



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE
COMPOSTOS SEMI-PURIFICADOS DE FOLHAS DE
BUCHENAVIA TETRAPHYLLA R. A. HOWARD E *MYRCIA
HIRTIFLORA* DC. AVALIADOS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***

TIAGO FONSECA SILVA

**ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
CO-ORIENTADORES: PROF^o DR LUIS CLAUDIO DO NASCIMENTO
SILVA
PROF^a DR^a MARCIA VANUSA DA SILVA**

**RECIFE
2021**

TIAGO FONSECA SILVA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE
COMPOSTOS SEMI-PURIFICADOS DE FOLHAS DE
BUCHENAVIA TETRAPHYLLA R. A. HOWARD E *MYRCIA
HIRTIFLORA* DC. AVALIADOS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese de Doutorado apresentado
como um dos requisitos para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título
de Doutor em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Tereza dos
Santos Correia

Coorientadores: Prof. Dr. Luis Claudio do
Nascimento Silva
Prof^a. Dra. Marcia Vanusa
da Silva

**RECIFE
2021**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Silva, Tiago Fonseca da

Potencial antimicrobiano e antioxidante de compostos semi-purificados de folhas de *Buchenavia tetraphylla* R.A. Howard e *Myrcia hirtiflora* DC. Avaliados em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* / Tiago Fonseca da Silva – 2021.

150 f. : il., fig., tab.

Orientador: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadores: Luis Claudio do Nascimento Silva e Marcia Vanusa da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Plantas medicinais 2. Antioxidantes 3. Caatinga I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient). II. Silva, Luis Claudio do Nascimento (coorient.) III. Silva, Marcia Vanusa da (coorient.) IV. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-168

TIAGO FONSECA SILVA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE
COMPOSTOS SEMI-PURIFICADOS DE FOLHAS DE
BUCHENAVIA TETRAPHYLLA R. A. HOWARD E *MYRCIA
HIRTIFLORA* DC. AVALIADOS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese de Doutorado apresentado
como um dos requisitos para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título
de Doutor em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr^a. Carolina Barbosa Malafaia
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Dr. Clovis Macêdo Bezerra Filho
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Data:24/08/2021

RESUMO

Atualmente doenças infecciosas e agentes estressores ainda representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre seres humanos, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Atingimos um ponto crítico em que novas drogas não estão sendo desenvolvidos no ritmo necessário para conter esta capacidade natural dos patógenos de adquirir resistência contra os antibióticos. E também é necessário o desenvolvimento de novas soluções para reduzir os efeitos deletérios do envelhecimento e, portanto prolongar o tempo de vida saudável. Diante disso o objetivo deste trabalho identificar e caracterizar metabólicos secundário de folhas da *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora* com ação antimicrobiana e antioxidante. As folhas de *B. tetraphylla* e *M. hirtiflora* foram coletadas em Buíque-PE, foram secas, moídas e realizada uma extração com solventes orgânicos para obtenção de extrato bruto. O fracionamento do extrato de melhor atividade foi realizado por cromatografia em coluna aberta Sephadex LH-20. Para a determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de micro diluição, onde foi determinado a concentração mínima Inibitória (CMI) e a Mínima Microbicida (CMM) contra as linhagens de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. Todos os extratos da *B. tetraphylla* apresentaram anti-*C. albicans*. Os valores de CMI variaram de 156 a 2500 µg/mL para o BTHE; 156 a 1250 µg/mL para o BTCE; 625 a 1250 µg/mL para o BTME e 625 a 2500 µg/mL para o BTEE. O BTME apresentou o melhor atividade anti-*C. albicans*. Este extrato demonstrou interações aditivas/sinérgicas com o fluconazol. A análise por microscopia eletrônica de varredura sugeriu que o BTME interfere na divisão celular e no desenvolvimento de *C. albicans*. O BTME apresentou valores de IC₅₀ 981 e 3935 µg/mL, contra macrófagos J774 e eritrócitos humanos, respectivamente. Este extrato também aumentou a produção de óxido

nítrico pelos macrófagos J774. Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizado várias metodologias, como: DPPH, ABTS, Dosagem de compostos fenólicos e flavonóides. Devido às suas maiores propriedades antioxidantes, o extrato metanólico (BTME) foi escolhido para ser fracionado por cromatografia em coluna Sephadex LH-20. Duas frações de BTME (BTFC e BTFD) foram as frações mais ativas. O pré-tratamento com essas frações protegeu as larvas de *T. molitor* do estresse induzido pela inoculação de *E. coli* inativada pelo calor. Da mesma forma, BTFC (10mg/Kg e 20mg/Kg) e BTFD (10mg/Kg e 20mg/Kg) aumentaram a vida útil das larvas infectadas com uma dose letal de *E. coli* 042 enteroagregativa. Também foram testados os extratos das folhas de *M. Hirtiflora* onde apresentou um aumento de vida útil das larvas com o extrato MHME (25mg/Kg). Os dados de RMN indicaram a presença de compostos alifáticos (terpenos, ácidos graxos, carboidratos) e compostos aromáticos (compostos fenólicos). Esses achados sugerem que os extratos utilizados são candidatos promissores para o desenvolvimento de agentes antioxidantes e anti-infecciosos. Assim, com esses dados estimular novas pesquisas sobre aspectos farmacológicos e citotóxicos dos extratos/frações da *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora* a fim de apoiar a sua aplicação como agente antimicrobiano e antioxidante.

Palavras-chave: *Buchenavia tetraphylla*; *Myrcia hirtiflora*; Caatinga; *Tenebrio molitor*; Resistência microbiana.

ABSTRACT

Currently, infectious diseases and stressors still represent an important cause of morbidity and mortality among human beings, especially in developing countries such as Brazil. We have reached a critical point where new drugs are not being developed at the pace necessary to curb this natural ability of pathogens to acquire resistance against antibiotics. And it is also necessary to develop new solutions to reduce the deleterious effects of aging and, therefore, prolong a healthy life span. Therefore, the objective of this work is to identify and characterize secondary metabolites of leaves of *Buchenavia tetraphylla* and *Myrcia hirtiflora* with antimicrobial and antioxidant action. The leaves of *B. tetraphylla* and *M. hirtiflora* were collected in Buíque-PE, dried, ground and extracted with organic solvents to obtain a crude extract. The fractionation of the extract with the best activity was performed by Sephadex LH-20 open column chromatography. The microdilution method was used to determine the antimicrobial activity, where the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum microbicidal concentration (MMC) were determined against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* strains. All extracts of *B. tetraphylla* showed anti-*C. albicans*. CMI values ranged from 156 to 2500 µg/mL for BTHE; 156 to 1250 µg/mL for BTCE; 625 to 1250 µg/mL for BTME and 625 to 2500 µg/mL for BTEE. BTME showed the best anti-*C. albicans*. This extract has demonstrated additive/synergistic interactions with fluconazole. Scanning electron microscopy analysis suggested that BTME interferes with cell division and development of *C. albicans*. The BTME presented IC₅₀ values of 981 and 3935 µg/mL, against J774 macrophages and human erythrocytes, respectively. This extract also increased nitric oxide production by J774 macrophages. For the determination of the antioxidant activity, several

methodologies were used, such as: DPPH, ABTS, Dosage of phenolic compounds and flavonoids. Due to its higher antioxidant properties, the methanolic extract (BTME) was chosen to be fractionated by Sephadex LH-20 column chromatography. Two BTME fractions (BTFC and BTFD) were the most active fractions. Pretreatment with these fractions protected *T. molitor* larvae from the stress induced by heat-inactivated *E. coli* inoculation. Likewise, BTFC (10mg/Kg and 20mg/Kg) and BTFD (10mg/Kg and 20mg/Kg) increased the lifespan of larvae infected with a lethal dose of enteroaggregative *E. coli* 042. The extracts of *M. Hirtiflora* leaves were also highlighted, which showed an increase in the useful life of the larvae with the MHME extract (25mg/Kg). NMR data indicated the presence of aliphatic compounds (terpenes, fatty acids, carbohydrates) and aromatic compounds (phenolic compounds). These findings suggest that the extracts used are promising candidates for the development of antioxidant and anti-infective agents. Thus, with these data stimulate further research on pharmacological and cytotoxic aspects of extracts/fractions of *Buchenavia tetraphylla* and *Myrcia hirtiflora* in order to support their application as an antimicrobial and antioxidant agent.

Keywords: *Buchenavia tetraphylla*; *Myrcia hirtiflora*; Caatinga; *Tenebrio molitor*; Microbial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Mapa do Brasil com a localização do domínio Caatinga....	21
Figura 2-	(A): Folha e fruto da <i>Buchenavia tetraphylla</i> , (B): Exsicata da <i>Buchenavia tetraphylla</i> depositada no herbário do IPA...	23
Figura 3-	(A): Folha e flores da <i>Myrcia hirtiflora</i> e (B): Exsicata da <i>Myrcia hirtiflora</i> depositada no herbário do IPA.....	26
Figura 4-	Fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários.....	27
Figura 5-	Síntese de metabolitos secundários de plantas medicinais..	29
Figura 6-	Classificação dos Compostos fenólicos/Polifenóis.....	30
Figura 7-	Classificação dos Flavonoides.....	31
Figura 8-	Estrutura básica dos flavonoides.....	32
Figura 9-	Classificação da catequina.....	33
Figura 10-	Estrutura molecular da catequina.....	34
Figura 11-	Fontes Endógenas e Exógenas produtoras de espécies reativas.....	37
Figura 12-	Mecanismo de Resistência Microbiano.....	42
Figura 13-	<i>Staphylococcus aureus</i> . (A) Imagem do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> em placa de petri com meio de cultura. (B) Imagem de <i>Staphylococcus aureus</i> por microscopia eletrônica de varredura.....	46
Figura 14-	<i>Candida albicans</i> . (A) Imagem do crescimento de <i>Candida albicans</i> em placa de petri com meio de cultura. (B) Imagem de <i>Candida albicans</i> por microscopia eletrônica de varredura.....	49
Figura 15-	Fases do desenvolvimento morfológico do <i>Tenebrio molitor</i> ; A: Fase larval, B: Fase de pupa e C Besouro.....	51

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ARTIGO 1

Figura 1-	Combinatory effects of BTME and fluconazole Against <i>Candida albicans</i> non: non-interactive effect; add: aditive effect; syn: synergistic effect; ant: antag-onistic effect.....	60
------------------	---	----

- Figura 2-** Effects of BTME on *C. albicans*. (a–c) Control cells; (d–f) cells treated with BTME at MIC for 12 h. (a–c) Ultrastructural aspects of untreated *C. albicans* culture at low (a) and high magnification (b–c) showing the presence of single and budding yeast cells with evident fragile blastoconidial septum (white arrow). (h) True hyphal structures could be also observed. Treated *C. albicans* culture at (d) low and (e–f) high magnifications. Note in (e) the presence of elongated cells (white asterisk) with multiple scars (white arrow). (f) Cells presenting surface depressions are indicated in white arrow..... 61
- Figura 3-** Effect of BTME on nitric oxide production by J774 macrophages. *Significant differences in relation to control ($p < 0.05$)..... 62

ARTIGO 2

- Figura 1-** Comparative evaluation of antioxidant activity by the ABTS assay of the crude extracts (A) and fractions (B) of *Buchenavia tetraphylla* leaves. BTHE: hexane extract; BTCE: chloroform extract; BTEE: ethyl acetate extract; BTME: methanolic extract; BTFA: Fraction A; BTFB: Fraction B; BTFC: Fraction C; BTFD: Fraction D; BTFE: Fraction E; BTFF: Fraction F; BTFG: Fraction G; BTFH: Fraction H; BTFI: Fraction I. In each graph, values with significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different superscript letters (^a, ^b, ^c). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$)..... 68
- Figura 2-** Hemolytic activity of the crude extracts of *Buchenavia tetraphylla* leaves. (A) BTHE (hexane extract); (B) BTCE (chloroform extract); (C) BTEE (ethyl acetate extract); (D) BTME (methanolic extract). *** Significant differences in relation to triton-X ($p < 0.0001$). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in quadruplicate ($n = 4$)..... 70
- Figura 3-** Hemolytic activity of the fractions obtained from the

methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves. (A) BTFA (Fraction A); (B) BTFB (Fraction B); (C) BTFC (Fraction C); (D) BTFD (Fraction D); (E) BTFE (Fraction E); (F) BTFF (Fraction F); (G) BTFG (Fraction G); (H) BTFH (Fraction H); (I) BTFI (Fraction I). *** Significant differences in relation to triton-X ($p < 0.0001$). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in quadruplicate ($n = 4$)... 71

Figura 4- Effects of methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves (BTME) and its fractions (BTFC and BTFD) on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with heat-killed *Escherichia coli* OP50. (A) Effects of BTME on the survival of *T. molitor* larvae challenged with heat-killed *E. coli* OP50; (B) effects of BTFC on the survival of *T. molitor* larvae challenged with heat-killed *E. coli* OP50; (C) effects of BTFD on the survival of *T. molitor* larvae challenged with heat-killed *E. coli* OP50. The larvae ($n = 10/\text{group}$) were pre-treated with each sample (at 10 mg/kg or 20 mg/kg) 12 h prior to inoculation of heat-killed bacteria. Larvae treated with phosphate-saline buffer (PBS) or *E. coli* OP50 (BAC) were used as negative or positive controls, respectively. In this set of assays, larvae survival was recorded each 12 h. The experiment was repeated three times.. 72

Figura 5- Effects of fractions from methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves (BTFC and BTFD) on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with *Escherichia coli* 042. (A) Effects of BTFC on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with *E. coli* 042. (B) Effects of BTFD on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with *E. coli* 042. The larvae ($n = 10/\text{group}$) received a lethal dose of EAEC 042 and after 2 h were treated with fraction BTFC and BTFD (at 10 mg/kg or 20 mg/kg). Larvae treated with phosphate-saline buffer (PBS) or EAEC 042 were used as negative or positive controls, respectively. In this set of assays, larvae survival was recorded each 24 h. The experiment was repeated three times..... 73

