidade de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), pela atuação da enzima aldose redutase na conversão de glicose a sorbitol (Chung et al., 2003). A aldose redutase é uma enzima encontrada nos túbulos renais, endotélio vascular, retina e neurônios, onde a absorção de glicose é mediada por transportadores de glicose tipo 2 e 3, de maneira independente à insulina, ou seja, as concentrações de glicose intracelular aumentam paralelamente à hiperglicemia (Chung et al., 2003). Adicionalmente, o sorbitol é convertido à frutose, resultando no aumento da síntese de diacilglicerol, o principal ativador fisiológico de PKC (Geraldles e King, 2010).

A ativação de PKC induz produção de óxido nítrico e aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial, da produção do vasoconstritor endotelina 1 e do fator de crescimento do endotélio vascular (Geraldles e King, 2010). Dessa maneira, a ativação de PKC gera anormalidades estruturais e funcionais do endotélio e, conseqüentemente redução do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, contribuindo para o desenvolvimento das complicações diabéticas (Geraldles e King, 2010).

A formação de AGEs também contribui para o desenvolvimento dos mesmos quadros de complicações diabéticas (Singh et al., 2014). Os AGEs constituem uma variedade de moléculas formadas pela interação amino-carbonila, entre açúcares redutores e proteínas ou lipídeos oxidados e, podem ser originados pela reação de Maillard e via do estresse carbonílico (Singh et al., 2014). Na via clássica da reação de Maillard, os AGEs são formados em três etapas que incluem, a formação das bases de Schiff, a geração dos produtos de Amadori e, a condensação com unidades amina primárias (Singh

et al., 2014). A via do estresse carbonílico origina os AGEs em duas etapas que incluem, a oxidação de lipídeos ou de açúcares a compostos dicarbonílicos e, a interação dos compostos diacarbonílicos com aminoácidos (Singh et al., 2014). A ligação dos AGEs aos seus receptores induzem a disfunção celular pelo estímulo a produção de citocinas inflamatórias, fator de crescimento I e fator de necrose tumoral α . Além disso, os AGEs se acumulam na maioria dos órgãos-alvo que podem ser acometidos no diabetes como rins, retina e placas ateroscleróticas (Singh et al., 2014).

Os mecanismos estudados para o controle glicêmico incluem inibição da absorção de glicose pela inibição da atividade de enzimas digestivas α -glicosidase e α -amilase, inibição da proteína cotransportadora de sódio/glicose 2 (SGLT2), bem como mecanismos posteriores a absorção, que incluem a ativação da translocação intracelular do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), aumento da sensibilidade do substrato 1 receptor de insulina (IRS1) e aumento da secreção de insulina (Proks et al., 2002; Funaki et al., 2004; Laar, 2008; Fu et al., 2013; Zou et al., 2017) (Tabela 3). Estes mecanismos podem ser ativados por diferentes substâncias como inibidores de glicosidases, inibidores de SGLT2, biguanidas, tiazolidinedionas, sulfonilureias e análogos do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (Bischoff, 1995; Hauner, 2002; Proks et al., 2002; Dharmalingam et al., 2011; Lee et al., 2012; Kalra et al., 2014) (Tabela 3).

Entretanto, em especial pelo número crescente de novos casos de diabetes no mundo e pela toxicidade dos fármacos disponíveis atualmente, buscam-se alternativas terapêuticas derivadas de plantas medicinais eficazes e com menos efeitos colaterais. Nesta perspectiva, os compostos fenólicos são descritos por modular mecanismos de controle glicêmico e do balanço redox, dois importantes fatores nos quadros de diabetes (Kim et al., 2016).

Tabela 3. Medicamentos para o controle glicêmico: classes, mecanismos de ação, exemplo e efeitos colaterais.

Classe	Mecanismo	Medicamento	Efeitos colaterais	Referências
Inibidores de glicosidases	Inibição (antagonista) da atividade de enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase. Retardo da absorção intestinal de glicose.	Acarbose	Flatulência, diarreia e dores abdominais.	Bischoff (1995)
Inibidores de SGLT2	Redução da reabsorção de glicose dos túbulos renais proximais.	Dapagliflozina	Infecção urinária e poliúria.	Kalra et al. (2014)
Biguanidas	Translocação de GLUT4 e aumento da atividade da enzima glicogênio sintetase.	Metformina	Diarreia e náuseas.	Lee et al. (2012)
Tiazolidinedionas (TZDs)	Aumento da expressão de GLUT4 pela ativação de PPAR- γ . Aumento da sensibilidade à insulina.	Rosiglitazona	Toxicidade hepática e aumento da massa corporal.	Hauner (2002)
Sulfonilureias	Insulinotrópico: aumento da secreção de insulina.	Glibenclamida	Hipoglicemia e aumento da massa corporal.	Proks et al. (2002)
Análogo de GLP-1	Aumento da síntese e secreção de insulina, além da redução de glucagon.	Liraglutida	Hipoglicemia, náuseas, vômitos e diarreia.	Dharmalingam et al. (2011)

SGLT2: proteína cotransportadora de sódio/glicose 2; GLUT4: transportador de glicose tipo 4; PPAR- γ : receptores de proliferador de peroxissomos gamma; GLP1: peptídeo semelhante a glucagon 1.

2.4.3. Infecções e controle bacteriano

As infecções bacterianas são um sério problema de saúde pública mundial devido ao aumento da resistência desses microrganismos aos medicamentos existentes, limitando as opções de tratamento (Revelas, 2012). Dentre as bactérias que contribuem para o desenvolvimento de infecções resistentes destacamos *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enteritidis* (Revelas, 2012).

A espécie *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva resistente a múltiplos agentes antimicrobianos, sendo constantemente fonte de infecções humanas, incluindo endocardite infecciosa, osteomielite, infecções pulmonares, gastroenterite, infecções do trato urinário e infecções cutâneas (Robert e Moellering, 2012; Taylor e Unakal, 2017). Algumas infecções bacterianas por *S. aureus* podem ocasionar complicações em outros quadros patológicos, como por exemplo, a infecção cutânea do pé diabético por *S. aureus* em indivíduos diabéticos (Vairamon et al., 2009; Hobizal e Wukich, 2012).

K. pneumoniae e *S. enteritidis* são bactérias gram-negativas. A bactéria *K. pneumoniae* é associada principalmente a infecções do trato urinário, pneumonia e infecções sanguíneas e, também ocasiona abscesso hepático piogênico, endoftalmite e meningite (Martin e Bachman, 2018). A bactéria *S. enteritidis* é a principal responsável por contaminações de origem alimentar, ocasionando infecções no trato gastrointestinal e desenvolvimento de doenças sistêmicas (Anderson e Kendall, 2017).

O controle do crescimento bacteriano é realizado por diferentes classes de medicamentos que atuam sobre diferentes alvos nas bactérias (Henry, 1943; Williamson et al., 1986; Hooper, 1999; Chopra e Roberts, 2001). Os principais alvos dos medicamentos antibacterianos incluem a parede celular, a membrana plasmática, a síntese proteica, o metabolismo de ácidos nucleicos e a ação direta sobre o DNA (Henry, 1943; Williamson et al., 1986; Hooper, 1999; Chopra e Roberts, 2001; Calvo e Martínez-Martínez, 2009) (Tabela 4).

Contudo, o aumento do número de bactérias resistentes e o baixo desenvolvimento de novas drogas nas últimas décadas, buscam-se alternativas terapêuticas derivadas de plantas medicinais e/ou produtos naturais eficazes e com baixos efeitos colaterais. Nesta perspectiva, os compostos fenólicos, terpenos e alcalóides são descritos por modular mecanismos de controle microbiano (Cushnie e Lamb, 2011; Cushnie et al., 2014; Zacchino et al., 2017).

Tabela 4. Medicamentos antibacterianos: classe, exemplo e mecanismos de ação.

Classe	Medicamento	Mecanismo	Referência
Sulfonamidas	Sulfadiazina	Interferem na síntese de nucleotídeos.	Henry (1943)
β -lactâmicos	Amoxicilina	Inibe a síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana.	Williamson et al. (1986)
Tetraciclinas	Doxiciclina	Inibe a síntese proteica impedindo a ligação do RNAt ao complexo RNAm-ribossomo.	Chopra e Roberts (2001)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Inibe Topoisomerase II e não permite a replicação e transcrição do DNA.	Hooper (1999)

RNAt: RNA transportador; RNAm: RNA mensageiro.

2.5. *Bauhinia rufa* Bong. Steud

Bauhinia rufa (Bong.) Steud. (Fabaceae) (Figura 2), conhecida popularmente como pata-de-vaca, unha-de-vaca ou catinga-de-tamanduá, é uma espécie nativa do Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.

O gênero *Bauhinia* abrange cerca de 300 espécies, sendo a *B. forficata* a mais estudada. Espécies do gênero *Bauhinia* são utilizadas popularmente, para o controle lipídico e glicêmico (Silva et al., 2010; Caffaro et al., 2015) e, algumas pesquisas apontam que esta ação está associada ao seu potencial antioxidante (Sousa et al., 2004; Salgueiro et al., 2013; Farag et al., 2015). Inclusive, o gênero *Bauhinia* faz parte das plantas medicinais indicadas pelo Sistema Único de Saúde no Brasil (RENISUS, 2009).

As espécies de *Bauhinia* apresentam metabólitos como flavonoides, taninos, além de terpenoides, aos quais são atribuídas parte de seu potencial biológico (Tabela 5). Contudo, são escassos os estudos sobre a composição química e atividades biológicas da espécie *B. rufa*.

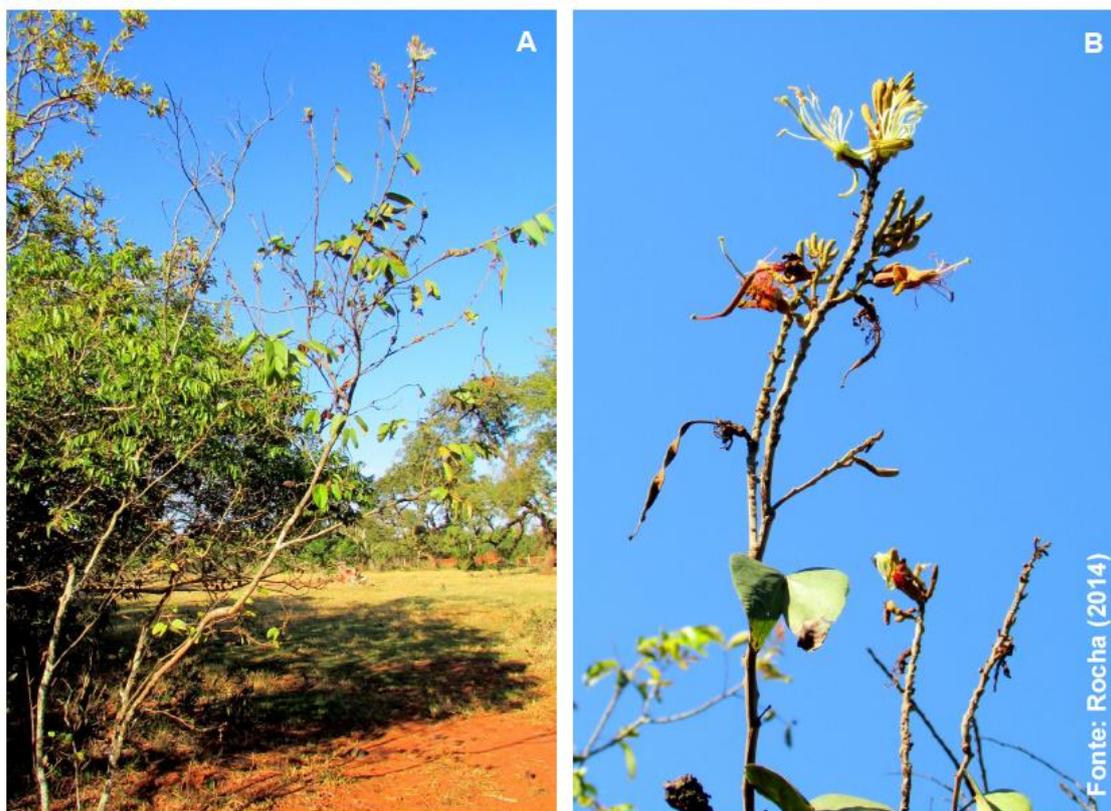


Figura 2. *Bauhinia rufa* Bong. Steud. (A) planta inteira (B) flores, frutos e folhas.

Tabela 5. *Bauhinia* spp. no controle glicêmico: espécies, parte da planta e solvente usado, compostos químicos e atividades biológicas.

Espécie	Extrato; Parte vegetal	Compostos químicos	Atividade e modelo biológico	Referência
<i>B. candicans</i>	Metanólico; folhas.	-	Hipoglicemiante e antidiabética; coelhos normoglicêmicos e diabéticos.	Fuentes et al. (2004)
<i>B. cheilandra</i>	Metanólico; folhas.	cumarinas, flavonoides, proantocianidinas, terpenoides, monoglicosídeos de quercetina e kaempferol e β-sistosterol.	Hipoglicemiante e antidiabética; ratos normoglicêmicos e diabéticos.	Almeida et al. (2006)
<i>B. forficata</i>	Etanólico; folhas.	-	Antioxidante, anti-glicação e inibitória de α-amilase, α-glucosidase e lipase pancreática.	Franco et al. (2018)
<i>B. forficata</i>	Aquoso, etanólico e hexânico; folhas.	-	Antidiabética; ratos diabéticos.	Lino et al. (2004)
<i>B. forficata</i>	Aquoso; folhas.	quercetina-3,7-O-diramnosídeo e kaempferol-3,7-O-diramnosídeo	Hipoglicemiante; camundongos normoglicêmicos.	Menezes et al. (2007)
<i>B. forficata</i>	Decocto; folhas.	-	Antidiabética; ratos diabéticos.	Pepato et al. (2002)
<i>B. forficata</i>	Infusão; folhas.	quercetina-3-O-(2-rhamnosil) rutinosídeo, kaempferol-3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo e kaempferol-3-O-rutinosídeo	Antioxidante; eritrócitos humanos em altas concentrações de glicose.	Salgueiro et al. (2013)
<i>B. forficata</i>	Infusão; folhas.	kaempferol-3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo, quercetina-3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo	Hepatoprotetor; ratos diabéticos.	Salgueiro et al. (2016)
<i>B. forficata</i>	Butanólico; folhas.	-	Antidiabética; ratos diabéticos.	Silva et al. (2002)
<i>B. forficata</i>	Fração butanólica; folhas.	kaempferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo	Antioxidante e antidiabética; ratos diabéticos.	Sousa et al. (2004)
<i>B. malabarica</i>	Etanólico; folhas.	-	Inibitória de α-glicosidase.	Dej-adisai et al. (2015)
<i>B. megalandra</i>	Metanólico; folhas.	quercetina 3-O-α-(2'-galol) ramnosídeo e kaempferol 3-O-α-(2"galoil) ramnosídeo	Anti-hiperglicemiante; inibição de glicose-6-fosfatase.	Estrada et al. (2005)
<i>B. megalandra</i>	Aquoso; folhas.	-	Inibitória da absorção intestinal da glicose e redução da tolerância à glicose; ratos normoglicêmicos.	Gonzalez-Mujica et al. (2003)
<i>B. thoningii</i>	Aquoso; folhas.	-	Antidiabética; ratos diabéticos.	Ojezele e Abatan (2011)
<i>B. tomentosa</i>	Aquoso; folhas.	-	Antidiabética; ratos diabéticos.	Devaki et al. (2011)
<i>B. vahlii</i>	Etanólico; folhas.	quercetina glicosídeos de quercetina.	Antioxidante e anti-hiperglicemiante; ratos diabéticos.	Elbanna et al. (2017)
<i>B. vahlii</i>	Etanólico e clorofórmio; cascas do caule.	alcaloides, flavonoides, fitosteróis, compostos fenólicos e glicosídeos	Anti-inflamatória e antidiabética; camundongos diabéticos.	Narayan et al. (2012)
<i>B. variegata</i>	Aquoso; folhas.	compostos fenólicos	Antidiabética; ratos diabéticos.	Kulkarni et al. (2016)
<i>B. variegata</i>	Etanólico; folhas.	Roseosídeo	Insulinotrópica; células INS-1.	Frankish et al. (2010)

- : não há avaliação de compostos químicos na referência citada.

2.6. *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) (Figura 3), conhecida popularmente como aroeira-vermelha ou pimenta-rosa, é uma espécie nativa do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, utilizada popularmente no tratamento de feridas e úlceras da pele, tumores, diarreia, artrite, infecções do trato urinário e do sistema respiratório e, inclusive faz parte das plantas medicinais indicadas pelo Sistema Único de Saúde no Brasil (Brandão et al., 2006; RENISUS, 2009). Estudos prévios, demonstram que *S. terebinthifolius* apresenta dentre seus constituintes, compostos fenólicos, aos quais são atribuídas diferentes atividades biológicas apresentadas na Tabela 6.

Adicionalmente, a atividade antimicrobiana do extrato dos fungos endofíticos isolados das folhas de *S. terebinthifolius* também foram relatadas na literatura (Silva et al., 2017; Tonial et al., 2017; Tonial et al., 2016). No entanto, não existem estudos sobre a composição química e atividades biológicas dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *S. terebinthifolius*.



Figura 3. *S. terebinthifolius* Raddi (A) planta inteira, (B) folhas e flores (C) frutos.

Tabela 6. *Schinus terebinthifolius*: partes utilizadas, extratos, compostos químicos e atividades biológicas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Parte utilizada	Extrato	Compostos químicos	Atividades biológicas	Autor	Ano
Frutos	-	triterpenos	Anti-inflamatória	Jain et al.	1995
Frutos	Alcoólico	compostos fenólicos	Antimicrobiano	Degaspari et al.	2005
Frutos	Óleo essencial	α -felandreno, β -felandreno, α -terpineol, α -pineno, β -pineno, p-cimeno e γ -cadineno	Antioxidante e anticâncer	Bendaoud et al.	2010
Frutos	Óleo essencial	α -pineno	Anticâncer	Matsuo et al.	2011
Frutos	Óleo essencial	δ -3-careno, limoneno, α -felandreno, α -pineno, trans-cariofileno	Antimicrobiana	Cole et al.	2014
Frutos	Óleo essencial	(r)-(+)-limoneno e α -filandreno	Anti-hiperalgésica e antidepressiva	Piccinelli et al.	2014
Frutos	Hidrometanólico	compostos fenólicos: naringenina e ácido gálico	Antioxidante e Anti-hipertensiva	Glória et al.	2017
Frutos	Óleo essencial	α -pineno e α -felandreno	Antibacteriana	Salem et al.	2018
Folhas	Aquoso	compostos fenólicos	Antiproliferativa	Queires et al.	2006
Folhas	Acetato de etila	ácido gálico, galato de metila e 1,2,3,4,6-pentagalactoglicose	Antialérgica	Cavalher-Machado et al.	2008
Folhas	Etanólico	ácido cafeico, ácido cumárico e o ácido siríngico	Antioxidante e antimicrobiana	El-Massry et al.	2009
Folhas	Hidroetanólico	schinol	Antifúngica	Johann et al.	2010
Folhas	Óleo essencial	p-cymen-7-ol, 9-epi-(e)-cariofileno, carvona e verbenona	Antibacteriana	Silva et al.	2010
Folhas	Óleo essencial	germacreno d, biciclogermacreno, β -pineno, β -longipineno	Citotóxica	Santana et al.	2012
Folhas	Óleo essencial	-	Cicatrizante	Estevão et al.	2013
Folhas	-	lectina	Antimicrobiana	Gomes et al.	2013
Folhas	Metanólico	-	Antigenotóxica e antimutagênica	Fedel-Mysato et al.	2014
Folhas	Etanólico	triterpenos	Antiparasitária	Morais et al.	2014
Folhas, cascas do caule e frutos	Etanólico	compostos fenólicos	Antioxidante e antibacteriana	D'Sousa'Costa et al.	2015
Folhas	Etanólico	compostos fenólicos	Hepatoprotetor	Abdou et al.	2015
Folhas	Hidroalcoólico	-	Anti-inflamatória	Rosas et al.	2015
Folhas	Óleo essencial	-	Anti-inflamatória	Estevão et al.	2017
Folhas	Metanólico	sitosterol-3-o-glicopiranosídeo; derivados de ácido gálico, 1,2,3,4,6-penta-ogaloil-glicopiranosídeo, metil galato, robustaflavona, quercetina, luteolina	Antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer	Silva et al.	2017
Folhas	Metanólico	compostos fenólicos	Antioxidante	Rocha et al.	2017
Folhas e frutos	Etanólicos	ácidos fenólicos, taninos, ácidos graxos, triterpenos e biflavonoides	Antibacteriana	Silva et al.	2018
Folhas	Óleo essencial	ácidos graxos e hidrocarbonetos monoterpênicos	Antibacteriana	Ennigrou et al.	2018
Folhas	Fração metanólica	antraquinonas, triterpenos, flavonoides, saponinas e cumarinas.	Antioxidante	Scheid et al.	2018
Cascas do caule	Hidroalcoólico	-	Cicatrizante	Coutinho et al.	2006
Cascas do caule	Hidroalcoólico	-	Cicatrizante	Lucena et al.	2006
Cascas do caule	Decocto	-	Antiulcerogênica	Carlini et al.	2010
Cascas do caule	Tintura	-	Fungistática e fungicida	Alves et al.	2012
Cascas do caule	Hidroalcoólico	-	Cicatrizante	Santos et al.	2012
Cascas do caule	Tintura	-	Fungistática e fungicida	Alves et al.	2013
Cascas do caule	Hidroalcoólico	-	Cicatrizante	Santos et al.	2013
Cascas do caule	Hidroetanólico	-	Antimicrobiana	Melo et al.	2014
Cascas do caule	Hidroetanólico	flavan-3-ols, catequina e galocatequina	Anti-viral	Nocchi et al.	2016
Cascas do caule	Hidroalcoólico	-	Cicatrizante	Scheibe et al.	2016
Cascas do caule	Hidroetanólico	ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido elágico	Anti-histamínica	Nunes-Neto et al.	2017

- : informações não citadas na referência utilizada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar a composição química e atividades biológicas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. e *Schinus terebinthifolius* Raddi.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Investigar os efeitos de *B. rufa* no estresse oxidativo e controle glicêmico *in vitro* e *in vivo*;

3.2.2. Avaliar a qualidade microbiológica, perfil químico e potencial antioxidante e antidiabético das raízes, cascas do caule e folhas de *S.terebinthifolius*;

3.2.3. Investigar o perfil químico, potencial antioxidante e antibacteriano dos extratos dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *S. teribinthifolius*.

4. REFERÊNCIAS

- Abdou, R. H., Saleh, S. Y., Khalil, W. F. (2015) Toxicological and biochemical studies on *Schinus terebinthifolius* concerning its curative and hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced liver injury. *Pharmacognosy Magazine*, 11, S93-S101. doi: 10.4103/0973-1296.157705
- Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., Rovira, C. (2009) The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 11751-11761. doi: 10.1021/ja9018572.
- Almeida, E.R., Guedes, M.C., Albuquerque, J.F.C., Xavier, H. (2006) Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. *Fitoterapia*, 77, 276-278. doi: 10.1016/j.fitote.2006.03.001
- Alov, P., Tsakovska, I., Pajeva, I. (2015) Computational Studies of Free Radical-Scavenging Properties of Phenolic Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 85-104. doi: 10.2174/1568026615666141209143702
- Alves, L. A., Freires Ide, A., Souza, T. M., Castro, R. D. (2012) *In vitro* activity of *Schinus terebinthifolius* (Brazilian pepper tree) on *Candida tropicalis* growth and cell wall formation. *Acta odontológica Latinoamericana*, 25, 287-292. PMID: 23798075
- Alves, L. A., Freires Ide, A., Pereira, T. M., Souza, A., Lima Ede, O., Castro, R. D. (2013) Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71, 965-971. doi: 10.3109/00016357.2012.741694
- Aly, A. H., Debbab, A., Proksch, P. (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1829-1845. doi: 10.1007/s00253-011-3270-y
- Al-Lawati, J. A. (2017) Diabetes Mellitus: A Local and Global Public Health Emergency! *Oman Medical Journal*, 32, 177-179. doi: 10.5001/omj.2017.34
- American Diabetes Association. (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33, 62-69. doi: 10.2337/dc10-S062
- Amiot, M. J., Riva, C., Vinet, A. (2016) Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obesity Reviews*, 17, 573-586. doi: 10.1111/obr.12409
- Anderson, C. J., Kendall, M. M. (2017) *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Strategies for Host Adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 01-16. doi: 10.3389/fmicb.2017.01983
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 01-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bendaoud, H., Romdhane, H., Souchard, J. P., Cazaux, S., Bouajila, J. (2010) Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *Journal of Food Science*, 75, C466-72. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x

- Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O. (1986) The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Biology & Medicine*, 2, 419-444. doi: [https://doi.org/10.1016/S8755-9668\(86\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S8755-9668(86)80021-7)
- Bhattacharya, S. (2015) Reactive oxygen species and cellular defense system. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 2015, 17-29. doi: 10.1007/978-81-322-2035-0_2
- Bischoff, H. (1995) The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clinical & Investigative Medicine*, 18, 303-311. PMID: 8549017
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization*, 5, 09-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Boer, H. J., Cotingting, C. (2014) Medicinal plants for women's healthcare in southeast Asia: a meta-analysis of their traditional use, chemical constituents, and pharmacology. *Journal Ethnopharmacology*, 151, 747-767. doi: 10.1016/j.jep.2013.11.030
- Brandão, M. G. L., Consenza, G. P., Moreira, R. A., Monte-Mor, R. L. M. (2006) Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 408-420. doi: 10.1590/S0102-695X2006000300020
- Bray, R. C., Cockle, S. A. (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 139, 43-48. PMID: 4377099
- Caffaro, K. M., Júnior, J. X. A., Santos, J. M., Santos, R. M., Campesatto, E. A., Bastos, M. L. A. (2015) Integrative review on medical use and pharmacological activities *Bauhinia* genus plant. *Journal of Nursing*, 9, 9399-9405. doi: 10.5205/reuol.6812-75590-1-ED.0908sup201509
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L. (2009) Antimicrobial mechanisms of action. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 44-52. doi: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Carlini, E. A., Duarte-Almeida, J. M., Rodrigues, E., Tabach, R. (2010) Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20, 140-146. doi: 10.1002/ptr.4767
- Cavalher-Machado, S. C., Rosas, E. C., Brito, F. A., Heringe, A. P., Oliveira, R. R., Kaplan, M. A., Figueiredo, M. R., Henriques, M. (2008) The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*, 8, 1552-1560. doi: 10.1016/j.intimp.2008.06.012
- Chopra, I., Roberts, M. (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001

- Chung, S. S. M., Ho, E. C. M., Lam, K. S. L., Chung, S. K. (2003) Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14, S233-S236. doi: 10.1097/01.ASN.0000077408.158
- Cole, E. R., Santos, R. B., Lacerda Júnior, V., Martins, J. D., Greco, S. J., Cunha Neto, A. (2014) Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 821-828. PMID: PMC4204964
- Coutinho, I. H., Torres, O. J., Matias, J. E., Coelho, J. C., Stahlke Júnior, H. J., Agulham, M. A., Bachle, E., Camargo, P. A., Pimentel, S. K., Freitas, A. C. (2006) *Schinus terebinthifolius* Raddi and its influence in the healing process of colonic anastomosis: experimental study in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 21, 49-54. PMID: 17293937
- Cushnie, T. P., Cushnie, B., Lamb, A. J. (2014) Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44, 377-386. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001
- Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99-107. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014
- Degaspari, C. H., Waszczyński, N., Prado, M. R. M. (2005) Antimicrobial activity of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciências e Agrotecnologia*, 29, 617-622. doi: doi.org/10.1590/S1413-70542005000300016
- Dej-adisai, S., Pitakbut, T. (2015) Determination of α -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 1679-1683. PMID: 26408887
- Demain, A. L., Fang, A. (2000) The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 69, 01-39. PMID: 11036689
- Devaki, K., Beulah, U., Akila, G., Narmadha, R., Gopalakrishnan, V. K. (2011) Glucose lowering effect of aqueous extract of *Bauhinia tomentosa* L. on alloxan induced type 2 diabetes mellitus in wistar albino rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2, 167-174. PMID: 24826019
- Dharmalingam, M., Sriram, U., Baruah, M. P. (2011) Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15, 9-17. doi: 10.4103/2230-8210.77571
- D'Sousa' Costa, C. O., Ribeiro, P. R., Loureiro, M. B., Simões, R. C., de Castro, R. D., Fernandez, L. G. (2015) Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, 11, 607-614. doi: 10.4103/0973-1296.160459
- Elbanna, A. H., Nooh, M. M., Mahrous, E. A., Khaleel, A. E., Elalfy, T. S. (2017) Extract of *Bauhinia vahlii* Shows Antihyperglycemic Activity, Reverses Oxidative Stress, and Protects against Liver Damage in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Pharmacognosy Magazine*, 13, S607-S612. doi: 10.4103/pm.pm_4_17

- El-Massry, K. F., El-Ghorab, A. H., Shaaban, H. A., Shibamoto, T. (2009) Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5265-5270. doi: 10.1021/jf900638c
- Ennigrou, A., Casabianca, H., Vulliet, E., Hanchi, B., Hosni, K. (2018) Assessing the fatty acid, essential oil composition, their radical scavenging and antibacterial activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves and twigs. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 1582-1590. doi: 10.1007/s13197-018-3049-6
- Estevão, L. R. M., Mendonça, F. S., Baratella-Evêncio, L., Simões, R. S., Barros, M. E. G., Arantes, R. M. E., Rachid, M. A., Evêncio-Neto, J. (2013) Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 28, 202-209.
- Estevão L. R. M., Simões, R. S., Cassini-Vieira, P., Canesso, M. C. C., Barcelos, L. D. S., Rachid M. A., Câmara, C. A. G. D., Evêncio-Neto, J. (2017) *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice 1. *Acta Cirurgica Brasileira* 32, 726-735. doi: 10.1590/s0102-865020170090000005
- Estrada, O., Hasegawa, M., Gonzalez-Mujica, F., Motta, N., Perdomo, E., Solorzano, A., Méndez, J., Méndez, B., Zea, E. G. (2005) Evaluation of flavonoids from *Bauhinia megalandra* leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. *Phytotherapy Research*, 19, 859-863. doi: 10.1002/ptr.1703
- Farag, M. A., Sakna, S. T., El-Fiky, N. M., Shabana, M. M., Wessjohann, L. A. (2015) Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*, 119, 41-50. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.09.004.
- Fedel-Miyasato, L. E. S., Kassuya, C. A. L., Auharek, S. A., Formagio, A. S. N., Cardoso, C. A. L., Mauro, M. O., Cunha-Laura, A. L., Monreal, A. C. D., Vieira, M. C., Oliveira, R. J. (2014) Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 565-575. doi: 10.1016/j.bjp.2014.08.004
- Foti, M. C. (2007) Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59,1673-1685. doi: 10.1211/jpp.59.12.0010
- Franco, R. R., Silva Carvalho, D., Moura, F. B. R., Justino, A. B., Silva, H. C. G., Peixoto, L. G., Espindola, F. S. (2018) Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 215, 140-146. doi: 10.1016/j.jep.2017.12.032
- Frankish, N., Menezes, F. S., Mills, C., Sheridan, H. (2010) Enhancement of insulin release from the β -cell line INS-1 by an ethanolic extract of *Bauhinia variegata* and its major constituent roseoside. *Planta Medica*, 76, 995-997. doi: 10.1055/s-0029-1240868
- Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 18515-18517.