Figura 6- Representative ^1H NMR spectrum of the active fractions (BTFC and BTFD) obtained from the methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves..... 74

ARTIGO 3

Figura 1-	Conteúdo de compostos fenólicos (A) e flavonóides (B) (concentração de 1000 µg/mL) dos extratos brutos obtidos de folhas <i>Myrcia hirtiflora</i> . CHX: extrato ciclohexânico; CLO: extrato clorofórmico; ACT: extrato de acetato de etila; MET: extrato metanólico.....	97
Figura 2-	Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do DPPH dos extratos bruto da <i>Myrcia hirtiflora</i> e Trolox. (A) Extrato Ciclohexano; (B) Extrato Clorofórmio; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico; (E) Trolox. CHX: extrato ciclohexano; CLO: extrato clorofórmio; ACT: extrato de acetato de etila; MET: extrato metanólico.....	98
Figura 3-	Avaliação de sobrevivência do <i>Tenebrio molitor</i> tratado com o extrato metanólico após o estresse causado pelo H ₂ O ₂	99
Figura 4-	Atividade hemolítica dos extratos brutos da <i>Myrcia hirtiflora</i> . (A) Extrato Hexânico; (B) Extrato Clorofórmico; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico.....	100
Figura 5-	Avaliação da atividade antibiofilme de concentrações subinibitórias do extrato de metanólico de folhas de <i>M. hirtiflora</i> contra diferentes linhagens de <i>S. aureus</i>	102
Figura 6-	Avaliação da eficácia do extrato metanólico (EMMH) obtido da folha de <i>M. hirtiflora</i> na sobrevivência das larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>S. aureus</i> ATCC 6538. As larvas foram tratadas com o extrato EMMH na dose de 3,12 mg/Kg, respectivamente. Foram incluídos no ensaio grupos de controle negativo injetadas com PBS.....	104
Figura 7-	Avaliação do efeito do extrato metanólico (EMMH) obtidos da folha de <i>M. hirtiflora</i> na carga bacteriana na hemolinfa de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectadas com <i>S. aureus</i> ATCC 6538 (Sa). (*) Diferenças estatística em relação as larvas infectadas e não-tratadas.....	105
Figura 8-	Efeito do tratamento do extrato metanólico das folhas de <i>Myrcia hirtiflora</i> na melanização (A) e densidade de hemócitos (B) de <i>T. molitor</i> infectados com <i>S. aureus</i> ATCC 6538 (Sa). (*) Diferenças estatística em relação as larvas não infectadas. (#) Diferenças estatística em relação as larvas infectadas e não-tratadas.....	106
Figura 9-	Total Ion Chromatogram from the methanol extract <i>Myrcia hirtiflora</i> acquired by LC-ESI-MS (<i>m/z</i> : 100–2000 Da) and proposed structures compounds identified by HPLC-DAD-ESI-MS and FIA-ESI-IT-MS ⁿ	107

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Antibiotic-resistance profile of <i>C. albicans</i> clinical strains isolatec from vaginal secretion samples.....	58
Tabela 2	Phytochemical analysis of <i>B. tetraphylla</i> leaves extracts.....	59
Tabela 3	The anti- <i>Candida albicans</i> activity os extracts from <i>B. tetraphylla</i> leaves.....	60

ARTIGO 2

Tabela 1	Comparative analysis of total phenolic compounds, flavonoid content, and DPPH radical scavenging of the crude extracts from the leaves of <i>Buchenavia tetraphylla</i>	67
Tabela 2	Comparative analysis of total phenolic compounds and flavonoid content and DPPH radical scavenging of the crude extracts from leaves of <i>Buchenavia tetraphylla</i>	69

ARTIGO 3

Tabela 1	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de <i>Myrcia hirtiflora</i> contra diferentes linhagens de <i>S. aureus</i>	101
Tabela 2	Valores de concentrações inibitórias mínimas obtidas para os antibióticos ciprofloxacina e vancomicina frente <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	103
Tabela 3	Concentração inibitória fracionada do extrato metanólico combinados com drogas ciprofloxacina e vancomicina frente <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	103
Tabela 4	Identification of compounds in <i>Myrcia hirtiflora</i> by FIA-ESI-IT/MS ⁿ	107

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	Plantas medicinais.....	19
2.2	Caatinga.....	20
2.3	Família Combretaceae.....	21
2.3.1	<i>Buchenavia tetraphylla</i>	22
2.4	Família Myrtaceae.....	24
2.4.1	<i>Myrcia hirtiflora</i>	25
2.5	Compostos Bioativos derivados de tecidos vegetais.....	26
2.5.1	Compostos Fenólicos.....	29
2.5.2	Flavonoides.....	30
2.5.3	Catequina.....	33
2.6	Aplicações terapêuticas dos metabólicos secundários.....	34
2.6.1	Atividade antioxidante.....	34
2.6.1.1	Compostos antioxidantes.....	35
2.6.1.2	Estresse oxidativo.....	36
2.6.1.3	Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS)	37
2.6.1.4	Mecanismos de defesa antioxidante enzimático e não enzimático	38
2.6.2	Atividade antimicrobiana.....	40
2.6.2.1	Resistência microbiana.....	41
2.6.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	45
2.6.2.3	<i>Candida albicans</i>	47
2.7	<i>Tenebrio molitor</i> e o desenvolvimento de novas drogas.....	49
3	OBJETIVOS	54
3.1	Geral.....	54
3.2	Específicos.....	54
4	ARTIGO 1	56
5	ARTIGO 2	64
6	ARTIGO 3	81
7	CONCLUSÕES	127
	REFERÊNCIAS	128

1. INTRODUÇÃO

Em milhares de anos vem se descobrindo que os produtos naturais tem desempenhado um papel fundamental na saúde da população em diversas culturas. O uso de plantas medicinais tem alcançado seus objetivos pela medicina tradicional usada mundialmente e são utilizadas pela humanidade buscando o alívio e cura de doenças (LEANDRO, *et al* 2017; VERRI, *et al* 2017; SILVA, *et al* 2017).

A caatinga é um bioma exclusivo brasileiro localizado majoritariamente na região do semiárido nordestino (MESQUITA, *et al* 2017; ALVALÁ, *et al* 2019). Nosso grupo, Núcleo de Bioprospecção da Caatinga – NBioCaat, têm demonstrado o potencial biotecnológico de plantas provenientes da Caatinga, com especial foco nas ações antimicrobiana (DA SILVA, *et al* 2013; ARANDA-SOUZA, *et al* 2012) e antioxidante (DA SILVA, *et al* 2011). Os produtos naturais provenientes de plantas têm grande importância na prospecção de novos agentes farmacológicos devido à larga variabilidade estrutural que culmina na inibição de patógeno infeccioso por diferentes vias metabólicas e de agentes oxidantes. Diante disso consideramos um domínio pouco explorado, como a Caatinga, um ecossistema rico em biomoléculas tornando-se um celeiro com potencial biotecnológico.

O domínio da caatinga que se localiza no Nordeste do Brasil. Estima-se que esse domínio possui cerca de 159 famílias, 1.141 gêneros e 4.547 espécies vegetais. Dentre essas famílias tem a Combretaceae e Myrtaceae.

A Família Combretaceae consiste em 20 gêneros e aproximadamente 400 espécies de árvores, arbustos ou lianas, às vezes com troncos eretos e monopodiais sustentando uma séria de ramos

horizontais e simpodiais. Dos 20 gêneros da família Combretaceae, cinco gêneros são nativos do Brasil: *Buchenavia*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*. O gênero *Buchenavia* têm evidenciado propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Dentre o gênero *Buchenavia*, temos *Buchenavia tetraphylla* é conhecida popularmente no Brasil como “Tanimbuca” (GLÓRIA, 2014; MININEL, 2015).

A família botânica Myrtaceae está inserida na classe das Myrtales ou Myrtiflorae, que consiste em 132 gêneros e aproximadamente 5600 espécies. Dos 132 gêneros da família Myrtaceae, três gêneros são os mais estudadas: *Myrcia* DC, *Eugenia* L. e *Psidium* L. Dentre o gênero *Myrcia*, temos *Myrcia hirtiflora* é conhecida popularmente no Brasil como “Batinga-da-borda” (MORAIS, 2014; BHUYAN, 2017).

Doenças infecciosas e agentes estressores ainda representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre seres humanos, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Atualmente atingimos um ponto crítico em que novas drogas não estão sendo desenvolvidos no ritmo necessário para conter esta capacidade natural dos patógenos de adquirir resistência e defender-se contra os antibióticos (SANTOS, *et al* 2018; GONÇALVES, *et al* 2018). E também é necessário o desenvolvimento de novas soluções para reduzir os efeitos deletérios do envelhecimento e, portanto prolongar o tempo de vida saudável (VALKO, *et al* 2007; JOHNSON, 2013; ZAMBERLAN, 2018).

Doenças infecciosas ainda representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre seres humanos, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Atualmente atingimos um ponto crítico em que novas drogas não estão sendo desenvolvidos no ritmo necessário para conter esta capacidade natural dos patógenos de adquirir resistência e defender-se contra os antibióticos (RODRÍGUEZ-ROJAS, *et*

al 2013 ; RODRÍGUEZ-ROJAS, *et al* 2014). Dentre os agentes patogênicos humanos, *Staphylococcus aureus* tem sido destacado devido à capacidade de expressar uma variedade de fatores de virulência que facilitam a adesão celular, a evasão do sistema imune, danos à célula hospedeira e provocam os sintomas de doença (DU TOIT, 2014).

Diversos agentes estressores são reconhecidos por antecipar ou intensificar o envelhecimento, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (EROS). Estes compostos são produzidos fisiologicamente pela célula e desempenham funções cruciais para a manutenção da homeostase. Contudo quando em excesso, seja por aumento na produção ou por falha nos mecanismos de remoção, EROS causam sérios danos celulares que podem desencadear diversas doenças, como o envelhecimento precoce e câncer, e por fim provocar a morte (VALKO, *etal* 2007). Retardar ou reduzir o aparecimento de várias doenças de fim de vida poderia ter um benefício muito maior do que tratamentos direcionados a cada doença específica (MILLER, 2002).

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para avaliar a ação antimicrobiana/anti-virulência e antioxidante de novos compostos, dentre eles estão aqueles que usam insetos como *Tenebrio molitor* (cascidunho amarelo). O *T. molitor* têm sistemas fisiológicos conservados como os mecanismos relacionados a imunidade inata (produção de espécies reativas e peptídeos antimicrobianos, fagocitose, etc.) (DE SOUZA, *et al* 2015).

No entanto, *T. molitor*, como outros organismos, é susceptível, a patógenos (como *S. aureus*) que são capazes de persistir dentro do inseto infectado e provocar alterações em: tecidos, hemolinfa, e fagócitos (HAN, 2016). Neste modelo também é susceptível aos danos oxidativos gerados pelo excesso de EROS, como ocorre na inflamação. Quando em excesso,

as EROS podem interagir comprometendo funções diversas em tecidos e órgãos com isso danificando carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (LI, *et al* 2016).

No Brasil, larvas de *T. molitor* são amplamente utilizadas e comercializadas como ração animal (aves e répteis) devido a sua facilidade de manuseio e curto ciclo de vida (HAN, *et al* 2016). Estas características têm favorecido o uso deste inseto como modelo alternativo para estudos *in vivo* de patogenicidade e de toxicidade (McGONIGLE, *et al* 2016). Neste trabalho foi avaliado o potencial antimicrobiano e antioxidante dos extratos brutos e frações do extrato bruto metanólico da *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais têm desempenhado um papel fundamental na saúde da população em diversas culturas. O uso de plantas medicinais tem alcançado seus objetivos pela medicina tradicional usada mundialmente e tem apresentado sua importância principalmente nos países em desenvolvimento até os dias de hoje. Da biodiversidade podemos extrair e/ou produzir alimentos, cosméticos e novos materiais. Desde os tempos da civilização humana dependemos diretamente de plantas medicinais com suas propriedades terapêuticas que incluem produtos minerais, animais e vegetais como fonte de nutrientes, no tratamento de doenças, na construção de moradias e na confecção de vestimentas (SCHIAVON, 2015; FILHO, 2014; SILVA, *et al* 2012; AGRA, *et al* 2008).

No Brasil, o uso de plantas medicinais tem sido utilizado como recurso terapêutico muito importante para o tratamento de patologias. A Organização Mundial de Saúde (OMS) avalia que muitas pessoas da população no mundo fazem uso de plantas medicinais como recurso natural para a saúde. Esse uso frequente é principalmente em comunidades que têm dificuldade de acesso ao medicamento alopático, favorecendo o hábito do uso de plantas medicinais (LEITÃO, *et al* 2013; BITU, *et al* 2015; COSTA, *et al* 2012; AMENI, *et al* 2015).

As plantas possuem compostos bioativos importantes para o desenvolvimento de um fármaco, que são chamados de compostos bioativos. Desta forma, o uso de planta para fins de pesquisa tem despertado interesse pelo conhecimento de seus metabólitos secundários.

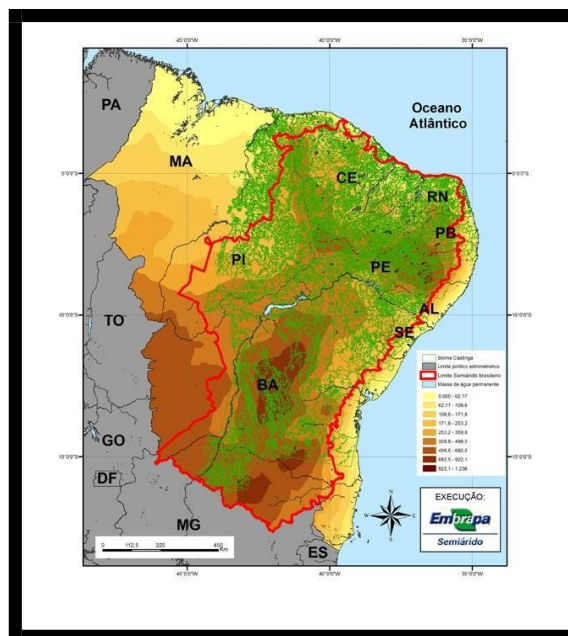
Eles são de extrema importância para o desenvolvimento de um medicamento. Os compostos bioativos são resultados de influência física, química e biológica encontrados na natureza, esses compostos são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas. (FILHO, 2014; SCHIAVON, 2015; MININEL, 2015; ALVES, *et al* 2008; SHER, 2009).