- Fu, Z., Gilbert, E. R., Liu, D. (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9, 25-53. doi: 10.2174/1573399811309010025
- Fuentes, O., Arancibia-Avila, P., Alarcón, J. (2004) Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. *Fitoterapia*, 75, 527-532. doi: 10.1016/j.fitote.2004.03.013
- Funaki, M., Randhawa, P., Janmey, P. A. (2004) Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 7567-7577. doi: 10.1128/MCB.24.17.7567-7577.2004
- Geraldes, P., King, G. L. (2010) Activation of protein kinase C isoforms & its impact on diabetic complications. *Circulation Research*, 106, 1319-1331. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217117
- Giovannini, P., Howes, M. J., Edwards, S. E. (2016) Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review. *Journal Ethnopharmacology*, 184, 58-71. doi: 10.1016/j.jep.2016.02.034
- Giacco, F., Brownlee, M. (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107, 1058-1070. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
- Glória, L. L., Arantes M. B. S., Pereira, S. M. F., Vieira, G. S., Martins, C. X., Junior A. R. C., Antunes, F., Braz-Filho, R., Vieira, I. J. C., Cruz, L. L, Chaves, D. S. A., Freitas, S. P., Barros de Oliveira, D. B. (2017) Phenolic Compounds Present *Schinus terebinthifolius* Raddi Influence the Lowering of Blood Pressure in Rats. *Molecules*, 22, E1792. doi: 10.3390/molecules22101792
- Gomes, F. S., Procópio, T. F., Napoleão, T. H., Coelho, L. C., Paiva, P. M. (2013) Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 672-679. doi: 10.1111/jam.12086
- Gonzalez-Mujica, F., Motta, N., Márquez, A. H., Capote-Zulueta, J. (2003) Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. *Fitoterapia*, 74, 84-90. PMID: 12628399
- Grassmann, J. (2005) Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins and Hormones*, 72, 505-535. doi: 10.1016/S0083-6729(05)72015-X
- Hauner, H. (2002) The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 18, 10-15. PMID: 11921433
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584. doi: [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Henry, R. J. (1943) The mode of action of sulfonamides. *Bacteriological reviews*, 7, 175-262. PMID: 16350088
- Heras, B., Rodríguez, B., Boscá, L., Villar, A. M. (2003) Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3, 171-185. doi: 10.2174/1568026033392462
- Heverly-Coulson, G. S., Boyd, R. J. (2010) Reduction of hydrogen peroxide by glutathione peroxidase mimics: reaction mechanism and energetic. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114, 1996-2000. doi: 10.1021/jp910368u

- Hobizal, K. B., Wukich, D. K. (2012) Diabetic foot infections: current concept review. *Diabetic Foot & Ankle*, 3, 10. doi: 10.3402/dfa.v3i0.18409
- Hooper, D. C. (1999) Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs*, 58, 6-10. PMID: 10553698
- Jain, M. K., Yu, B. Z., Rogers, J. M., Smith, A. E., Boger, E. T., Ostrander, R. L., Rheingold, A. L. (1995) Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*, 39, 537-547. PMID: 7576451
- Johann, S., Sá, N. P., Lima, L. A., Cisalpino, P. S., Cota, B. B., Alves, T. M., Siqueira, E. P., Zani, C. L. (2010) Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9, 30. doi: 10.1186/1476-0711-9-30
- Kalra, S. (2014) Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. *Diabetes Therapy*, 5, 355-366. doi: 10.1007/s13300-014-0089-4
- Kanner, J., Kinsella, J. E. (1983) Initiation of lipid peroxidation by a peroxidase/hydrogen peroxide/halide system. *Lipids*, 18, 204-210. PMID: 6855480
- Kim, Y., Keogh, J. K., Clifton, P. M. (2016) Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, 8, 01-17. doi: 10.3390/nu8010017
- Kulkarni, Y. A., Garud, M. S. (2016) *Bauhinia variegata* (Caesalpinaceae) leaf extract: An effective treatment option in type I and type II diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 122-129. doi: 10.1016/j.biopha.2016.06.025
- Kumar, A., Patil, D., Rajamohan, P. R., Ahmad, A. (2013) Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *PLoS One*, 8, e71805. doi: 10.1371/journal.pone.0071805
- Laar, F. A. (2008) Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 1189-1195. PMID: 19337532
- Lee, J. O., Lee, S. K., Kim, J. H., Kim, N., You, G. Y., Moon, J. W., Kim, S. J., Park, S. H., Kim, H. S. (2012) Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 44121-44129. doi: 10.1074/jbc.M112.361386
- Lino, C. S., Diógenes, J. P., Pereira, B. A., Faria, R. A., Andrade Neto, M., Alves, R. S., de Queiroz, M. G., de Sousa, F. C., Viana, G. S. (2004) Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 125-127. doi: <https://doi.org/10.1248/bpb.27.125>
- Lipinski, B. (2011) Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 01-09. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/809696>

- Lucena, P. L., Ribas Filho, J. M., Mazza, M., Czeczko, N.G., Dietz, U. A., Correa Neto, M. A., Henriques, G. S., Santos, O. J., Ceschin, A. P., Thiele, E. S. (2006) Evaluation of the areira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 21, 46-51. PMID: 17117277
- Lushchak, V. I. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Martin, R. M., Bachman, M. A. (2018) Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 01-15, 2018. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004
- Matsuo, A. L., Figueiredo, C. R., Arruda, D. C., Pereira, F. V., Scutti, J. A., Massaoka, M. H., Travassos, L. R., Sartorelli, P., Lago, J. H. (2011) α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411, 449-454. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.176
- Matsuura, H. N., Fett-Neto, A. G. (2015) Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. *Plant Toxins*, 01-15. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_2-1
- Melo, M. C., Gadelha, D. N., Oliveira, T. K., Brandt, C. T. (2014) Alcohol extract of *Schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae) as a local antimicrobial agent in severe autogenously fecal peritonitis in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 1, 52-56.
- Menezes, F. S., Minto, A. B. M., Ruela, H. S., Kuster, R. M., Sheridan, H., Frankish, N. (2007) Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 08-13. doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100003
- Morais, T. R., Costa-Silva, T. A., Tempone, A. G., Borborema, S. E., Scotti, M. T., Sousa, R. M., Araujo, A. C., Oliveira, A., Morais, S. A., Sartorelli, P., Lago, J. H. (2014) Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): structure/activity relationships. *Molecules*, 19, 5761-576. doi: 10.3390/molecules19055761
- Narayan, D. S., Jagannath, P. V., Chandra, D. S. (2012) Evaluation of anti-inflammatory, anti-diabetic activity of Indian *Bauhinia vahlii* (stem bark). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, S1382-S1387. doi: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60421-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60421-3)
- Nocchi, S.R., Moura-Costa, G.F., Novello, C. R., Rodrigues, J., Longhini, R., Mello, J. C., Filho, B. P., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T. (2016) *In vitro* Cytotoxicity and Anti-herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Hydroethanolic Extract, Fractions, and Isolated Compounds from Stem Bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Pharmacognosy Magazine*, 12, 160-164. doi: 10.4103/0973-1296.177903
- Nunes-Neto, P. A., Peixoto-Sobrinho, T. J. S., Júnior, E. D. S., Leopoldina da Silva, J. L., Oliveira, A. R. S., Pupo, A. S., Araújo, A. V., Costa-Silva, J. H., Wanderley, A. G. (2017) The Effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Bark Extract on Histamine-Induced Paw Edema and Ileum

Smooth Muscle Contraction. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. doi: 10.1155/2017/1416375

Ojezele, M. O., Abatan, O. M. (2011) Hypoglycaemic and coronary risk index lowering effects of *Bauhinia thonin* in alloxan induced diabetic rats. African Health Sciences, 11, 85-89. PMID: 21572862

Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., Lopes, N. P. (2012) Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. Animal Feed Science and Technology, 176, 05-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002>

Pepato, M. T., Keller, E. H., Baviera, A. M., Kettelhut, I. C., Vendramini, R. C., Brunetti, I. L. (2002) Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 81, 191-197. PMID: 12065150

Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., Tainer, J.A. (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochimica et Biophysica Acta, 1804, 245-262. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.11.004

Petrovska, B. B. (2012) Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy Review, 6, 1-5. doi: 10.4103/0973-7847.95849

Piccinelli A. C., Santos, J. A., Konkiewitz, E. C., Oesterreich, S. A., Formagio, A. S., Croda, J., Ziff, E. B., Kassuya, C. A. (2015) Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. Nutritional Neuroscience, 18, 217-224. doi: 10.1179/1476830514Y.0000000119

Pokorny, J. (2007) Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants? European Journal of Lipid Science and Technology, 109, 629-642. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700064>

Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F., Ashcroft, F. (2002) Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. Diabetes, 51, 368-376. doi: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S368>

Queires, L. C., Fauvel-Lafève, F., Terry, S., De la Taille, A., Kouyoumdjian, J. C., Chopin, D. K., Vacherot, F., Rodrigues, L. E., Crépin, M. (2006) Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. Anticancer Research, 26, 379-87. PMID: 16475722

Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Amanchy, R., Upadhyayula, S. M. (2017). Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. Brazilian Archives of Biology and Technology, 60, e17160542. doi: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160542>

Rakotoarivelo, N. H., Rakotoarivony, F., Ramarosandratana, A. V., Jeannoda, V. H., Kuhlman, A. R., Randrianasolo, A., Bussmann, R. W. (2015). Medicinal plants used to treat the most frequent diseases encountered in Ambalabe rural community, Eastern Madagascar. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 11, 68. <http://doi.org/10.1186/s13002-015-0050-2>

Ratajczak, M., Kubicka, M.M., Kamińska, D., Sawicka, P., Długaszewska, J. (2015) Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. Saudi Pharmaceutical Journal, 23, 303-307. doi: 10.1016/j.jsps.2014.11.015

RENISUS (2009) Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>

Revelas, A. (2012) Healthcare – associated infections: A public health problem. *Nigerian Medical Journal*, 53, 59-64. doi: 10.4103/0300-1652.103543

Riedl, K. M., Carando, S., Alessio, H. M., McCarthy, M., Hagerman, A. E. (2002) Antioxidant Activity of Tannins and Tannin-Protein Complexes: Assessment *In Vitro* and *In Vivo*. *Free Radicals in Food*, 14, 188-200. doi: 10.1021/bk-2002-0807.ch014

Robert, C., Moellering, Jr. (2012) MRSA: the first half century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 4-11. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr437>

Rocha, P. S., Campos, J. F., Nunes-Souza, V., Vieira, M. C., Boleti, A. P. A., Rabelo, L. A., Santos, E. L., de Picoli Souza, K. (2017) Antioxidant and Protective Effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi Against Doxorubicin-Induced Toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017. doi: 10.1007/s12010-017-2589-y

Rosas, E. C., Correa, L. B., Pádua, T. A., Costa, T. E., Mazzei, J. L., Heringer, A. P., Bizarro, C. A., Kaplan, M. A., Figueiredo, M. R., Henriques, M. G. (2015) Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 490-498. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.014

Salem, M. Z. M., El-Hefny, M., Ali, H. M., Elansary, H. O., Nasser, R. A., El-Settawy, A. A. A., El Shanhorey, N., Ashmawy, N. A., Salem, A. Z. M. (2018) Antibacterial activity of extracted bioactive molecules of *Schinus terebinthifolius* ripened fruits against some pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 120, 119-127. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.040

Salgueiro, A. C. F., Folmer, V., Silva, M. P., Mendez, A. S. L., Zemolin, A. P. P., Posser, T., Franco, J. L., Puntel, R. L., Puntel, G. O. (2016) Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 8902954. doi: 10.1155/2016/8902954

Salgueiro, A. C., Leal, C. Q., Bianchini, M. C., Prado, I. O., Mendez, A. S., Puntel, R. L., Folmer, V., Soares, F. A., Avila, D. S., Puntel, G. O. (2013) The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. pruinosa tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 81-87. doi: 10.1016/j.jep.2013.03.070

Salvi, A., Carrupt, P. A., Tillement, J. P., Testa, B. (2001) Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology*, 61, 1237-1242. doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00607-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00607-4)

Santana, J. S., Sartorelli, P., Guadagnin, R. C., Matsuo, A. L., Figueiredo, C. R., Soares, M. G., Silva, A. M., Lago, J. H. G. (2012) Essential oils from *Schinus terebinthifolius* leaves – chemical composition and *in vitro* cytotoxicity evaluation. *Pharmaceutical Biology*, 50, 1248-1253.

Santos, O. J., Barros-Filho, A. K. D., Malafaia, O., Ribas-Filho, J. M., Santos, R. H. P., Santos, R. A. P. (2012) *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) in

the healing process of gastrorrhaphy in rats. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 25, 140-146, 2012.

Santos, O. J., Malafaia, O., Ribas-Filho, J. M., Czecko, N. G., Santos, R. H., Santos, R. A. (2013) Influence of *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) and *Carapa guianensis* Aublet (andiroba) in the healing process of gastrorrhaphies. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 26, 84-91.

Scheid, T., Moraes, M. S., Henriques, T. P., Riffel, A. P. K., Belló-Klein, A., Poser, G. L. V., Ethur, E. M., Partata, W.A. (2018) Effects of Methanol Fraction from Leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on Nociception and Spinal-Cord Oxidative Biomarkers in Rats with Neuropathic Pain. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018: 5783412. doi: 10.1155/2018/5783412

Scheibe, C. L., Ribas-Filho, J. M., Czecko, N. G., Malafaia, O., Barboza, L. E., Ribas, F. M., Wendler, E., Torres, O., Lovato, F. C., Scapini, J. G. (2016) *Schinus terebinthifolius* raddi (Aroeira) and *Orbignya phalerata* mart. (Babassu) effect in cecorrhaphy healing in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 31, 402-410. doi: 10.1590/S0102-865020160060000007

Sena, L. A., Chandel, N. S. (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48, 158-167. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025

Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291-295. doi: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>

Silva, A. B., Silva, T., Franco, E. S., Rabelo, S. A., Lima, E. R., Mota, R. A., Câmara, C. A., Pontes-Filho, N. T., Lima-Filho, J. V. (2010) Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 158-163. doi: 10.1590/S1517-838220100001000023

Silva, F. R., Szpoganicz, B., Pizzolatti, M. G., Willrich, M. A., de Sousa E. (2002) Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 33-37. PMID: 12413705

Silva, G. B. P. G., Silvino, K. F., Bezerra, J. D. P., Farias, T. G. S., Araújo, J. M., Stamford, T. L. M. (2017) Antimicrobial activity of *Phoma* sp. URM 7221: An endophyte from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *African Journal of Microbiology Research*, 11, 1-7. DOI: 10.5897/AJMR2016.8326

Silva, J. H. S., Simas, N. K., Alviano, C. S., Alviano, D. S., Ventura, J. A., Lima, E. J., Seabra, S. H., Kuster, R. M. (2018) Atividade anti-*Escherichia coli* de extratos de frutos e folhas de *Schinus terebinthifolius*. *Natural Product Research*, 32, 1365-1368. doi: 10.1080/14786419.2017.1344657

Silva, M. A. B., Melo, L. V. L., Ribeiro, R. V., Souza, J. P. M., Lima, J. C. S., Martins, D. T. O., Silva, R. M. (2010) Ethnobotanical survey of plants used as anti-hyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 549-562. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400014>

Silva, M. M., Iriguchi, E. K. K., Kassuya, C. A. L., Vieira, M. C., Foglio, M. A., Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Souza, K. P., Formagio, A. S. N. (2017)

Schinus terebinthifolius: phenolic constituents and *in vitro* antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-inflammatory activities.

Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A. S. (2014) Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 18, 01-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1

Sofowora, A., Ogunbodede, E., Onayade, A. (2013) The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10, 210-229. PMID: 24311829

Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T. B., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B., Silva, F. R. (2004) Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products*, 67, 829-832. doi: 10.1021/np030513u

Stahl, W., Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351. doi: [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)

Stark, G. (2005) Functional consequences of oxidative membrane damage. *The Journal Membrane Biology*, 205, 01-16. doi: 10.1007/s00232-005-0753-8

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67, 257-268. doi: 10.1021/np030397v

Sudha, V., Govindaraj, R., Baskar, K., Al-Dhabi, N. A., Duraipandiyan, V. (2016). Biological properties of Endophytic Fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, e16150436. doi: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436>

Sugiura, T., Dohi, Y., Yamashita, S., Yamamoto, K., Tanaka, S., Wakamatsu, Y., Kimura, G. (2011) Malondialdehyde-modified LDL to HDL-cholesterol ratio reflects endothelial damage. *International Journal of Cardiology*, 147, 461-463. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.12.112>

Taylor, T. A., Unakal, C. G. (2017) *Staphylococcus aureus*. *StatPearls*, 2017. PMID: 28722898

Thiele, G. M., Duryee, M. J., Willis, M. S., Sorrell, M. F., Freeman, T. L., Tuma, D. J., Klassen, L. W. (2004) Malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) modified proteins induce pro-inflammatory and pro-fibrotic responses by liver endothelial cells. *Comparative Hepatology*, 3, 01-04. doi: 10.1186/1476-5926-2-S1-S25

Tonial, F., Maia, B. H. L. N. S., Gomes-Figueiredo, J. A., Sobottka, A. M., Bertol, C. D., Nepel, A., Savi, D. C., Vicente, V. A., Gomes, R. R., Glienke, C. (2016) Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Current Microbiology*, 72, 173-183. DOI: 10.1007/s00284-015-0929-0

Tonial, F., Maia, B. H. L. N. S., Sobottka, A. M., Savi, D. C., Vicente, V. A., Gomes, R. R., Glienke, C. (2017) Biological activity of *Diaporthe terebinthifolii* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 1-7. DOI: 10.1093/femsle/fnx026

- Traber, M. G., Atkinson, J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 04-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024
- Vairamon, S. J., Babu, M., Viswanathan, V. (2009) Oxidative stress markers regulating the healing of foot ulcers in patients with type 2 diabetes. *Wounds*, 21, 273-279. PMID: 25902714
- Zacchino, S. A., Butassi, E., Liberto, M. D., Raimondi, M., Postigo, A., Sortino, M. (2017) Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. *Phytomedicine*, 37, 27-48. doi: 10.1016/j.phymed.2017.10.018
- Zou, H., Zhou, B., Xu, G. (2017) SGLT2 inhibitors: a novel choice for the combination therapy in diabetic kidney disease. *Cardiovascular Diabetology*, 16, 65. doi: 10.1186/s12933-017-0547-1
- Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Hamid, S. B. A., Alhadi, A. A., Kadir, F. A., Yaeghoobi, M. (2015) Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 295-312. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.06.026
- Wet, H. D., Nciki, S., Vuuren, S. F. (2013) Medicinal plants used for the treatment of various skin disorders by a rural community in northern Maputaland, South Africa. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9, 51. doi: 10.1186/1746-4269-9-51
- Williamson, R., Collatz, E., Gutmann, L. (1986) Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance. *La Presse Médicale*, 15, 2282-2299. PMID: 2949269
- Wink, M. (2015) Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2, 251-286. doi: 10.3390/medicines2030251
- Winterbourn, C. C. (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82, 969-974. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Efeitos de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud no estresse oxidativo e controle glicêmico: estudo *in vitro* e *in vivo*

Artigo científico a ser submetido: Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Fator de impacto: 4.956

Estrato Qualis-Capes: A1 em Biotecnologia

Escopo: publica pesquisa original e artigos de revisão que tratam dos mecanismos celulares e moleculares do estresse oxidativo no sistema nervoso e sistemas relacionados ao envelhecimento, função imunológica, biologia vascular, metabolismo, sobrevivência celular e longevidade celular.

Qualidade microbiológica, perfil químico e atividade antioxidante e antidiabética de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Artigo científico a ser submetido: Plos One

Fator de impacto: 3.54

Estrato Qualis-Capes: A1 em Biotecnologia

Escopo: publica relatórios de pesquisas originais de ciências naturais, pesquisa médica, engenharia, bem como ciências sociais e ciências humanas relacionadas, que contribuirão para a base do conhecimento científico.

Compostos químicos, atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *Schinus teribinthifolius* Raddi

Artigo científico a ser submetido: Frontiers in Microbiology

Fator de impacto: 4.076

Estrato Qualis-Capes: A1 em Biotecnologia

Escopo: publica pesquisas rigorosamente revisadas por pares em todo o espectro da microbiologia.

5.1. Efeitos de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud no estresse oxidativo e controle glicêmico: estudo *in vitro* e *in vivo*

Resumo

O estresse oxidativo pode desencadear ou agravar diversas doenças, como diabetes. Associados, o estresse oxidativo e a hiperglicemia aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O objetivo desse estudo foi investigar a composição fitoquímica do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. (MEBr) e seus efeitos biológicos no controle do estresse oxidativo e glicêmico. Foram determinados por ensaios espectrofotométricos as concentrações de compostos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides e a presença de taninos condensados no MEBr. Os compostos fenólicos foram identificados por HPLC-DAD-MS/MS. A atividade antioxidante do MEBr foi observada nos ensaios de DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, poder redutor e branqueamento de β -caroteno. Em eritrócitos humanos, o MEBr aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase, reduziu a hemólise oxidativa e os níveis de malodialdeído (MDA). Adicionalmente, o apresentou atividade anti-glicação pelas vias frutose e glioxal. As elevações da hemoglobina glicada, colesterol e MDA do coração, induzidas pela dieta de alta gordura foram prevenidas pelo MEBr. Sobre parâmetros do controle glicêmico, o MEBr inibiu a atividade das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase e, em camundongos submetidos a sobrecarga de amido o MEBr reduziu a hiperglicemia pós-prandial. Em conjunto, o MEBr tem ação antioxidante e antihiperglicemiante, apresentando potencial para reduzir os danos do estresse oxidativo e contribuir para o controle glicêmico, provavelmente por ações mediadas pelos flavonoides glicosilados identificados no extrato.

Palavras-chave: pata-de-vaca, compostos fenólicos, antioxidante, produtos finais de glicação avançada, α -amilase e α -glicosidase

Introdução

O estresse oxidativo é uma condição caracterizada como desbalanço redox intracelular, decorrente do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em desequilíbrio com o sistema de defesa antioxidante do organismo (Lushchak et al., 2014). As EROs podem atuar sobre DNA, proteínas ou lipídeos e gerar danos celulares que desencadeiam o desenvolvimento de diversas doenças, como diabetes (Araki e Nishikawa, 2010; Han, 2016).

Diabetes é uma desordem metabólica que tem como principal característica a glicemia elevada (Kharroubi e Darwish, 2015). Em 2017, foram estimadas cerca de 451 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo e, os gastos globais com a saúde relacionados ao diabetes atingiram 850 bilhões de dólares (Cho et al., 2018).

A hiperglicemia estimula a produção de EROs e de produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais são fatores importantes na geração de danos cardiovasculares no quadro diabético (Yamagishi et al., 2012; Fiorentino et al., 2013). Dentre as abordagens terapêuticas promissoras para a prevenção e/ou tratamento de complicações diabéticas, está à utilização de produtos antioxidantes (Golbidi et al., 2011), anti-glicação (Abbas et al., 2016) e substâncias capazes de reduzir a absorção intestinal de glicose (Tundis et al., 2010).

Os compostos fenólicos são descritos por modular mecanismos antioxidantes e de controle glicêmico (Lü et al., 2010; Kim et al., 2016). Nesta perspectiva, as investigações para geração de produtos naturais para o controle do estresse oxidativo e hiperglicemia são extremamente relevantes. Neste sentido, as plantas medicinais vêm sendo estudadas por apresentar atividade antioxidante, anti-glicação e por serem capazes de regular a atividade de enzimas digestivas relacionadas ao controle glicêmico (Galeno et al., 2014; Hung et al., 2017).

Bauhinia rufa (Bong.) Steud. (Fabaceae), conhecida popularmente como pata-de-vaca, unha-de-vaca ou catinga-de-tamanduá, é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro e utilizada popularmente como hipoglicemiante (Silva et al., 2010; Caffaro et al., 2015). Não existem estudos sobre sua composição química e são escassos os relatos científicos que comprovem suas atividades

biológicas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a composição fitoquímica do extrato metanólico das folhas de *B. rufa* (MEBr) e, avaliar suas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, sobre o controle do estresse oxidativo e glicêmico.

Material e métodos

Material vegetal e preparação do MEBr

Folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud foram coletadas após autorização obtida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO n° 45365-1). O material vegetal foi coletado em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, sob as coordenadas geográficas 22° 13' 16" W 54° 48' 2". Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil (DDMS n° 4878). O material vegetal seco (360,60 g) foi mantido em maceração exaustiva em metanol P.A. O filtrado foi concentrado sob vácuo em evaporador rotativo a 45 °C e ao final liofilizado para obtenção do extrato metanólico das folhas de *B. rufa* (MEBr). O rendimento do MEBr foi de 16%.

Compostos químicos

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi determinado de acordo com o método descrito por Barros et al. (2007). O extrato (100 mg) foi misturado ao ácido metafosfórico 1% (10 mL). A mistura foi incubada a temperatura ambiente no escuro durante 45 min. Após esse período, a mistura foi filtrada com papel filtro Whatman n° 4. O filtrado (1 mL) foi misturado ao 2,6-diclorofenolindofenol (9 mL) e, incubado a temperatura ambiente no escuro durante 30 min. Após esse período, a absorbância foi mensurada a 515 nm. O ácido ascórbico (0,020-0,12 mg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/g de extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com o método descrito por Pinela et al. (2011). O extrato na concentração de 0,625 mg/mL (250 µL) foi misturado ao HCl 0,1% (250 µL, preparado em etanol 95%) e ao HCl 2% (4550 µL). A mistura foi incubada em temperatura ambiente durante 15

min. Após esse período, a absorvância foi mensurada a 280, 320 e 360 nm, para avaliação dos compostos fenólicos totais, ácido fenólicos e flavonoides, respectivamente. O ácido gálico (50-500 µg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão dos compostos fenólicos totais e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato. O ácido cafeico (50-500 µg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão dos ácidos fenólicos e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido cafeico (EAC)/g de extrato. A quercetina (30-300 µg/mL) foi utilizada para calcular a curva padrão dos flavonoides e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ)/g de extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Identificação dos compostos de MEBr por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS

O MEBr (6 µg) foi injetado no cromatógrafo Shimadzu LC-20AD UFLC, acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massa ESI-QTOF microTOF III. O DAD foi monitorado entre 240-800 nm e MS entre *m/z* 120-1200 em modo negativo e modo positivo. A energia de colisão (CID) MS/MS variou de 45 a 65 eV. A fase estacionária foi uma coluna de cromatografia Kinetex C-18 (Phenomenex, 2,6 µ, 150 x 2,1 mm) aplicando um gradiente de eluição de água (Fase A) e acetonitrila (Fase B), ambas com ácido fórmico 0,1%: 0-2 min 3% B; 2-25 min 3-25% B; 25-35 min 25-62% B, seguido de lavagem e recondicionamento da coluna (11 min). A vazão foi de 0,3 mL/min. Os dados foram processados usando o software Data Analysis versão 4.2 (Bruker) e os compostos foram identificados com base nos espectros de UV, tempo de retenção e perfil de fragmentação em comparação com a literatura.

Atividade antioxidante

Ensaio DPPH^{*}

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{*}) de acordo com o método descrito por Campos et al. (2014). O extrato nas concentrações finais de 0,1 a 1000 µg/mL (200 µL) foi misturado a solução de DPPH^{*} 0,11 mM (1800 µL, preparado em etanol 80%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 30 min. A absorvância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico e o butil-hidroxitolueno

(BHT) foram utilizados como controles positivos. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $(1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio ABTS^{•+}

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) de acordo com o método descrito por Campos et al. (2015). O radical livre ABTS^{•+} foi preparado pela mistura de ABTS 7 mM (5 mL) e persulfato de potássio 140 mM (88 µL). A mistura foi incubada em temperatura ambiente no escuro por 12-16 h. Após esse período, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol P.A. até atingir a absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Em seguida, o extrato nas concentrações finais de 0,1 a 200 µg/mL (20 µL) foi misturado a solução de ABTS^{•+} (1980 µL). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 6 min. A absorbância foi mensurada a 734 nm. O ácido ascórbico e BHT foram utilizados como controles positivos. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $[(\text{Abs}_{\text{controle}}/\text{Abs}_{\text{amostra}})/\text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio FRAP

A atividade antioxidante foi avaliada pelo poder redutor férrico (FRAP) de acordo com o método descrito por Pulido et al. (2000). O reagente FRAP foi preparado pela mistura da solução de TPTZ 10 mM (10 mL, preparado em HCl 40 mM), FeCl₃•6H₂O 20 mM (10 mL) e tampão acetato 300 mM, pH 3,6 (100 mL). O extrato nas concentrações de 1-1000 µg/mL (100 µL) foi misturado ao reagente FRAP (3 mL) e água destilada (300 µL). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 20 min. A absorbância foi mensurada a 595 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O controle

negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A concentração efetiva média (EC_{50}) da amostra foi determinada utilizando a equação de regressão correspondente. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio de poder redutor

A atividade antioxidante foi avaliada pelo poder redutor de acordo com o método descrito por Berker et al. (2007). O extrato nas concentrações de 1-1000 $\mu\text{g/mL}$ (1 mL) foi misturado ao tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 (2,5 mL) e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% (2,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Após esse período, foi adicionado ácido tricloroacético 10% (2,5 mL). A uma alíquota dessa mistura (2,5 mL) foram adicionados, água (2,5 mL) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (0,5 mL). A absorbância foi mensurada a 700 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A concentração efetiva média (EC_{50}) da amostra foi determinada utilizando a equação de regressão correspondente. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio de branqueamento de β -caroteno

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do branqueamento de β -caroteno de acordo com o método descrito por Taga et al. (1984). A solução de β -caroteno foi preparada pela mistura de β -caroteno (2 mg) e clorofórmio (10 mL). A emulsão de reação foi preparada em uma balão de ebulição, pela mistura da solução de β -caroteno (1 mL), ácido linoléico (20 mg) e Tween 40 (200 mg), o clorofórmio foi removido utilizando um evaporador rotativo a 40 °C e, por último, água destilada oxigenada (50 mL) foi adicionada. O extrato nas concentrações de 1-1000 $\mu\text{g/mL}$ (0,2 mL) foi misturado à emulsão (5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 60 min. A absorbância foi mensurada a 470 nm no tempo 0 (antes da incubação) e 60 min (após a incubação). O hidroxianisol butilado (BHA) foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. O branco consistiu na mistura de 2 mg de ácido linoleico, 20 mg de Tween 40 e 5 mL de água oxigenada. A porcentagem de inibição foi

calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $(1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio de enzimas antioxidantes

Os ensaios para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes foram realizados em microplacas, utilizando suspensão de eritrócitos 1:200 (preparada em tampão fosfato de potássio a 25 mM, pH 7,5, suplementado com albumina de soro bovino 0,1% e EDTA 1 mM). O extrato nas concentrações finais de 50 a 250 µg/mL foi misturado a suspensão de eritrócitos. A mistura foi incubada à 37 °C durante 20 min. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada utilizando o kit comercial Fluka[®] de acordo com as instruções do fabricante. Os dados são expressos como a unidade internacional (UI) normalizada para a concentração de hemoglobina em mM/L (UI/Hb, mM).

A atividade da catalase (CAT) foi determinada espectrofotometricamente pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), de acordo com o método descrito por Xu et al. (2008), com modificações para microplacas. Os dados foram normalizados para os níveis de hemoglobina e, a atividade foi expressa em µM/min/mL/mM Hb.

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Paglia e Valentine (1967), adaptado para microplacas. Os dados foram normalizados pelos níveis de hemoglobina e a atividade enzimática foi expressa em nM/min/mL/ Hb, mM.

Eritrócitos humanos

O ensaio utilizando eritrócitos humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Brasil (CEP n° 1.739.987). A atividade antioxidante em modelo de eritrócitos humanos foi realizada de acordo com o método descrito por Rocha et al. (2017). O sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo citrato de sódio. Os tubos foram centrifugados a 2000 xg durante 5 min para descarte do plasma sanguíneo e leucócitos. Os eritrócitos foram

lavados três vezes com solução de cloreto de sódio 0,9% (NaCl) e, em seguida, uma suspensão de eritrócitos 10% foi preparada em NaCl 0,9%.

Hemólise e hemólise oxidativa

O extrato nas concentrações finais de 50 a 250 µg/mL (250 µL) foi misturado a suspensão de eritrócitos 10% (250 µL). A mistura foi pré-incubada à 37 °C durante 30 min. Após esse período, foi adicionada a solução de NaCl 0,9% (500 µL) ou AAPH 50 mM (500 µL). A mistura permaneceu incubada a 37 °C durante 180 min, com agitação periódica. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 2000 xg durante 5 min. A absorbância do sobrenadante (200 µL) foi mensurada a 540 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A hemólise total (HT) foi induzida pela incubação da suspensão de eritrócitos (250 µL) com água destilada (750 µL). A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Hemólise = $(Abs_{amostra}/Abs_{HT}) \times 100$. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Dosagem de malondialdeído (MDA)

O extrato nas concentrações finais de 50 a 250 µg/mL (250 µL) foi misturado a solução de eritrócitos 10% (250 µL). A mistura foi pré-incubada à 35 °C durante 30 min. Após esse período, foi adicionada a solução de AAPH 50 mM (500 µL). A mistura permaneceu incubada a 37 °C durante 180 min, com agitação periódica. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 2000 xg durante 5 min e, o sobrenadante (500 µL) foi adicionado ao ácido tiobarbitúrico 10 nmol (1 mL) (preparado em tampão monobásico de fosfato de potássio 75 mM, pH 2,5) que posteriormente, foi incubado a 96 °C durante 45 min. Após esse período, o material foi resfriado e foram adicionados 4 mL de álcool n-butílico, seguido de agitação e centrifugação a 2000 xg por 15 min. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. O controle padrão foi preparado pela mistura de MDA 20 mM (500 µL) e ácido tiobarbitúrico (1 mL). Os níveis de MDA das amostras foram expressos em

nmol/mL, obtidos pela seguinte fórmula: $MDA \text{ (nmol/mL)} = ABS_{amostra} \times (20 \times 220,32 / ABS_{padrão})$. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

Ensaio anti-glicação

A atividade anti-glicação foi avaliada de acordo com o método descrito por Kiho et al. (2004). As soluções de frutose 0,1 mM, glioxal 30 mM e BSA 8 mg/mL foram preparadas em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, contendo azida de sódio 3 mM como agente antimicrobiano. O extrato nas concentrações finais de 1 a 100 µg/mL (30 µL) foi misturado ao BSA (300 µL) e a frutose ou glioxal (135 µL). A mistura foi incubada à 37 °C durante 48 h ou 72 h sob condições estéreis. A fluorescência foi detectada (λ_{ex} 330 nm e λ_{em} 420 nm) em leitor de microplacas. A quercetina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $\% \text{ Inibição} = (1 - \text{Fluorescência}_{amostra} / \text{Fluorescência}_{controle}) \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC_{50}) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Enzimas digestivas relacionadas ao controle glicêmico

Ensaio de alfa-amilase

O ensaio de α -amilase foi realizado de acordo com o método descrito por Kazeem et al. (2013). As soluções do substrato amido e da enzima α -amilase foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9). O extrato nas concentrações finais de 1 a 30 mg/mL (125 µL) foi misturado a α -amilase 0,5 mg/mL (125 µL). A mistura foi pré-incubada à 25 °C durante 10 min. Em seguida, para iniciar a reação foi adicionado amido 1% (125 µL). A mistura de reação permaneceu incubada a 25 °C durante 10 min e, a reação foi interrompida pela adição de ácido dinitrossalicílico (250 µL). A mistura foi incubada a 100 °C durante 5 min e, posteriormente resfriada. A mistura de reação foi diluída com água destilada (2,5 mL). A absorbância foi mensurada a 540 nm. A acarbose foi utilizada como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

% Inibição = $[(Abs_{controle}/Abs_{amostra})/Abs_{controle}] \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio de alfa-glicosidase

O ensaio de α -glicosidase foi realizado de acordo com o método descrito por Kazeem et al. (2013), utilizando α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*. As soluções do substrato p-nitrofenil glicopiranosídeo (pNPG) e da enzima α -glucosidase foram preparadas em tampão fosfato 20 mM, pH 6,9. O extrato nas concentrações finais de 1 a 100 μ g/mL (5 μ L) foi misturado a α -glicosidase 1 U/mL (10 μ L). A mistura foi pré-incubada à 37 °C durante 20 min. Em seguida, para iniciar a reação foi adicionado pNPG 3 mM (5 μ L). A mistura de reação permaneceu incubada a 37 °C durante 20 min e, a reação foi interrompida pela adição de Na₂CO₃ 0,1 M (200 μ L). A absorbância foi mensurada a 405 nm. A acarbose foi utilizada como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $[(Abs_{controle}/Abs_{amostra})/Abs_{controle}] \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Estudos *in vivo*

Os procedimentos experimentais com camundongos seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (parecer nº 37/2015 CEUA/UFGD). Camundongos C57Bl/6 com 20-30 g, 16-24 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados-MS, Brasil. Os camundongos foram alojados em microisoladores (5 camundongos por microisolador), mantidos em condições padrão (12 h de luz e 12 h de escuro, 22 \pm 2 °C), com acesso à água e ração *ad libitum*. Antes do início do experimento, os camundongos foram aclimatados às condições laboratoriais. A dose para os ensaios *in vivo* foi selecionada com base no estudo de toxicidade aguda. A dose escolhida foi um décimo da dose considerada segura.

Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado com base nos protocolos da *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)- Guidelines 425*. No primeiro dia, um camundongo fêmea C57Bl/6 em jejum de 8 h recebeu a dose de 2000 mg/kg de MEBr via gavagem. Sequencialmente, outros quatro camundongos foram submetidos a jejum durante 8 h e uma dose única de 2000 mg/kg de MEBr. O mesmo procedimento foi realizado posteriormente com outro grupo de camundongos utilizando a dose de 5000 mg/kg do MEBr, para definição da dose letal para 50% dos camundongos (DL₅₀). Os camundongos foram observados periodicamente durante as primeiras 24 h, posteriormente, uma vez ao dia durante 14 dias. A massa corporal, o consumo de água e ração foram registrados. Ao final do período de observação, todos os camundongos foram submetidos à eutanásia. Os órgãos (coração, pulmão, fígado e rins) foram retirados, pesados e analisados macroscopicamente. O sangue dos camundongos foi retirado para análises hematológicas.

Modelo de estresse oxidativo *in vivo*

O efeito do MEBr foi avaliado sobre modelo de estresse oxidativo *in vivo*, induzido pela dieta de alta gordura (HFD), constituída por 40% de gordura. O experimento foi realizado com camundongos C57Bl/6 machos, durante 12 semanas. Trinta camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos: (I) ND-Controle: dieta padrão e água via gavagem, (II) HFD-Controle: HFD e água via gavagem e, (III) HFD-MEBr: HFD e MEBr 200 mg/kg via gavagem. A dieta e a gavagem foram mantidas durante 90 dias. A massa corporal, o consumo de água e ração foram registrados semanalmente. Ao final do período de experimentação, todos os camundongos foram submetidos à eutanásia. Os órgãos foram retirados, pesados e os níveis de malondialdeído (MDA) foram avaliados. O sangue dos camundongos foi coletado para análises bioquímicas.

Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado seguindo metodologia descrita por Lanjhiyana et al. (2011). Para isso, foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 adultos. Os camundongos permaneceram em jejum durante

12 h e foram divididos em dois grupos de cinco camundongos cada: (I) Controle: água via gavagem e, (II) MEBr: extrato metanólico de *B. rufa* na dose única de 200 mg/kg via gavagem. Após 30 min da administração dos tratamentos, todos os camundongos receberam uma solução de glicose (2 g/kg) via gavagem. As amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal nos tempos 0 (imediatamente antes da administração de glicose), 30, 60, 90, 120 e 180 min (após a administração de glicose). Os níveis de glicose no sangue foram determinados utilizando o glicosímetro AccuChek[®] active.

Teste de tolerância ao amido

O teste de tolerância ao amido foi realizado seguindo metodologia descrita por Mohamed et al. (2015). Para isso, foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 adultos. Os camundongos permaneceram em jejum durante 12 h e foram divididos em dois grupos de cinco camundongos cada: (I) Controle: água via gavagem e, (II) MEBr: extrato metanólico de *B. rufa* na dose única de 200 mg/kg via gavagem. Após 30 min da administração dos tratamentos, todos os camundongos receberam uma solução de amido (3 g/kg) via gavagem. As amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal nos tempos -30 (imediatamente antes da administração dos tratamentos), 0 (imediatamente antes da administração de amido), 30, 60, 90, 120 e 180 min (após a administração de amido). Os níveis de glicose no sangue foram determinados utilizando o glicosímetro AccuChek[®] active.

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para análise dos dados nos testes de tolerância a glicose e ao amido foi empregado o Test t e calculada área sobre a curva (AUC). Para análise e comparação entre os grupos experimentais nos demais ensaios foi empregado o teste de variância ANOVA com pós-teste *Student Newman Keuls*. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism*, versão 5.0. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados

Determinação das concentrações totais de ácido ascórbico, fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides

As concentrações de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, ácidos fenólicos e flavonoides presentes no MEBr foram $0,034 \pm 0,002$ mg/g de extrato, $230,63 \pm 13,92$ mg EAG/g de extrato, $60,01 \pm 3,63$ mg EAC/g de extrato e $92,54 \pm 4,35$ mg EQ/g de extrato, respectivamente. Os principais compostos fenólicos do extrato foram os flavonoides.

Identificação de compostos por HPLC-DAD-MS

Os compostos presentes no MEBr foram identificados por HPLC-DAD-MS/MS (Figura 1 e Tabela 1). O pico 1 (m/z 330,1188 $[M+H]^+$, $C_{14}H_{19}NO_8$), gerou o fragmento m/z 168 ($C_8H_{10}NO_3$)⁺, referindo-se à perda de um grupo glicosídeo e, foi identificado como cianoglicosídeo com uma hexose e um ciano derivado com a fórmula $C_8H_9NO_3$, essa classe de compostos já foi relatada em *Bauhinia* (Fort et al., 2001; Erdemgil et al., 2003). O composto 2 (m/z 327,1074 $[M+H]^+$, $C_{15}H_{18}O_8$) mostrou um espectro UV compatível com um grupo coumaroil e foi identificado de acordo com os dados relatados por Anttonen et al. (2006) como coumaroil-O-hexosídeo. Os picos 3 e 4 m/z 413 ($C_{19}H_{34}O_8$) não absorveram no espectro UV monitorizado (240-800 nm) e, de acordo com dados reportados por Yoshikawa et al. (2007), pode ser identificado como megastigmane-O-hexosídeo.

Os outros compostos identificados no extrato mostraram espectros UV compatíveis com um esqueleto de flavonol, com duas bandas centradas em cerca de 270-280 nm e 340-360 nm. Esta classe é comumente encontrada no gênero *Bauhinia* (Ferrerres et al., 2012; Gašić et al., 2014; Farag et al., 2015). Os picos 5, 6, 7 e 11 (m/z 379 $[M-H]^-$, $C_{21}H_{20}O_{13}$), apresentaram o fragmento m/z 316 $[M-H^-hexose]^-$, compatível com a perda de um grupo hexosídeo, identificados como derivados de miricetina-O-hexosídeo (Panda, et al., 2015). Os compostos 8 e 10 (m/z 449 $[M-H]^-$, $C_{20}H_{18}O_{12}$) formaram o mesmo fragmento mencionado (m/z 316), no entanto, neste caso, referindo-se perda de um pentosídeo, identificado como miricetina-O-pentosídeo (Ferrerres et al., 2012). Os compostos 12 e 13 m/z 463 $[M-H]^-$ foram compatíveis com a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{12}$, que contém um oxigênio a menos que os derivados de

miricetina-O-hexosídeo, e geraram o fragmento m/z 300 $[M-H^- \text{-hexose}]^-$, referindo-se à perda de um grupo hexosídeo, sendo identificado como quercetina-O-hexosídeo (Al-Sayed et al., 2016). Assim como, o composto 16 com m/z 447,0954 $[M-H]^-$, também gerou o íon radical m/z 300 e foi identificado como quercetina-O-deoxihexosídeo (Farag et al., 2015). O composto 15 (m/z 433,0754 $[M-H]^-$, $C_{20}H_{18}O_{11}$) foi identificado como quercetina-O-pentosídeo devido à perda de um grupo pentosídeo revelado pelo fragmento m/z 300 $[M\text{-pentose}]^-$ (Ferrerres et al., 2012). Enquanto o composto 17 (m/z 315,0499 $[M-H]^-$, $C_{16}H_{12}O_7$) forneceu o m/z 315 $[M-H]^-$ e foi identificado como metoxiquercetina, conferindo com os dados relatados por Farag et al. (2015) e Gašić et al. (2014).

Finalmente, o composto 14 (m/z 447,0908 $[M-H]^-$, $C_{21}H_{20}O_{11}$), apresentou fórmula molecular com um oxigênio a menos que a quercetina-O-hexosídeo e gerou o fragmento radical m/z 284,0299 $[M-H^- \text{-hexose}]^-$, relativo à perda de um grupo hexosídeo, identificado como kaempferol-O-hexosídeo (Ferrerres et al., 2012).

Todos os flavonoides identificados já foram relatados no gênero *Bauhinia* (Ferrerres et al., 2012; Gašić et al., 2014; Farag et al., 2015; Al-Sayed et al., 2016).

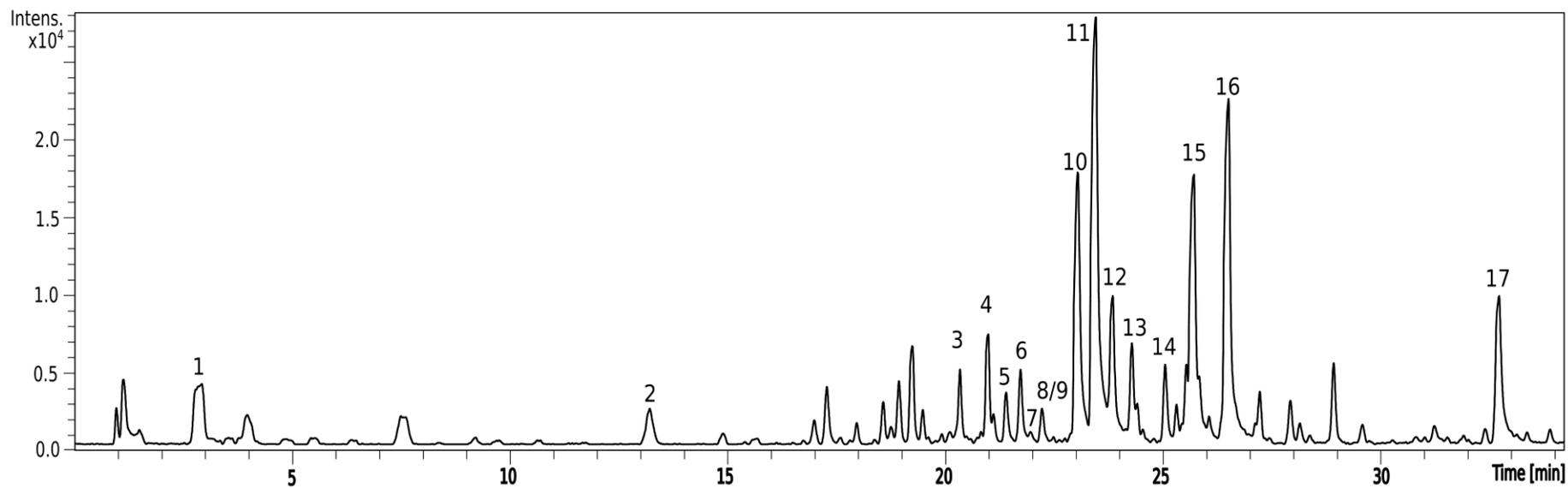


Figura 1. Cromatograma do pico de base no modo de ionização negativa do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr). Os picos 1-17 foram identificados na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos presentes no extrato metanólico de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr) identificados por HPLC-DAD-MS / MS.

Pico	RT (min)	UV (λ max)	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z) -	MS/MS (m/z) +	Composto/Classe
1	3	258	C ₁₄ H ₁₉ NO ₈	-	330,1188	-	168,0686	Cianoglicosídeo
2	13,2	280	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325,0919	327,1074	-	-	coumaroil- O-hexosídeo
3	20,4	-	C ₁₉ H ₃₄ O ₈	389,2131	391,2212	-	-	megastgmane- O-hexosídeo
4	21	-	C ₁₉ H ₃₄ O ₈	389,2137	391,2091	-	-	megastgmane- O-hexosídeo
5	21,4	270/350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,082	481,0986	316,0189	319,0474; 273,0419;245,0471	miricetina- O-hexosídeo
6	21,8	270/350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0811	481,0992	316,0204	-	miricetina- O-hexosídeo
7	22	270/350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0772	481,0977	-	-	miricetina- O-hexosídeo
8	22,3	270/350	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	-	451,881	-	319,0459; 273,0394	miricetina- O-pentosídeo
9	22,3	270/350	-	-	563,2158	-	-	desconhecido
10	23,1	260/351	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449,0703	451,0887	316,0201; 287,0269; 271,0220	319,0470; 273,0368; 165,0159.	miricetina- O-pentosídeo
11	23,5	256/348	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0863	465,1026	316,0210; 271,0257; 178,9971	319,0433; 245,0471; 153,0141	miricetina- O-hexosídeo
12	23,9	258/350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0866	465,1039	300,0248; 271,0235	303,0611	quercetina- O-hexosídeo
13	24,4	268/350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0864	465,1047	300,0253;	303,0513	quercetina- O-hexosídeo
14	25,6	265/340	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0908	449,1081	284,0299	287,0552	kaempferol- O-hexosídeo
15	25,8	260/351	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0754	435,0921	300,0257; 271,0254; 255,0295; 178,9950	303,0476; 257,0433; 229,0515; 201,0507	quercetina- O-pentosídeo
16	26,5	255/347	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0904	449,1097	300,0257; 271,0238; 178,9948	303,0515; 257,0440; 229,0501	quercetina- O-deoxihexosídeo
17	32,7	270/360	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315,0499	317,0657	300,0277; 271,0242; 255,0283	302,0423; 274,0486; 228,0422;	metoxiquercetina

RT: tempo de retenção.

Atividades *in vitro*

Antioxidante

A atividade antioxidante do MEBr foi observada nos ensaios DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, poder redutor, branqueamento de β -caroteno (Tabela 2), atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx (Figura 2), hemólise oxidativa e dosagem de MDA em eritrócitos humanos (Figura 3) e atividade anti-glicação (Tabela 3).

Em relação aos controles utilizados, a concentração do MEBr capaz de inibir 50% (IC₅₀) do radical DPPH[•] e ABTS^{•+} foi maior que o ácido ascórbico (aproximadamente 3 vezes) e menor que o BHT (aproximadamente 3 vezes) (Tabela 2). As concentrações efetivas médias (EC₅₀) do MEBr nos ensaios FRAP e poder redutor foram maiores que o ácido ascórbico (aproximadamente 4 e 5 vezes, respectivamente) (Tabela 2). No ensaio de branqueamento do β -caroteno, o MEBr apresentou IC₅₀ maior que o BHA (aproximadamente 52 vezes) (Tabela 2). A IC₅₀ do ácido ascórbico não foi detectada no ensaio de branqueamento de β -caroteno (Tabela 2).

Em eritrócitos humanos, o MEBr aumentou a atividade da enzima antioxidante SOD em todas as concentrações avaliadas (50-250 μ g/mL), de maneira independente da concentração (aproximadamente $17 \pm 1\%$) e, não alterou a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx (Figura 2).

A incubação dos eritrócitos humanos com MEBr não promoveu hemólise durante 180 min de avaliação nas concentrações testadas (Figura 3). O MEBr reduziu o estresse oxidativo induzido pelo agente oxidante AAPH em eritrócitos humanos, como observado pelos menores níveis de hemólise ($50 \pm 4\%$, $35 \pm 3\%$, $29 \pm 3\%$ e $35 \pm 10\%$) e de MDA gerados ($72 \pm 8\%$, $50 \pm 3\%$, $41 \pm 6\%$ e $27 \pm 2\%$), de maneira dependente da concentração (75, 100, 125 e 250 μ g/mL, respectivamente) (Figura 3).

O MEBr apresentou atividade anti-glicação, com IC₅₀ superior ao controle quercetina via frutose (aproximadamente 9 vezes) e via glioxal (aproximadamente 1,5 vezes) (Tabela 3).

Tabela 2. Atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr).

Amostra	DPPH [*]	ABTS ^{**}	FRAP	Poder redutor	Branqueamento β -caroteno
	IC ₅₀ (μ g/mL)		EC ₅₀ (μ g/mL)		IC ₅₀ (μ g/mL)
Ácido ascórbico	3,06 \pm 0,09	2,30 \pm 0,08	33,58 \pm 0,80	42,97 \pm 0,70	ND
Antioxidante lipofílico	21,49 \pm 0,39	22,77 \pm 2,18	-	-	3,80 \pm 0,10
MEBr	8,23 \pm 0,46	5,24 \pm 0,37	125,88 \pm 4,81	231,11 \pm 2,87	196,99 \pm 20,51

Antioxidante lipofílico: BHT para DPPH^{*} e ABTS^{**} e BHA para branqueamento de β -caroteno; -: não realizado; ND: não detectado. Os resultados são expressos em média \pm SEM.

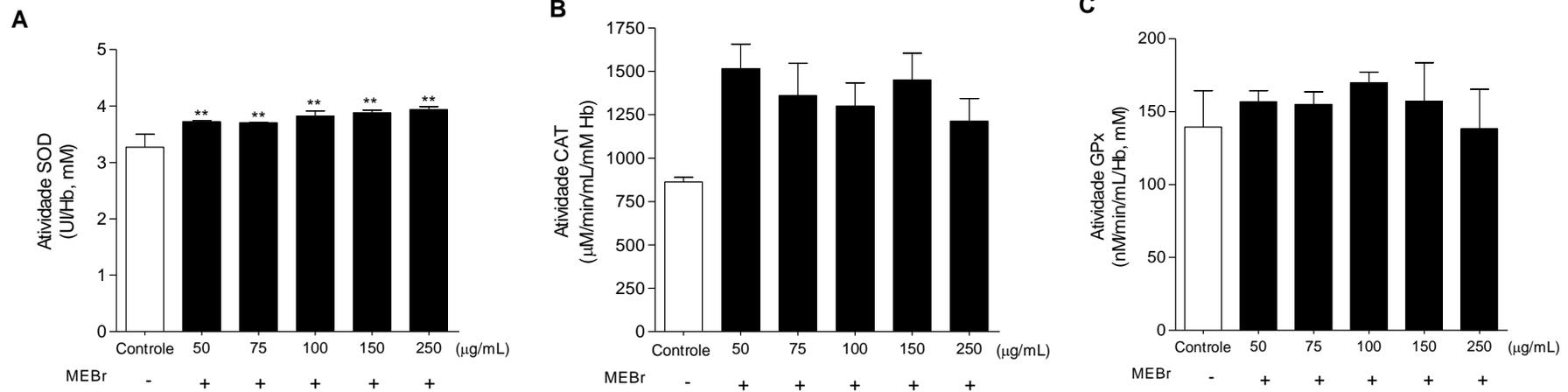


Figura 2. Efeito do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr) sobre a atividade de enzimas antioxidantes de eritrócitos humanos: (A) superóxido dismutase, (B) catalase e (C) glutatona peroxidase. Os valores são expressos como média \pm SEM. **P<0,01 versus Controle.

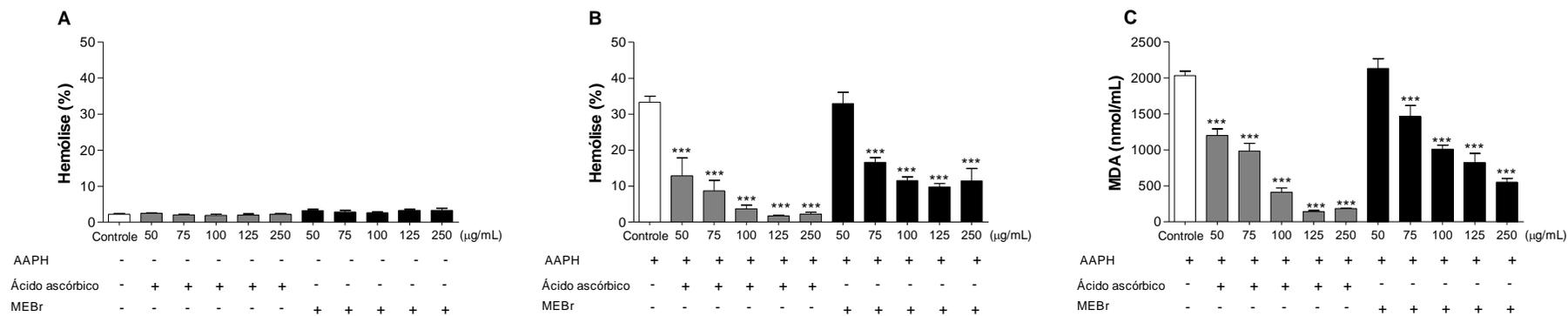


Figura 3. Efeito do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud. (MEBr) em eritrócitos humanos sobre (A) hemólise, (B) hemólise oxidativa induzida por AAPH 50 mM e respectivos (C) níveis de malondialdeído (MDA) gerados. Os valores são expressos como média ± SEM. ***P<0,001 versus Controle.

Tabela 3. Atividade anti-glicação do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr) via frutose e glioxal.

Amostra	Anti-glicação IC ₅₀ (µg/mL)	
	Frutose	Glioxal
Quercetina	0,32 ± 0,01	35,59 ± 0,48
MEBr	2,76 ± 0,09	53,13 ± 0,43

Os resultados são expressos em média ± SEM.

Enzimas digestivas relacionadas ao controle glicêmico

A tabela 4 demonstra o efeito do MEBr sobre a atividade das enzimas digestivas relacionadas ao controle glicêmico, α-amilase e α-glicosidase. O MEBr inibiu a atividade da enzima α-amilase aproximadamente 2 vezes, com IC₅₀ maior que a droga de referência acarbose. Sua ação inibitória também foi observada sobre a atividade da enzima digestiva α-glicosidase, embora a IC₅₀ da acarbose não tenha sido detectada para atividade dessa enzima.

Tabela 4. Efeito do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr) sobre a atividade das enzimas digestivas α-amilase e α-glicosidase relacionadas ao controle glicêmico.

Amostra	α-Amilase	α-Glicosidase
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Acarbose	3,39 ± 0,11	ND
MEBr	6,80 ± 0,09	16,54 ± 0,86

ND: não detectado. Os resultados são expressos em média ± SEM.

Atividades *in vivo*

Toxicidade aguda

A Tabela 5 apresenta os parâmetros antropométricos e hematológicos de camundongos tratados com MEBr no teste de toxicidade aguda. Não foi observada mortalidade durante o período experimental após a administração das doses de 2000 e 5000 mg/kg de MEBr. Os camundongos tratados com 2000 e 5000 mg/kg do MEBr não apresentaram alterações nos parâmetros antropométricos e hematológicos, exceto aumento do fígado na maior dose. Assim, considerando os dados em conjunto, a DL₅₀ do MEBr foi estimada como superior a 5000 mg/kg e, os ensaios *in vivo* seguiram com a dose de 200 mg/kg, ou seja, 10 vezes menor que a dose considerada segura nesse estudo.

Tabela 5. Efeito do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr) sobre parâmetros antropométricos e hematológicos de camundongos C57Bl/6 em teste de toxicidade aguda.

Parâmetros	Controle	MEBr	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Antropométricos			
Δ MC (%)	3,42 ± 0,95	1,48 ± 1,61	2,99 ± 1,89
Consumo de água (mL/dia)	5,10 ± 0,23	4,83 ± 0,43	4,53 ± 0,42
Consumo de ração (g/dia)	3,44 ± 0,16	3,41 ± 0,22	3,33 ± 0,21
Fígado (g/100 g de MC)	3,74 ± 0,05 ^a	3,83 ± 0,04 ^a	4,02 ± 0,06 ^b
Pulmão (g/100 g de MC)	0,62 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,61 ± 0,01
Rins (g/100 g de MC)	1,02 ± 0,02	1,03 ± 0,02	1,04 ± 0,01
Coração (g/100 g de MC)	0,49 ± 0,03	0,56 ± 0,02	0,55 ± 0,02
Hematológicos			
Contagem de hemácias (mm ⁶)	9,75 ± 0,16	9,65 ± 0,10	9,66 ± 0,08
Hemoglobina (g/L)	13,82 ± 0,18	13,74 ± 0,18	14,17 ± 0,17
VCM (fL)	55,92 ± 0,33	56,26 ± 0,28	56,87 ± 0,16
HCM (pg)	14,23 ± 0,06	14,24 ± 0,07	14,46 ± 0,21
CHCM (g/dL)	25,34 ± 0,23	25,32 ± 0,19	25,78 ± 0,14
Plaquetas (mm ³)	904,60 ± 52,23	883,40 ± 26,46	941,33 ± 8,59
Contagem de leucócitos (mm ³)	3,58 ± 0,29	3,17 ± 0,36	3,13 ± 0,24
Neutrófilos (%)	6,38 ± 2,30	4,14 ± 0,69	3,50 ± 0,60
Linfócitos (%)	93,08 ± 2,31	95,30 ± 0,64	95,93 ± 0,83
Monócitos (%)	0,30 ± 0,16	0,36 ± 0,12	0,45 ± 0,26

Δ MC (%): variação em % entre peso corporal final e inicial; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. Os valores são expressos como média ± SEM. N=5 camundongos por grupo. Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa entre os grupos (P <0,05).