2.2 Caatinga

As florestas tropicais e subtropicais ocupam 40% do globo terrestre, entre as quais 42% corresponde pelas florestas secas, onde está inclusa a caatinga. O domínio da caatinga que se localiza no Nordeste do Brasil, é conhecida por ser um local seco ocasionado pela má distribuição de chuvas na região (MOREIRA, *et al* 2006; ALBUQUERQUE, *et al* 2005).

É um domínio brasileiro que ocupa 11% do território do Brasil e 60% da região nordestina, chegando a medir aproximadamente 900 mil km² de dimensão territorial, que abrange os estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí (**Figura 1 – delimitada na linha em vermelho**). Possui uma vasta diversificação em sua vegetação e é uma flora pouco pesquisada e que possui várias espécies de árvores e arbustos. Estima-se que esse domínio possui cerca de 159 famílias, 1.141 gêneros e 4.547 espécies vegetais. Dessas, 318 espécies são consideradas endêmicas (MOREIRA, *et al* 2006; FILHO, 2014).

Figura 1: Mapa do Brasil com a localização do domínio Caatinga.



Fonte: www.agencia.cnptia.embrapa.br

2.3 Família Combretaceae

A família botânica denominada de Combretaceae está inserida na classe das Myrtales, que consiste em 20 gêneros e aproximadamente 400 espécies de árvores, arbustos ou lianas, às vezes com troncos eretos e monopodiais sustentando uma série de ramos horizontais e simpodiais. Predominantemente ocorrem em áreas tropicais e subtropicais e estão largamente nas regiões da Ásia, África ocidental e região nordeste do Brasil (SOUSA, 2010; GLÓRIA, 2014; LINSINGEN, *et al* 2009).

SILVA, *et al* (2005), descreve essa família da seguinte forma:

Árvores, arbustos ou subarbustos geralmente escandentes. Folhas opostas ou alternas, simples, inteiras, pecioladas, sem estípulas, com indumento de tricomas

combretáceo-compartimentados, escamiformes ou glândulas pedunculadas. **Inflorescências** em espigas, panículas de espigas, racemos ou panículas, terminais ou axilares, às vezes capitadas. Brácteas muitas vezes presentes. **Flores** actinomorfas ou zigomorfas, frequentemente hermafroditas, raramente diclinas, tetrâmeras ou pentâmeras; hipanto dividido em duas partes, a inferior envolvendo o ovário e a superior em tubo curto ou alongado, terminando nos lobos do cálices. Lobos do cálice 4 ou 5, às vezes pouco desenvolvidos. Pétalas 4,5 ou ausentes pequenas ou conspícuas, inseridas entre os lobos do cálice. Estames geralmente 8 ou 10, inseridos em 2 verticilos, exsertos, às vezes com filetes curtos, anteras versáteis ou adnatas aos filetes, rimosas. Disco nectarífero bem desenvolvido ou nulo. Ovário ínfero ou semi-ínfero (*Strephnonema*), unilocular, 2-6 óvulos pêndulos. **Fruto** indeiscente, seco ou carnoso, às vezes 2-5 alado. Sementes sem endosperma, cotilédones convolutos ou plicados.

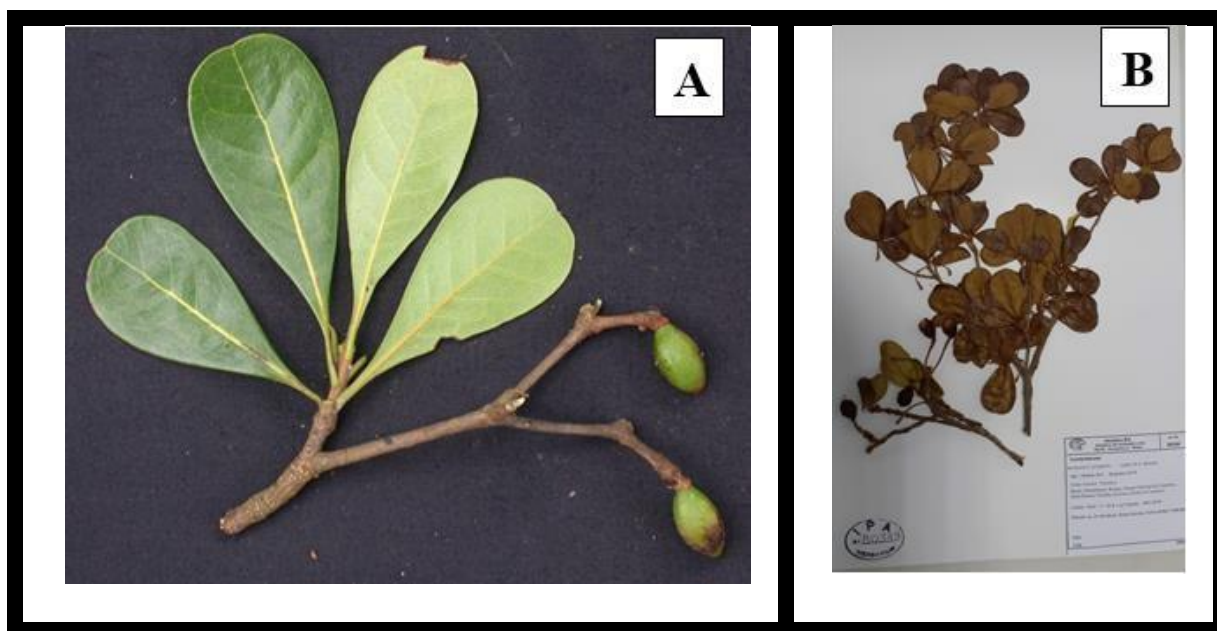
2.3.1 *Buchenavia tetraphylla*

Dos 20 gêneros da família Combretaceae, cinco gêneros são nativos do Brasil: *Buchenavia*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*. Muitas espécies pertencentes a estes gêneros são utilizadas tradicionalmente para tratar dores abdominais, conjuntivite, úlceras gástricas, hemorragias, doenças de pele, câncer, infecções bacterianas, febre, dores de cabeça e doenças venéreas. Diante disso, há interesse em realizar estudos científicos para comprovar que extratos e compostos isolados desta família apresentam fortes atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, anti-inflamatória, ansiolítica, antioxidante, citotóxica e

antiproliferativa (MININEL, 2015; SOUSA, 2010; BESSONG, *et al* 2005; GLÓRIA, 2014).

Pesquisas desenvolvidas com a espécies do gênero *Buchenavia* vêm aumentando e já se descobriu, por meio de isolamento e identificação de compostos, tais como taninos, terpenos, flavonóides, carboidratos, triterpenos, entre outros, que possuem propriedades biológicas. Estes compostos são os responsáveis por apresentarem propriedades biológicas comprovadas por essas pesquisas. Estudos recentes envolvendo espécies do gênero *Buchenavia* têm evidenciado propriedades antimicrobianas e antioxidantes referentes aos extratos e também aos compostos isolados (OLIVEIRA, *et al* 2012; FILHO, 2014).

Figura 2. (A): Folha e fruto da *Buchenavia tetraphylla*, **(B):** Exsicata da *Buchenavia tetraphylla* depositada no herbário do Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA



Fonte: (A): www.herbariovaa.org; **(B):** Autor, 2020.

2.4 Família Myrtaceae

A família botânica denominada de Myrtaceae está inserida na classe das Myrtales ou Myrtiflorae, que consiste em 132 gêneros e aproximadamente 5600 espécies. Está dividida em Leptospermoideae e Myrtoideae, que são duas subfamílias. As Leptospermoideae apresentam folhas alternadas e frutos secos, já as Myrtoideae apresentam folhas opostas e frutos carnosos. Predominantemente a subfamília Leptospermoideae está distribuída na Austrália e a subfamília Myrtoideae está localizada na América do Sul e Central. No Brasil tem registros de 23 gêneros e aproximadamente 997 espécies, distribuídas na Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul. (LEGRAND; KLEIN, 1978; SACRAMENTO, 2007; SARMENTO, 2012; MORAIS, 2014; THE PLANT LIST, 2018).

WILSON, *et al* (2001), descreve essa família da seguinte forma:

Arbustos ou subarbustos. Folhas inteiras contendo cavidades oleíferas, ovário semi-ínfero a ínfero, estames geralmente numerosos, floema interno, e pontuações guarnecidas nos vasos de xilema. As folhas inteiras podem apresentar disposição alterna, oposta ou oposta cruzada, com presença de pontuações e pequenas estípulas. Pode ocorrer cauliforia. **Flores** são na maioria das vezes brancas, mas podem apresentar coloração avermelhada. São hermafroditas, efêmeras, com simetria radial, geralmente pentâmeras, mono ou diclamídeas. O receptáculo pode ser bem desenvolvido, a corola quando suprimida apresenta um cálice gamossépalo com deiscência transversal e frequentemente observa-se a presença de vários estames. O ovário pode ser pentacarpelar e pentalocular, apresentando muitos óvulos, e varia de súpero a

semi- ínfero, até ínfero. **Fruto** pode ser do tipo baciforme ou capsular loculicida, e as sementes podem ser tipo aladas e apresentar poliembrionia.

Dos 132 gêneros da família Myrtaceae, três gêneros são os mais estudadas: *Myrcia* DC, *Eugenia* L. e *Psidium* L. Muitas espécies pertencentes a estes gêneros são utilizadas na medicina popular como: antidiurético, antirreumático, broncodilatador, antiinflamatório, antibiabeticos, antitérmicos, anti-hemorragicos e antidislipidémicos (CRUZ, 2004). Diante disso, há interesse em realizar estudos científicos para comprovar que extratos desta família apresentam fortes atividades biológicas, tais como: antiinflamatório, antioxidante, antimicrobiana e anticancer (KLAFKE, 2016; DUARTE, 2006; KNEZEVIC, 2016; BHUYAN, 2017).

2.4.1 *Myrcia hirtiflora*

Myrcia hirtiflora é conhecida popularmente no Brasil como “Batinga-da-borda”. Essa espécie apresenta flores merasas, os lóbulos ovados do cálice vértices arredondados, sem reflexos e 2-4 panículas agrupadas em grupos subtendidos por brácteas pequenas (**Figura 3A**). (SIQUEIRA, 2014; LIMA, 2017).

Figura 3. (A): Folha e flores da *Myrcia hirtiflora* e **(B):** Exsicata da *Myrcia hirtiflora* depositada no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA.



Fonte: (A): www.flickr.com.br; (B): Autor, 2020.

2.5 Compostos Bioativos derivados de tecidos vegetais

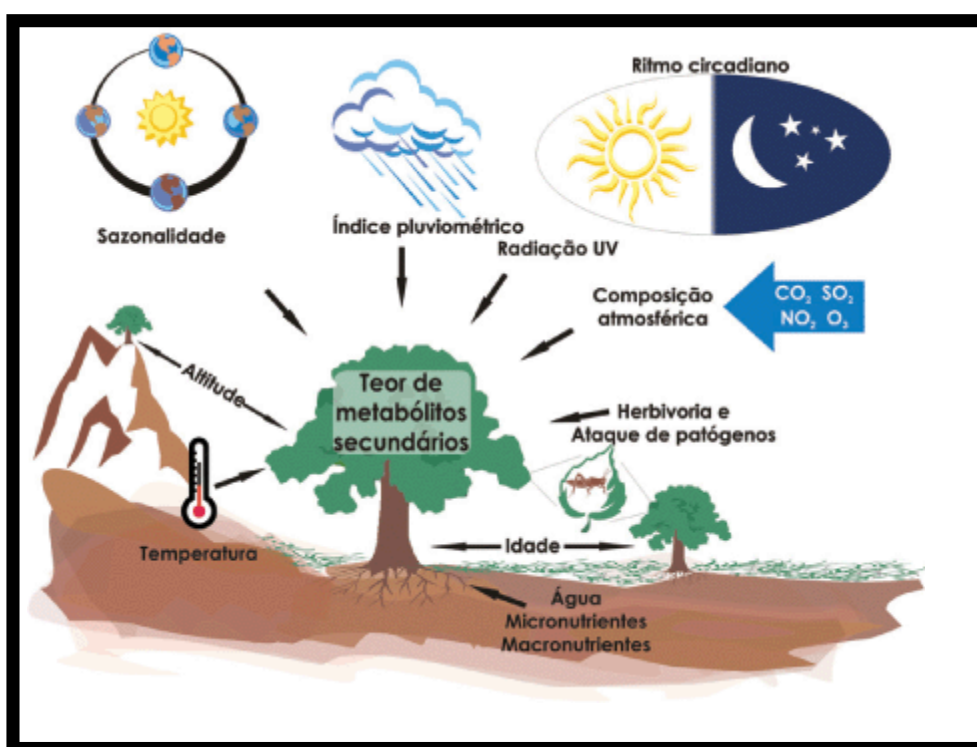
Há séculos a comunidade vem utilizando extratos derivados das partes de plantas para tratar patologias. As plantas, diferente da maioria dos animais, estão em situações menos favoráveis ou estressantes, devido pela sua ausência de movimentos. Diante disso desenvolvem substâncias, os metabólicos secundários, que as auxiliam em sua sobrevivência ao meio em que vive (FILHO, 2018; Da SILVA 2016).

Muito tempo atrás acreditou-se que essas substâncias, os metabolitos secundários, eram produzidas sem função específica, e elas eram utilizadas pelas plantas para algum tipo de desintoxicação ou resultado de algum erro no metabolismo vegetal, e diante disso sem nenhum valor para

a população humana. Só na década de 1950, foi elucidado a importância dessas substâncias para a vida das plantas e para a população (DOS SANTOS, 2015).