Controle do estresse oxidativo

A tabela 6 apresenta os parâmetros antropométricos e bioquímicos de camundongos alimentados por 90 dias com as dietas padrão (ND-Controle) e de alta gordura (HFD). Os camundongos alimentados com HFD (grupo HFD-Controle) apresentaram aumento da massa corporal e da quantidade de calorias ingeridas além, de redução do consumo de água quando comparados aos camundongos alimentados com dieta padrão normolipídica (grupo ND-Controle) (Tabela 6). Os camundongos em HFD tratados com o MEBr (HFD-MEBr) apresentaram aumento na quantidade de calorias ingeridas e, no consumo de água quando comparados aos demais grupos (Tabela 6).

O efeito do MEBr no controle do estresse oxidativo em camundongos tratados com HFD foi observado pelos menores níveis de hemoglobina glicada (HbA1C) (Tabela 6) e de MDA do coração (Figura 4). As elevações de $20 \pm 3\%$ da HbA1C, de $45 \pm 8\%$ do colesterol e de $78 \pm 29\%$ do MDA do coração induzidas pela HFD foram prevenidas pelo tratamento com o MEBr. O grupo HFD-MEBr apresentaram níveis semelhantes aos camundongos tratados com dieta padrão (ND-Controle). Não foram observadas alterações na glicemia dos camundongos entre os grupos avaliados.

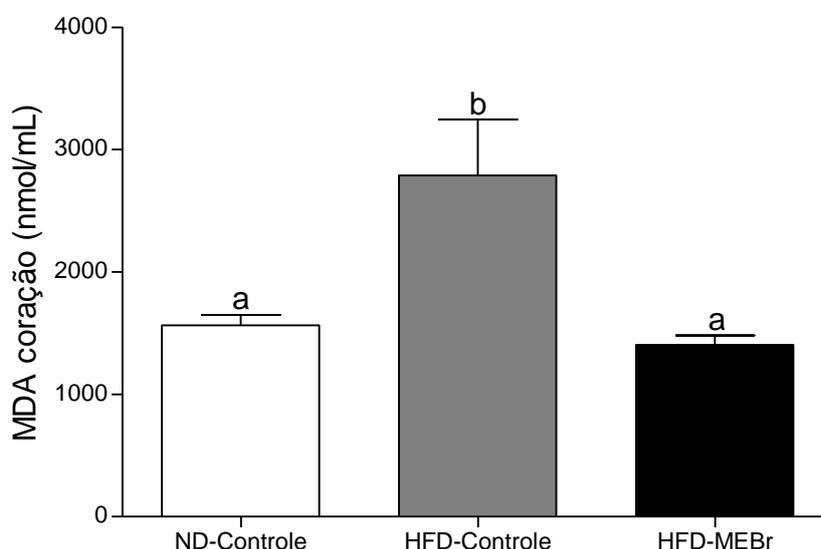


Figura 4. Malondialdeído (MDA) do coração de camundongos C57Bl/6 alimentados por 90 dias com as dietas padrão (ND-Controle) e de alta gordura (HFD). Os camundongos alimentados com HFD foram tratados com água (HFD-Controle) e extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (HFD-MEBr). Os valores são expressos como média \pm SEM. N=10. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos (P <0,05).

Tabela 6. Parâmetros antropométricos e bioquímicos de camundongos C57Bl/6 alimentados por 90 dias com as dietas padrão (ND-Controle) e de alta gordura (HFD). Os camundongos alimentados com HFD foram concomitantemente tratados com água (HFD-Controle) e extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (HFD-MEBr).

Parâmetros	ND-Controle	HFD-Controle	HFD-MEBr
Antropométricos			
Δ MC (%)	14,33 ± 2,60 ^a	31,89 ± 3,96 ^b	31,24 ± 5,05 ^b
Consumo de água (mL/dia)	2,89 ± 0,05 ^a	2,38 ± 0,02 ^b	3,20 ± 0,02 ^c
Consumo de ração (Kcal/dia)	9,46 ± 0,11 ^a	11,11 ± 0,09 ^b	12,79 ± 0,06 ^c
Fígado (g)	0,947 ± 0,031	0,897 ± 0,020	0,979 ± 0,036
Rins (g)	0,279 ± 0,09	0,254 ± 0,005	0,266 ± 0,007
Coração (g)	0,133 ± 0,005	0,123 ± 0,002	0,130 ± 0,002
Bioquímicos			
Glicemia (mg/dL)	147,52 ± 22,51	185,52 ± 13,76	174,80 ± 23,55
Colesterol (mg/dL)	76,33 ± 3,91 ^a	110,40 ± 6,02 ^b	84,60 ± 7,40 ^a
HbA1C (%)	2,09 ± 0,21 ^a	2,52 ± 0,06 ^b	1,89 ± 0,08 ^a

Δ MC (%): variação em % entre peso corporal final e inicial; HbA1C: hemoglobina glicada. Os valores são expressos como média ± SEM. N=10 camundongos por grupo. Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística significativa entre os grupos (P <0,05).

Controle glicêmico

A figura 5 demonstra os efeitos do MEBr na glicemia de camundongos normoglicêmicos após sobrecarga de glicose e amido. O extrato não alterou a glicemia após sobrecarga de glicose (Figura 5 A e B). Contudo, após sobrecarga de amido, foi observada redução do pico glicêmico aos 30 min em $20 \pm 2\%$ (Figura 5C), bem como, a glicemia pós-prandial em $14 \pm 1\%$, avaliada pela AUC até 120 min (Figura 5C).

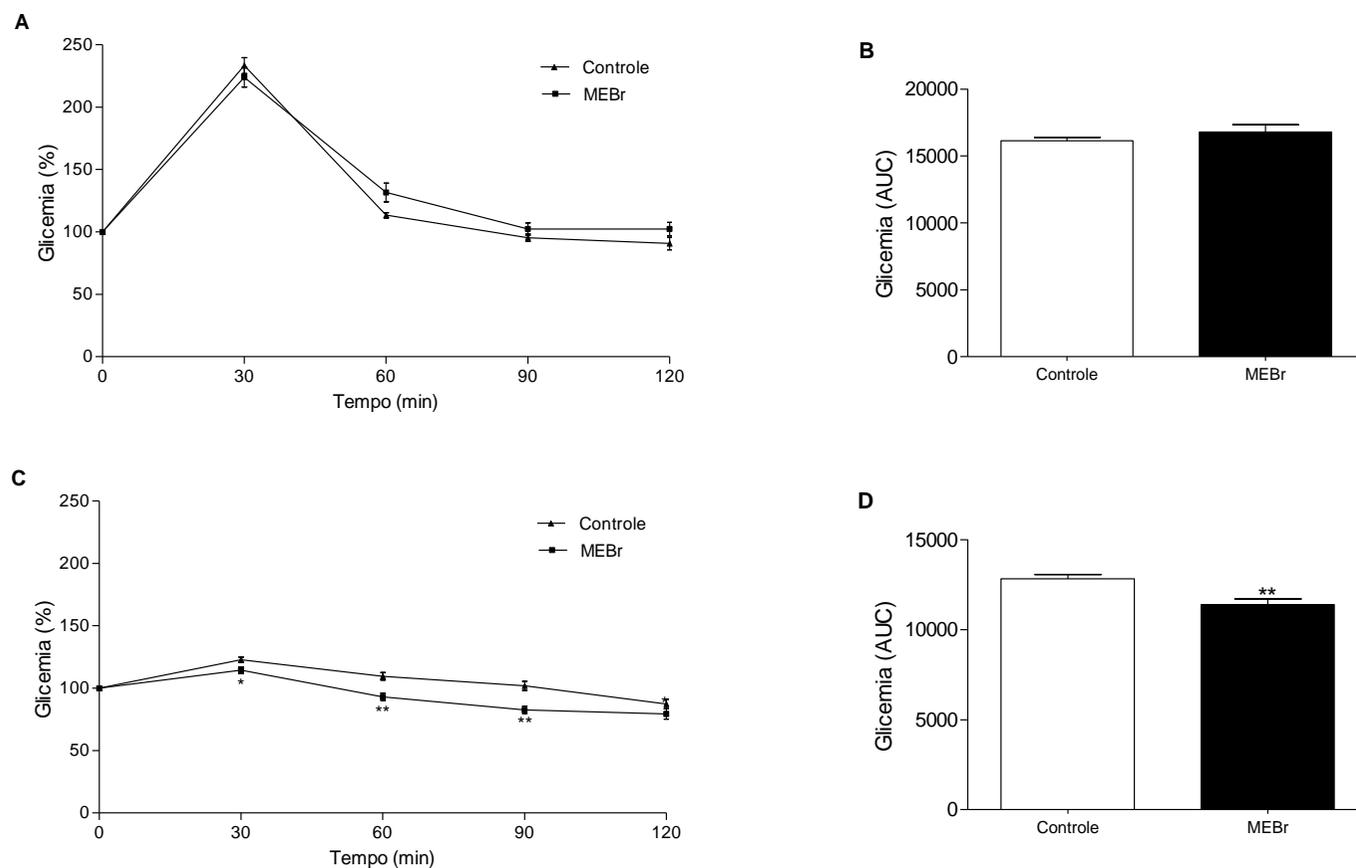


Figura 5. Efeitos do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (MEBr) (200 mg/kg) em camundongos C57Bl/6 normoglicêmicos após sobrecarga de glicose e amido: (A) glicemia e (B) AUC obtidos no teste de tolerância à glicose; (C) glicemia e (D) AUC obtidos no teste de tolerância ao amido. Os grupos Controle receberam água via gavagem. Os valores são expressos como média \pm SEM. N=5. *P<0,05; **P<0,01 versus Controle.

Discussão

Este estudo investigou pela primeira vez a composição fitoquímica do MEBr e seus efeitos biológicos sobre o controle do estresse oxidativo e glicêmico. Dentre os compostos fenólicos presentes no MEBr foram identificados diversos compostos fenólicos, como flavonoides glicosilados, constituídos pelas agliconas miricetina, quercetina e kaempferol, além de cianoglicosídeo, megastigmane glicosídeo e glicosídeos de flavonoides p-coumaroil.

Os compostos fenólicos são descritos por seu potencial antioxidante, atribuído a sua habilidade de redução e capacidade em inibir reações de peroxidação lipídica, conferida por seus grupos hidroxilas (Foti, 2007; Ružić et al., 2010; Alov et al., 2015). A atividade antioxidante do MEBr foi observada pela estabilização de moléculas radicalares nos ensaios DPPH[•], ABTS^{•+}, pela sua capacidade de redução nos ensaios FRAP e poder redutor e pela inibição da oxidação em substrato lipídico no ensaio de branqueamento do β -caroteno pelo ácido linoleico.

As agliconas miricetina, quercetina e kaempferol, como as presentes no MEBr, são reconhecidos antioxidantes, além disso, cianoglicosídeo, megastigmane glicosídeo e glicosídeos de flavonoides p-coumaroil também já foram descritos por seu potencial antioxidante (Silva et al., 2013; Nomoto et al., 2013; Li et al., 2017). A glicosilação dos compostos fenólicos melhora sua bioatividade em sistemas biológicos (Xu et al., 2016; Xiao, 2017).

O desbalanço redox em sistemas biológicos pode desencadear ou agravar um estado patológico, como diabetes (Araki e Nishikawa, 2010). Os danos oxidativos celulares ocasionados pelo excesso de EROs podem ser prevenidos ou reduzidos pela modulação do balanço redox, por meio da inibição de radicais livres, como observado nesse estudo, mas também por outros mecanismos como a ativação de enzimas antioxidantes, redução da peroxidação lipídica e consequente preservação da membrana celular e dos processos decorrentes desta organela (Rani et al., 2016).

As enzimas antioxidantes contribuem para o balanço redox. O MEBr aumentou a atividade da enzima antioxidante SOD. A SOD é responsável por dismutar o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Zelko et al., 2002). O $O_2^{\bullet-}$ atua como uma molécula de sinalização, regulando

numerosos processos biológicos, entretanto, sua superprodução desencadeia o desenvolvimento de diversas doenças, como as cardiovasculares (Fukai e Ushio-Fukai, 2011; Chiste et al., 2015). Em condições fisiopatológicas o H_2O_2 pode reagir com o íon ferroso (Fe^{2+}) intracelular por meio da Reação de Fenton, gerando radical hidroxila ($\cdot OH$), considerado altamente reativo, pois não existe sistema endógeno de neutralização para esta molécula (Halliwell e Gutteridge, 1992).

O flavonoide glicosilado miricetina presente no MEBr já foi associado ao aumento da atividade de SOD e redução da peroxidação lipídica no fígado, rim e pulmão de camundongos diabéticos alimentados com HFD (Baldissera et al., 2016). Em estudos recentes, compostos fenólicos, como cianoglicosídeo e glicosídeos de flavonoides com p-coumaroil, exibiram atividade de quelação de metal (Fe^{2+}) o que pode impedir a formação do $\cdot OH$ (Perron e Brumaghim, 2009; Silva et al., 2013; Li et al., 2017). Assim, considerando a presença dos flavonoides glicosilados no MEBr, todos os mecanismos anteriormente apresentados podem estar associados ao efeito do extrato sobre o controle do estresse oxidativo observados pelos menores níveis de hemólise e MDA em eritrócitos humanos.

Adicionalmente, o estresse oxidativo associado à hiperglicemia aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Fiorentino et al., 2013). A hiperglicemia eleva a produção de radicais livres, principalmente por proporcionar a glicação de proteínas ou formação de AGEs (Singh et al., 2014). Os AGEs constituem uma variedade de moléculas formadas pela interação amino-carbonila, de proteínas e açúcares redutores (Singh et al., 2014). Alguns flavonoides glicosilados de quercetina e kaempferol foram associados à atividade anti-glicação (Lal et al., 2012; Ahmad et al., 2016). O MEBr apresentou atividade anti-glicação, além de prevenir o aumento da HbA1C em camundongos alimentados com HFD.

O consumo de dieta de alta gordura (HFD) promove o estresse oxidativo pela redução da atividade do sistema antioxidante endógeno, aumento dos produtos de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (Rani et al., 2016). Nessa condição, o estresse oxidativo com decorrente disfunção mitocondrial é reconhecido como contribuinte para o dano cardiovascular em

camundongos alimentados com HFD, devido a produção de AGEs (Yu et al., 2017).

A redução do estresse oxidativo cardíaco pelo MEBr em camundongos alimentados com HFD foi observada pelos menores níveis de MDA gerados no coração e, podem estar relacionados aos flavonoides glicosilados presente no MEBr e seu potencial antioxidante, demonstrado pela sua ação estimulatória sobre a atividade da enzima antioxidante SOD e seus efeitos anti-glicação.

Adicionalmente, a hiperglicemia pós-prandial aumenta a produção de $O_2^{\cdot-}$ e, pode gerar produtos de glicação e peroxidação lipídica, que atuam como ativadores de quinases que geram a disfunção endotelial e conseqüentemente o desenvolvimento das complicações microvasculares e macrovasculares do diabetes, que aumentam o risco de eventos cardiovasculares (Yamagishi et al., 2012). Assim, o controle do metabolismo de carboidratos por meio da inibição da absorção intestinal de glicose torna-se uma alternativa terapêutica para o controle glicêmico pós-prandial e comorbidades (Tundis et al., 2010). O MEBr inibiu a atividade das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase e, estas ações podem estar relacionadas a presença de flavonoides glicosilados no extrado, como quercetina, kaempferol e miricetina, os quais já foram associados à inibição da atividade dessas enzimas (Rubilar et al., 2011; Thanakosai and Phuwapraisirisan, 2013; Wubshet et al., 2015).

A redução da hiperglicemia pós-prandial por inibidores enzimáticos, como acarbose, sugere uma redução do risco de eventos cardiovasculares em longo prazo, em especial pelas menores complicações microvasculares e macrovasculares associadas a redução do estresse oxidativo. No entanto, o uso terapêutico de acarbose promove efeitos secundários, como desconforto abdominal, distensão, flatulência e diarreia, sendo utilizado apenas para o tratamento de diabetes (Standl et al., 2014) e portanto novas alternativas com menos efeitos colaterais têm sido investigadas.

O MEBr reduziu a glicemia pós-prandial em camundongos C57Bl/6 normoglicêmicos, após sobrecarga de amido. O flavonoide glicosilado quercetina já foi relatado por apresentar efeitos sobre o controle glicêmico (Heyman et al., 2014), bem como o kaempferol glicosilado, que já foi descrito por atuar sobre o controle glicêmico e metabolismo lipídico, pela regulação

negativa de receptores γ ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR- γ) e proteína de ligação a elemento regulador de esterol (SREBP-1c) (Zang et al., 2015).

Em conjunto, os efeitos biológicos apresentados pelo MEBr, provavelmente mediados pelos flavonoides glicosilados, indicam o potencial do extrato em reduzir danos do estresse oxidativo, por meio da redução do excesso de EROs por captação direta, ativação da enzima antioxidante SOD, prevenção da peroxidação lipídica e efeito anti-glicação, além de contribuir para o controle glicêmico por meio da inibição de enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase e modulação da glicemia pós-prandial. Portanto, *B. rufa* torna-se um alvo promissor para outros estudos e para o desenvolvimento de novos produtos coadjuvantes no tratamento da diabetes.

Referências

- Abbas, G., Al-Harrasi, A. S., Hussain, H., Hussain, J., Rashid, R., Choudhary, M. I. (2016) Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. *Pharmaceutical Biology*, 54, 198-206. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1028080>
- Ahmad, R., Ahmad, N., Naqvi, A. A., Exarchou, V., Upadhyay, A., Tuenter, E, Foubert, K., Apers, S., Hermans, N., Pieters, L. (2016) Antioxidant and Antiglycating Constituents from Leaves of *Ziziphus oxyphylla* and *Cedrela serrata*. *Antioxidants*, 5, 01-09. DOI: 10.3390/antiox5010009
- Al-Sayed, E., Tolba, M. F., Karonen, M. (2016) Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Flavonoids from *Bauhinia hookeri*. *Records of Natural Products*, 10, 812-817. DOI: http://www.acgpubs.org/RNP/2016/Volume10/Issue%201/97-RNP_1510-223-SI.pdf
- Alov, P., Tsakovska, I., Pajeva, I. (2015) Computational Studies of Free Radical-Scavenging Properties of Phenolic Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 85-104. DOI: 10.2174/1568026615666141209143702
- Anttonen, M. J., Karjalainen, R. O. (2006) High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Phenolics Grown either Conventionally or Organically. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7530-7538. DOI: 10.1021/jf0615350
- Araki, E., Nishikawa, T. (2010) Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation*, 1, 90-96. DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00013.x
- Barros, L., Ferreira, M. J., Queirós, B., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P. (2007) Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103, 413-419. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.038>
- Baldissera, G., Sperotto, N. D., Rosa, H. T., Henn, J. G., Peres, V. F., Moura, D. J., Roehrs, R., Denardin, E. L., Dal Lago, P., Nunes, R. B., Saffi, J. (2016) Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 1012-1021. DOI: 10.1016/j.jep.2016.10.056
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., Apak, R. (2007) Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.01.019>
- Caffaro, K. M., Júnior, J. X. A., Santos, J. M., Santos, R. M., Campesatto, E. A., Bastos, M. L. A. (2015) Integrative review on medical use and pharmacological activities *Bauhinia* genus plant. *Journal of Nursing*, 9, 9399-9405. DOI: 10.5205/reuol.6812-75590-1-ED.0908sup201509
- Campos, J. F., Santos, U. P., Macorini, L. F., Melo, A. M., Balestieri, J. B., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A., de Picoli Souza, K., Santos, E. L. (2014) Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from

Melipona orbignyi (Hymenoptera, Apidae). Food and Chemical Toxicology, 65, 374-380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>

Campos, J. F., Santos, U. P., Rocha, P. S., Damiao, M. J., Balestieri, J. B., Cardoso, C. A., Paredes-Gamero, E. J., Estevinho, L. M., Picoli Souza, K., Santos, E. L. (2015) Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 296186. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/296186>

Chiste, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z., Fernandes, E. (2015) Superoxide Anion Radical: Generation and Detection in Cellular and Non-Cellular Systems. Current Medicinal Chemistry, 22, 4234-4256. DOI: 10.2174/0929867322666151029104311

Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., Malanda, B. (2018) IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. Diabetes Research and Clinical Practice, 138, 271-281. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.02.023

Erdemgil, F. Z., Basera, K. H. C., Akbayb, P., Sticherb, O., Ihsan C. (2003) Thalictricoside, a New Phenolic Compound from *Thalictrum orientale*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 58, 632-636. PMID: 14577621

Farag, M. A., Sakna, S. T., M. El-fiky, N. M., Shabana, M. M., Wessjohann, L. A. (2015) Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. Phytochemistry, 119, 41-50. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.09.004

Ferreres, F., Izquierdo, A. G., Vinholes, J., Silva, S. T., Valentão, P., Andrade, P. B. (2012) *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. Food Chemistry, 134, 894-904. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.201

Fiorentino, T. V., Prioleta, A., Zuo, P., Folli, F. (2013) Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. Current Pharmaceutical Design, 19, 5695-5703. DOI: 10.2174/1381612811319320005

Formagio, A. S., Volobuff, C. R., Santiago, M., Cardoso, C. A., Vieira, M. C., Pereira, Z. V. (2014) Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in *Psychotria* Leaf Extracts. Antioxidants (Basel), 3, 745-757. DOI:10.3390/antiox3040745

Fort, D. M., Jolad, S. D., Nelson, S. T. (2001) Lithospermoside from *Bauhinia fassoglensis* (Fabaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 29, 439-441. PMID: 11182495

Foti, M. C. (2007) Antioxidant properties of phenols. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 59,1673-1685. DOI: 10.1211/jpp.59.12.0010

Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxidants & Redox Signaling, 15,1583-1606. DOI: 10.1089/ars.2011.3999

Galeno, D. M. L., Carvalho, R. P., Boleti, A. P., Lima, A. S., Almeida, P. D. O., Pacheco, C. C., Souza, T. P., Lima, E. S. (2014) Extract from *Eugenia*

punicifolia is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 311-324. DOI: 10.1007/s12010-013-0520-8

Gašić, U., Keckeš, S., Dabic, D., Trifkovic, J., Milojkovic, D., Natic, O. M., Tešić, Z. (2014) Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chemistry*, 145, 599-607. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.088

Golbidi, S., Ebadi, S. A., Laher, I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 7, 106-125. DOI: 10.2174/157339911794940729

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Letters*, 307, 108-112. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80911-Y

Han, C. Y. (2016) Roles of Reactive Oxygen Species on Insulin Resistance in Adipose Tissue. *Diabetes & Metabolism Journal*, 40, 272-279. DOI: 10.4093/dmj.2016.40.4.272

Heyman, L., Axling, U., Blanco, N., Sterner, O., Holm, C., Berger, K. (2014) Evaluation of Beneficial Metabolic Effects of Berries in High-Fat Fed C57BL/6J Mice. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2014: 403041. DOI: 10.1155/2014/403041

Hung, W. C., Ling, X. H., Chang, C. C., Hsu, H. F., Wang, S. W., Lee, Y. C., Luo, C., Lee, Y. T., Houng, J. Y. (2017) Inhibitory Effects of *Siegesbeckia orientalis* Extracts on Advanced Glycation End Product Formation and Key Enzymes Related to Metabolic Syndrome. *Molecules*, 22, 01-18. DOI: 10.3390/molecules22101785

Kazeem, M. I., Adamson, J. O., Ogunwande, I. A. (2013) Modes of inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* Benth leaf. *BioMed Research International*, 2013, 01-06. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/527570>

Kharroubi, A. T., Darwish, H. M. (2015) Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6, 850-867. DOI: 10.4239/wjd.v6.i6.850

Kiho, T., Usui, S., Hirano, K., Aizawa, K., Inakuma, T. (2004) Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 200-205. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.68.200>

Kim, Y., Keogh, J. K., Clifton, P. M. (2016) Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, 8, 01-17. DOI: 10.3390/nu8010017

Lal, Shyaula, S., Abbas, G., Siddiqui, H., Sattar, S. A., Choudhary, M. I., Basha, F. Z. (2012) Synthesis and antiglycation activity of kaempferol-3-O-rutinoside (nicotiflorin). *Medicinal Chemistry*, 8, 415-420. DOI: 10.2174/1573406411208030415

Lanjhiyana, S., Garabadu, D., Ahirwar, D., Bigoniya, P., Rana, A. C., Patra, K. C., Lanjhiyana, S. K., Karuppai, M. (2011) Antidiabetic activity of methanolic extract of stem bark of *Elaeodendron glaucum* Pers. in Alloxanized rat model. *Advances in Applied Science Research*, 2, 47-62. DOI: <http://www.imedpub.com/articles/antidiabetic-activity-of-methanolic-extract-of-stem-bark-ofelaodendron-glaucum-pers-in-alloxanized-rat-model.pdf>

- Li, X., Tian, Y., Wang, T., Lin, Q., Feng, X., Jiang, Q., Liu, Y., Chen, D. (2017) Role of the p-Coumaroyl Moiety in the Antioxidant and Cytoprotective Effects of Flavonoid Glycosides: Comparison of Astragaloside and Tiliroside. *Molecules*, 22, 1165-1176. DOI: 10.3390/molecules22071165
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., Chen, C. (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 840-860. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x
- Lushchak, V. I. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Mohamed, E. A., Ahmad, M., Ang, L. F., Asmawi, M. Z. Yam, M. F. (2015) Evaluation of α -glucosidase inhibitory effect of 50% ethanolic standardized extract of *Orthosiphon stamineus* benth in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 01-06. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/754931>
- Nomoto, Y., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H. (2013) Hirtionosides A-C, gallates of megastigmane glucosides, 3-hydroxyoctanoic acid glucosides and a phenylpropanoid glucoside from the whole plants of *Euphorbia hirta*. *Journal of Natural Medicines*, 67, 350-358. DOI: 10.1007/s11418-012-0692-5
- OECD. 425. Test N° 425 - Acute Oral Toxicity - Up-and-Down Procedure. <http://www.oecd.org/env/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure-9789264071049-en.htm>
- Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-169. PMID: 6066618
- Panda, P., Das, D., Dash, P., Ghosh, G. (2015) Therapeutic Potential of *Bauhinia racemosa* - A Mini Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 28, 169-179. DOI: <http://globalresearchonline.net/journalcontents/v32-2/28.pdf>
- Perron, N. R., Brumaghim, J. L. (2009) A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53, 75-100. DOI: 10.1007/s12013-009-9043-x
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2011) Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2983-2989. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.054>
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-402. DOI: 10.1021/jf9913458
- Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., Yadav, U. C. (2016) Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183-193. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.02.002

- Rocha, P. S., Campos, J. F., Souza, V. N., Vieira, M. C., Boleti, A. P. A., Rabelo, L. A., Santos, E. L., Souza, K. P. (2017) Antioxidant and Protective Effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi Against Doxorubicin-Induced Toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 01-16. DOI: 10.1007/s12010-017-2589-y
- Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., Shene, C. (2011) Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): sources of antioxidant compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1630-1637. DOI: 10.1021/jf103461k
- Ružić, I., Skerget, M., Knez, Z. (2010) Potential of phenolic antioxidants. *Acta Chimica Slovenica*, 57, 263-271. PMID: 24061721
- Silva, T. M. S., Lins, A. C. S., Sarmiento-Filha, M. J., Ramos, C. S., Agra, M. F., Camara, C. A. (2013) Riachin, a new cyanoglucoside from *Bauhinia pentandra* and its antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 49: 685-690. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10600-013-0707-9>
- Silva, M. A. B., Melo, L. V. L., Ribeiro, R. V., Souza, J. P. M., Lima, J. C. S., Martins, D. T. O., Silva, R. M. (2010) Ethnobotanical survey of plants used as anti-hyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 549-562. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400014>
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A. S. (2014) Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 18, 01-14. DOI 10.4196/kjpp.2014.18.1.1
- Standl, E., Theodorakis, M. J., Erbach, M., Schnell, O., Tuomilehto, J. (2014) On the potential of acarbose to reduce cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology*, 13, 01-12. DOI: 10.1186/1475-2840-13-81
- Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt, D. E. (1984) Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 928-931. DOI: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/bf02542169.pdf>
- Thanakosai, W., Phuwapraisirisan, P. (2013) First identification of α -glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. *Natural Product Communications*, 8, 1085-1088. PMID: 24079173
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F. (2010) Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 315-331. DOI: 10.2174/138955710791331007
- Xiao, J. (2017) Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 1874-1905. DOI: 10.1080/10408398.2015.1032400
- Xu, P., Costa-Goncalves, A. C., Todiras, M., Rabelo, L. A., Sampaio, W. O., Moura, M. M., Santos, S. S., Luft, F. C., Bader, M., Gross, V., Alenina, N., Santos, R. A. (2008) Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in mas gene-deleted mice. *Hypertension*, 51, 574-580. DOI: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102764>

- Xu, L., Qi, T., Xu, L., Lu, L., Xiao, M. (2016) Recent progress in the enzymatic glycosylation of phenolic compounds. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 35, 1-23. DOI: <https://doi.org/10.1080/07328303.2015.1137580>
- Zang, Y., Zhang, L., Igarashi, K., Yu, C. (2015) The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food & Function*, 6, 834-841. DOI: [10.1039/c4fo00844h](https://doi.org/10.1039/c4fo00844h)
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 337-349. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X)
- Yamagishi, S., Maeda, S., Matsui, T., Ueda, S., Fukami, K., Okuda, S. (2012) Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 663-671. DOI: [10.1016/j.bbagen.2011.03.014](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.014)
- Yoshikawa, M., Morikawa, T., Zhang, Y., Nakamura, S., Muraoka, O., Matsuda, H. (2007) Megastigmanes and Their Glucosides from the Whole Plant of *Sedum sarmentosum*. *Journal of Natural Products*, 70, 575-583. DOI: [10.1021/np068059s](https://doi.org/10.1021/np068059s)
- Yu, Y., Wang, L., Delguste, F., Durand, A., Guilbaud, A., Rousselin, C., Schmidt, A. M., Tessier, F., Boulanger, E., Neviere, R. (2017) Advanced glycation end products receptor RAGE controls myocardial dysfunction and oxidative stress in high-fat fed mice by sustaining mitochondrial dynamics and autophagy-lysosome pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 112, 397-410. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.012](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.012)
- Wubshet, S. G., Moresco, H. H., Tahtah, Y., Brighente, I. M. C., Staerk, D. (2015) High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). *Phytochemistry*, 116, 246-252. DOI: [10.1016/j.phytochem.2015.04.004](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.04.004)

5.2. Qualidade microbiológica, perfil químico e atividade antioxidante e antidiabética de *Schinus terebinthifolius* Raddi

Resumo

Schinus terebinthifolius Raddi, conhecida popularmente como pimenta-rosa, é uma espécie vegetal amplamente utilizada na medicina popular do Brasil para diversos fins. O objetivo desse estudo foi investigar a qualidade microbiológica, segurança de uso, perfil químico, potencial antioxidante e antidiabético de diferentes partes de *S. terebinthifolius*. Análises microbiológicas realizadas dos extratos metanólicos das raízes (MESR), cascas do caule (MESB) e folhas (MESL) de *S. terebinthifolius* revelaram ausência de crescimento microbiano. As concentrações de compostos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides e a presença de taninos condensados dos extratos foram determinados por ensaios espectrofotométricos. Os compostos fenólicos do MESL foram identificados por cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM). A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos ensaios de DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, poder redutor, branqueamento de β -caroteno e dosagem de MDA em eritrócitos humanos. As propriedades antidiabéticas dos extratos foram demonstradas *in vitro* pela inibição da enzima α -glicosidase e atividade anti-glicação via frutose e glicoxal. Após verificação de ausência de toxicidade aguda, *in vivo*, o MESL apresentou capacidade de reduzir a glicemia pós-prandial após sobrecarga de glicose em camundongos normoglicêmicos e, o consumo de água, de ração, massa do fígado, glicemia, hemoglobina glicada e níveis séricos de AST e ALT em camundongos diabéticos. Em conjunto, os extratos de *S. terebinthifolius* demonstram segurança microbiológica para uso e apresentam atividades antioxidante e antidiabética, provavelmente mediadas pelos compostos químicos presentes como, o ácido gálico, galotaninos e flavonols glicosilados.

Palavras-chave: pimenta-rosa, segurança de uso, compostos fenólicos, estresse oxidativo, controle glicêmico, diabetes

Introdução

Schinus terebinthifolius Raddi, pertencente à família Anacardiaceae, é uma planta medicinal nativa do Brasil, conhecida popularmente como aroeira-vermelha ou pimenta-rosa. Estudos prévios, demonstram que *S. terebinthifolius* apresenta dentre seus fitoquímicos, compostos fenólicos, aos quais são atribuídas diferentes atividades biológicas. Na medicina popular esta planta é utilizada para o tratamento de feridas e úlceras da pele, tumores, diarreia, artrite, infecções do trato urinário e do sistema respiratório (Brandão et al., 2006). Dentre as atividades farmacológicas descritas para esta planta, estão as atividades antimicrobiana (Silva et al., 2017a), antiulcerogênica (Carlini et al., 2010), anticâncer (Silva et al., 2017b), anti-histamínica (Nunes-Neto et al., 2017), anti-hipertensiva (Glória et al., 2017), anti-hiperalgésica (Piccinelli et al., 2015), cicatrizante (Estevão et al., 2017), anti-inflamatória (Silva et al., 2017b), e antioxidante (Rocha et al., 2017) em diferentes modelos.

A crescente utilização de plantas medicinais amplia a necessidade de estudos que comprovem sua eficácia e segurança de uso. Dentre os principais fatores que afetam essas características dos produtos naturais esta a qualidade microbiológica, pois, a presença e a quantidade de algumas espécies de microrganismos na matéria-prima podem influenciar diretamente a atividade biológica do produto final (Ratajczak et al., 2015). As análises microbiológicas das plantas medicinais e/ou produtos farmacêuticos não estéreis visam identificar e quantificar os microrganismos presentes, a fim de garantir a qualidade e segurança no uso destes produtos para saúde humana (Ratajczak et al., 2015).

Dentre as doenças atualmente consideradas epidemias globais e, com perspectivas de crescimento na população mundial, para a qual se busca constantemente novas alternativas terapêuticas, está o diabetes mellitus (Kharroubi e Darwish, 2015; Wild et al., 2004). Essa é uma doença multifatorial caracterizada pelo desenvolvimento de distúrbios metabólicos que envolvem inicialmente a elevação da glicemia em resposta a secreção deficiente de insulina (diabetes tipo 1) ou resistência celular a esse hormônio (diabetes tipo 2) (Kharroubi e Darwish, 2015).

A exposição prolongada à hiperglicemia está diretamente relacionada ao aumento dos níveis de radicais livres, que desencadeiam ou agravam o

quadro de estresse oxidativo. Em conjunto, essas alterações levam à anormalidades estruturais e funcionais do endotélio e outros tecidos, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e outras comorbidades em diabéticos (Node e Inoue 2009; Singh et al., 2014; Kharroubi e Darwish, 2015). As complicações diabéticas são potencializadas por fatores como a hiperglicemia pós-prandial e a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Node e Inoue 2009; Singh et al., 2014). Assim, plantas medicinais com propriedades antioxidantes e com capacidade de reduzir a hiperglicemia tornam-se alternativas no tratamento do diabetes.

Neste contexto, os objetivos deste estudo foram determinar a qualidade e segurança de uso, identificar os compostos químicos, avaliar as propriedades antioxidantes e antidiabéticas *in vitro* e *in vivo* de diferentes partes de *S. terebinthifolius*.

Material e métodos

Material vegetal e preparação do extrato

Raízes, cascas do caule e folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram coletadas após autorização obtida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO n° 45365-1). O material vegetal foi coletado em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, sob as coordenadas geográficas 22°11'43.7568"S e 54°56'8.0916" W. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil (DDMS n° 4889). Os materiais vegetais foram secos, pulverizados e posteriormente mantidos em maceração exaustiva em metanol P.A. O filtrado foi concentrado sob vácuo em evaporador rotativo a 45 °C e ao final liofilizado. Os rendimentos dos extratos metanólicos foram de aproximadamente 2% para raízes (MESR), 7% para cascas do caule (MESB) e 13% para as folhas (MESL) de *S. terebinthifolius*.

Análises microbiológicas

Para a avaliação dos microrganismos, 5 g de pó ou 1 g de extrato foram pesados assepticamente e homogeneizados com 45 ou 9 mL de solução de peptona estéril 0,5%, respectivamente. As diluições seriadas (1:10) da amostra foram preparadas a partir deste homogeneizado no mesmo diluente estéril.

Foram realizados dois ensaios independentes em duplicata, como descritos a seguir.

Microrganismos mesófilos e psicrófilos

A quantificação dos microrganismos mesófilos e psicrófilos totais foram realizadas seguindo a NP-3788 (2002). As diluições da amostra foram inoculadas por incorporação (1 mL) ou espalhamento (0,1 mL), utilizando o meio de cultura Plate Count Agar. A contagem de colônias foi realizada após incubação das placas a 30 °C durante 72 h ou 15 °C durante 5 dias, para microrganismos mesófilos e psicrófilos, respectivamente. Os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

Bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada em meio de cultura DG18. As diluições da amostra (0,1 mL) foram inoculadas por espalhamento e incubadas a 25 °C durante 5 dias, seguindo a ISO-21527-2 (2008). As contagens microbianas foram expressas como UFC/g.

Esporos *Clostridium* sp. sulfito-redutor

A quantificação de esporos *Clostridium* sp. sulfito-redutor foi realizada de acordo com ISO-15213 (2003). Para isso, diluições da amostra foram aquecidas a 80 °C durante 10 min. Posteriormente, 1 mL das diluições da amostra foram adicionadas aos tubos contendo base ágar de sulfito de ferro. Em seguida, adicionou-se outra camada de ágar. Após a solidificação, os tubos foram incubados a 37 °C durante 5 dias. O aparecimento de colônias negras foi considerado como um resultado positivo. Os resultados foram expressos como UFC/g.

***Salmonella* sp.**

A detecção de *Salmonella* sp. foi realizada utilizando o teste de imunodifusão 1-2, conforme descrito pela AOAC (1989). Os resultados foram obtidos após o pré-enriquecimento da amostra em água peptonada tamponada estéril (1:10) incubada a 37 °C durante 24 h. Os resultados foram interpretados visualmente acompanhando o desenvolvimento de um imunobanda.

Escherichia coli

A quantificação de *E. coli* foi realizada utilizando o sistema kit SimPlate da Bio Control de acordo com AOAC (2005). O meio de cultura fornecido foi pré-hidratado em 9 mL de água destilada e as diluições da amostra (1 mL) foram inoculadas, seguindo as recomendações do fabricante. O conteúdo foi vertido sobre placas contendo 84 poços. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A quantificação de *E. coli* foi determinada pela contagem do número de poços em que a fluorescência foi observada após a exposição à luz ultravioleta a 365 nm. As populações de *E. coli* foram definidas com base nos números de poços positivos, correlacionando com a tabela de conversão do SimPlate e expressas como UFC/g.

Staphylococcus aureus

Para verificar a presença de *S. aureus*, as diluições da amostra (0,1 mL) foram inoculadas por espalhamento em ágar Baird-Parker com Egg Yolk Tellurito Emulsion como descrito pela NP-4400-1 (2002), por 48 h a 37 °C. Os resultados foram expressos como UFC/g.

Bacillus cereus

A contagem de *B. cereus* foi realizada seguindo ISO 7932 (2004), utilizando Mannitol-egg yolk-polymyxin B agar (MYP). As diluições da amostra (0,1 mL) foram inoculadas por espalhamento e incubadas a 30 °C durante 24 h. A contagem de colônias típicas de *B. cereus* (com superfície seca e áspera, vermelho-púrpura com precipitado branco) foi expressa como UFC/g.

Compostos químicos

β-caroteno e licopeno

O β-caroteno e o licopeno foram determinados de acordo com o método descrito por Barros et al. (2007). O extrato (150 mg) foi misturado a acetona-hexano 4:6 (10 mL). A mistura foi agitada durante 1 min. Após esse período, a mistura foi filtrada utilizando papel filtro Whatman nº 4. A absorbância (A) foi mensurada a 453, 505 e 663 nm. Os conteúdos de β-caroteno e licopeno foram calculados de acordo com as seguintes equações: β-caroteno = 0,216 x A₆₆₃ -

$0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$; licopeno = $-0,0458 \times A_{663} + 0,372 \times A_{505} - 0,0806 \times A_{453}$. Os resultados foram expressos em mg de carotenoide/g de extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi determinado de acordo com o método descrito por Barros et al. (2007). O extrato (100 mg) foi misturado ao ácido metafosfórico 1% (10 mL). A mistura foi incubada a temperatura ambiente no escuro durante 45 min. Após esse período, a mistura foi filtrada com papel filtro Whatman nº 4. O filtrado (1 mL) foi misturado ao 2,6-diclorofenolindofenol (9 mL) e, incubado a temperatura ambiente no escuro durante 30 min. Após esse período, a absorbância foi mensurada a 515 nm. O ácido ascórbico (0,020-0,12 mg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/g de extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com o método descrito por Pinela et al. (2011). O extrato na concentração de 0,625 mg/mL (250 µL) foi misturado ao HCl 0,1% (250 µL, preparado em etanol 95%) e ao HCl 2% (4550 µL). A mistura foi incubada em temperatura ambiente durante 15 min. Após esse período, a absorbância foi mensurada a 280, 320 e 360 nm, para avaliação dos compostos fenólicos totais, ácido fenólicos e flavonoides, respectivamente. O ácido gálico (50-500 µg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão dos fenólicos totais e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato. O ácido cafeico (50-500 µg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão dos ácidos fenólicos e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido cafeico (EAC)/g de extrato. A quercetina (30-300 µg/mL) foi utilizada para calcular a curva padrão dos flavonoides e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ)/g de extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Identificação dos compostos de MESL por LC-DAD-MS

O extrato metanólico de folhas de *S. terebinthifolius* (MESL) foi analisado por LC-DAD-MS Prominence Shimadzu acoplado a um detector de arranjo de

diodos (DAD) e espectrômetro de massa (MicroTOF-Q III). Uma coluna Kinetex C18 (2,6 µm, 150 x 2,1 mm, Phenomenex) foi utilizada, aplicando-se com o volume de injeção, vazão e temperatura de forno de 4 µL, 0,3 mL/min e 50 °C, respectivamente. Acetonitrila (solvente B) e água (solvente A), ambos contendo ácido fórmico 0,1%, foram utilizados como fase móvel, utilizando o seguinte perfil de eluição por gradiente: 0-8 min 3% B, 8-30 min 8-25% B, 30-60 min 25-80% B e 60-63 min 80% B. Para a espectrometria de massa, nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador (4 Bar), gás de secagem (9 L/min) e de colisão aplicando uma voltagem no capilar de 2,5 kV. O extrato foi avaliado na concentração de 1 mg/mL em modo ionização negativa e positiva.

Atividade antioxidante

Ensaio DPPH[•]

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) de acordo com o método descrito por Campos et al. (2014). O extrato nas concentrações finais de 0,1 a 1000 µg/mL (200 µL) foi misturado a solução de DPPH[•] 0,11 mM (1800 µL, preparado em etanol 80%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 30 min. A absorbância foi mensurada a 517 nm. O ácido ascórbico e o butil-hidroxitolueno (BHT) foram utilizados como controles positivos. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $(1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio ABTS^{•+}

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) de acordo com o método descrito por Campos et al. (2015). O radical livre ABTS^{•+} foi preparado pela mistura de ABTS 7 mM (5 mL) e persulfato de potássio 140 mM (88 µL). A mistura foi incubada em temperatura ambiente no escuro por 12-16 h. Após esse período, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol P.A. até atingir a absorbância de 0,70 ± 0,05 a 734 nm. Em seguida, o extrato nas

concentrações finais de 0,1 a 200 µg/mL (20 µL) foi misturado a solução de ABTS^{•+} (1980 µL). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 6 min. A absorbância foi mensurada a 734 nm. O ácido ascórbico e BHT foram utilizados como controles positivos. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $[(Abs_{controle}/Abs_{amostra})/Abs_{controle}] \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio FRAP

A atividade antioxidante foi avaliada pelo poder redutor férrico (FRAP) de acordo com o método descrito por Pulido et al. (2000). O reagente FRAP foi preparado pela mistura da solução de TPTZ 10 mM (10 mL, preparado em HCl 40 mM, FeCl₃•6H₂O 20 mM (10 mL) e tampão acetato 300 mM, pH 3,6 (100 mL). O extrato nas concentrações de 1-1000 µg/mL (100 µL) foi misturado ao reagente FRAP (3 mL) e água destilada (300 µL). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 20 min. A absorbância foi mensurada a 595 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A concentração efetiva média (EC₅₀) da amostra foi determinada utilizando a equação de regressão correspondente. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio de poder redutor

A atividade antioxidante foi avaliada pelo poder redutor de acordo com o método descrito por Berker et al. (2007). O extrato nas concentrações de 1-1000 µg/mL (1 mL) foi misturado ao tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 (2,5 mL) e K₃Fe(CN)₆ 1% (2,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Após esse período, foi adicionado ácido tricloroacético 10% (2,5 mL). A uma alíquota dessa mistura (2,5 mL) foram adicionados, água (2,5 mL) e FeCl₃•6H₂O 0,1% (0,5 mL). A absorbância foi mensurada a 700 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A concentração

efetiva média (EC_{50}) da amostra foi determinada utilizando a equação de regressão correspondente. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio de branqueamento de β -caroteno

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do branqueamento de β -caroteno de acordo com o método descrito por Taga et al. (1984). A solução de β -caroteno foi preparada pela mistura de β -caroteno (2 mg) e clorofórmio (10 mL). A emulsão de reação foi preparada em uma balão de ebulição, pela mistura da solução de β -caroteno (1 mL), ácido linoléico (20 mg) e Tween 40 (200 mg), o clorofórmio foi removido utilizando um evaporador rotativo a 40 °C e, por último, água destilada oxigenada (50 mL) foi adicionada. O extrato nas concentrações de 1-1000 μ g/mL (0,2 mL) foi misturado à emulsão (5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 60 min. A absorbância foi mensurada a 470 nm no tempo 0 (antes da incubação) e 60 min (após a incubação). O hidroxianisol butilado (BHA) foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. O branco (zero no espectrofotômetro) consistiu na mistura de 2 mg de ácido linoleico, 20 mg de Tween 40 e 5 mL de água oxigenada. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $(1 - Abs_{amostra}/Abs_{controle}) \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC_{50}) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Dosagem de malondialdeído (MDA)

O ensaio utilizando eritrócitos humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Brasil (CEP nº 1.739.987). A atividade antioxidante em modelo de eritrócitos humanos foi realizada de acordo com o método descrito por Rocha et al. (2017). O sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo citrato de sódio. Os tubos foram centrifugados a 2000 xg durante 5 min para descarte do plasma sanguíneo e leucócitos. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução de cloreto de sódio 0,9% (NaCl) e, em seguida, uma suspensão de eritrócitos 10% foi preparada em NaCl 0,9%.

O extrato nas concentrações finais de 50 a 250 µg/mL (250 µL) foi misturado a suspensão de eritrócitos 10% (250 µL). A mistura foi pré-incubada à 37 °C durante 30 min. Após esse período, foi adicionada a solução de AAPH 50 mM (500 µL). A mistura permaneceu incubada a 37 °C durante 180 min, com agitação periódica. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 2000 xg durante 5 min e, o sobrenadante (500 µL) foi adicionado ao ácido tiobarbitúrico 10 nmol (1 mL) (preparado em tampão monobásico de fosfato de potássio 75 mM, pH 2,5) que posteriormente, foi incubado a 96 °C durante 45 min. Após esse período, o material foi resfriado e foram adicionados 4 mL de álcool n-butílico, seguido de agitação e centrifugação a 2000 xg por 15 min. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. O controle padrão foi preparado pela mistura de MDA 20 mM (500 µL) e ácido tiobarbitúrico (1 mL). Os níveis de MDA das amostras foram expressos em nmol/mL, obtidos pela seguinte fórmula: $MDA \text{ (nmol/mL)} = ABS_{amostra} \times (20 \times 220,32 / ABS_{padrão})$. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

Propriedades antidiabéticas

Ensaio de alfa-glicosidase

O ensaio de α-glicosidase foi realizado de acordo com o método descrito por Kazeem et al. (2013), utilizando α-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae*. A solução do substrato p-nitrofenil glicopiranosídeo (pNPG) foi preparada em tampão fosfato 20 mM, pH 6,9. O extrato nas concentrações finais de 1 a 100 µg/mL (5 µL) foi misturado a α-glicosidase 1 U/mL (10 µL). A mistura foi pré-incubada à 37 °C durante 20 min. Em seguida, para iniciar a reação foi adicionado pNPG 3 mM (5 µL). A mistura de reação permaneceu incubada a 37 °C durante 20 min e, a reação foi interrompida pela adição de Na₂CO₃ 0,1 M (200 µL). A absorbância foi mensurada a 405 nm. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $\% \text{ Inibição} = [(Abs_{controle}/Abs_{amostra})/Abs_{controle}] \times 100$. A concentração da

amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Ensaio anti-glicação

A atividade anti-glicação foi avaliada de acordo com o método descrito por Kiho et al. (2004). As soluções de frutose 0,1 mM, glioxal 30 mM e BSA 8 mg/mL foram preparadas em tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, contendo azida de sódio 3 mM como agente antimicrobiano. O extrato nas concentrações finais de 1 a 100 µg/mL (30 µL) foi misturado ao BSA (300 µL) e a frutose ou glioxal (135 µL). A mistura foi incubada à 37 °C durante 48 h ou 72 h sob condições estéreis. A fluorescência foi detectada (λ_{ex} 330 nm e λ_{em} 420 nm) em leitor de microplacas. A quercetina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $(1 - \text{Fluorescência}_{\text{amostra}} / \text{Fluorescência}_{\text{controle}}) \times 100$. A concentração da amostra capaz de inibir 50% (IC₅₀) foi determinada. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Estudos *in vivo*

Os procedimentos experimentais com camundongos seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (parecer n° 37/2015 CEUA/UFGD). Camundongos C57Bl/6 com 20-30 g, 16-24 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados-MS, Brasil. Os camundongos foram alojados em microisoladores (5 camundongos por microisolador), mantidos em condições padrão (12 h de luz e 12 h de escuro, 22 ± 2 °C), com acesso à água e ração *ad libitum*. Antes do início do experimento, os camundongos foram aclimatados às condições laboratoriais. A dose administrada para os ensaios *in vivo* foi selecionada com base no estudo de toxicidade aguda. A dose escolhida foi um décimo da dose considerada segura.

Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado com base nos protocolos da *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)- Guidelines 425*. No primeiro dia, um camundongo C57Bl/6 em jejum de 8 h recebeu a dose de 2000 mg/kg de MESL via gavagem. Sequencialmente, outros quatro camundongos foram submetidos a jejum durante 8 h e uma dose única de 2000 mg/kg de MESL. O mesmo procedimento foi realizado posteriormente com outro grupo de camundongos utilizando a dose de 5000 mg/kg do MESL, para definição da dose letal para 50% dos camundongos (DL₅₀). Os camundongos foram observados periodicamente durante as primeiras 24 h, posteriormente, uma vez ao dia durante 14 dias. A massa corporal, o consumo de água e ração foram registrados. Ao final do período de observação, todos os camundongos foram submetidos à eutanásia. Os órgãos (coração, pulmão, fígado e rins) foram retirados, pesados e analisados macroscopicamente.

Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado seguindo metodologia descrita por Lanjhiyana et al. (2011). Para isso, foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 adultos. Os camundongos permaneceram em jejum durante 12 h e foram divididos em quatro grupos de cinco camundongos cada: (I) Controle: água via gavagem, (II) Glib: glibenclamida 10 mg/kg via gavagem, (III) Met: metformina 100 mg/kg via gavagem e, (IV) MESL: extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* 200 mg/kg via gavagem. Todos os camundongos receberam uma solução de glicose (2 g/kg) via gavagem. As amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal nos tempos 0 (imediatamente antes da administração da glicose), 30, 60, 90, 120 e 180 min (após a administração da glicose). Os níveis de glicose no sangue foram determinados utilizando o glicosímetro AccuChek[®] active.

Indução de diabetes e procedimento experimental

Camundongos C57Bl/6 submetidos a 12 h de jejum foram induzidos ao diabetes por uma única injeção intraperitoneal de solução de aloxano monohidrato 180 mg/kg. A solução de aloxano monohidrato foi preparada com NaCl 0,9%. Após 72 h da injeção os níveis séricos de glicose foram

determinados com auxílio do glicosímetro AccuChek[®] active. Os camundongos com glicemia em jejum acima de 200 mg/dL foram considerados diabéticos.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos de cinco animais, sendo: (I) ND-Controle: camundongos normoglicêmicos tratados com água; (II) D-Controle: camundongos diabéticos tratados com água; (III) D-Met: camundongos diabéticos tratados com metformina 100 mg/kg e, (IV) D-MESL: camundongos diabéticos tratados com extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* 200 mg/kg. Os tratamentos foram administrados via gavagem durante 28 dias, uma vez ao dia. Após esse período, os camundongos foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os órgãos (coração, fígado e rins) foram retirados e pesados para cálculo de massa relativa (g de órgão por 100 g de massa corporal).

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para análise e comparação entre os grupos experimentais foi empregado o teste de variância ANOVA com pós-teste *Student Newman Keuls*, A área sobre a curva (AUC) foi empregada para o ensaio de GTT. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism*, versão 5.0. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados

Qualidade microbiológica

A tabela 1 apresenta a avaliação microbiológica das raízes (MESR), cascas do caule (MESB) e folhas (MESL) de *S. terebinthifolius*. O crescimento de microrganismos mesófilos foi observado no pó das raízes, cascas do caule e folhas de *S. terebinthifolius*. Colônias de microrganismos psicrófilos, bolores e leveduras cresceram no pó das raízes e cascas do caule. Não foi observado o crescimento de microrganismos patogênicos, exceto no pó das raízes, onde cresceram colônias de *B. cereus*. Contudo, nos extratos metanólicos preparados a partir do pó das raízes, cascas do caule e folhas de *S. terebinthifolius* não houve crescimento microbiano.

Tabela 1. Avaliações microbiológicas (UFC/g) do pó e do extrato metanólico da raiz, cascas do caule e folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

	Pó			Extrato		
	Raiz	Cascas do caule	Folhas	Raiz	Cascas do caule	Folhas
Microrganismos mesófilos	$1,90 \times 10^{-3} \pm 0,001$	$1,43 \times 10^0 \pm 0,11$	$5,17 \times 10^{-1} \pm 0,01$	ausente	ausente	ausente
Microrganismos psicrófilos	$4,70 \times 10^0 \pm 1,54$	$4,73 \times 10^1 \pm 7,70$	ausente	ausente	ausente	ausente
Bolores e leveduras	$1,93 \times 10^1 \pm 1,85$	$4,95 \times 10^1 \pm 7,70$	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>Clostridium</i> sulfito redutor	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>Salmonella</i> sp.	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>Escherichia coli</i>	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>Bacillus cereus</i>	$1,87 \times 10^1 \pm 7,21$	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente

Os valores são expressos como média \pm SEM.

Compostos químicos

A tabela 2 demonstra o conteúdo de compostos lipofílicos e hidrofílicos do MESR, MESB e MESL. Os compostos hidrofílicos se destacaram em todos os extratos sendo os compostos fenólicos majoritários. O MESB e MESL apresentaram maior concentração de ácidos fenólicos e flavonoides.

Tabela 2. Compostos lipofílicos e hidrofílicos do extrato metanólico da raiz (MESR), cascas do caule (MESB) e folhas (MESL) de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Compostos químicos	MESR	MESB	MESL
Lipofílico			
β-Caroteno (mg/g extrato)	0,054 ± 0,006	0,313 ± 0,027	1,455 ± 0,009
Licopeno (mg/g extrato)	0,029 ± 0,002	0,049 ± 0,008	0,013 ± 0,002
Hidrofílico			
Ácido ascórbico (mg/g extrato)	0,115 ± 0,002	0,123 ± 0,002	0,070 ± 0,003
Fenólicos (mg EAG/g extrato)	300,42 ± 9,30	274,94 ± 8,09	446,48 ± 28,93
Ácidos fenólicos (mg EAC/g extrato)	24,49 ± 1,80	49,12 ± 1,30	52,95 ± 4,23
Flavonoides (mg EQ/g extrato)	21,16 ± 2,65	55,72 ± 1,56	57,78 ± 3,79

Os valores são expressos como média ± SEM.

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do MESR, MESB e MESL foi observada nos ensaios DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, poder redutor, branqueamento de β -caroteno (Tabela 3) e dosagem de MDA em eritrócitos humanos (Figura 1).

Em relação aos controles utilizados, as concentrações dos extratos capazes de inibir 50% (IC₅₀) do radical DPPH[•] e ABTS^{•+} foram semelhantes ao ácido ascórbico e inferiores ao BHT (Tabela 3). As concentrações efetivas médias (EC₅₀) do MESL nos ensaios FRAP e poder redutor foram menores quando comparadas aos MESR e MESB e, aproximadamente duas vezes maiores em comparação ao ácido ascórbico (Tabela 3).

No ensaio de branqueamento de β -caroteno (Tabela 3), o MESL demonstrou menor IC₅₀ em comparação aos demais extratos e maior IC₅₀ que o antioxidante BHA (aproximadamente 18 vezes). A IC₅₀ do ácido ascórbico não foi detectada nesse ensaio.

Em eritrócitos humanos, os extratos reduziram o estresse oxidativo induzido pelo agente oxidante AAPH, demonstrado pelos menores níveis de MDA gerados (Figura 3). O MESL promoveu os menores níveis de MDA nas concentrações avaliadas (50 a 125 μ g/mL), comparado aos demais extratos e ao controle ácido ascórbico (Figura 3).

Tabela 3. Atividade antioxidante do extrato metanólico da raiz (MESR), cascas do caule (MESB) e folhas (MESL) de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Amostra	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	FRAP	Poder redutor	Branqueamento β-caroteno
	IC ₅₀ (µg/mL)		EC ₅₀ (µg/mL)		IC ₅₀ (µg/mL)
Ácido ascórbico	3,06 ± 0,16	2,31 ± 0,05	33,58 ± 0,80	42,97 ± 0,70	ND
Antioxidante lipofílico	37,45 ± 3,09	20,87 ± 1,82	-	-	3,80 ± 0,10
MESR	6,31 ± 0,06	3,25 ± 0,22	85,11 ± 4,27	133,52 ± 1,11	176,56 ± 21,30
MESB	4,50 ± 0,11	4,45 ± 0,49	116,33 ± 3,53	169,76 ± 1,90	220,37 ± 35,99
MESL	4,17 ± 0,69	3,83 ± 0,36	68,78 ± 2,01	95,30 ± 3,64	67,06 ± 3,78

Antioxidante lipofílico: BHT para DPPH[•] e ABTS^{•+}; BHA para o ensaio de branqueamento com β-caroteno. ND: não detectado. -: não realizado. Os valores são expressos como média ± SEM.

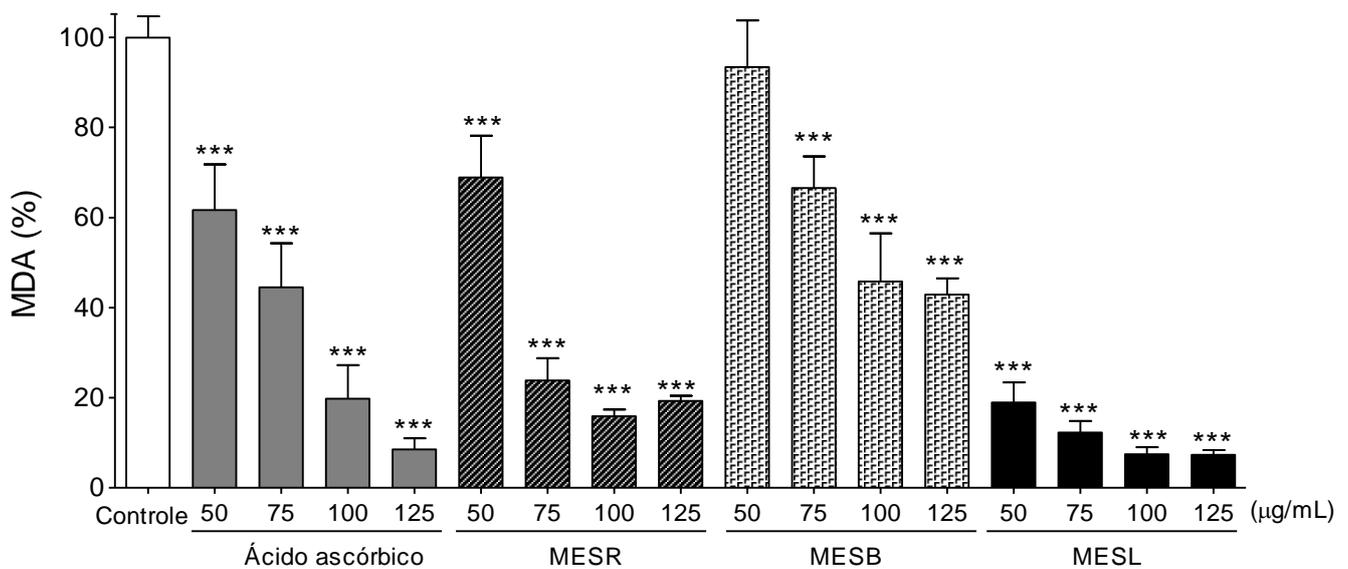


Figura 1. Atividade antioxidante do extrato metanólico da raiz (MESR), cascas do caule (MESB) e folhas (MESL) de *Schinus terebinthifolius* Raddi em eritrócitos humanos submetido ao estresse oxidativo induzido por AAPH. MDA: malondialdeído. Os valores são expressos como média \pm SEM. ***P < 0,001 versus Controle.