Os metabólitos secundários são produzidos por processos de interação com o meio ambiente e por predadores, que são produzidos como forma de defesa. Vários fatores estão envolvidos como: temperatura, umidade, luminosidade, disponibilidade de água, radiação, sazonalidade, entre outras (**Figura 4**) (FILHO, 2018).

Figura 4. Fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários.



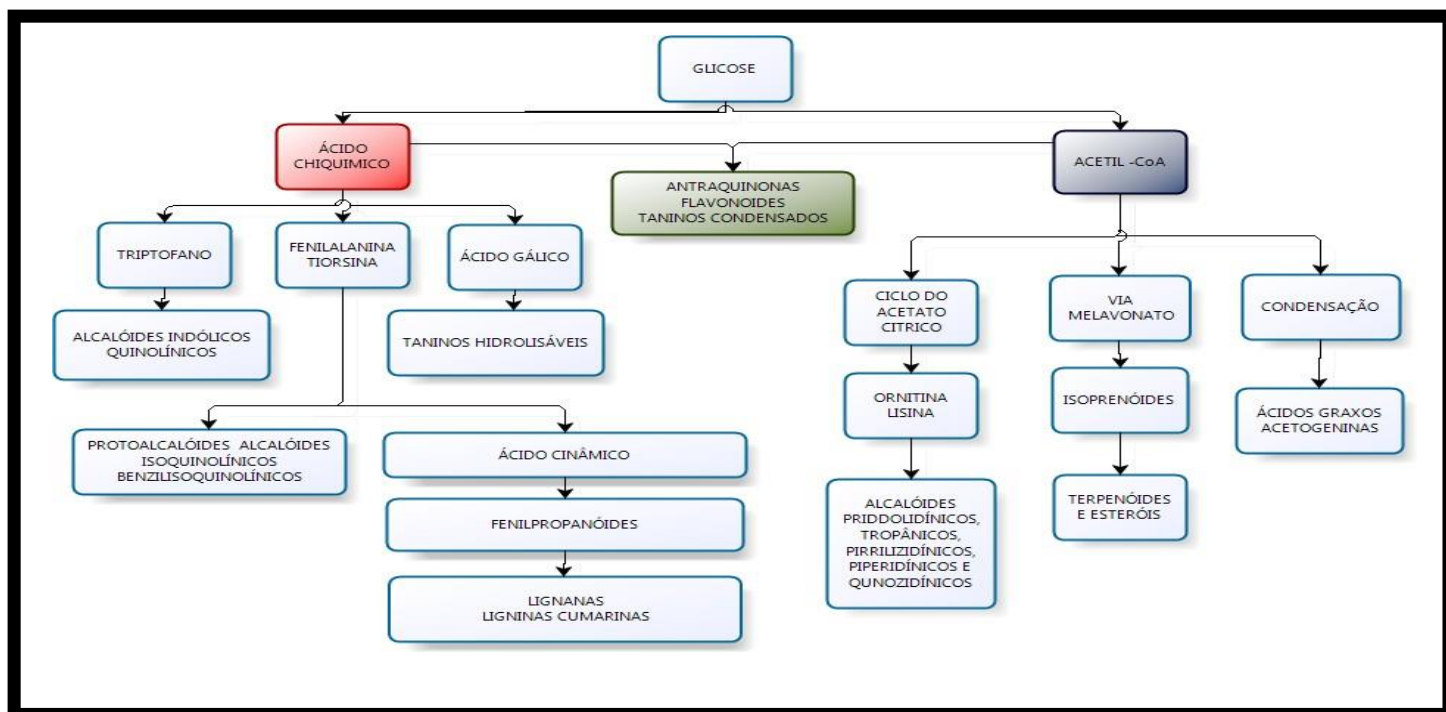
Fonte: Gobbo-Neto; Lopes (2007).

Fatores bióticos e abióticos podem interferir na qualidade e quantidade de metabólitos secundários de uma planta em determinado

momento e local. Dentre os metabólitos existem três grandes classes: os terpenos, os alcaloides e os compostos fenólicos, que são derivadas a partir de três vias metabólicas principais (**Figura 5**): via do acetato-malonato, via do acetato- mevalonato e a via do ácido chiquímico. Para uma dessas três vias metabólicas serem ativadas elas dependem diretamente dos metabolitos primários, como carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, que estão envolvidos em processos biológicos para a vida da planta, tais como: respiração, fotossíntese e formação de novos tecidos nas plantas (FILHO, 2018; Dos SANTOS, 2015; Da SILVA 2016).

Diante da complexidade de formação dos metabólitos secundários, essas substância possuem propriedades farmacológicas que são biossintetizados como mecanismo de defesa desses vegetais, que já foram descritas em literatura como atividades: inseticida (Bessa *et al*, 2019; MERCÊS *et al*, 2018; LOPES *et al*, 2018), antioxidante (SILVA *et al*, 2020; CORDEIRO *et al*, 2018), inibição de formação de biofilme (MALAFAIA *et al*, 2018), antimicrobiana (FILHO *et al*, 2020; SANTOS *et al*, 2019).

Figura 5. Síntese de metabolitos secundários de plantas medicinais.



Fonte: Autor, 2021.

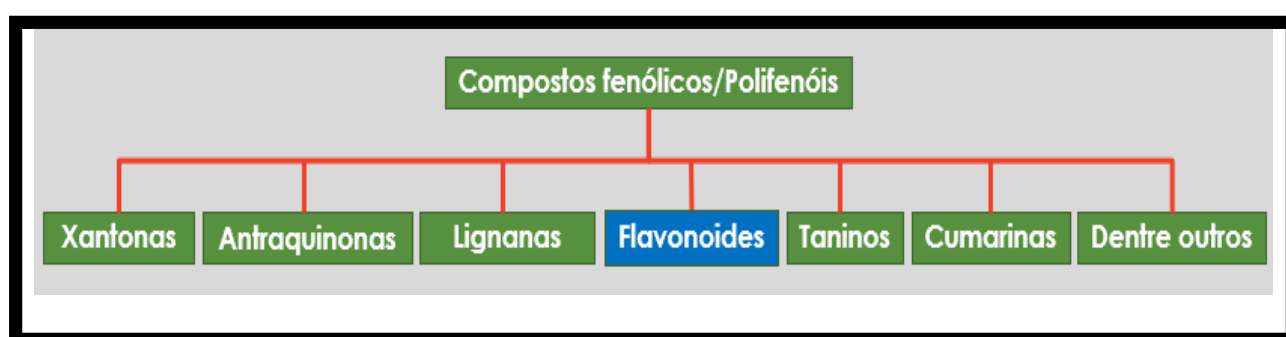
2.5.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias essenciais para o crescimento, reprodução dos vegetais e que também tem um papel importante como agente antipatogênico e contribuem na pigmentação das espécies (SILVEIRA, 2018).

Os Polifenóis possuem compostos com diversas estruturas e estão representados por mais de 8.000 compostos, que são apresentados como estrutura principal um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila (PINTO, 2018). Os compostos fenólicos possuem características antioxidantes por terem elementos químicos em sua estrutura que dão esta função química e apresentar propriedades redutoras. Essas substâncias pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade

de estruturas, simples e complexas, que possuem pelos menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Esta classe abrange as xantonas, flavonoides, lignanas, antraquinonas, taninos, cumarinas, dentre outras (**Figura 6**) (SIMÕES, *et al* 2001).

Figura 6. Classificação dos Compostos fenólicos/Polifenóis.

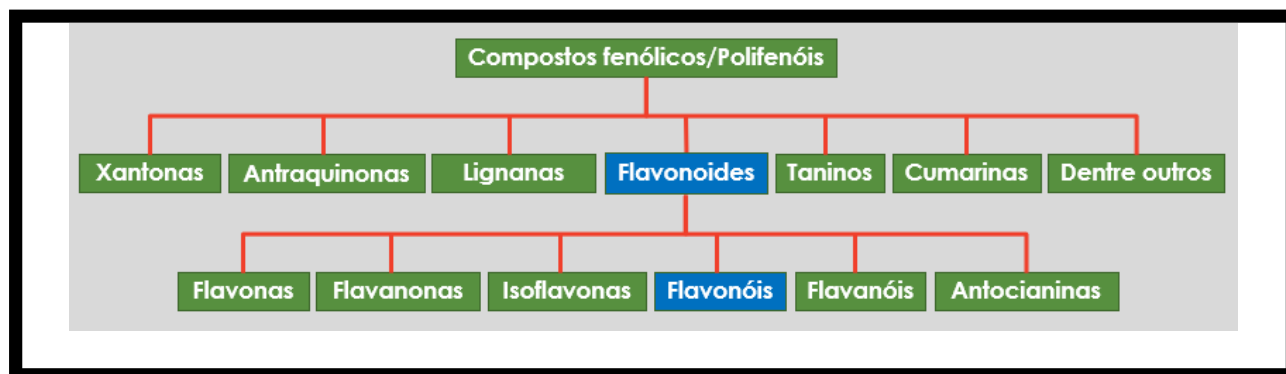


Fonte: Autor, 2021.

2.5.2 Flavonoides

Os Polifenólicos são produzidos no citosol e vacúolos dos vegetais. Dentre suas subclasses estão os flavonoides que possuem um baixo peso molecular. Os flavonóides representam um dos metabolitos secundários mais importantes entre compostos fenólicos de plantas medicinais e são encontrados me raízes, folhas, flores e frutos. Este grupo pode ser subdivido em seis classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas (**Figura 7**) (SANTOS, 2017; SILVEIRA, 2018).

Figura 7. Classificação dos Flavonoides.

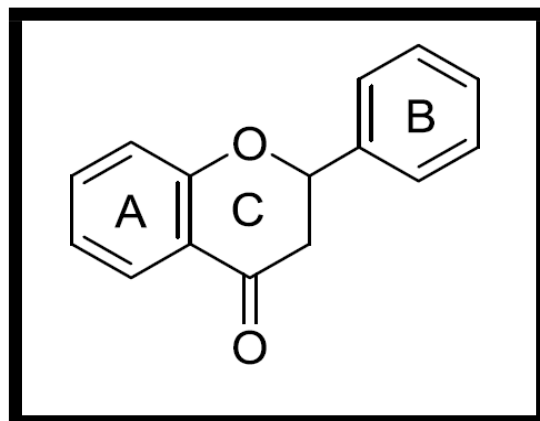


Fonte: Autor, 2021.

Encontram-se flavonóides em diversas formas estruturais e funções como, proteção contra os raios ultravioleta, antioxidantes, antimicrobiana. As ações antioxidantes dos flavonóides são de reduzir os níveis de radicais livres e proteção das células contra os fenômenos da peroxidação das membranas lipídicas neutralizando o estresse oxidativo (SIMÕES, 2001; RODRIGUES, 2016).

A estrutura química principal dos flavonoides é formada por 15 átomos de carbono constituído por dois anéis de benzeno (A e B como mostrado na **Figura 8**), ligado por meio de uma cadeia três carbonos entre elas e um oxigênio como heteroátomo (C) (SANTOS, 2017).

Figura 8. Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: SANTOS, 2017.

Segundo PEREIRA 2018, os flavonoides são biossintetizados da seguinte forma:

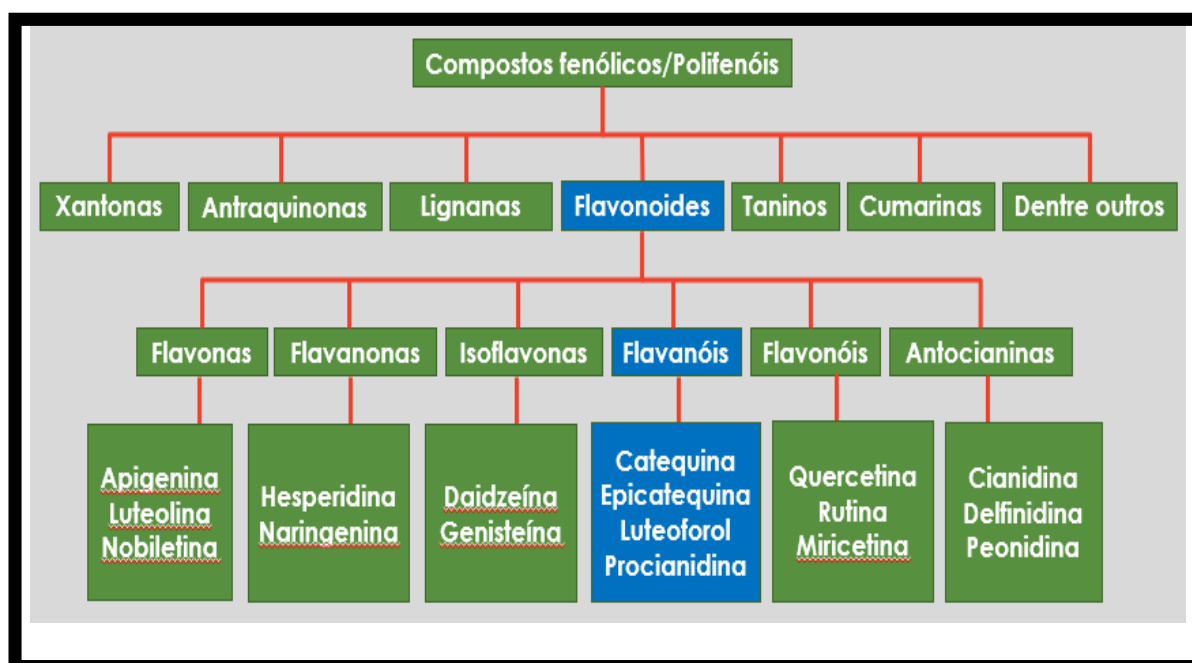
A estrutura comum dos flavonoides é biossintetizada a partir dos metabólitos que são derivados do ácido chiquímico e acetil-coA. O ácido chiquímico produz a fenilalanina que é o precursor inicial da síntese dos flavonoides. O aminoácido fenilalanina é desaminado pela enzima fenilalanina-amônia-líase (PAL) e produz o ácido cinâmico. Este é convertido em ácido p-cumárico por ação da enzima 4-hidroxilase cinamato. Por conseguinte, ocorre a adição da CoA, catalisada pela enzima p-cumarato/CoA liase originando a p-cumaroil-CoA. A p-cumaroil-CoA, ao reagir com três moléculas de malonil-CoA forma a calcona. Esta reação é catalisada pela enzima calcona sintetase. Finalmente, ocorre a ciclização do anel da calcona pela ação da enzima calçona isomerase, originando a flavanona (naringenina), como núcleo básico de todos os

flavonoides. Assim, nos flavonoides o anel S é formado via acetil CoA, o anel B via ácido chiquímico e o anel C deriva do fosfoenolpiruvato.