Propriedades antidiabéticas *in vitro*

As propriedades antidiabéticas do MESR, MESB e MESL foram determinadas *in vitro* pela inibição da atividade da enzima digestiva α -glicosidase e pelo efeito anti-glicação, vias frutose e glicoxal (Tabela 4).

Os extratos de *S. terebinthifolius* inibiram a atividade da enzima α -glicosidase, sendo que o MESL apresentou atividade superior em relação aos demais, com IC₅₀ aproximadamente duas vezes menor em comparação aos demais (Tabela 4). O MESL apresentou atividade anti-glicação superior comparado aos demais extratos e, em relação ao controle quercetina apresentou IC₅₀ maior (aproximadamente 4 vezes) na via frutose e, semelhante via glicoxal (Tabela 4).

Tabela 4. Inibição de α -glicosidase e atividade anti-glicação do extrato metanólico da raiz (MESR), cascas do caule (MESB) e folhas (MESL) de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Amostra	α -Glicosidase IC ₅₀ (μ g/mL)	Anti-glicação	
		Frutose IC ₅₀ (μ g/mL)	Glooxal IC ₅₀ (μ g/mL)
Quercetina	-	0,32 \pm 0,01	35,12 \pm 0,27
MESR	31,16 \pm 0,17	3,16 \pm 0,01	116,18 \pm 2,23
MESB	33,01 \pm 1,65	1,54 \pm 0,03	98,43 \pm 0,48
MESL	16,13 \pm 0,49	1,29 \pm 0,01	32,40 \pm 0,84

-: não realizado. Os valores são expressos como média \pm SEM.

Perfil químico do MESL

Os compostos químicos foram identificados por seus espectros de massas e íons fragmentos comparados aos dados publicados na literatura. Alguns metabólitos foram confirmados pela injeção de padrão autêntico. Os compostos identificados foram flavonols *O*-glicosilados (4-7, 9-10, 12-14, 16-17, 19-20), galotaninos (3, 8, 15, 18), ácido gálico 1 e seus derivados 2, 11 (Figura 2, Tabela 5) Os principais compostos observados no cromatograma ($\lambda = 270\text{-}330\text{ nm}$) foram o ácido 4-*O*-metil-gálico (2) e o penta-*O*-galoil hexosídeo (15) (Figura 2).

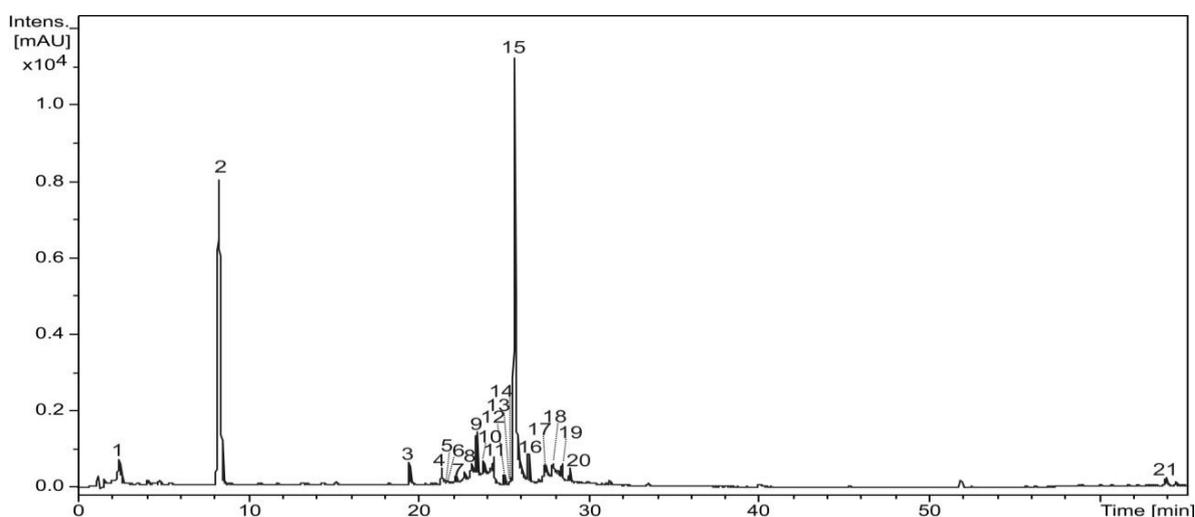


Figura 2. Perfil cromatográfico a 270-330 nm do extrato metanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (MESL).

Tabela 5. Identificação dos compostos do extrato metanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* por LC-DAD-MS/MS.

Pico	RT (min)	Composto	UV (nm)	FM	Modo negativo (m/z)		Modo positivo (m/z)	
					MS [M-H] ⁻ (ppm ^{er})	MS/MS	MS [M+H] ⁺ (ppm ^{er})	MS/MS
1	2,4	Ácido gálico*	270	C ₇ H ₆ O ₅	169,0146 (2,1)	-	171,0295 (4,0)	-
2	8,2	Ácido gálico 4- <i>O</i> -metil	271	C ₈ H ₈ O ₅	183,0304 (2,8)	-	185,0451 (3,6)	153
3	19,5	Tri- <i>O</i> -galoil hexosídeo	278	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635,0873 (2,7)	465, 313, 169	659,0883 ^{Na} (4,3)	153
4	21,4	Miricetina- <i>O</i> -hexosídeo	265, 365	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0819 (2,6)	316	481,0993 (3,3)	319
5	21,6	Miricetina- <i>O</i> -hexosil-deoxihexosídeo	265, 355	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,1396 (2,3)	479, 316	627,1564 (1,3)	481, 319
6	21,8	Miricetina- <i>O</i> -hexosil-deoxihexosídeo	265, 355	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,1416 (1,0)	479, 316	627,1585 (4,6)	481, 319
7	22,3	Miricetina- <i>O</i> -pentosídeo	265, 353	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	449,0721 (1,0)	316	451,0888 (3,7)	319, 273, 245, 167
8	23,2	Tetra- <i>O</i> -galoilhexasídeo	278	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787,1000 (0,1)	635, 617, 465, 169	811,0966 ^{Na} (0,2)	-
9	23,5	Miricetina- <i>O</i> -deoxihexosídeo	265, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882 (1,3)	316, 271	465,1048 (4,3)	319, 245, 217, 153
10	23,8	Quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	265, 353	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0881 (0,2)	300	465,1044 (3,6)	303
11	24,4	Metil digalato	275	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	335,0412 (1,1)	183	337,0568 (4,2)	153
12	25,1	Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo	263, 355	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0775 (0,4)	300, 271	435,0911 (2,5)	303
13	25,5	Quercetina- <i>O</i> -pentosídeo	263, 355	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0772 (0,9)	300, 271	435,0938 (3,7)	303
14	25,6	Kaempferol- <i>O</i> -hexosídeo	263, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0950 (3,9)	284	449,1086 (1,8)	287
15	25,7	Penta- <i>O</i> -galoil hexosídeo	279	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939,1102 (0,8)	787, 769, 617, 599, 447, 277, 169, 125	963,1107 ^{Na} (3,4)	793, 641, 471, 301, 153
16	26,5	Quercetina- <i>O</i> -deoxihexosídeo	260, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0943 (2,2)	300, 271, 255	449,1070 (1,9)	303
17	27,1	Kaempferol- <i>O</i> -pentosídeo	263, 350	C ₂₀ H ₃₄ O ₉	417,2125 (1,3)	284	419,0991 (4,5)	287
18	27,9	Hexa- <i>O</i> -galoil hexosídeo	280	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	1091,1212 (0,6)	921, 769, 617, 393	1115,1175 ^{Na} (0,7)	-
19	28,5	Miricetina- <i>O</i> -galoil- <i>O</i> -deoxihexosídeo	267, 280, 350	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	615,1003 (1,9)	317	617,1145 (1,2)	-
20	28,9	Kaempferol- <i>O</i> -deoxihexosídeo	263, 350	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0989 (1,1)	284	433,1121 (2,0)	287
21	64,0	Desconhecido	300	C ₂₄ H ₃₆ O ₃	371,2581 (2,8)	327	373,2747 (2,7)	355

RT: tempo de retenção; (ppm^{er}): erro em ppm; ^{Na}: [M+Na]⁺; *: confirmado por padrão autêntico.

Os picos 1, 2 e 11 mostraram $\lambda_{\max} \approx 280$ nm e o ácido gálico (1) foi confirmado por padrão. O composto 2 exibiu íons de m/z 185,0451 $[M+H]^+$ e 183,0304 $[M-H]^-$, confirmando a fórmula molecular $C_8H_8O_5$ e uma metila adicional no ácido gálico. O íon fragmento m/z 153,0186 ($C_7H_5O_4^+$, erro 2,4 ppm) indicou a perda de uma molécula de metanol (32 u), este é o íon diagnóstico para o grupo metil em C-4 (Liao et al., 2013), essa perda do radical metil e subsequente moléculas de CO_2 sugerem o substituinte metil em C-3 ou C-7 (carboxil) (Kumar et al., 2015; Ersan et al., 2016). Para o composto 11, o íon m/z 335,0412 $[M-H]^-$ ($C_{15}H_{11}O_9^-$, erro 2,8 ppm) produziu um íon fragmento m/z 183 pela perda de uma unidade de galoil, a qual é relativa a um galoil metilado, como relatado por Ersan et al. (2016). Assim, os compostos 1, 2 e 11 foram identificados como ácido gálico, ácido 4-O-metil-gálico e metil digalato, respectivamente.

As substâncias 3, 8, 15 e 18 apresentaram bandas de absorção com λ_{\max} semelhante ao ácido gálico. Além disso, eles revelaram perdas consecutivas de unidades de galoil (152 u) ou perdas de unidade de galoil e subsequentemente uma molécula de água (170 u), revelando o típico íon fragmento de m/z 169 [ácido gálico-H] $^-$, bem como a ausência do íon m/z 301, o que confirmou a identificação dos galotaninos (Ersan et al., 2016; Muccilli et al., 2017). Por exemplo, o composto 15 exibiu um íon intenso m/z 939,1102 $[M-H]^-$ (compatível com $C_{41}H_{31}O_{26}^-$) e produziu os íons fragmentos por perdas de unidades de galoil como m/z 787 $[M-H-galoil]^-$, 769 $[M-H-galoil-H_2O]^-$, 617 $[M-H-2x\ galoil-H_2O]^-$, 599 $[M-H-2x\ galoil-2x\ H_2O]^-$, 447 $[M-H-3x\ galoil-2x\ H_2O]^-$, 277 $[M-H-4x\ galoil-3x\ H_2O]^-$, assim confirmaram a identificação do penta-O-galoilhexosídeo, um composto já descrito para *S. terebinthifolius* (Hayashi et al., 1989). Assim, as substâncias 3, 8 e 18 foram identificadas como tri-O-galoil hexosídeo, tetra-O-galoil hexosídeo e hexa-O-galoil hexosídeo, respectivamente. Todos os dados foram confirmados com os dados publicados para esses compostos (Kumar et al., 2015; Abu-Reidah et al., 2015; Ersan et al., 2016; Muccilli et al., 2017).

Os compostos 4-7, 9-10, 12-14, 16-17 e 19-20 revelaram espectros de UV semelhantes a flavonol ($\lambda_{\max} \approx 265$ e 350 nm) (Ersan et al., 2016). As substâncias 4-7, 9 e 19 produziram o íon fragmento relativas à aglicona de m/z 316, enquanto os compostos 10, 12, 16 e 14, 17, 20 produziram os íons

fragmentos m/z 284 e 300 no íon modo negativo, os quais são compatíveis com agliconas miricetina ($C_{15}H_8O_8^-$), kaempferol ($C_{15}H_8O_6^-$) e quercetina ($C_{15}H_8O_7^-$). As perdas de 132, 146 e 162 u confirmaram os açúcares pentosil, desoxihexosil e hexosil, respectivamente. Todos os íons fragmentos foram semelhantes pelos dados relatados na literatura (March et al., 2006; Liao et al., 2013; Ersan et al., 2016).

Toxicidade aguda

A Tabela 6 apresenta os parâmetros antropométricos de camundongos tratados com MESL no teste de toxicidade aguda. Não foi observada mortalidade durante o período experimental após administração das doses de 2000 e 5000 mg/kg de MESL. Os camundongos tratados com 2000 mg/kg do MESL não apresentaram alterações nos parâmetros antropométricos (Tabela 6). Contudo, os camundongos tratados com 5000 mg/kg do MESL apresentaram redução da massa corporal, aumento no consumo de água e ração, e leve redução da massa equivalente dos rins quando comparados aos demais grupos. Assim, considerando os dados em conjunto, a DL_{50} do MESL foi estimada como superior a 5000 mg/kg e, os ensaios *in vivo* seguiram com a dose de 200 mg/kg, ou seja, 10 vezes menor que a dose considerada segura nesse estudo.

Tabela 6. Parâmetros antropométricos de camundongos C57Bl/6 normais em teste de toxicidade aguda tratados com extrato metanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (MESL).

Parâmetros antropométricos	Control	MESL	
		2000 mg/kg	5000 mg/kg
Δ MC (%)	-0,31 ± 1,30 ^a	-2,78 ± 1,62 ^{ab}	-5,73 ± 1,11 ^b
Consumo de água (mL/dia)	6,25 ± 0,45 ^a	6,02 ± 0,52 ^a	12,36 ± 0,77 ^b
Consumo de alimento (g/dia)	3,84 ± 0,21 ^a	5,14 ± 0,31 ^{ab}	6,30 ± 0,65 ^b
Fígado (g/100 g de MC)	3,93 ± 0,10	3,59 ± 0,09	3,75 ± 0,14
Pulmão (g/100 g de MC)	0,60 ± 0,02	0,68 ± 0,09	0,62 ± 0,02
Rim (g/100 g de MC)	1,06 ± 0,02 ^{ab}	1,11 ± 0,06 ^a	0,95 ± 0,02 ^b
Coração (g/100 g de MC)	0,56 ± 0,03	0,57 ± 0,04	0,54 ± 0,02

Δ MC (%): variação entre % de massa corporal final e massa corporal inicial. Os valores são expressos como média ± SEM. N = 5 camundongos por grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Propriedades antidiabéticas *in vivo*

Teste de tolerância oral à glicose

A figura 3 demonstra os efeitos do MESL na glicemia de camundongos normoglicêmicos após sobrecarga oral de glicose. O MESL reduziu o pico glicêmico aos 30 min em $35 \pm 5\%$ (Figura 3A), bem como a glicemia pós-prandial em $24 \pm 6\%$, avaliada pela AUC até 180 min (Figura 3B), quando comparado ao grupo Controle. Adicionalmente, o efeito apresentado pelo MESL sobre a glicemia dos camundongos normoglicêmicos foi semelhante ao promovido pela glibenclamida e inferior ao da metformina.

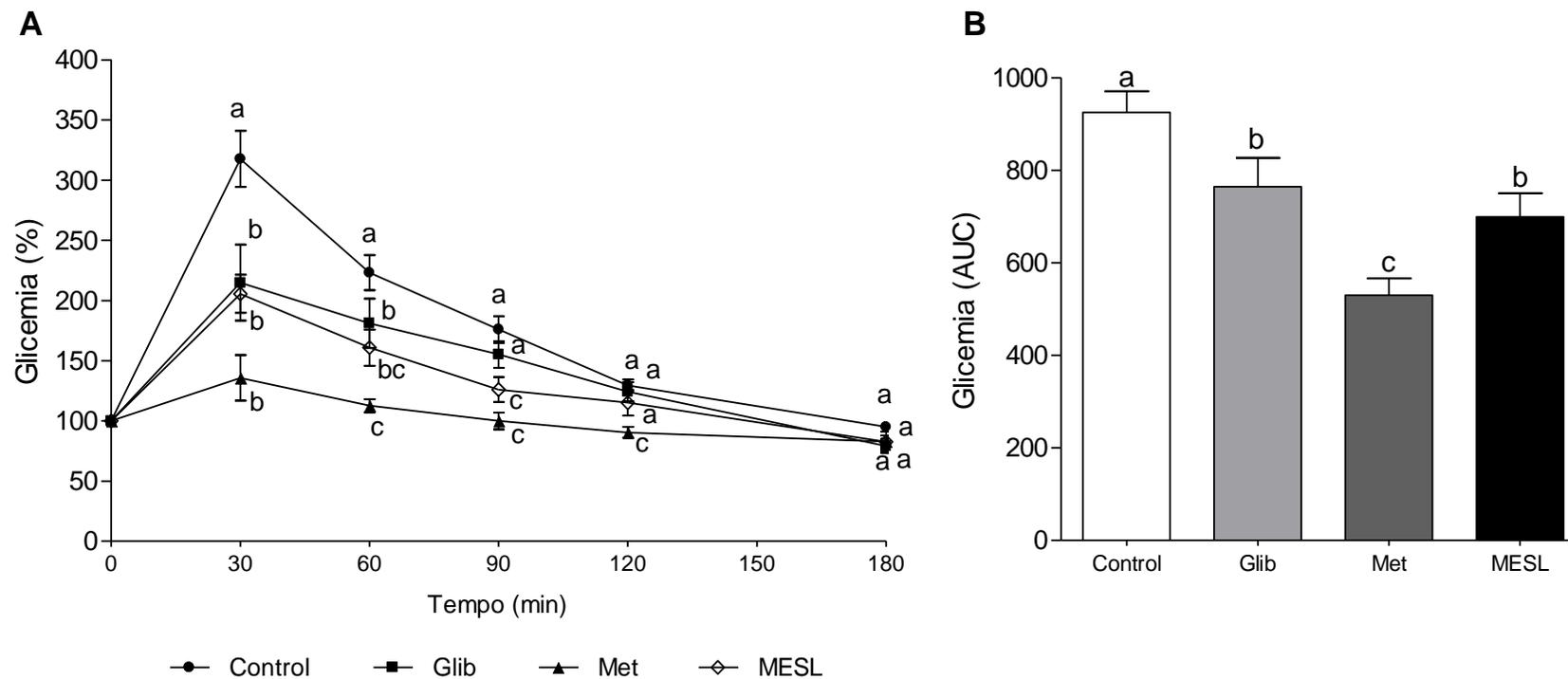


Figura 3. (A) Glicemia e (B) AUC obtidos no teste de tolerância à glicose em camundongos C57Bl/6 normoglicêmicos que receberam uma dose única de: água (Control), glibenclamida 10 mg/kg (Glib), metformina 100 mg/kg (Met) e extrato metanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi 200 mg/kg (MESL). Os valores são expressos como média \pm SEM. N = 5 camundongos por grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Atividade antidiabética *in vivo*

A tabela 7 apresenta os parâmetros antropométricos e bioquímicos de camundongos C57Bl/6 normoglicêmicos (ND-Controle) e diabéticos tratados com água (D-Controle), metformina (D-Met) e MESL (D-MESL).

Os camundongos diabéticos (D-Controle) apresentaram aumento no consumo de água e ração, elevação da glicemia, hemoglobina glicada, enzimas hepáticas AST e ALT e massa do fígado, comparado ao grupo ND-Controle (Tabela 7). Os camundongos diabéticos tratados com o MESL (D-MESL) apresentaram redução do consumo de água e normalização dos demais parâmetros antropométricos e bioquímicos (Tabela 7). Os efeitos apresentados pelo MESL sobre os parâmetros avaliados em camundongos diabéticos foram superiores aos efeitos demonstrados pela droga de referência metformina nas concentrações avaliadas (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros antropométricos e bioquímicos de camundongos C57Bl/6 normoglicêmicos (ND-Control) e diabéticos, tratados durante 28 dias com água (D-Control), metformina 100 mg/kg (D-Met) e extrato metanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi 200 mg/kg (D-MESL).

Parâmetros	Normal ND-Control	Diabético		
		D-Control	D-Met	D-MESL
Antropométricos				
Δ Massa corporal (%)	5,71 ± 2,43	0,43 ± 4,21	7,95 ± 3,12	8,60 ± 2,05
Consumo de água (mL/dia)	7,51 ± 0,38 ^a	30,41 ± 1,49 ^b	23,32 ± 1,15 ^c	11,23 ± 0,76 ^d
Consumo de alimento (g/dia)	4,55 ± 0,24 ^a	6,79 ± 0,47 ^b	6,51 ± 0,17 ^b	4,81 ± 0,23 ^a
Fígado (g/100 g de MC)	4,14 ± 0,15 ^{ac}	5,21 ± 0,15 ^b	4,69 ± 0,20 ^{ab}	4,02 ± 0,17 ^c
Rim (g/100 g de MC)	1,08 ± 0,03	1,48 ± 0,05	1,12 ± 0,09	1,03 ± 0,03
Coração (g/100 g de MC)	0,45 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,49 ± 0,03
Bioquímicos				
Glicemia (mg/dL)	134,40 ± 6,39 ^a	481,25 ± 14,57 ^b	288,00 ± 74,69 ^c	160,33 ± 22,00 ^a
HbA1c (%)	4,82 ± 0,02 ^a	9,13 ± 0,48 ^b	6,74 ± 1,26 ^{ab}	6,05 ± 0,61 ^a
Total colesterol (mg/dL)	99,74 ± 6,90	105,55 ± 7,98	95,44 ± 6,41	108,73 ± 1,57
HDL-colesterol (mg/dL)	102,72 ± 8,41	107,90 ± 7,68	91,24 ± 6,35	106,92 ± 2,17
Triglicerídeos (mg/dL)	50,80 ± 4,13	48,90 ± 5,36	56,36 ± 6,32	66,27 ± 5,63
AST (U/L)	63,54 ± 6,15 ^a	163,08 ± 20,04 ^b	77,84 ± 13,06 ^a	61,23 ± 7,98 ^a
ALT (U/L)	26,32 ± 2,58 ^a	71,98 ± 15,29 ^b	35,20 ± 4,61 ^a	30,48 ± 4,01 ^a
Ureia (mg/dL)	106,34 ± 8,86	143,25 ± 20,51	112,82 ± 12,72	105,55 ± 8,37
Creatinina (mg/dL)	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,23 ± 0,01

Δ MC (%): variação entre % de massa corporal final e massa corporal inicial; HbA1c: hemoglobina glicada; AST: aspartato transaminase; ALT: alanina transaminase. Os valores são expressos como média ± SEM. N = 5 camundongos por grupo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Discussão

O conhecimento científico sobre as atividades biológicas das plantas medicinais pode estimular o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma planta medicinal utilizada popularmente para diversos fins, inclusive faz parte das plantas medicinais indicadas pelo sistema público de saúde no Brasil (RENISUS, 2009).

A segurança de uso dos produtos naturais inclui avaliações microbiológicas e toxicológicas desses produtos. A presença de microrganismos nas plantas é o resultado de diferentes interferentes, oriundos do solo, ar e água e, muitos destes contaminantes em produtos farmacêuticos não estéreis podem alterar suas propriedades terapêuticas e ocasionar danos à saúde (Ratajczak et al., 2015). A presença do microrganismo patogênico *Bacillus cereus*, apenas no pó das raízes de *S. terebinthifolius* e, a ausência de crescimento microbiano nos extratos de todas as partes vegetais da planta, pode indicar a segurança microbiológica para uso desse material, caracterizando-o como um produto natural de qualidade (Santos et al., 2018). Adicionalmente, a ausência de sinais de tóxicos, no teste de toxicidade aguda, favorece a avaliação do potencial farmacológico de *S. terebinthifolius*.

Os extratos vegetais apresentam um conjunto de diferentes compostos bioativos e, os compostos fenólicos foram majoritários nos extratos de *S. terebinthifolius*. Dentre os extratos, o MESL demonstrou maior conteúdo de compostos fenólicos e maior eficiência nas atividades antioxidantes avaliadas. Sabidamente, os compostos fenólicos atuam como antioxidantes, em especial, pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, inibindo a ação de EROs e reações de peroxidação lipídica (Rice-Evans et al., 1997).

A captura de radicais livres observada nesse estudo indica o potencial desses extratos em doar elétrons para estabilização de moléculas radicalares. Essa capacidade é fundamental, pois o excesso de radicais livres é um dos principais fatores que acarretam e agravam quadros patológicos, como câncer (Reuter et al., 2010), obesidade (Fernandez-Sanchez et al., 2011), doenças cardiovasculares (Csányi e Miler, 2014) e diabetes (Giacco e Brownlee, 2010).

O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é uma das moléculas mais reativas para a qual não há sistema endógeno de defesa (Lipinski, 2011). Ele é formado na reação de Fenton, quando o íon férrico (Fe^{2+}) é oxidado a íon ferroso (Fe^{3+}) pelo

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Winterbourn, 1995). Os extratos de *S. terebinthifolius* apresentaram um baixo poder redutor de ferro comparado ao padrão ácido ascórbico e, portanto podem evitar a geração de OH^\bullet . Alguns antioxidantes com elevado poder redutor de ferro podem apresentar características pró-oxidantes (Chobot e Hadacek, 2011).

Nos sistemas biológicos, os lipídeos das membranas são alvos do OH^\bullet , sendo este capaz de oxidar ácidos graxos poliinsaturados e formar hidroperóxidos lipídicos (Ayala et al., 2014). A inibição da oxidação do substrato lipídico β -caroteno pelos extratos de *S. terebinthifolius* pode indicar capacidade de prevenir alterações na estrutura e permeabilidade da membrana decorrentes da peroxidação lipídica.

Essas alterações das membranas podem ser decorrentes de subprodutos tóxicos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) (Grotto et al., 2009). Nos eritrócitos humanos induzidos ao estresse oxidativo, os extratos de *S. terebinthifolius* reduziram os níveis de MDA gerados, sendo o MESL o extrato que apresentou melhor atividade.

O estresse oxidativo afeta praticamente todos os sistemas fisiológicos e está associado ao desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas o diabetes (Giacco e Brownlee, 2010). O aumento da glicemia também eleva a produção de radicais livres, especialmente por acarretar a glicação de proteínas (Singh et al., 2014). A hemoglobina glicada e a frutossamina são exemplos de produtos de Amadori (Gillery, 2014) que originam AGEs. A formação de AGEs está intimamente relacionada ao desenvolvimento das complicações diabéticas (Node e Inoue, 2009, Singh et al., 2014), portanto, o controle glicêmico é fundamental para prevenir tais eventos (Skyler, 2004). A ligação dos AGEs aos seus receptores acarreta a disfunção celular, que inclui o estímulo à produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6), fator de crescimento I (GF-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Singh et al., 2014). Os AGEs se acumulam na maioria dos órgãos-alvo acometidos no diabetes, como por exemplo, rins e retina (Singh et al., 2014). A atividade anti-glicação dos extratos foi observada pela diminuição da glicação via frutose e via glioxal, sendo o MESL superior aos demais. Os animais diabéticos tratados com o MESL apresentaram redução dos níveis de hemoglobina glicada.

A hiperglicemia pós-prandial também colabora para o agravamento do estado de estresse oxidativo, pela indução da produção excessiva de ânion radical superóxido, que pode reagir com o óxido nítrico (NO) e produzir peroxinitrito (ONOO⁻) (Ceriello, 2005, Node e Inoue, 2009). O aumento da produção de espécies reativas associado aos produtos de glicação conduz ao desenvolvimento da disfunção endotelial e, complicações microvasculares e macrovasculares no diabetes (Node e Inoue, 2009).

O controle do estresse oxidativo e da hiperglicemia, bem como do quadro diabético, tem sido relacionado à ação de diversas substâncias naturais, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos (Rice-Evans et al., 1997, Xie e Chen, 2013). No MESL foram identificados ácido gálico e seus derivados, galotaninos e flavonols glicosilados de miricetina, quercetina e kaempferol. Em outros estudos, estes compostos fenólicos têm sido relacionados à ação antioxidante e de controle glicêmico. O ácido gálico e seus derivados são descritos por reduzir o estresse oxidativo (Omobowale et al., 2017, Karimi-Khouzani et al., 2017, Abdel-Moneim et al., 2017). Os taninos apresentam propriedades antioxidantes, mas principalmente de manutenção glicêmica, atuando sobre a inibição de α -glicosidase (Lee et al., 2017, Muccilli et al., 2017). Estudos apontam o efeito da quercetina glicosilada sobre a redução glicêmica, através da proteção de células pancreáticas ou por melhorar a sensibilidade à insulina (Yan et al., 2015). A redução da glicemia em jejum e dos níveis séricos de hemoglobina glicada *in vivo* já foi observada após administração de kaemperol glicosilado (Zang et al., 2015). Outros estudos observaram que flavonols glicosilados também são capazes de inibir a atividade de α -glicosidase (Sun et al., 2014) e a glicação de proteínas *in vitro* (Kim et al., 2004). Adicionalmente aos efeitos já apontados, o MESL reduziu a glicemia pós-prandial em camundongos normoglicêmicos após sobrecarga de glicose, indicando sua capacidade de alterar mecanismos de controle glicêmico.

Dentre os mecanismos atualmente utilizados para o controle da hiperglicemia, destaca-se a inibição da atividade da enzima digestiva α -glicosidase que regula a absorção de glicose, gerada a partir do amido (van de Laar, 2008). Os inibidores de glicosidase existentes, como acarbose, o miglitol e a voglibose atuam como antagonistas enzimáticos de α -glicosidase,

reduzindo a absorção intestinal da glicose e a glicemia pós-prandial, entretanto, produzem efeitos colaterais, como flatulência, diarreia e dores abdominais (van de Laar et al., 2005). Os extratos de *S. terebinthifolius*, em especial o MESL, inibiram a atividade de α -glicosidase e, a inibição da atividade desta enzima tem sido um alvo promissor para o desenvolvimento de drogas antidiabéticas (van de Laar, 2008).

Os sintomas clássicos da hiperglicemia crônica, polidipsia e polifagia, que refletem desequilíbrios homeostáticos no quadro diabético (Fournier, 2000, American Diabetes Association, 2009), foram revertidos parcial ou totalmente com a administração do MESL a camundongos diabéticos. A normalização no consumo dos camundongos diabéticos tratados com MESL correlaciona-se positivamente com a redução dos níveis de glicose e hemoglobina glicada observada nesses animais.

Assim também, a hepatomegalia e elevação nos níveis de AST e ALT apresentada pelos camundongos diabéticos, provavelmente relacionadas ao acúmulo excessivo de glicogênio nos hepatócitos (Sarkhy et al., 2017), foi revertida totalmente nos camundongos diabéticos tratados com MESL, os quais apresentaram normalização da massa do fígado e das enzimas hepáticas, AST e ALT, semelhantes aos camundongos tratados com metformina.

Em conjunto, os dados mostram que os extratos de *S. terebinthifolius* apresentam segurança microbiológica para uso, e, que, em especial o MESL atua no controle do estresse oxidativo, da hiperglicemia pós-prandial e dos principais sintomas do diabetes, provavelmente mediados pelos seus compostos químicos, ácido gálico, galotaninos e flavonols glicosilados.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Moneim, A., Yousef, Al., Abd El-Twab, S. M., Abdel Reheim, E. S., Ashour, M. B. (2017) Gallic acid and p-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced neurodegeneration in rats. *Metabolic Brain Disease*, 32, 1279-1286. doi: 10.1007/s11011-017-0039-8
- Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2015) HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*, 166, 179-191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>
- Ajith, T. A., Vinodkumar, P. (2016) Advanced Glycation End Products: Association with the Pathogenesis of Diseases and the Current Therapeutic Advances. *Current Clinical Pharmacology*, 11, 118-127. doi: 10.2174/1574884711666160511150028
- Alov, P., Tsakovska, I., Pajeva, I. (2015) Computational Studies of Free Radical-Scavenging Properties of Phenolic Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 85-104. doi: 10.2174/1568026615666141209143702
- American Diabetes Association (2009) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 32, 62-67. doi: 10.2337/dc09-S062
- AOAC (1989-13) Motile Salmonella in All Foods Immunodiffusion 1–2 Teste - Method First Action. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA.
- AOAC (2005-03) Detection and confirmed quantitation of coliforms and *Escherichia coli* in foods SimPlate coliform and *Escherichia coli* color indicator first action. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA.
- Ayala, A., Munoz, M. F., Arguelles, S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>
- Barros, L., Ferreira, M. J., Queirós, B., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P. (2007) Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103, 413-419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.038>
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., Apak, R. (2007) Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165. doi: 10.1016/j.talanta.2007.01.019
- Brandão, M. G. L., Consenza, G. P., Moreira, R. A., Monte-Mor, R. L. M. (2006) Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 408-420. doi: 10.1590/S0102-695X2006000300020
- Bray, R. C., Cockle, S. A., Fielden, E. M., Roberts, P. B., Rotilio, G., Calabrese, L. (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 139, 43-48. doi: 10.1042/bj1390043

- Campos, J. F., Santos, U. P., Macorini, L. F., Melo, A. M., Balestieri, J. B., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A., de Picoli Souza, K., Santos, E. L. (2014) Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*, 65, 374-380. doi: 10.1016/j.fct.2014.01.008
- Campos, J. F., Santos, U. P., Rocha, P. S., Damiao, M. J., Balestieri, J. B., Cardoso, C. A., Paredes-Gamero, E. J., Estevinho, L. M., de Picoli Souza, K., Santos, E. L. (2015) Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). *Evidence-Based Complementary and Alternative*, 2015, 296186. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/296186>
- Carlini, E. A., Duarte-Almeida, J. M., Rodrigues, E., Tabach, R. (2010) Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20, 140-146. <https://www.researchgate.net/publication/247854122>
- Chobot, V., Hadacek, F. (2011) Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. *Redox Report*, 16, 242-247, doi: 10.1179/1351000211Y.0000000015
- Csányi, G., Miller, F. J. (2014) Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 6002-6008. doi: 10.3390/ijms15046002
- Eid, H. M., Martineau, L. C., Saleem, A., Muhammad, A., Vallerand, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Nistor, L., Afshar, A., Arnason, J. T., Haddad, P. S. (2010) Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 991-1003. doi: 10.1002/mnfr.200900218
- Ersan, S., Guclu Ustundag, O., Carle, R., Schweiggert, R. M. (2016) Identification of Phenolic Compounds in Red and Green Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS(n). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 64, 5334-5344. doi: 10.1021/acs.jafc.6b01745
- Estevão L. R. M., Simões, R. S., Cassini-Vieira, P., Canesso, M. C. C., Barcelos, L. D. S., Rachid M. A., Câmara, C. A. G. D., Evêncio-Neto, J. (2017) *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) leaves oil attenuates inflammatory responses in cutaneous wound healing in mice 1. *Acta Cirurgica Brasileira* 32, 726-735. doi: 10.1590/s0102-865020170090000005
- Fernandez-Sanchez, A., Madrigal-Santillan, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-Gonzalez, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sanchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., Morales-Gonzalez, J. A. (2011) Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3117-3132. doi: 10.3390/ijms12053117
- Formagio, A. S., Volobuff, C. R., Santiago, M., Cardoso, C. A., Vieira, M. C., Pereira, Z. V. (2014) Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in *Psychotria* Leaf Extracts. *Antioxidants (Basel)*, 3, 745-757. doi: 10.3390/antiox3040745

- Fournier, A. (2000) Diagnosing Diabetes. *Journal of General Internal Medicine*, 15, 603-604. doi: 10.1046/j.1525-1497.2000.00535.x
- Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 18515-18517. doi: 10.1074/jbc.272.30.18515
- Giacco, F., Brownlee, M. (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107, 1058-1070. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
- Gillery, P. (2014). Assays of HbA1c and Amadori products in human biology. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 72, 330-336. doi: 10.1016/j.pharma.2014.04.002
- Glória, L. L., Arantes M. B. S., Pereira, S. M. F., Vieira, G. S., Martins, C. X., Junior A. R. C., Antunes, F., Braz-Filho, R., Vieira, I. J. C., Cruz, L. L, Chaves, D. S. A., Freitas, S. P., Barros de Oliveira, D. B. (2017) Phenolic Compounds Present *Schinus terebinthifolius* Raddi Influence the Lowering of Blood Pressure in Rats. *Molecules*, 22, E1792. doi: 10.3390/molecules22101792
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., Pomblum, V. J., Rocha, J. B. T., Farina, M. (2009) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova*, 32, 169-174. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>
- Gugliucci, A. (2017) Formation of Fructose-Mediated Advanced Glycation End Products and Their Roles in Metabolic and Inflammatory Diseases. *Advances in Nutrition*, 8, 54-62. doi: 10.3945/an.116.013912
- Hayashi, T., Nagayama, K., Arisawa, M., Shimizu, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I., Berganza, L. H. (1989) Pentagalloylglucose, A Xanthine Oxidase Inhibitor from a Paraguayan Crude Drug, "Molle-I" (*Schinus terebinthifolius*). *Journal of Natural Products*, 52, 210-211. PMID: 2723668
- ISO 7932 (2004-06) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30 °C.
- ISO 15213 (2003-05). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.
- ISO 21527-2 (2008-07). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95.
- Karimi-Khouzani, O., Heidarian, E., Amini, S. A. (2017) Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharmacological Reports*, 69, 830-835. doi: 10.1016/j.pharep.2017.03.011
- Kazeem, M. I., Adamson, J. O., Ogunwande, I. A. (2013) Modes of inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase by aqueous extract of *Morinda lucida* Benth leaf. *Biomed Research International*, 2013, 527570. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/527570>

- Kharroubi, A. T., Darwish, H. M. (2015) Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6, 850-867. doi: 10.4239/wjd.v6.i6.850
- Kiho, T., Usui, S., Hirano, K., Aizawa, K., Inakuma, T. (2004) Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 200-205. doi: 10.1271/bbb.68.200
- Kim, H. Y., Moon, B. H., Lee, H. J., Choi, D. H. (2004) Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 227-230. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.047
- Kumar, S., Chandra, P., Bajpai, V., Singh, A., Srivastava, M., Mishra, D. K., Kumar, B. (2015) Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. *Industrial Crops and Products*, 69, 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.012>
- Lanjhiyana, S., Garabadu, D., Ahirwar, D., Bigoniya, P., Rana, A. C., Patra, K. C., Lanjhiyana, S. K., Karuppai, M. (2011) Antidiabetic activity of methanolic extract of stem bark of *Elaeodendron glaucum* Pers. in Alloxanized rat model. *Advances in Applied Science Research*, 2, 47-62. <http://www.imedpub.com/articles/antidiabetic-activity-of-methanolic-extract-of-stem-bark-of-elaodendron-glaucum-pers-in-alloxanized-rat-model.pdf>
- Lee, D. Y., Kim, H. W., Yang, H., Sung, S. H. (2017) Hydrolyzable tannins from the fruits of *Terminalia chebula* Retz and their α -glucosidase inhibitory activities. *Phytochemistry*, 137, 109-116. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.02.006
- Liao, S. G., Zhang, L. J., Sun, F., Wang, Z., He, X., Wang, A. M., Li, Y. J., Huang, Y., Lan, Y. Y., Zhang, B. L., Wang, Y. L. (2013) Identification and characterisation of phenolics in *Polygonum capitatum* by ultrahigh-performance liquid chromatography with photodiode array detection and tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 24, 556-68. doi: 10.1002/pca.2432.
- Lipinski, B. (2011) Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 809696. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/809696>
- March, R. E., Lewars, E. G., Stadey, C. J., Miao, X. S., Zhao, X., Metcalfe, C. D. (2006) A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 248, 61-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.09.011>
- Matafome, P., Rodrigues, T., Sena, C., Seica, R. (2017) Methylglyoxal in Metabolic Disorders: Facts, Myths, and Promises. *Medicinal Research Reviews*, 37, 368-403. doi: 10.1002/med.21410
- Muccilli, V., Cardullo, N., Spatafora, C., Cunsolo, V., Tringali, C. (2017) α -Glucosidase inhibition and antioxidant activity of an oenological commercial tannin. Extraction, fractionation and analysis by HPLC/ESI-MS/MS and (1)H NMR. *Food Chemistry*, 215, 50-60. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.136
- Node, K., Inoue, T. (2009) Postprandial hyperglycemia as an etiological factor in vascular failure. *Cardiovascular Diabetology*, 8, 23. doi: 10.1186/1475-2840-8-23

NP 3788 (2002) Microbiologia Alimentar - Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30 °C. Instituto Português da Qualidade (IPQ): Lisboa, Portugal.

NP 4400-1 (2002) Microbiologia Alimentar - Regras gerais para contagem de *Estafilococos coagulase* positiva - *Staphylococcus aureus* e outras espécies - Parte 1:Técnica com confirmação de colónias - método corrente. Instituto Português da Qualidade (IPQ): Lisboa, Portugal.

Nunes-Neto, P. A., Peixoto-Sobrinho, T. J. S., Júnior, E. D. S., Leopoldina da Silva, J. L., Oliveira, A. R. S., Pupo, A. S., Araújo, A. V., Costa-Silva, J. H., Wanderley, A. G. (2017) The Effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Bark Extract on Histamine-Induced Paw Edema and Ileum Smooth Muscle Contraction. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. doi: 10.1155/2017/1416375

OECD, 425. Test N° 425 - Acute Oral Toxicity - Up-and-Down Procedure. @OECD_Pubs.

Omobowale, T. O., Oyagbemi, A. A., Ajufo, U. E., Adejumobi, O. A., Ola-Davies, O. E., Adedapo, A. A., Yakubu, M. A. (2017) Ameliorative Effect of Gallic Acid in Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats Through Antioxidant Defense System. Journal of Dietary Supplements, 15, 183-196. doi: 10.1080/19390211.2017.1335822

Piccinelli A. C., Santos, J. A., Konkiewitz, E. C., Oesterreich, S. A., Formagio, A. S., Croda, J., Ziff, E. B., Kassuya, C. A. (2015) Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. Nutritional Neuroscience, 18, 217-224. doi: 10.1179/1476830514Y.0000000119

Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2011) Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). Food and Chemical Toxicology, 49, 2983-2989. doi: 10.1016/j.fct.2011.07.054

Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48, 3396-3402. doi: 10.1021/jf9913458

Ratajczak, M., Kubicka, M.M., Kamińska, D., Sawicka, P., Długaszewska, J. (2015) Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. Saudi Pharmaceutical Journal, 23, 303-307. doi: 10.1016/j.jsps.2014.11.015

RENISUS (2009) Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radical Biology and Medicine, 49, 1603-1616. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2, 152-159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)

- Rocha, P. S., Campos, J. F., Nunes-Souza, V., Vieira, M. C., Boleti, A. P. A., Rabelo, L. A., Santos, E. L., de Picoli Souza, K. (2017) Antioxidant and Protective Effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi Against Doxorubicin-Induced Toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017. doi: 10.1007/s12010-017-2589-y
- Sarkhy, A. A. A. Zaidi, Z. A., Babiker, A. M. (2017) Glycogenic hepatopathy, an underdiagnosed cause of relapsing hepatitis in uncontrolled type 1 diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, 38, 89-92. doi: 10.15537/smj.2017.1.15934
- Shao, J., Geacintov, N. E., Shafirovich, V. (2010) Oxidative modification of guanine bases initiated by oxyl radicals derived from photolysis of azo compounds. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 6685-6692. doi: 10.1021/jp100686j
- Silva, J. H. S., Simas, N. K., Alviano, C. S., Alviano, D. S., Ventura, J. A., Lima, E. J., Seabra, S. H., Kuster, R. M. (2017a) Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. *Natural Product Research*, 3, 1-4. doi: 10.1080/14786419.2017.1344657
- Silva, M. M., Iriguchi, E. K. K., Kassuya, C. A. L., Vieira, M. C., Foglio, M. A., Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Souza, K. P., Formagio, A. S. N. (2017b) *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and *in vitro* antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-inflammatory activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 445-452. doi: 10.1016/j.bjp.2016.12.007
- Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A. S. (2014) Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 18, 01-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1
- Skyler, J. S. (2004) Effects of Glycemic Control on Diabetes Complications and on the Prevention of Diabetes. *Clinical Diabetes*, 22, 162-166. <https://doi.org/10.2337/diaclin.22.4.162>
- Sun, J., Zhang, F., Yang, M., Zhang, J., Chen, L., Zhan, R., Li, L., Chen, Y. (2014) Isolation of α -glucosidase inhibitors including a new flavonol glycoside from *Dendrobium devonianum*. *Natural Product Research*, 28, 1900-1905. doi: 10.1080/14786419.2014.955495
- Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt, D. E. (1984) Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 928-931. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02542169>
- van de Laar, F. A. V., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Lisdonk, E. H. V., Rutten, G. E., Weel, C. V. (2005) α -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28, 154-163. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.1.154>
- van de Laar, F. A. (2008) Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 1189-1195. PMID: PMC2663450
- Xie, Y., Chen, X. (2013) Structures required of polyphenols for inhibiting advanced glycation end products formation. *Current Drug Metabolism*, 14, 414-431. doi: 10.2174/1389200211314040005

Zang, Y., Zhang, L., Igarashi, K., Yu, C. (2015) The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food & Function*, 6, 834-841. doi: 10.1039/c4fo00844h

Yan, S. X., Li, X., Sun, C. D., Chen, K. S. (2015) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of quercetin and its glycosides. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 40, 4560-4567. PMID: 27141664

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053. PMID: 15111519

Winterbourn, C. C. (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82, 969-974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)

5.3. Compostos químicos, atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *Schinus teribinthifolius* Raddi

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os compostos químicos, atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *Schinus teribinthifolius* Raddi. Dezesesseis fungos endofíticos foram isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *S. teribinthifolius*. Foram identificadas cinco ordens incluindo, Mucorales, Xylariales, Diaporthales, Eurotiales e Pleosporales. O conteúdo de compostos fenólicos totais, ácidos fenólicos e flavonoides dos extratos acetato de etila dos fungos endofíticos foram analisados. A atividade antioxidante dos extratos dos fungos endofíticos foi avaliada pelos métodos de DPPH^{*}, FRAP e inibição do branqueamento de β -caroteno. A atividade antibacteriana dos extratos dos fungos endofíticos foi testada contra seis cepas patogênicas humanas, sendo três estirpes ATCC e três hospitalares: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enteritidis*. Os extratos dos fungos endofíticos apresentaram os flavonoides como compostos majoritários, seguido dos ácidos fenólicos. O decanol foi o composto volátil predominante em todos os extratos estudados. Dentre os fungos endofíticos avaliados, o extrato do fungo endofítico *Ochrocladosporium elatum* (EAOe) apresentou maior conteúdo fenólico e exibiu melhor perfil antioxidante em todos os ensaios realizados. Adicionalmente, o EAOe apresentou melhor atividade antibacteriana, sendo eficaz contra todas as cepas testadas. Para as estirpes ATCC e hospitalar de *S. aureus*, a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) do EAOe foi de 0,5 mg/mL. Para a bactéria *K. pneumoniae* ATCC, o EAOe apresentou MIC 0,13 mg/mL e MBC 0,25 mg/mL, e para estirpe hospitalar seu efeito foi bacteriostático, com MIC 1,00 mg/mL. O EAOe exibiu MIC e MBC de 0,5 mg/mL para cepa ATCC de *S. enteritidis*, e para estirpe hospitalar seu comportamento foi bacteriostático, com MIC de 1,00 mg/mL. Os resultados observados para EAOe, indicam um recurso natural promissor com potencial antioxidante e antibacteriano.

Palavras-chave: pimenta-rosa, produtos naturais, estresse oxidativo, infecções

Introdução

Os fungos endofíticos são uma fonte alternativa e promissora para a geração de novos fármacos de origem natural (Aly et al., 2011). Dentre os exemplos de compostos ativos isolados de fungos endofíticos está a penicilina, um antibacteriano isolado da espécie *Penicillium notatum* (Strobel et al., 2014). Estudos mostram que os fungos endofíticos são capazes de produzir metabólitos bioativos de plantas, como por exemplo, o taxol e a vincristina, reconhecidos antineoplásicos isolados das espécies de plantas *Taxus brevifolia* e *Catharanthus roseus* e, produzidos pelos fungos endofíticos *Taxomyces andreanae* e *Fusarium oxysporum* (Kumar et al., 2013; Stierle et al., 1993).

A bioprospecção para a geração de novos produtos naturais é um recurso que vem sendo amplamente utilizado na ciência para fins medicinais (Tanvir et al., 2017; Coulibaly et al., 2014; Benko-Iseppon et al., 2010). Os fungos endofíticos de plantas medicinais são fonte de metabolitos bioativos e, são alvos de estudos tendo em vista a pesquisa e detecção de novos compostos com atividade biológica de interesse, em nível farmacêutico e medicinal, tais como antioxidantes e antibióticos (Mani et al., 2015).

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) conhecida popularmente como aroeira-vermelha, pimenta-rosa ou aroeira-pimenteira é uma planta medicinal nativa do Brasil. A utilização etnofarmacológica desta espécie incluem o tratamento de feridas e úlceras cutâneas, tumores, diarreia, artrite, infecções urinárias e respiratórias (Morton et al., 1978; Brandão et al., 2006). As atividades antioxidante (Rocha et al., 2017; Silva et al., 2017a; D'Sousa'Costa et al., 2015; Bendaoud et al., 2010; El-Massry et al., 2009) e antimicrobiana (Silva et al., 2017b; D'Sousa'Costa et al., 2015; Cole et al., 2014; Alves et al., 2013; El-Massry et al., 2009) das diferentes partes da planta da espécie *S. terebinthifolius* vem sendo estudadas utilizando diferentes modelos farmacológicos.

Existem alguns estudos sobre a atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados das folhas de *S. terebinthifolius* (Silva et al., 2017c; Tonial et al., 2017; Tonial et al., 2016), no entanto, não existem estudos sobre a composição química e atividades biológicas dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz desta espécie. Neste contexto, este estudo busca identificar os compostos químicos, avaliar a atividade antioxidante e

antibacteriana dos extratos dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *S. teribinthifolius*.

Material e Métodos

Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *S. terebinthifolius* Raddi. Para isso, 1 g de material pulverizado foi desinfectado em 5 mL de etanol 70% durante 2 min, 5 mL de hipoclorito de sódio 4% durante 5 min e lavado 2 vezes com 5 mL de água destilada estéril. Em cada etapa, o material foi centrifugado a 3000 rpm por 2 min e o sobrenadante descartado. O material pulverizado e esterilizado foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura sólido extrato malte ágar (MEA), batata dextrose ágar (PDA) e rosa bengala, suplementado com ácido tartárico 10%, para inibir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 25 °C durante 7 dias. As colônias formadas dos fungos endofíticos foram posteriormente isoladas em novas placas. Dezesesseis fungos endofíticos foram selecionados para identificação.

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

A identificação molecular dos fungos endofíticos foi realizada pelo laboratório [®]STABVIDA, Lda, Caparica, Portugal. Para extração do DNA dos fungos endofíticos, uma colônia de cada cultura foi suspensa em 10 µL de PBS estéril (1x, pH 7,4). A extração de DNA da cultura de células foi armazenada em Micro Card Indicador FTA[™]. A amplificação de um segmento contendo as regiões ITS e D1/D2 foi realizada por PCR de um segmento contendo. Posteriormente, foi realizado o sequenciamento do produto amplificado (DNA Sanger sense e antisense). O sequenciamento foi realizado utilizando iniciadores específicos de ITS (ITS1/ITS4) e primers específicos D1/D2 (NL1/NL4). As espécies foram identificadas a partir de cada sequência de *consensus* BLASTed contra base de dados de nucleotídeos NCBI. Árvore filogenética foi construída com auxílio do programa CLC Sequence Viewer 7.8.1. Os fungos endofíticos identificados, foram congelados em meio MEA 5% glicerol, com identificação ESA-FE 1 ao 15 (Escola Superior Agrária-Fungos Endofíticos).

Extração dos fungos endofíticos

A extração dos fungos endofíticos foi realizada de acordo com protocolo de Kjer et al. (2010). Os 10 fungos endofíticos que apresentaram crescimento superior a 5% foram inoculados em extrato de malte caldo por 2 semanas. O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de MEA, adicionando três discos de micélio fúngico crescidos em ágar (6 mm), de cada cultura isolada. Para obtenção dos extratos fúngicos, todas as culturas foram maceradas com 250 mL de acetato de etila a 25 °C por 24 h e posteriormente filtrados e particionado em um Funil de separação de 500 mL, com 200 mL de acetato de etila e 100 mL de água destilada. Os extratos de acetato de etila dos fungos endofíticos foram concentrados utilizando evaporador rotativo a vácuo, a pressão reduzida, a 40 °C. Os extratos brutos foram posteriormente armazenados a -20 °C.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com o método descrito por Pinela et al. (2011). O extrato na concentração de 2 mg/mL (10 µL) foi misturado ao HCl 0,1% (10 µL, preparado em etanol 95%) e ao HCl 2% (180 µL). A mistura foi incubada em temperatura ambiente durante 15 min. Após esse período, a absorbância foi mensurada a 280, 320 e 360 nm, para avaliação dos compostos fenólicos totais, ácidos fenólicos e flavonoides, respectivamente. O ácido gálico (50-500 µg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão dos compostos fenólicos totais e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato. O ácido cafeico (50-500 µg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão dos ácidos fenólicos e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido cafeico (EAC)/g de extrato. A quercetina (30-300 µg/mL) foi utilizada para calcular a curva padrão dos flavonoides e, os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ)/g de extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade antioxidante

Ensaio DPPH'

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH') de acordo com o método descrito por Bobo-

García et al. (2014). O extrato na concentração de 2 mg/mL (20 µL) foi misturado a solução de DPPH[•] 150 µM (180 µL). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 40 min. A absorbância foi mensurada a 515 nm. O ácido ascórbico e o hidroxianisol butilado (BHA) foram utilizados como controles positivos. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. O trolox (0,1-1 mg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão. Os resultados foram expressos como mg equivalentes de trolox/g de extrato. Os extratos com inibição superior a 50% tiveram a concentração inibitória média (IC₅₀) calculada. O percentual de inibição do DPPH[•] foi obtido pela equação: Inibição DPPH[•] (%) = $(1 - \text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

FRAP

A atividade antioxidante foi avaliada pelo poder redutor férrico (FRAP) de acordo com o método descrito por Ustundag et al. (2016). O reagente FRAP foi preparado pela mistura da solução de TPTZ 10 mM (1 mL, preparado em HCl 40 mM), FeCl₃•6H₂O 20 mM (1 mL) e tampão acetato 300 mM, pH 3,6 (10 mL). O extrato na concentração de 2 mg/mL (20 µL) foi misturado ao reagente FRAP (280 µL). A mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro durante 30 min. A absorbância foi mensurada a 593 nm. O ácido ascórbico e o BHA foram utilizados como controles positivos. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. O sulfato de amônio e ferro (II) (0,03-0,3 mg/mL) foi utilizado para calcular a curva padrão. Os resultados foram expressos como mg equivalentes de Fe II/ g de extrato. Os extratos com absorbâncias superiores a 0,5 tiveram a concentração efetiva média (EC₅₀) calculada. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

Ensaio de branqueamento de β-caroteno

A atividade antioxidante foi avaliada pela inibição do branqueamento do β-caroteno de acordo com o método descrito por Koleva et al. (2002). A solução de β-caroteno foi preparada pela mistura de β-caroteno (1 mg) e clorofórmio (5 mL). A emulsão de reação foi preparada em uma balão de

ebulição, pela mistura da solução de β -caroteno (1 mL), ácido linoléico (20 mg) e Tween 40 (200 mg), o clorofórmio foi removido utilizando um evaporador rotativo a 40 °C durante 15 min e, por último, água destilada oxigenada (50 mL) foi adicionada. O extrato na concentração de 2 mg/mL (30 μ L) foi misturado à emulsão (250 μ L). A mistura foi incubada a 50 °C durante 120 min. A absorbância foi mensurada a 470 nm no tempo 0 (antes da incubação) e 60 min (após a incubação). O ácido ascórbico e o BHA foram utilizados como controles positivos. O controle negativo foi preparado utilizando o mesmo procedimento, substituindo o extrato pelo seu solvente. O branco consistiu na mistura de 2 mg de ácido linoleico, 20 mg de Tween 40 e 5 mL de água oxigenada. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % Inibição = $(1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$. Os extratos com inibição superior a 50% tiveram a concentração inibitória média (IC₅₀) calculada. Foram realizados dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

Atividade antibacteriana

A capacidade antibacteriana foi avaliada de acordo com o método de microplaca descrito por Molla et al. (2016). Foram utilizadas três bactérias patogênicas humanas neste estudo, cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) e hospitalares obtidas da Escola Superior Agrária (ESA). Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 e *Staphylococcus aureus* ESA 111. Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella pneumoniae* ESA 232, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella enteritidis* ESA 206. Inicialmente, as cepas bacterianas foram inoculadas em placa de ágar nutritivo estéril e incubadas a 37 °C por 24h. As cepas bacterianas foram sub-cultivadas em caldo nutritivo overnight, antes do teste.

Extratos dos fungos endofíticos (0,1-1 mg/mL), foram diluídos utilizando o método de microdiluição em série em caldo nutritivo. Para determinar a concentração inibitória mínima (MIC), foi utilizado 30 μ L de rezasurina 0,01%. Logo em seguida, foram inoculados 20 μ L de bactéria, escala MacFarland (absorbância 0,3-0,4 a 540 nm). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Metanol 0,5% foi utilizado como controle negativo. Gentamicina foi utilizada como referência (0,0001-1 mg/mL). Todas as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Para avaliação da concentração

bactericida mínima (MBC), 20 µL dos poços negativos para crescimento bacteriano foram semeados por espalhamento em placas contendo ágar nutritivo, incubados a 37 °C durante 24 h. O resultado com crescimento inferior a 10 colônias foi considerado bactericida e, superior a 10 colônias foi considerado bacteriostático.

Compostos voláteis GC-MS

A análise de compostos voláteis foi realizada utilizando um cromatógrafo de gases Varian 3800 equipado com um espectrômetro de massa modelo Saturn 2000 da Varian e uma fonte de íons de impacto de elétrons (EI). Os compostos foram separados em uma coluna capilar Sapiens-Wax MS (30 m, 0.15 mm i.d., espessura do filme 0.15 µm). O programa de temperatura foi inicialmente ajustado para 60 °C mantidos durante 2 min, aumentado gradualmente para 234°C a uma taxa de 3 °C/min e finalmente para 260 °C a uma taxa de 5 °C/min. Foi utilizado o gás Hélio 49 (Praxair) como gás transportador, a um fluxo constante de 1.3 mL/min. A porta de injeção, linha de transferência e temperaturas da fonte de íons foram ajustados para 250 °C. Foram utilizados 70 elétrons volts de energia de ionização, e o intervalo de varredura em massa foi definido de 35 m/z para 260 m/z em varredura completa com um intervalo de 610 ms. A injeção foi realizada em modo splitless, mantido por 30 s. O tempo de atraso do solvente foi definido a 3 min. Os dados foram processados no programa MS Data Review (v.6.9.3). Todos os componentes voláteis foram identificados comparando-se com os índices de retenção e os espectros de massa obtidos de padrões puros.

Resultados

Identificação dos fungos endofíticos

Foram isoladas 16 espécies de fungos endofíticos em *S. terebinthifolius*, sendo identificadas 15 espécies (Tabela 1). As cepas dos fungos observadas pertencem as seguintes ordens: Mucorales, Xylariales, Diaporthales, Eurotiales e Pleosporales (Tabela 1).

A frequência de colonização está apresentada na Tabela 2. Dentre as espécies identificadas *M.racemosus* estava presente em 30,77 % das amostras de frutos e não foi detectado nas amostras de raiz e do caule. *B. pondoensis* foi

isolada a partir de todas as amostras estudadas, com uma porcentagem de colonização que oscilou entre 6,92 a 15,38%. *T. verruculosum* foi observado predominantemente na raiz (frequência de colonização 43,18%) e *Dothideomycetes* sp. no caule (Tabela 2).

Tabela 1. Espécies identificadas com base na sequência de *consensus* BLASTed contra base de dados de nucleotídeos NCBI.

N°	Espécie	Ordem	NCBI	Identidade (%)
1	<i>Mucor racemosus</i>	Mucorales	AJ271061.1	99
2	<i>Hymenopleella hippophaeicol</i>	Xylariales	KT949901.1	98
3	<i>Bartalinia pondoensis</i>	Xylariales	GU291796.1	96
4	<i>Xylaria cf. heliscus</i>	Xylariales	JQ760911.1	99
5	<i>Diaporthe</i> sp.	Diaporthales	KU747906.1	98
6	<i>Diaporthe endophytica</i>	Diaporthales	KX988294.1	99
7	<i>Diaporthe eres</i>	Diaporthales	HQ115664.1	96
8	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i>	Eurotiales	AF033414.1	99
9	<i>Penicillium olsonii</i>	Eurotiales	EF200100.1	100
10	<i>Talaromyces</i> sp.	Eurotiales	JX244062.1	98
11	<i>Talaromyces verruculosum</i>	Eurotiales	AF510496.1	98
12	<i>Talaromyces atroroseus</i>	Eurotiales	LT558942.1	93
13	<i>Talaromyces minioluteus</i>	Eurotiales	AY213618.1	96
14	<i>Ochrocladosporium elatum</i>	Pleosporales	EU040233.1	96
15	<i>Dothideomycetes</i> sp.	Pleosporales	KX908640.1	97
16	Desconhecido	nd	nd	nd

nd: não detectado.