2.5.3 Catequina

A Catequina é um flavonoide, na subdivisão dos Flavanóis (**Figura 9**), mais distribuído na natureza e está presente em bebidas e frutas, incluindo chá verde, vinho tinto, maçãs e chocolate (PORTO, 2002; BEZERRA, 2012). Possui uma ação potencial antioxidante dentre os agentes de origem vegetal. Devido a sua alta atividade antioxidante consegue reduzir a formação das EROS, regenera ou mantém o α - tocoferol e tem a capacidade de quelar os metais de transição (Fe^{2+} e Cu^{2+}) que estão envolvidos na formação das EROS (ANTUNES, 2011).

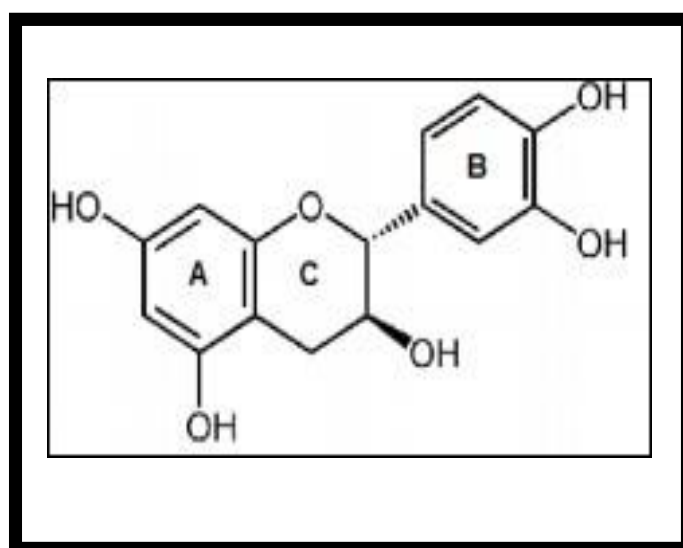
Figura 9. Classificação da catequina.



Fonte: Autor, 2021.

Em sua molécula estrutural possui um anel floroglucinol (A), um anel pirânico (C) e um anel catecol (B) (**Figura 10**) (PORTO, 2002), que lhe dá uma importante ação antioxidante, caracterizando um agente terapêutico potencial contra doenças como, diabetes, cardiovasculares e dislipidemias (CAVALCANTE, *et al* 2020).

Figura 10. Estrutura molecular da Catequina.



Fonte: BEZERRA, 2012.

2.6 Aplicações terapêuticas dos metabólicos secundários

2.6.1 Atividade Antioxidante

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população brasileira em 2060, o percentual de pessoas com mais de 65 anos passará dos atuais 9,2% para 25,5%, que estes dados caracterizam uma trajetória de envelhecimento (IBGE, 2018). O mecanismo de oxidação está diretamente ligado ao envelhecimento, pois

substâncias oxidantes podem se formar dentro da parede celular ocasionando a diminuição da vida útil. Compostos Bioativos com atividades antioxidantes, como compostos fenólicos, tem a capacidade de absorver e neutralizar estes radicais livres que são produzidos pelos mecanismos normais de oxidação celular (NOVAES, 2013).

Os flavonoides possuem uma atividade antioxidante efetiva devido ao sequestro de radicais livres eficiente e por possuir propriedades quelante de íons metálicos, devido a essas propriedades têm efeito estabilizadora de membrana podendo afetar processos do metabolismo. A propriedade antioxidante é determinada pela inibição do radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2\text{-}\bullet$), que são espécies altamente reativas na peroxidação lipídica. A quercetina inibe a xantina oxidase, a peroxidação lipídica e sequestra os radicais de oxigênio. O radical hidroxile o ânion superóxido, que são exemplos de radicais de oxigênio, causam o danos tecidual devido a peroxidação lipídica. Outras propriedades também importantes da quercetina é a estabilizadora e quelante do ferro (BEHLING *et al*, 2004).

2.6.1.1 Compostos Antioxidantes

As Biomoléculas antioxidantes são substâncias que interagem com os radicais livres, bloqueando o processo oxidativo e desta forma retarda ou inibi as EROS (Espécies Reativas de Oxigênio), o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante são essenciais para a contribuição de uma maior longevidade. O organismo desenvolveu mecanismos de defesa para evitar os danos caudados pelos processos oxidativos. Esses classificados em dois mecanismos de defesa que podem bloquear ou retardar danos causados pelos radicais livres: enzimáticos e não-enzimáticos. Os enzimáticos são aqueles presentes em nosso

organismo e são ativados por estímulos e os não-enzimáticos são adquiridos pela dieta (FILHO, 2014; VARGAS, *et al* 2008; RENZ, 2003).

A ação dos antioxidantes pode ser acompanhado por variados mecanismos, desde a remoção de oxigênio, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento de produção de antioxidante endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo (RENZ, 2003).

2.6.1.2 Estresse Oxidativo

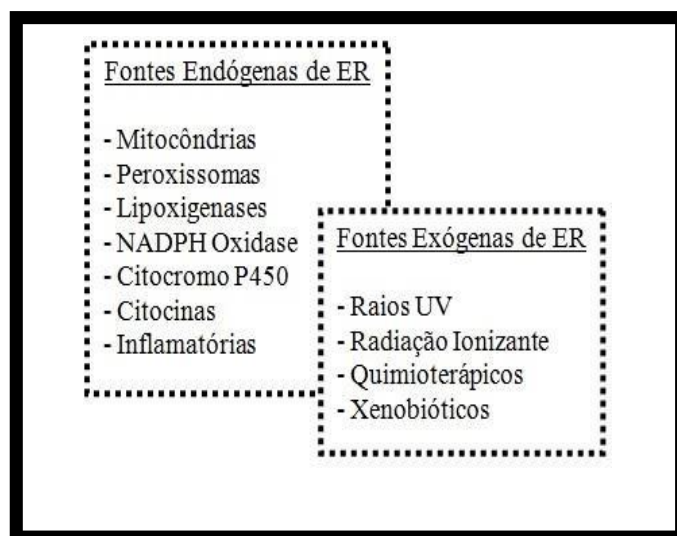
O estresse oxidativo é um desequilíbrio metabólico entre os sistemas pró e antioxidante do organismo, que é causado pelas EROS – espécies reativas de oxigênio. As EROS são moléculas altamente reativas portarem um par de elétrons não pareados na última camada, com isso tornam-se potentes agentes oxidantes. As EROS, como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), são resultantes do metabolismo celular normal e tem um papel importante no funcionamento e sinalização celular (OLIVEIRA, 2012; PEDROSA, 2013; MACHIELA, *et al* 2016).

No entanto, devido a sua reatividade, em altas concentrações podem comprometer funções diversas de tecidos e órgãos danificando carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, isso contribui para o desenvolvimento de várias patologias, como câncer, envelhecimento, diabetes, doenças cardiovasculares e outras doenças degenerativas em humanos (MACHIELA, *et al* 2016; RUIZ, *et al* 2016).

Normalmente ocorre a produção de EROS em nosso organismo como uma forma de preservação de várias funções fisiológicas. Isso acontece para manter seu funcionamento normal, com isso o nosso

organismo utiliza reações de óxido-redução em alguma ou várias etapas do seu processo (**Figura 11**). Por outro lado, o nosso organismo produz enzimas e moléculas que neutralizam essas EROS produzidas em excesso, mantendo a homeostase redox, chamada de regulação redox. Em condições normais, o sistema antioxidante dos organismos aeróbios é capaz de inibir os efeitos nocivos das EROS (MACHIELA, *et al* 2016; OLIVEIRA, 2012).

Figura 11. Fontes Endógenas e Exógenas produtoras de espécies reativas.

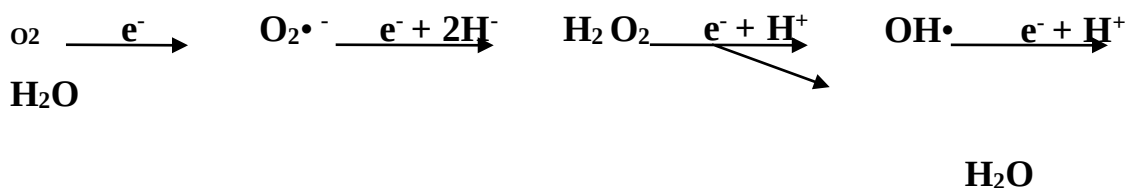


Fonte: Autor, 2020.

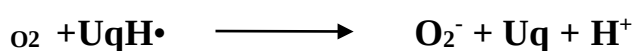
2.6.1.3 Formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

De acordo com sua configuração eletrônica, o oxigênio recebe um elétron de cada vez tornando-o compostos reativos. Os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) são os primeiros a se formarem reduzindo o oxigênio até a água e formando também uma hidroxila ($HO^{\bullet}$), sendo transformado a partir dele outros EROS. A hidroxila é uma dos oxidantes mais potentes,

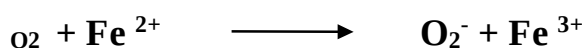
pode passar pela membrana e reagir com moléculas como lipídeos insaturados e DNA (RENZ, 2003).



Outras transformações de EROS podem ser formadas na mitocôndria, como a oxidação da semiquinona a partir da ubiquinona. Pode observar na equação abaixo:



Reações de formação de EROS no retículo endoplasmático a partir da citocromo P₄₅₀ e a partir da flavoproteína NADPH-Citocromo P₄₅₀ redutase:



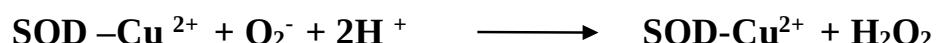
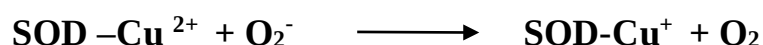
Reações de formação de EROS no citosol pela enzima xantina oxidase (RENZ, 2003):



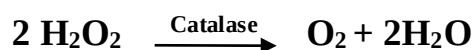
2.6.1.4 Mecanismos de defesa antioxidante Enzimático e Não Enzimático

O sistema antioxidante classifica-se em enzimático e não enzimático. O enzimático são substâncias que neutralizam os radicais livres, reduzindo-os pela adição de um elétron do íon hidrogênio, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) (MICHIELA, *et al* 2016).

A superóxido dismutase (SOD) transforma dois ânions radicais superóxido em um peróxido de hidrogênio. Não penetra nas células e possui uma meia vida curta e sua ação está na destruição do O_2^- . Dependendo do metal associado à SOD pode ocorrer de três formas: Fe em bactérias, Cu e Zn no citoplasma de eucariontes e Mn na matriz mitocondrial (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015; NAHAR, *et al* 2016).



A catalase é outro antioxidante enzimático, que tem a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Está localizado nos peroxissomas e possui ação de dismutação de H_2O_2 . Em alguns órgãos como: coração, pulmão e o cérebro, onde possuem pouco peroxissomas, tem uma ação diminuída da catalase. Quando os radicais livres atingem a circulação sanguínea ocorre a ação antioxidante desta enzima, através da catalase eritrocitária (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015; MICHELI, *et al* 2016).

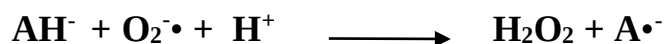
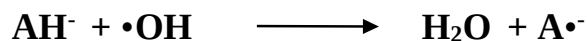


A glutathion peroxidase (GPx) está localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Igualmente a catalase é doador de elétrons. Sua ação ocorre na dismutação de H_2O_2 (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015).

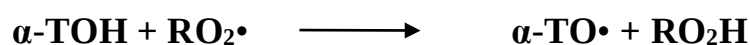
O sistema não enzimático é formado por muitas substâncias, entre elas a GSH, principal composto antioxidante endógeno e intracelular, além das vitaminas tocoferóis, β -caroteno e ascorbato. A vitamina C (ascorbato), por ser hidrossolúvel, possui ação maior no plasma sanguíneo, já a vitamina E (tocoferol) tem maior ação na membrana celular, por ser lipossolúvel. Os carotenóides, β -caroteno precursores da vitamina A, agem como sequestrantes de lipoperóxidos na circulação

junto com as lipoproteínas absorvidas na superfície intestinal (RENZ, 2003; BEZERRA, *et al* 2015; MACHIELA, *et al* 2016; DUARTE, *et al* 2016).

Reações do ácido ascórbico através do ascorbato (RENZ, 2003):



Reações da vitamina E (tocoferol) (RENZ, 2003):



O ácido úrico e proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (responsável pelo transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina), tem ação antioxidante por possui capacidade de seqüestrar radicais livres dos uratos (RENZ, 2003; MACHIELA, *et al* 2016; RUIZ, *et al* 2016).

2.6.2 Atividade Antimicrobiana

Doenças infecciosas ainda representam um alto índice de morbidade e mortalidade entre seres humanos, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. A cada ano bactérias, fungos e vírus são responsáveis por essas doenças infecciosas e por serem resistentes a diversas drogas que se tornaram ineficazes para o tratamento das infecções causadas por esses agentes. A partir da descoberta da penicilina, no século XX por Alexander Fleming, o desejo de encontrar medicamentos com ação antimicrobiana bem crescendo (NOGUEIRA *et al*, 2016). Atingimos um ponto crítico em que novas drogas não estão sendo desenvolvidos no ritmo necessário para conter esta capacidade

natural dos patógenos de adquirir resistência e defender-se contra os antibióticos (RODRÍGUEZ *et al*, 2014; RODRÍGUEZ *et al*, 2013).

Dentre os agentes patogênicos humanos, *Staphylococcus aureus* tem sido destacado devido à capacidade de expressar uma variedade de fatores de virulência que facilitam a adesão celular, a evasão do sistema imune e danos à célula hospedeira (DU TOIT, 2014). Outro agente patogênico humano, *Candida albicans* que também expressa uma variedade de fatores de virulência que adere as células epiteliais e endoteliais humanas, a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteinases e fosfolipases, a variabilidade fenotípica e a capacidade de aderir e secretar uma matriz exopolimérica em materiais implantados, bem como nos tecidos de pacientes, originando uma estrutura denominada biofilme (FILHO, 2018).

2.6.2.1 Resistência Microbiana

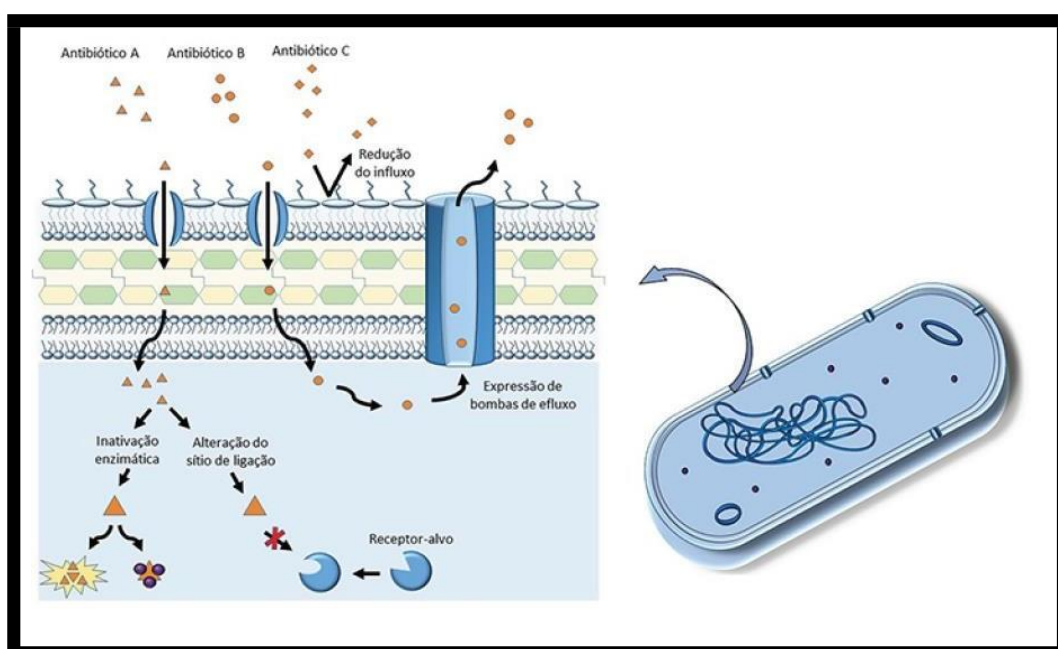
No século XX Alexander Fleming descobriu a penicilina que foi considerado um dos grandes avanços no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos, mas devido ao uso irracional apresentou a resistência microbiana (NOGUEIRA *et al*, 2016). Atualmente a resistência microbiana tem sido um dos maiores problemas no combate aos micro-organismos (DA SILVA & AQUINO, 2018; LIMA *et al*, 2017). Diante disso há uma dificuldade dos profissionais de saúde escolher o melhor esquema para o tratamento. Essa dificuldade se dá por vários fatores, tais como: uso excessivo de antimicrobianos, há subutilização/uso de subdoses e a escolha imprópria do antimicrobiano (TRONCOSO & ALENCAR, 2020).

A resistência antimicrobiana não só tem um impacto na parte clínica, mas também na parte econômica gerando um custo adicional de 10 a 40

mil dólares por paciente. A resistência está sendo considerada uma das maiores ameaças globais à saúde pública, dessa forma temos que entender os mecanismos pelos quais os micro-organismos adquirem a resistência ao ataques desta classe de medicamentos (NOGUEIRA *et al*, 2016).

Os mecanismos da resistência microbiana nada mais é do que inativar os antimicrobianos, desta forma podemos destacar 4 mecanismos para as bactérias e fungos (**Figura 12**), como: (i) produção de enzimas que destroem ou modificam a estrutura química do antimicrobiano; (ii) bombas de efluxo, levando a extrusão dos agentes antimicrobianos; (iii) alteração no local de ligação do agente antimicrobiano; (iv) bloqueio ou proteção no local de ligação do agente antimicrobiano (NOGUEIRA *et al*, 2016; ANDRADE & DARINI, 2018).

Figura 12. Mecanismo de Resistência Microbiano



Fonte: NOGUEIRA *et al*, 2016.

1. Produção de enzimas que degradam ou modificam a estrutura química do antimicrobiano

A inativação enzimática dos antimicrobianos foi um dos primeiros dos mecanismos a serem descobertos, que estão divididos em duas classes: enzimas que degradam e as enzimas que modificam dos agentes antimicrobianos. As enzimas que degradam os agentes antibacteriano é destacada pela inibição da betalactamases pela catálise hidrolítica das moléculas e as enzimas são modificadas por transferência de grupo(s) químico(s) para a molécula da droga, como: acil, fosfato, nucleotídeo ou ribitol, que são radicais que inativam a ação dos aminoglicosídeos (NOGUEIRA *et al*, 2016; ANDRADE & DARINI, 2018). As enzimas que modificam os agentes antifúngicos é destacado a alteração do lanosterol 14- α -esterol desmetilase, que é codificada pelo gene ERG11, essas mutações no ERG11 impossibilita a ligação dos azóis ao sítio enzimático, reduzindo a eficácia do antifúngico (CRUZ, 2019).

2. Bombas de efluxo, levando a expulsão dos agentes antimicrobianos

As bombas de efluxo são proteínas existentes na parede celular dos micro-organismos que controlam a expulsão de substâncias. As bombas estão totalmente ligadas aos mecanismos de resistência, podendo sofrer mutações que estão associados na eficiência da expulsão de substância tóxicas, que neste caso são os agentes antimicrobianos (NOGUEIRA *et al*, 2016; ANDRADE & DARINI, 2018).

As bombas de efluxo das bactérias podemos destacar cinco famílias de proteínas distintas: RND (resistance-nodulation-division), MATE (multidrug and toxic compound extrusion), MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance) e a ABC (ATP binding cassette). As famílias RND, MATE, MFS e SMR expulsão as substâncias

tóxicas, utilizando a força matriz proveniente de prótons e íons de sódio, através do sistema de antiporte. Já a família ABC, realiza a expulsão pela hidrólise de ATP (NOGUEIRA *et al*, 2016; ANDRADE & DARINI, 2018).

As bombas de efluxo dos fungos podemos destacar a espécie de *Candida* que são codificadas pelos genes MDR e pelos genes CDR da superfamília de cassetes de ligação de ATP (CRUZ, 2019).

3. Alteração no local de ligação do agente antimicrobiano

A ligação de um agente antimicrobiano é especificamente em um alvo na célula microbiana. Alterações estruturais nesses alvos pode impedir a eficiência da ligação ou diminuir a sua afinidade, que estão associadas a mutações em genes do próprio micro-organismo e são suficientes para gerar a resistência microbiana (NOGUEIRA *et al*, 2016; ANDRADE & DARINI, 2018).

4. Bloqueio ou proteção no local de ligação do agente antimicrobiano

O bloqueio ou proteção do local de ligação do agente antimicrobiano está associado pela produção de enzimas ou presença de estruturas celulares bacterianas.

Um exemplo de bloqueio às drogas nas bactérias, é o que ocorre na parede celular em *Staphylococcus aureus*, que é mediado pela expressão de genes que irá funcionar como barreira ao glicopeptídeos ao sítio alvo, ocasionando resistência aos agentes antimicrobianos. Já nos fungos, é o que ocorre na parede celular envolvendo a redução do ergosterol, que está redução ocasiona a resistência fungica.

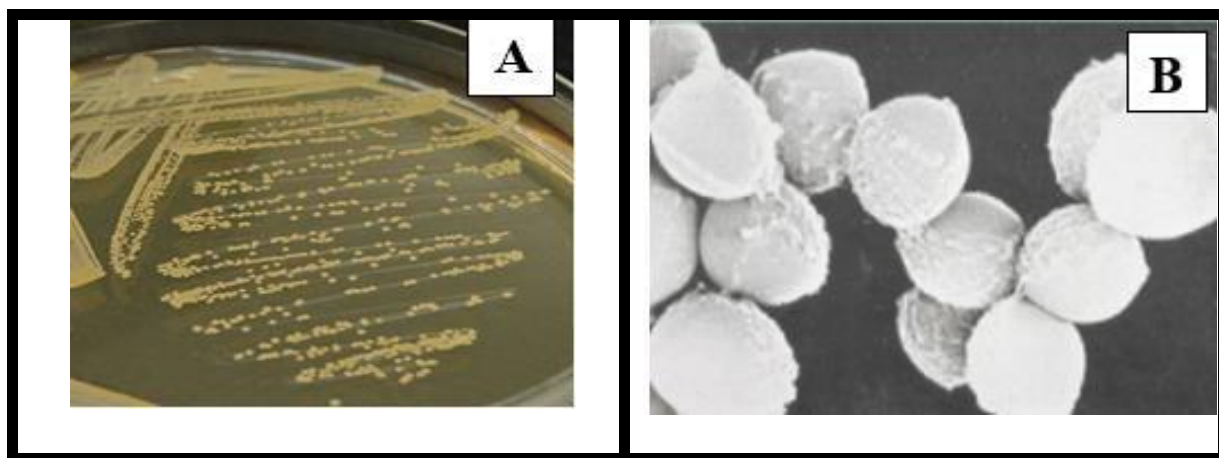
Um exemplo de proteção é mediada por genes obtidos que se agregam e protegem ao DNA topoisomerase tipo II contra a ação das quinolonas, o que diminui a sensibilidade destes microorganismos aos agentes antimicrobianos dessa classe (NOGUEIRA *et al*, 2016; ANDRADE & DARINI, 2018).

2.6.2.2 *Staphylococcus aureus*

As infecções associadas às bactérias representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade aos usuários do sistema de saúde, devido à dificuldade de tratamento e pelas altas taxas de resistência aos antibióticos (NÓBREGA, 2013). Dessa forma, evidencia a necessidade de novos compostos que sejam capazes de inibir o crescimento dos microorganismos.

A infecção por *Staphylococcus aureus* foi descrita pela primeira vez em 1880, em pus de abscesso cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e é uma das bactérias mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (SANTOS, 2007). Esta espécie geralmente se apresenta na forma de cocos Gram positivos formadores de agregados que pertencem à família Micrococcaceae, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e imóveis, se distinguem de outras espécies de estafilococos, pois formam colônias amarelo-douradas e por produzirem a enzima coagulase (**Figura 13**) (RIBEIRO, 2003), essa enzima se liga à protrombina tornando-a ativa, que atua catalisando a conversão de fibrinogênio em fibrina (SCHAECHTER, 2009; WINN, 2010).

Figura 13. *Staphylococcus aureus*. **(A)** Imagem do crescimento de *Staphylococcus aureus* em placa de petri com meio de cultura. **(B)** Imagem de *Staphylococcus aureus* por microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: **(A)** www.minutobiomedicina.com.br ; **(B)** www.slidetodoc.com.

Apesar de ser encontrado na microbiota humana colonizando principalmente a pele e as cavidades nasais, *S. aureus* pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até enfermidades mais graves, como: pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, sepse, abscessos e lesões necróticas graves (SANTOS, 2007). Esta bactéria tem a capacidade de segregar inúmeras enzimas e toxinas que elevam a patogenicidade e permitem a aderência, resistência à fagocitose e lise de células eucarióticas, entre outros (BARTLETT, 2008; BROSNAHAN, 2009; De la FUENT, 2007). Os produtos de tais genes são responsáveis pela formação de cápsula, síntese de proteína A, estafiloxantina e coagulase (KONEMA, 2005).

A eficiência da disseminação de *S. aureus* se deve, em parte, à sua grande versatilidade. A capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes, muitas vezes hostis devido ao pH, umidade, pressão osmótica

ou deficiência de nutrientes, possibilita não só a colonização do homem como do ambiente ao seu redor, criando reservatórios de células aptas a colonizar outros indivíduos (CEPEDA, 2005; KNIEHL, 2005). Foi verificado que cepas resistente à meticilina (MRSA) são capazes de sobreviver por mais de 1 mês em roupas, tecidos e plásticos comumente utilizados em hospitais, tornando assim, um fator de risco para o desenvolvimento de infecções oportunistas (DIAS, 2012).

Além disso, um número cada vez maior de linhagens de *S. aureus* têm sido reconhecidos como as principais causas de infecções hospitalares. Níveis alarmantes de resistência já são detectados em algumas localizações, chegando ao ponto de algumas cepas bacterianas não possuírem sensibilidade a nenhuma das drogas atualmente disponíveis (CLUZET, 2015). Este cenário torna evidente a necessidade constante de novas estratégias tecnológicas, que viabilize a descoberta de terapias mais eficientes no combate aos microrganismos oportunistas multirresistentes. Os produtos naturais, por apresentarem alto poder farmacológico e elevada diversidade química de seus compostos, são fortes candidatos na prospecção de moléculas bioativas (FARHA, 2016).