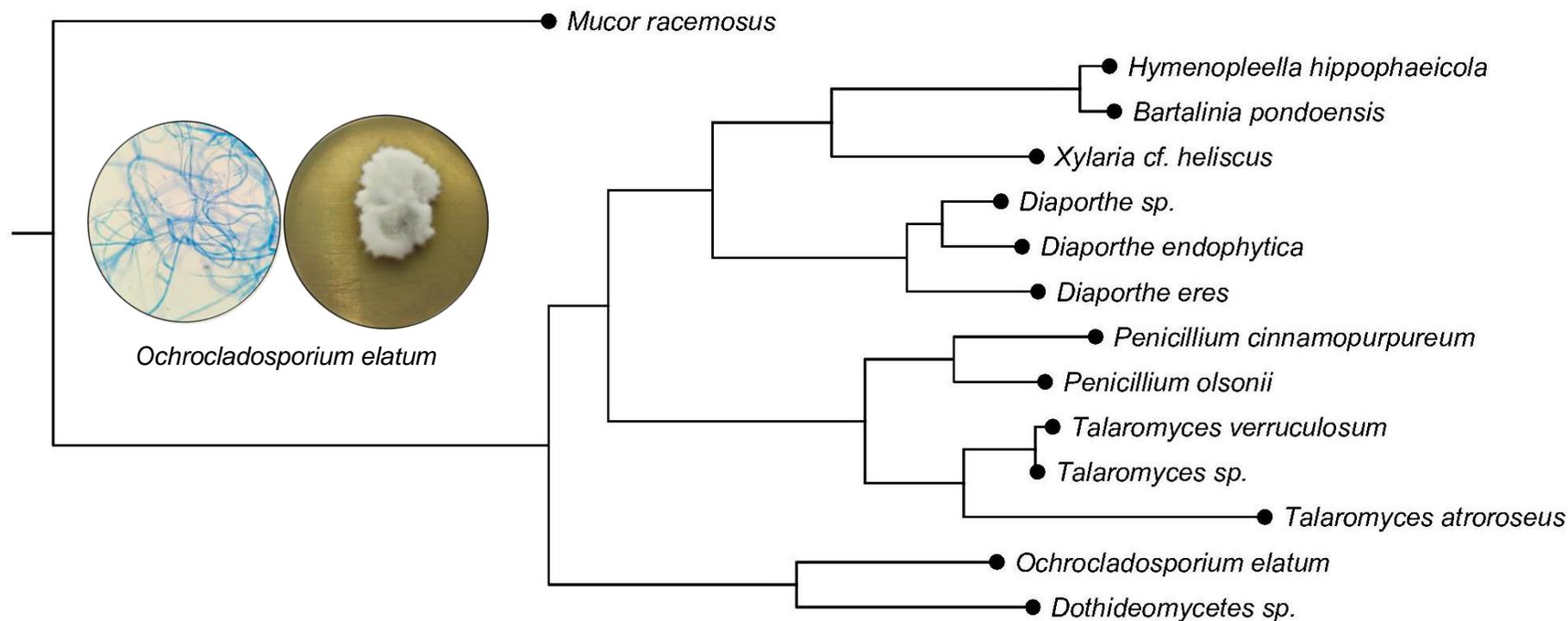


Figura 1. A) Árvore filogenética de máxima probabilidade obtida a partir da análise dos fragmentos de restrição da região ITS1. Os valores numéricos indicam o suporte ao bootstrap e probabilidades posteriores nesta ordem. B) Microscopia 100x e macromorfologia do fungo endofítico *O. elatum* em extrato malte ágar (MEA).

Tabela 2. Frequência de colonização (%) e rendimento do extrato dos fungos endofíticos isolados dos frutos, cascas do caule e raiz de *S. terebinthifolius* Raddi.

N°	Espécie	Identificação ESA	Frequência de colonização (%)			Rendimento (mg)
			Frutos	Caule	Raiz	
1	<i>M.racemosus</i>	ESA-FE1	30,77	nd	nd	49,20
2	<i>H. hippophaeicol</i>	ESA-FE2	nd	2,53	nd	nd
3	<i>B. pondoensis</i>	ESA-FE3	15,38	8,86	6,82	13,00
4	<i>X. cf. heliscus</i>	ESA-FE4	nd	1,27	nd	nd
5	<i>Diaporthe</i> sp.	ESA-FE5	15,38	27,85	nd	19,20
6	<i>D. endophytica</i>	ESA-FE6	15,38	10,13	nd	62,00
7	<i>D. eres</i>	ESA-FE7	nd	3,80	nd	nd
8	<i>P. cinnamopurpureum</i>	ESA-FE8	nd	nd	1,14	nd
9	<i>P. olsonii</i>	ESA-FE9	15,38	nd	nd	80,60
10	<i>Talaromyces</i> sp.	ESA-FE10	nd	nd	2,27	nd
11	<i>T. verruculosum</i>	ESA-FE11	nd	nd	18,18	182,00
12	<i>T. atroseus</i>	ESA-FE12	nd	1,27	43,18	175,60
13	<i>T. minioluteus</i>	ESA-FE13	nd	nd	28,41	219,00
14	<i>O. elatum</i>	ESA-FE14	7,69	nd	nd	25,20
15	<i>Dothideomycetes</i> sp.	ESA-FE15	nd	43,04	nd	22,10
16	Não identificado	-	nd	1,27	nd	nd

ESA: Escola Superior Agrária de Bragança; nd: não detectado.

Compostos fenólicos

Os extratos das 10 espécies de fungos endofíticos isolados de *S. terebinthifolius*, apresentaram como constituintes fenólicos majoritários flavonoides (Tabela 3). Dentre os endófitos, o extrato do fungo endofítico *O. elatum* (EAOc) apresentou maior quantidade de ácidos fenólicos e flavonoides.

Tabela 3. Compostos fenólicos dos extratos dos fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* Raddi.

Fungos endofíticos	Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	Ácidos fenólicos (mg EAC/g)	Flavonoides (mg EQ/g)
<i>M. racemosus</i>	51,58 ± 1,33	6,99 ± 0,85	18,28 ± 1,02
<i>B. pondoensis</i>	70,48 ± 0,64	16,13 ± 0,83	46,85 ± 1,70
<i>Diaporthe</i> sp.	65,61 ± 0,74	14,74 ± 0,02	43,43 ± 0,93
<i>D.endophytica</i>	30,59 ± 1,55	0,95 ± 0,32	10,93 ± 0,46
<i>P. olsonii</i>	70,51 ± 0,80	10,44 ± 0,10	41,40 ± 0,69
<i>T. verruculosum</i>	75,52 ± 0,18	20,01 ± 0,17	76,51 ± 1,62
<i>T. atroroseus</i>	18,72 ± 0,74	0,00 ± 0,00	8,68 ± 0,56
<i>T. minioluteus</i>	21,66 ± 1,58	0,00 ± 0,00	5,08 ± 0,74
<i>O. elatum</i>	85,18 ± 2,73	25,18 ± 1,38	72,41 ± 4,35
<i>Dothideomycetes</i> sp.	58,72 ± 0,25	9,15 ± 0,08	28,62 ± 0,44

AG: ácido gálico; AC: ácido cafeico; Q: quercetina. Os resultados são expressos em média ± SEM.

Atividade antioxidante

As propriedades antioxidantes dos extratos dos fungos endofíticos foram avaliadas pelos métodos de captura do radical livre DPPH[•], poder redutor do ferro FRAP e inibição do branqueamento de β -caroteno (Tabela 4). Todos os extratos dos fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* apresentaram atividade antioxidante. O EAOc apresentou a maior atividade antioxidante comparado aos demais extratos. Os valores de IC₅₀ para os ensaios de DPPH[•] e inibição do branqueamento β -caroteno, além do EC₅₀ para o ensaio de FRAP para o EAOe estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Propriedades antioxidantes dos extratos dos fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* Raddi.

Fungos endofíticos	DPPH[*] (mg equivalente Trolox/g)	FRAP (mg equivalente Fe II/g)	Inibição do branqueamento β-caroteno (%) (2 mg/mL)
<i>M. racemosus</i>	238,79 \pm 18,43	166,11 \pm 9,37	31,54 \pm 0,88
<i>B. pondoensis</i>	80,35 \pm 7,80	102,13 \pm 1,67	29,36 \pm 0,89
<i>Diaporthe</i> sp.	201,98 \pm 16,37	153,40 \pm 5,25	44,47 \pm 0,20
<i>D. endophytica</i>	67,54 \pm 2,23	46,30 \pm 2,00	30,05 \pm 0,66
<i>P. olsonii</i>	119,33 \pm 7,24	82,18 \pm 3,44	43,12 \pm 0,09
<i>T. verruculosum</i>	206,16 \pm 7,74	94,70 \pm 1,90	28,69 \pm 1,37
<i>T. atroroseus</i>	54,17 \pm 7,46	30,62 \pm 1,25	6,61 \pm 0,29
<i>T. minioluteus</i>	91,32 \pm 13,20	27,32 \pm 0,52	4,65 \pm 0,01
<i>O. elatum</i>	758,91 \pm 0,01	272,72 \pm 10,31	80,06 \pm 0,01
<i>Dothideomycetes</i> sp.	151,08 \pm 16,04	104,79 \pm 11,85	37,86 \pm 0,18

Os resultados são expressos em média \pm SEM.

Tabela 5. Propriedades antioxidantes do extrato do fungo endofítico *O. elatum* (EAOe).

Amostras	DPPH[•] (IC₅₀)	FRAP (EC₅₀)	Branqueamento β-caroteno (IC₅₀)
Ácido ascórbico	74,09 ± 0,72	28,30 ± 0,27	nd
BHA	79,87 ± 1,45	55,78 ± 1,85	4,92 ± 0,21
EAOe	677,27 ± 1,57	539,14 ± 6,70	161,36 ± 19,07

nd: não detectado. Os resultados são expressos em média ± SEM.

Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos dos fungos endofíticos foi avaliada contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os 10 extratos dos fungos testados apresentaram atividade antibacteriana contra pelo menos uma bactéria patogênica humana (Tabela 6).

Os extratos mostraram atividades seletivas contra a maioria das estirpes bacterianas testadas. *M. racemosus*, *D. endophytica*, *T. minioluteus*, *O. elatum* e *Dothideomyces* sp inibiram o crescimento de *S. aureus*, com valores de MIC que oscilaram entre 0,5 e 1,0 mg/mL.

K. pneumoniae ATCC foi a estirpe mais sensível aos extratos testados (concentrações entre 0,13 e 0,50 mg/mL), seguida de *S. enteritidis* ATCC (concentrações entre 0,25 e 1 mg/mL), cujo o crescimento foi inibido pelos 10 extratos. Para estas estirpes todos os extratos apresentaram atividade bactericida.

Os extratos de *D. endophytica* e *O. elatum* foram ativos contra todas as bactérias testadas. Entretanto, o EAOe evidenciou maior eficácia para as estirpes *S. aureus* ATCC e hospitalar (MBC de 0,5 mg/mL). O antibiótico de referência gentamicina, não foi eficaz contra as estirpes ATCC e hospitalar de *S. aureus*, sendo ativo contra as estirpes de *K. pneumoniae*, seguido de *S. enteritidis*.

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) (mg/mL), dos extratos dos fungos endofíticos isolados de *S. terebinthifolius* Raddi.

Fungos endofíticos	Bactérias gram-positivas		Bactérias gram-negativas			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Salmonella enteritidis</i>	
	ATCC 43300	ESA 111	ATCC 13883	ESA 232	ATCC 13076	ESA 206
<i>M. racemosus</i>	1,00*	1,00*	0,25*	nd	0,25*	nd
<i>B. pondoensis</i>	nd	nd	0,25*	nd	0,25/0,50*	nd
<i>Diaporthe</i> sp.	nd	nd	0,50*	nd	0,50*	nd
<i>D. endophytica</i>	1,00	1,00	0,50*	1,00	0,50*	1,00
<i>P. olsonii</i>	nd	nd	0,25/0,50*	nd	0,25*	nd
<i>T. verruculosum</i>	nd	nd	0,25*	nd	1,00*	nd
<i>T. atroroseus</i>	nd	nd	0,50*	nd	0,50*	nd
<i>T. minioluteus</i>	1,00	1,00	0,50/1,00*	nd	0,50*	nd
<i>O. elatum</i>	0,50*	0,50*	0,13/0,25*	1,00	0,50*	1,00
<i>Dothideomycetes</i> sp.	1,00	1,00	0,25/0,50*	nd	0,50*	nd
Gentamicina	nd	nd	0,0002/0,0006*	0,0003*	0,002*	0,0002/0,002*

ATCC: American Type Culture Collection; ESA: Escola Superior Agrária de Bragança; nd, não detectado (resultado superior a 1,00 mg/mL); *MBC

Compostos voláteis

Os compostos voláteis foram identificados nos extratos dos fungos endofíticos que apresentaram melhor atividade antibacteriana contra as cepas testadas. Dentre os compostos voláteis identificados, o composto 1-dodecanol foi majoritário em todos os extratos selecionados (Tabela 7).

Tabela 7. Compostos voláteis dos extratos de acetado de etila dos fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* Raddi.

Compostos voláteis (mg/L)	TR (min)	Fungos endofíticos				
		<i>M. racemosus</i>	<i>D. endophytica</i>	<i>T. verruculosum</i>	<i>O. elatum</i>	<i>Dothideomycetes sp.</i>
Ácido acético	11,22	0,87	2,52	8,70	1,65	1,76
Ácido 3-metilbutírico	18,69	nd	nd	9,67	8,03	0,12
Acetato 2-feniletilo	24,05	1,66	1,87	0,26	0,18	0,10
2-feniletanol	27,02	4,17	56,01	1,55	1,97	0,46
1-dodecanol	29,43	21,02	42,87	28,08	18,41	23,84
g-decalactona	34,44	1,74	0,24	1,72	nd	nd
Ácido hexadecanoico	54,77	nd	nd	13,96	nd	nd
4-octanol (padrão)	12,57	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00

TR: tempo de retenção; nd: não detectado.

Discussão

Neste estudo, foram isolados e identificados pela primeira vez, os fungos endofíticos dos frutos, cascas do caule e raiz de *S. terebinthifolius*. Os compostos bioativos e suas atividades biológicas foram investigados.

Assim como já identificado para as folhas de *S. terebinthifolius*, neste estudo foi observado o crescimento de espécies dos gêneros *Diaporthe* nos frutos e cascas do caule, *Xylaria* nas cascas do caule e *Penicillium* para os frutos e raiz (Tonial et al., 2017; Tonial et al., 2016; Lima et al., 2012). Além destes, neste estudo foram identificados os gêneros *Mucor*, *Hymenopleella*, *Bartalinia*, *Talaromyces*, *Ochrocladosporium* e *Dothideomycetes*.

Para avaliação da composição química e atividades biológicas, antioxidante e antibacteriana foram selecionados 10 fungos endofíticos com frequência de colonização superior a 5%. Foi verificado que os extratos dos fungos endofíticos isolados de *S. terebinthifolius* apresentaram dentre seus compostos fenólicos, flavonoides como grupo majoritário, seguido ácidos fenólicos.

Os compostos fenólicos são descritos por seu potencial antioxidante, devido sua habilidade em eliminar radicais livres, alto poder redutor e capacidade de inibir a oxidação lipídica, devido à presença de grupamentos hidroxilas em sua molécula (Amorati e Valgimigli, 2012; Cheng e Li, 2004; Rice-Evans et al., 1997). Neste trabalho, as atividades antioxidantes observadas pela eliminação do radical livre DPPH[•], poder redutor do ferro no ensaio FRAP, e inibição do branqueamento do β -caroteno por meio da redução da oxidação do ácido linoleico a radicais livres, corroboram essa perspectiva.

O extrato do fungo endofítico *O. elatum* (EAOe), apresentou maior conteúdo fenólico e melhores propriedades antioxidantes. Dentre os dez fungos endofíticos selecionados neste estudo, apenas o extrato de *Diaporthe* sp. (Tanapichatsakul et al., 2017) e compostos isolados de *Dothideomycete* sp. (Leutou et al., 2012) apresentam atividade antioxidante relatada na literatura, utilizando o método de eliminação do radical livre DPPH[•]. Não existem estudos sobre a constituição química e atividade biológica do EAOe, o que torna os resultados observados neste estudo promissores.

Além disso, os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade estrutural e, a presença de grupamentos hidroxilas, bem como, sua posição de

substituição e comprimento da cadeia lateral saturada, influenciam na a atividade antibacteriana, permitindo uma eficácia seletiva e atividade contra microrganismos resistentes (Rempe et al., 2017; Cushnie e Lamb, 2011; Cueva et al., 2010).

S. aureus é uma bactéria gram-positiva, entretanto, esse patógeno humano apresenta mecanismos para adquirir resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, sendo constantemente fonte de infecções humanas, incluindo endocardite infecciosa, infecções cutâneas, osteomielite, infecções pulmonares, gastroenterite e infecções do trato urinário (Taylor e Unakal, 2017; Bhimji e Unakal, 2017; Robert e Moellering, 2012). Neste estudo, a gentamicina, não inibiu o crescimento de *S. aureus*, no entanto, cinco extratos dos fungos endofíticos (*M. racemosus*, *D. endophytica*, *T. minioluteus*, *O. elatum* e *Dothideomycetes* sp.) foram capazes de inibir o crescimento do patógeno. Dentre os fungos ativos contra *S. aureus*, o EAOe apresentou maior eficácia nas cepas ATCC e hospitalar com MIC e MBC de 0,5 mg/mL.

Outros estudos mostram a atividade antibacteriana contra a bactéria *S. aureus* de extratos obtidos dos fungos endofíticos *Mucor racemosus* (Tajdini et al., 2010), extrato e compostos isolados de *Diaporthe* sp. (Tanapichatsakul et al., 2017; Sousa et al., 2016; Li et al., 2015) e compostos isolados do fungo endofítico *Dothideomycete* sp. (Leutou et al., 2012), contra a bactéria *S. aureus*. Compostos isolados da espécie *T. minioluteus* foram testadas em estudo anterior contra bactéria *S. aureus*, onde os valores de MIC foram considerados superiores a 100 µg/mL (Kaur et al., 2016). Não existem estudos sobre a atividade antibacteriana do fungo endofítico *O. elatum*, tornando os resultados obtidos neste estudo relevantes para o desenvolvimento de produtos antibacterianos.

K. pneumoniae e *S. enteritidis* são bactérias gram-negativas. A bactéria *K. pneumoniae* esta associada principalmente a infecções hospitalares, infecções do trato urinário, pneumonia e infecções sanguíneas e, também ocasionam abscesso hepático piogênico, endoftalmite e meningite (Martin e Bachman, 2018). A bactéria *S. enteritidis* é a principal responsável por contaminações de origem alimentar, ocasionando infecções no trato gastrointestinal e desenvolvimento de doenças sistêmicas (Anderson e Kendall, 2017).

Todos os extratos dos fungos endofíticos isolados e identificados neste estudo foram ativos contra as estirpes ATCC de *K. pneumoniae* e *S. enteritidis*, entretanto, apenas *D. endophytica* e *O. elatum* foram eficazes nas estirpes hospitalares de *K. pneumoniae* e *S. enteritidis*. Este estudo corrobora pesquisas anteriores, onde o extrato obtido do fungo endofítico *Mucor racemosus* (Tajdini et al., 2010) e *Diaporthe* sp. (Tanapichatsakul et al., 2017) apresentaram atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae*. Não existem pesquisas com os fungos endofíticos identificados neste estudo contra a bactéria *S. enteritidis*.

Os compostos antibacterianos podem atuar sobre diferentes alvos nas bactérias que incluem a parede celular, a membrana plasmática, a síntese proteica, o metabolismo de ácidos nucleicos e a ação direta sobre o DNA (Calvo e Martínez-Martínez, 2009).

Os compostos voláteis são descritos por seu potencial antimicrobiano (Jirovetz et al., 2011; Ryssel et al., 2009; Hayashida et al., 2008; Togashi et al., 2007; Fraud et al., 2003). Dentre os fungos endofíticos avaliados, *O. elatum* se destacou por apresentar melhor atividade antioxidante e antibacteriana, atribuída aos compostos fenólicos e compostos voláteis. Dentre os compostos voláteis identificados no EAOe, o 1-dodecanol foi majoritário, seguido pelo ácido 3-metilbutírico, 2-feniletanol, ácido acético e acetato 2-feniletilo.

A atividade antibacteriana do 1-dodecanol e do ácido 3-metilbutírico já foi reportada contra bactérias resistentes, atribuída as suas cadeias de carbono alifáticas, que atuam sobre a integridade da membrana plasmática (Yang et al., 2016; Hayashida et al., 2008; Togashi et al., 2007). O álcool aromático 2-feniletanol (Fraud et al., 2003), o ácido acético (Ryssel et al., 2009) e, o acetato 2-feniletilo (Jirovetz et al., 2011) apresentam atividade antibacteriana contra diferentes bactérias gram-positiva e gram-negativa.

Em conclusão, este estudo evidenciou pela primeira vez a atividade biológica do EAOe, isolado dos frutos de *S. terebinthifolius*. As atividades antioxidante e antibacteriana podem ser atribuídas aos compostos fenólicos e compostos voláteis. O EAOe pode ser indicado como uma fonte natural promissora de compostos antioxidantes e antibacterianos.

Referências

- Alves, L. A., Freires, I. A., Pereira, T. M., Souza, A., Lima, E. O., Castro, R. D. (2013) Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71, 965-971. DOI: 10.3109/00016357.2012.741694
- Aly, A. H., Debbab, A., Proksch, P. (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1829-1845. DOI: 10.1007/s00253-011-3270-y
- Amorati, R., Valgimigli, L. (2012) Modulation of the antioxidant activity of phenols by non-covalent interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 4147-4158. DOI: 10.1039/c2ob25174d
- Anderson, C. J., Kendall, M. M. (2017) *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Strategies for Host Adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 01-16. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01983
- Bendaoud, H., Romdhane, H., Souchard, J. P., Cazaux, S., Bouajila, J. (2010) Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *Journal of Food Science*, 75, C466-72. DOI: 10.1111 / j.1750-3841.2010.01711.x
- Benko-Iseppon, A. M., Crovella, S. (2010) Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and perspectives. *Current Protein & Peptide Science*, 11, 189-194. DOI: 10.2174/138920310791112129
- Bhimji, S.S., Unakal, C. G. (2017) Bacteria, Gram Positive. *StatPearls*, 2017. PMID: 29261915
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., Navarro, M. (2014) Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 1-6. DOI: 10.1002/jsfa.6706
- Brandão, M. G. L., Consenza, G. P., Moreira, R. A., Monte-Mor, R. L. M. (2006) Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian official pharmacopeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16, 408-420. DOI: 10.1590/S0102-695X2006000300020
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L. (2009) Antimicrobial mechanisms of action. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 44-52. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Cheng, Z., Li, Y. (2004) Reducing power: the measure of antioxidant activities of reductant compounds? *Redox Report*, 9, 213-217. DOI: 10.1179/135100004225005994
- Cole, E. R., Santos, R. B., Lacerda Júnior, V., Martins, J. D., Greco, S. J., Cunha Neto, A. (2014) Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 821-828. PMID: PMC4204964

- Coulibaly, A. Y., Hashim, R., Sulaiman, S. F. Sulaiman, O., Ang, L. Z., Ooi, K. L. (2014) Bioprospecting medicinal plants for antioxidant components. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7S1, S553-9. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60289-3
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodríguez, J. M., Bartolomé B. (2010) Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. 161, 372-382. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.04.006
- Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99-107. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014
- D'Sousa' Costa, C. O., Ribeiro, P. R., Loureiro, M. B., Simões, R. C., de Castro, R. D., Fernandez, L. G. (2015) Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacognosy Magazine*, 11, 607-614. <http://www.phcog.com/text.asp?2015/11/43/607/160459>
- El-Massry, K. F., El-Ghorab, A. H., Shaaban, H. A., Shibamoto, T. (2009) Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5265-5270. DOI: 10.1021/jf900638c
- Fraud, S., Rees, E. L., Mahenthiralingam, E., Russell, A. D., Maillard, J.-Y. (2003) Aromatic alcohols and their effect on Gram-negative bacteria, cocci and mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1435–1436. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg246>
- Hayashida-Soiza, G., Uchida, A., Mori, N., Kuwahara, Y., Ishida, Y. (2008) Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. *Journal of Applied Microbiology*, 105,1672-1677. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03878.x.
- Leopold Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A., Geissler, M. (2011) Purity, Antimicrobial Activities and Olfactory Evaluations of 2-Phenylethanol and Some Derivatives. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 82-85. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9699429>
- Kaur, A., Raja, H. A., Swenson, D. C., Agarwal, R., Deep, G., Falkinham, J. O., Oberlies, N. H. (2016) Talarolutins A–D: Meroterpenoids from an Endophytic Fungal Isolate of *Talaromyces minioluteus*. *Phytochemistry*, 126, 4-10. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.03.013
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H., Proksch, P. (2010) Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols*, 5, 479-490. DOI: 10.1038/nprot.2009.233
- Koleva, I. I., Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A., Evstatieva, L. N. (2002) Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 8-17. DOI: 10.1002/pca.611

- Kumar, A., Patil, D., Rajamohanam, P. R., Ahmad, A. (2013) Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. PLoS One, 8, e71805. DOI: 10.1371/journal.pone.0071805
- Leutou, A. S., Yun, K., Choi, H. D., Kang, J. S., Son, B. W. (2012) New Production of 5-Bromotoluhydroquinone and 4-O-Methyltoluhydroquinone from the Marine-Derived Fungus *Dothideomycete* sp. Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 80-83. PMID: 22297222
- Li, G., Kusari, S., Kusari, P., Kayser, O., Spiteller, M. (2015) Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 Produces a Potent Antibacterial Tetracyclic Triterpenoid. Journal of Natural Products, 78, 2128-2132. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00170
- Lima, J. S., Figueiredo, J. G., Gomes, R. G., Stringari, D., Goulin, E. H., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L. V., Glienke, C. (2012) Genetic Diversity of Colletotrichum spp. an Endophytic Fungi in a Medicinal Plant, Brazilian Pepper Tree. International Scholarly Research Network, 2012, 7 pages. DOI: 10.5402/2012/215716
- Mani, V. M., Soundari, A. P., Karthiyaini, D., Preeth, K. (2015) Bioprospecting Endophytic Fungi and Their Metabolites from Medicinal Tree *Aegle marmelos* in Western Ghats, India. Mycobiology, 43, 303-310. DOI: 10.5941/MYCO.2015.43.3.303
- Martin, R. M., Bachman, M. A. (2018) Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8, 01-15, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
- Molla, Y., Nedi, T., Tadesse, G., Alemayehu, H., Shibeshi, W. (2016) Evaluation of the *in vitro* antibacterial activity of the solvent fractions of the leaves of *Rhamnus prinoides* L'Herit (Rhamnaceae) against pathogenic bacteria. BMC Complementary & Alternative Medicine, 16, 1-9. DOI: 10.1186/s12906-016-1279-6
- Morton, J. F. (1978) Brazilian pepper: its impact on people, animals and the environment. Economic Botany, 32, 353-359. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4613-2907-2_27.pdf
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2011) Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). Food and Chemical Toxicology, 49, 2983-2989. DOI: 10.1016/j.fct.2011.07.054
- Rempe, C. S., Burris, K. P., Lenaghan, S. C., Stewart, C. N. (2017) The Potential of Systems Biology to Discover Antibacterial Mechanisms of Plant Phenolics. Frontiers in Microbiology, 8, 422. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00422
- Robert, C., Moellering, Jr. (2012) MRSA: the first half century. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67, 4-11. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkr437>
- Rocha, P. S., Campos, J. F., Souza, V. N., Vieira, M. C., Boleti, A. P. A., Rabelo, L. A., Santos, E. L., Souza, K. P. (2017) Antioxidant and Protective Effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi Against Doxorubicin-Induced Toxicity.

Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 1-16. DOI: 10.1007/s12010-017-2589-y

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science, 2, 152-159. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)

Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, T., Wiedemann, G., Oehlbauer, M. (2009) The antimicrobial effect of acetic acid-an alternative to common local antiseptics? Burns, 35, 695-700. DOI: 10.1016/j.burns.2008.11.009.

Santos, U. P. S., Tolentino, G. S., Morais, J. S., Souza, K. P., Estevinho, M. L. M. F., Santos, E. L. (2018) Physicochemical Characterization, Microbiological Quality and Safety, and Pharmacological Potential of *Hancornia speciosa* Gomes. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018: 2976985. DOI: 10.1155/2018/2976985

Silva, M. M., Iriguchi, E. K. K., Kassuya, C. A. L., Vieira, M. C., Foglio, M. A., Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Souza, K. P., Formagio, A. S. N. (2017a) *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and *in vitro* antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-inflammatory activities. Revista Brasileira de Farmacognosia, 27, 445-452. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.12.007

Silva, J. H. S., Simas, N. K., Alviano, C. S., Alviano, D. S., Ventura, J. A., Lima, E. J., Seabra, S. H., Kuster, R. M. (2017b) Anti-*Escherichia coli* activity of extracts from *Schinus terebinthifolius* fruits and leaves. Natural Product Research, 3, 1-4. DOI: 10.1080/14786419.2017.1344657

Silva, G. B. P. G., Silvino, K. F., Bezerra, J. D. P., Farias, T. G. S., Araújo, J. M., Stamford, T. L. M. (2017c) Antimicrobial activity of *Phoma* sp. URM 7221: An endophyte from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). African Journal of Microbiology Research, 11, 1-7. DOI: 10.5897/AJMR2016.8326

Sousa, J.P.B., Aguilar-Perez, M.M., Arnold, A.E., Rios, N., Coley, P.D., Kursar, T.A., Cubilla-Rios, L. (2016) Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. Journal of Applied Microbiology, 120, 1501-1508. DOI: 10.1111/jam.13132

Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science, 260, 214-216. DOI: 10.1126/science.8097061

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004) Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products, 67, 257-268. DOI: 10.1021/np030397v

Tajdini, F., Amini, M. A., Nafissi-Varcheh, N., Faramarzi, M. A. (2010) Production, physicochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. International Journal of Biological Macromolecules, 47, 180-183. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.05.002

Tanapichatsakul, C., Monggoot, S., Gentekaki, E., Pripdeevech, P. (2017) Antibacterial and Antioxidant Metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from Flowers of *Melodorum fruticosum*. Current Microbiology, 2017, 1-8. DOI: 10.1007/s00284-017-1405-9

Tanvir, R., Javeed, A., Bajwa, A. G. (2017) Endophyte bioprospecting in South Asian medicinal plants: an attractive resource for biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 1831-1844. DOI: 10.1007/s00253-017-8115-x

Taylor, T. A., Unakal, C. G. (2017) *Staphylococcus aureus*. StatPearls, 2017. PMID: 28722898

Togashi, N., Shiraishi, A., Nishizaka, M., Matsuoka, K., Endo, K., Hamashima, H., Inoue, Y. (2007) Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 12, 139-148. DOI:10.3390/12020139

Tonial, F., Maia, B. H. L. N. S., Gomes-Figueiredo, J. A., Sobottka, A. M., Bertol, C. D., Nepel, A., Savi, D. C., Vicente, V. A., Gomes, R. R., Glienke, C. (2016) Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Current Microbiology*, 72, 173-183. DOI: 10.1007/s00284-015-0929-0

Tonial, F., Maia, B. H. L. N. S., Sobottka, A. M., Savi, D. C., Vicente, V. A., Gomes, R. R., Glienke, C. (2017) Biological activity of *Diaporthe terebinthifolii* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 1-7. DOI: 10.1093/femsle/fnx026

Ustundag, Y., Huysal, K., Kahvecioglu, S., Demirci, H., Yavuz, S., Sambel, M., Unal, D. (2016) Establishing reference values and evaluation of an in-house ferric reducing antioxidant power (FRAP) colorimetric assay in microplates. *The European Research Journal*, 2, 126-131. DOI: <http://dx.doi.org/10.18621/eurj.2016.5000190265>

Yang, X., Huang, E., Yuan, C., Zhang, L., Yousef, A. E. (2016) Isolation and Structural Elucidation of Brevibacillin, an Antimicrobial Lipopeptide from *Brevibacillus laterosporus* That Combats Drug-Resistant Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 2763-2772. DOI: 10.1128/AEM.00315-16