2.6.2.3 *Candida albicans*

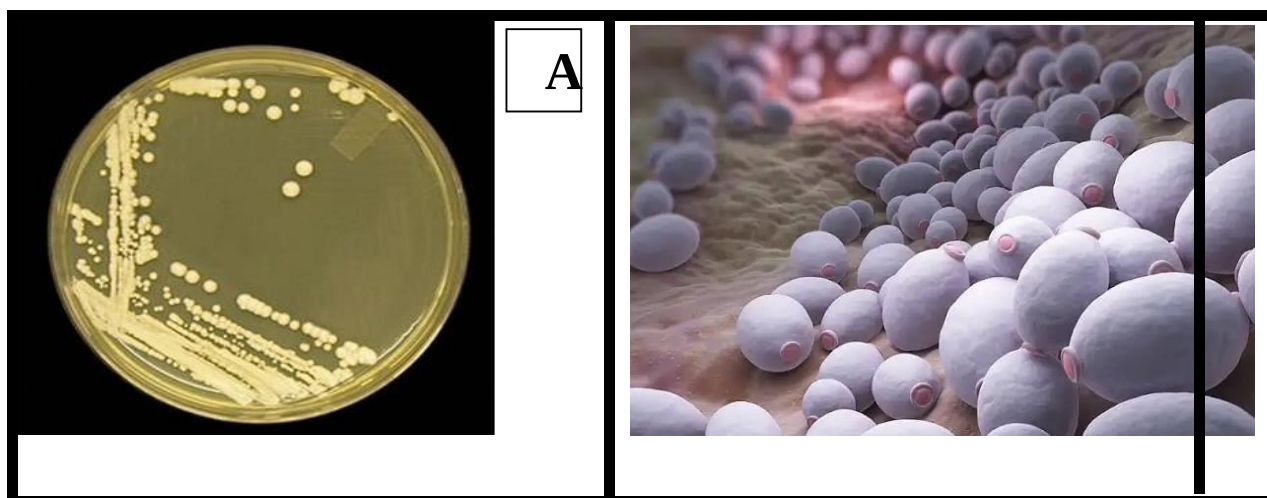
Gênero *Candida* pertencem ao reino fungi, grupo Eumycota, filo Ascomycota, classe Blastomycetes e fazem parte da família Criptococcaceae. As espécies do gênero *Candida* são oportunistas e alguns fatores desencadeadores são necessários para que ocorra a manifestação e/ou proliferação da doença, podem reproduzir -se por gemulação, dando á célula uma forma oval, característica das leveduras, ou podem crescer sob a forma filamentosa, com produção de pseudo-hifas(**Figura 14**). Dentre as 200 espécies deste gênero, a *C. albicans* é uma das

mais virulentas, estando frequentemente envolvida em candidíases, com prevalência na Europa, Canadá e nas Américas (WILLIAMS *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2013; CHIN *et al.*, 2016).

A patogenicidade é definida por múltiplos fatores que determinam a doença provocada por micro-organismo. A transição é atribuível a um extenso repertório de fatores de virulência seletivamente expressos sob adequadas condições predisponentes (OLIVEIRA *et al.*, 2013; HÖFS *et al.*, 2016).

Dentre os fatores de virulência, os mais reconhecidos são para espécies de *Candida*: a capacidade de aderir a células epiteliais e endoteliais humanas, a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteinases e fosfolipases, a variabilidade fenotípica e a capacidade de aderir e secretar uma matriz exopolimérica em materiais implantados, bem como nos tecidos de pacientes, originando uma estrutura denominada biofilme. (FILHO *et al.*, 2017; HASAN *et al.*, 2009).

Figura 14. *Candida albicans*. **(A)** Imagem do crescimento de *Candida albicans* em placa de petri com meio de cultura. **(B)** Imagem de *Candida albicans* por microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: **(A)** www.medsimples.com; **(B)** www.pebmed.com.br.

2.7 *Tenebrio molitor* e o desenvolvimento de novas drogas

O estudo com insetos teve um grande desenvolvimento no início do século XX por ser o grupo que contém mais de 70% das espécies. O *Tenebrio molitor* pertence à família denominada de Tenebrionidae, são geralmente encontrados em regiões desertas e em lugares secos, se alimentam de grãos de cereais e farinhas. Aproximadamente 15.000 famílias e 2.900 espécies descritas. (LIMA, 1955; BETON, 2009).

Segundo LIMA, 1955 as larvas e o inseto são descritos da seguinte forma:

Larvas: Alongadas, subcilíndricas ou algo deprimidas, via de regra de tegumento fortemente esclerosado, glabras e brilhantes, providas de pernas curtas. Distinguem-se, porém,

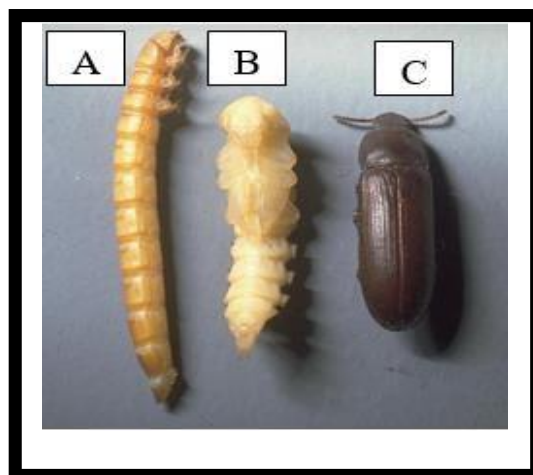
dos verdadeiros “vermes arame” pela estrutura do segmento anal, em geral simples.

Inseto: Besouros de aspecto, cor e tamanho variáveis, porém, via de regra, de cor uniforme, negra, parda ou cinérea; exosqueleto relaticamente espesso e duro, fosco ou brilhante, diversamente esculpado, porém, quasi sempre desprovido de pilosidade. Podem ter de alguns milímetros a alguns centrimetros de comprimento. Cabeça relativamente pequena, quase sempre mais estreita que o protorax, provida de antenas geralmente mais curtas ou pouco mais longas que a cabeça e o torax reunidos, de 11 ou, mais raramente, 10 segmentos, filiformes ou moniliformes, raramente serradas, com os segmentos distais gradualmente dilatado-se até o ápice sem serem, todavia, de tipo claviforme, exceto em alguns gêneros. Pernas geralmente de tipo ambulatório; em algumas espécies distintamente fossoriais; tarsos simples.

As fêmeas colocam em média 500 a 100 ovos durante a primeira postura. Da fase embrionária à fase larval (estágio de eclosão), ocorre surgimento da larva com periodo de 10 a 15 dias. Da fase larval à fase de pupa (estágio larval) efetuam 5 a 7 mudanças de pele, este periodo dura em torno de 60 dias. A fase de pupa até a fase adulta (estágio de metamorfose) dura aproximadamente 3 semanas ou 21 dias para completar o seu desenvolvimento. Os ovos medem cerca de 1,8mm, as larvas de 2 à 30mm, a pupa uns 16mm e o adulto macho vária de 10 – 15 mm e a fêmea de 10 a 18 mm (**Figura 15**).

Figura 15. Fases do desenvolvimento morfológico do *Tenebrio molitor*;

A: Fase larval, B: Fase de pupa e C: Besouro



Fonte: www.agrolink.com

T. molitor têm sido utilizado como modelo experimental para avaliar diversas atividades como: antimicrobiana (MOREY, *et al* 2016), citotoxicidade (VAN DER VALK; MEIJDEN, 2014), atividade inseticida (WANG, *et al* 2015). Pesquisas analisaram o funcionamento do intestino do inseto, atuando em duas linhas principais de estudo: (i) pesquisa por inibidores, direcionado nas enzimas digestivas; (ii) superfície intestinal, na busca de alguma substância que afetem, em sentido geral, o sistema absorptivo (BETON, 2009; HAN *et al* 2016).

Estudos relacionados com a atividade antimicrobiana avaliam a sobrevivência das larvas infectadas após a inoculação do composto a ser estudado. Também podem ser avaliados os mecanismos relacionados à imunidade inata do inseto (produção de espécies reativas e peptídeos antimicrobianos, fagocitose, etc) (DE SOUZA, *et al* 2015). *T. molitor* é susceptível a patógenos como *Escherichia coli* (SEO, *et al* 2016) e *Staphylococcus aureus* (MCGONIGLE, *et al* 2016), que são capazes de

persistir dentro do inseto infectado, e provocar alterações em tecidos, hemolinfa, e fagócitos. O sistema imune deste inseto já possui algumas vias de sinalização conhecidas, como a via Toll, a cascata profenoloxidasee a via de autofagia (SEO, *et al* 2016). Estas características têm favorecido o uso deste inseto como modelo alternativo de infecção para estudos de patogenicidade, e de atividade antimicrobiana e antivirulência *in vivo* (HAN, *et al* 2016; McGONIGLE, *et al* 2016).

Como outros organismos, *T. molitor* também possui um sistema de defesa antioxidante, responsável pela neutralização de espécies reativas em excesso. Este sistema é composto por diversas enzimas antioxidantes e desintoxicantes como superoxide dismutases (SODs), peroxidases (PODs), catalases (CATs), bem como tirosinase (TYR), acetilcolinesterase (AChE), carboxilesterase (CarE), and glutathione S- transferase (GSTs) (LI, *et al* 2016) Estudos prévios demonstraram um aumento da produção de espécies reativas em resposta a infecção de larvas de *T. molitor* (ZHU, *et al* 2014; LI, *et al* 2016). Como discutido anteriormente, a produção exacerbada de espécie reativas é deletéria para os organismos, levando a danos moleculares que culminam na indução de vias de morte celular. A capacidade de *T. molitor* de produzir espécies reativas em resposta à infecção faz deste inseto um modelo potencial para o estudo de substâncias com caráter antioxidante. Neste caso, um agente com potencial atividade antioxidante *in vitro* deve ser inoculado na larva submetida ao estresse oxidativo (induzida por um patógeno ou algum componente microbiano). A ação protetora do agente é evidenciada pelo aumento da sobrevivência das larvas tratadas em comparação a larvas não tratadas. Esta abordagem utilizando larvas poderia trazer mais informações que aquelas tradicionalmente utilizadas para a prospecção antioxidante, baseadas na interação química de compostos e sem relevância biológica (DA SILVA, *et al* 2016). Por se tratar de um

organismo multicelular, esta plataforma também apresenta vantagens em relação àquelas que utilizam células. Em adição, esta plataforma também avaliaria a toxicidade do agente antioxidante. Estudos antioxidantes utilizando organismos são bem estabelecidos para outros invertebrados, como o *Caenorhabditis elegans* (ZHANG, *et al* 2016; WANG, *et al* 2016), no entanto, ao nosso conhecimento, estes estudos ainda não foram realizados utilizando *T. molitor*. O uso deste inseto oferece algumas vantagens, em relação ao *C. elegans*, como facilidade de manuseio e a possibilidade da inoculação direta do agente antioxidante na larva.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Identificar e caracterizar metabólitos secundários e avaliar a capacidade antimicrobiana e antioxidante de extratos e frações de folhas *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora* endêmicas da caatinga em *Tenebrio molitor*.

3.2. Específicos

- Obtenção dos extratos brutos das folhas de *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora* e frações do extrato metanólico de *Buchenavia tetraphylla*;
- Avaliação antifúngica dos extratos das folhas de *Buchenavia tetraphylla* frente a *Candida albicans*;
- Avaliação da atividade sinérgica do extrato metanólico da *Buchenavia tetraphylla* + Fluconazol frente a *Candida albicans*;
- Avaliação antimicrobiana dos extratos das folhas de *Myrcia hirtiflora* frente a *Staphylococcus aureus*;
- Avaliação da atividade sinérgica do extrato metanólico da *Myrcia hirtiflora* + Ciprofloxacino e extrato metanólico da *Myrcia hirtiflora* + vancomicina frente a *Staphylococcus aureus*;
- Avaliação hemolítica dos extratos brutos das folhas de *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora* e frações do extrato metanólico de *Buchenavia tetraphylla*;
- Dosagem e Compostos fenólicos e Flavonóides dos extratos brutos das folhas de *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora* e frações do extrato metanólico de *Buchenavia tetraphylla*;
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos das folhas de *Buchenavia tetraphylla* e *Myrcia hirtiflora* e frações do extrato

metanólico de *Buchenavia tetrphylla* em sequestros dos radicais livre do DPPH e ABTS;

- Avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico da *Buchenavia tetrphylla* em *Tenebrio molitor*;
- Avaliação antimicrobiano do extrato metabólico das folhas de *Myrcia hirtiflora* frente a *Staphylococcus aureus* em *Tenebrio molitor*;

5. ARTIGO 1

Artigo aceito da revista:

Pharmaceutical Biology

Volume 55, 2017 – Issue 1

ISSN: 1388-0209

DOI: 10.1080/13880209.2017.1304427

Fator de Impacto: 2.490

Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions

Autores:

José Robson Neves Cavalcanti Filho,
Tiago Fonseca Silva,
Woah Queiroz Nobre,
Larissa Isabela Oliveira de Souza,
Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo,
Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo,
Norma Buarque de Gusmão,
Márcia Vanusa Silva,
Luís Cláudio Nascimento da Silva,
Maria Tereza dos Santos Correia.

RESEARCH ARTICLE



Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions

José Robson Neves Cavalcanti Filho^a, Tiago Fonseca Silva^{a,b}, Woah Queiroz Nobre^b, Larissa Isabela Oliveira de Souza^c, Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo^d, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^c, Norma Buarque de Gusmão^e, Márcia Vanusa Silva^a, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{b,d} and Maria Tereza dos Santos Correia^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil; ^bCurso de Farmácia, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Brasil; ^cCentro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, Brasil; ^dPrograma de Pósgraduação, Universidade CEUMA, São Luís, Brasil;

^eDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

ABSTRACT

Context: *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretaceae) is an ethnomedicinal plant with reported antifungal action.

Objective: This study evaluates the antimicrobial activity of *B. tetraphylla* leaf extracts against clinical isolates of *Candida albicans*. The morphological alterations, combinatory effects with fluconazole and the cytotoxicity of the active extract were analyzed.

Materials and methods: Extracts were obtained using different solvents (hexane: BTHE; chloroform: BTCE; ethyl acetate: BTEE; and methanol: BTME). Antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method using nine strains of *C. albicans* isolated from vaginal secretions and one standard strain (UFPEDA 1007).

Results: All extracts showed anti-*C. albicans* activity, including against the azole-resistant strains. The MIC values ranged from 156 to 2500 µg/mL for the BTHE; 156 to 1250 µg/mL for the BTCE; 625 to 1250 µg/mL for the BTME and 625 µg/mL to 2500 µg/mL for the BTEE. BTME showed the best anti-*C. albicans* activity. This extract demonstrated additive/synergistic interactions with fluconazole. Scanning electron microscopy analysis suggested that the BTME interferes with the cell division and development of *C. albicans*. BTME showed IC₅₀ values of 981 and 3935 µg/mL, against J774 macrophages and human erythrocytes, respectively. This extract also enhanced the production of nitric oxide by J774 macrophages.

Discussion and conclusion: *Buchenavia tetraphylla* methanolic extract (BTME) is a great source of antimicrobial compounds that are able to enhance the action of fluconazole against different *C. albicans* strains; this action seems related to inhibition of cell division.

ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2016
Revised 25 January 2017
Accepted 3 March 2017

KEYWORDS

Antifungal agents; natural products; Caatinga biome

Introduction

Candida albicans is a polymorphic fungus recognized as one of the most common fungal pathogens, responsible for a range of diseases (Mayer et al. 2013). This yeast is usually found in the normal microbiota of several distinct anatomical sites such as skin, mouth and genitourinary and digestive systems (Pfäler & Diekema 2010; Gulati & Nobile 2016). However, some adverse environmental conditions such as pH shift, nutritional deficiency, use of antibiotics or variations in the immune status of the host, can enable this microorganism to cause infections, which range from superficial dermal and mucosal cases to more severe systemic infections (candidemia and invasive candidiasis, frequently associated with patients with compromised immunity). Several factors, related to both host and pathogen, are recognized as crucial for infection development; for example, *C. albicans* possesses a range of virulence factors, associated to adherence, filamentation, biofilm formation and secretion of proteases. Additionally, antibiotic and immunosuppressive therapies, diseases (human immunodeficiency virus, diabetes), and aging are also factors that

favour *C. albicans* infections (Gow & Hube 2012; Mayer et al. 2013; Fadda et al. 2015).

The treatment of *C. albicans* infection is based on the use of systemic antifungals (fluconazole or itraconazole) and topical nystatin (Pappas et al. 2015). An increase in the resistance of *C. albicans* to antifungals has been observed in recent decades, which makes this yeast a serious concern for the global health system. Indeed, the development of new and effective approaches to treat fungal infections remains one of the major challenges for modern medicine (Sardi et al. 2013).

Traditional medicinal plants from underexploited environments, such as the Caatinga (semi-arid region), an exclusively Brazilian biome, have been the subject of various studies in the search for new antimicrobial compounds, due to their exceptional activity against microorganisms (Oliveira et al. 2012; Silva et al. 2014). *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretaceae) is a Neotropical plant, distributed from Cuba (Caribbean) to Brazil (South America) (Weaver 1991). In Brazil, this plant is popularly known as 'Tanimbuca'

CONTACT Luis Cláudio Nascimento da Silva luisclaudionsilva@yahoo.com.br Universidade CEUMA, São Luís, Brasil

*These authors have contributed equally to this work.

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and is listed as an ethnomedicinal plant used by the traditional communities of northeastern Brazil (Agra et al. 2007, 2008). Our group has shown that extracts and fractions of *B. tetraphylla* leaves have a broad-spectrum of antimicrobial activities, inhibiting both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi (including *C. albicans*) (Oliveira et al. 2012). Additionally, a recent study has shown that *B. tomentosa* had a potential antifungal effect against different *Candida* species (Teodoro et al. 2015). In this context, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of *B. tetraphylla* extracts alone or in combination with fluconazole against clinical isolates of *C. albicans* isolated from vaginal secretions, and to analyze the ultrastructural changes and the combinatory effect with fluconazole induced by the active extract.

Materials and methods

Plant material: collection, identification and extraction

Leaves of *B. tetraphylla* were collected in the Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brazil) in November of 2013. The taxonomic identification was performed by Dr Alexandre Gomes da Silva, at the Herbarium of the Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), where the voucher specimen (Number 84.104) was deposited. Leaves were dried using an incubator at 45 °C for 2 to 3 days. The dried material was ground into powder form using a grinder followed by a Waring blender.

For extraction, dried leaves (25 g) were mixed with hexane (100 mL) in a shaker at 125 rpm for 72 h at 25 °C. Then, the extract was filtered and the supernatant was concentrated in a rotary vacuum. The residue was suspended in 100 mL of chloroform. The extraction procedure was repeated and the residue was resuspended in 100 mL of ethyl acetate. Finally, the residue was subjected to methanol extraction. All extract samples were diluted in 100% dimethyl sulfoxide and stored at 4 °C prior to use.

Phytochemical analysis

The extracts from *B. tetraphylla* were submitted to thin-layer chromatography (TLC) assays in order to perform a qualitative detection of their functional compounds. The extracts were loaded in silica gel F254 + 366 plates (20 × 20 cm; <AQ5>), and developed in a solvent system: A (toluene/dioxan/acetic acid, 180:45:5, v/v) and B (hexane/diethyl ether/formic acid, 130:80:20, v/v). Bands were revealed under UV light (254/365 nm), using ceric sulphate and ferric chloride. The bands were identified by their R_f values and compared with the standards used.

Antimicrobial assays

Candida albicans strains

A total of 10 *C. albicans* strains were used in this study. The standard strain (UFPEDA1007) was obtained from the Microbial Collection of the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). The clinical strains were isolated from vaginal secretions at different clinical laboratories in Recife (Pernambuco, Brazil) and kindly provided by them between September and December 2012.

The antibiotic-susceptibility profile of each isolate was performed according to the CLSI recommendations (CLSI 2011) using the disc-diffusion assay on Sabouraud dextrose agar (SDA). In brief, colonies from overnight cultures of *C. albicans* were suspended in sterile saline water equivalent to a 0.5 McFarland standard.

Table 1. Antibiotic-resistance profile of *C. albicans* clinical strains isolated from vaginal secretion samples.

Strain	Amphotericin B	Ketoconazole	Fluconazole	Itraconazole
F01	R	S	S	S
F02	S	S	R	R
F03	S	S	S	S
F08	S	S	R	R
F11	S	S	R	R
F14	S	S	I	I
F22	S	S	I	I
F23	S	S	S	S
F27	S	S	I	I

Interpretation of IDZ values (mm) (CLSI, 2011)			
Drugs	Sensitive (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
Amphotericin B	≥15	14–10	<10
Ketoconazole	≥28	27–21	≤20
Fluconazole	≥19	18–15	≤15
Itraconazole	≥23	22–14	<13

The suspension (100 µL) was spread over an SDA plate and the antibiotic disc was applied aseptically onto the surface. Afterwards, the plates were incubated at 30 °C for a period of 48 h and then each inhibition diameter zone (IDZ) was measured and interpreted as shown in Table 1. The antibiotics used were amphotericin B, fluconazole, itraconazole and ketoconazole.

The multiple antibiotic resistance (MAR) index was calculated as previously described by Kruperman (1983) using the formula $MAR = x/y$, where 'x' is the number of antibiotics to which the isolate demonstrated resistance; and 'y' is the total number of antibiotics tested.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method (CLSI 2011). Twofold serial dilution of each extract was prepared in Sabouraud broth and 10 µL of yeast suspension (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) were added. The microplates were incubated at 30 °C. After 48 h, 50 µL of resazurin solution (0.01%) were added to each well. The plates were re-incubated for 2 h at 30 °C, and any colour changes from purple to pink was recorded as microbial growth. The lowest concentration at which no colour change occurred was taken as the MIC. Afterwards, cultures were seeded in SDA plates and incubated for 48 h at 30 °C to determine the minimum fungicidal concentration (MFC).

Combinatory effects of *B. tetraphylla* methanolic extract and fluconazole

The combinatory effects of the BTME and fluconazole were evaluated against five *C. albicans* strains (F03, F08, F11, F22, 1007). Both samples were added to microplates containing SAB and a twofold serial dilution was prepared (5000 to 98 µg/mL for BTME and 100 to 0.2 µg/mL for fluconazole). The antimicrobial drug was evaluated as described for MIC, and after 48 h, the drug/extract interaction was assessed algebraically by determining the Fractional Inhibitory Concentration indices (ΣFIC), according to the following equation:

$$\Sigma FIC = (MIC_E + F/MIC_E) + (MIC_F + E/MIC_F)$$

MIC_E or MIC_F: the MIC extract or MIC fluconazole; MIC_{F+E}: the MIC_E when in combination with fluconazole; MIC_{D+F}: the MIC of fluconazole when in combination with extract; Data interpretation: ΣFIC ≤0.5: synergism (syn);

0.5 < Σ FIC $\leq$ 1: addition (add); 1 < Σ FIC < 4: non-interaction (non); Σ FIC $\geq$ 4: antagonism (ant) (Vuuren & Viljoen 2011).

Scanning electron microscopy (SEM)

To evaluate the morphological changes induced by the BTME extract, a sample of 100 μ L of a diluted overnight culture of *C. albicans* (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) was added to 1 mL of SAB and mixed with the BTME (MIC). After incubation (12 h at 30 °C) the cells were treated as described by da Silva et al. (2013) and imaged with a Quanta 200F scanning electron microscope (FEI company).

Determination of nitric oxide production and cell viability in macrophages

J774 macrophages (1×10^5 cells/mL) were seeded in a 96-wells plate for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ and then treated with the BTME (156–2500 μ g/mL) for another 24 h. After the treatment, the supernatant was used to determine nitric oxide (NO) production, and the adherent cells were used for viability assays. For NO determination, the supernatant (100 μ L) from each well was mixed with 100 μ L of Griess reagent in a 96-wells plate. After incubation for 15 min at room temperature, the optical density was determined at 540 nm with a microplate reader (Benchmark plus, Bio-Rad, Hercules, CA). The nitrite content (μ M/ 10^6 cells) was quantified by extrapolation from sodium nitrite standard curve in each experiment. Cell viability was evaluated using the MTT assay, which measures the metabolic conversion of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) salt by mitochondria of viable cells, by the use of coloured formazan dye. At the end of the incubation, the medium was removed and an MTT solution (5000 μ g/mL in RPMI) was added to the cells that were further incubated for 3 h. Afterwards, the medium was removed and the intracellular formazan product was dissolved in DMSO. Optical density (OD) was measured at 595 nm. Cell viability was calculated in comparison to the OD obtained by untreated cells.

Haemolytic assay

Blood (5–10 mL) samples were obtained from healthy volunteers by venipuncture and placed in heparinized tubes, after written informed consent was obtained. Human erythrocytes were isolated by centrifugation (1500 rpm for 10 min) and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Each test tube received 1.1 mL of erythrocyte suspension (1%) and 0.4 mL of the various extracts at different concentrations (156–2500 μ g/mL). Cells incubated in PBS or in a solution of saponin from *Quillaja* sp. (0.0025%) were used as negative and positive controls for haemolytic activity, respectively. After 60 min of incubation, cells were centrifuged and the absorbance of supernatant was read at 540 nm. The haemolytic activity was expressed by the following formula:

$$\text{Haemolytic activity (\%)} = (A_s - A_b) \times 100 / (A_c - A_b)$$

A_b = solvent absorbance, A_s = sample absorbance; A_c = saponin absorbance.

Statistical analysis

All experiments were performed in quadruplicate with at least two independent experiments. Results are expressed as

Table 2. Phytochemical analysis of *B. tetraphylla* leaves extracts.

Phytochemical compounds	Extract			
	BTHE	BTEE	BTCE	BTME
Hydrocarbons	+	+	–	–
Sugars	+	–	+	–
Glycosides	+	–	–	–
Terpenes	+	+	+	–
Flavonoids	–	+	–	+
Tannins	–	+	–	+

BTHE: *Buchenavia tetraphylla* extracts hexane; BTEE: *B. tetraphylla* extracts Ethyl acetate; BTCE: *B. tetraphylla* extracts Chloroform; BTME: *B. tetraphylla* extracts Methanol.

mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analyses were performed by Student's *t* test. All analyses were carried out using the Statistica 8.0 software. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (ρ).

Results

Phytochemical analysis

The phytochemical profile of extracts from leaves of *B. tetraphylla* is shown in Table 2. The results showed that all extracts have at least one class of compound reported as an antimicrobial agent. The hexane extract (BTHE) presented hydrocarbons, glycosides, sugar and terpenes. Flavonoids, terpenes and tannins were detected in the ethyl acetate extract (BTEE), while only terpenes and sugar were found in the chloroform extract (BTCE). Finally, flavonoids and tannins were detected in the methanol extract (BTME).

Antibiotic susceptibility of *C. albicans* strains

All clinical isolates of *C. albicans* tested in this study had their antibiotic-susceptibility profile analyzed (Table 1). According to the disc-diffusion assay, two strains (F03 and F23) were susceptible to all tested antifungal agents; another three isolates (F14, F23 and F27) were susceptible to amphotericin B and ketoconazole and showed intermediate susceptibility to fluconazole and itraconazole; the strain F01 was only resistant to amphotericin B; finally, the strains F02, F08 and F11 showed resistance to fluconazole with cross-resistance to itraconazole (MAR index of 0.5). Fluconazole resistance of each strain was confirmed by MIC determination as recommend by CLSI (CLSI 2011). Strains F03, F08 and 1007 were inhibited by fluconazole at 3.125 μ g/mL, while strains F11 and F22 were inhibited by the same drug at 6.25 μ g/mL.

Anti-*C. albicans* action of *B. Tetraphylla* extracts

The inhibitory action of *B. tetraphylla* extracts was evaluated against 10 *C. albicans* strains (Table 3). The extracts showed anti-*C. albicans* activity against all tested strains, including the azole-resistant strains (F02, F08 and F11). The MIC values ranged from 156 to 2500 μ g/mL for the BTHE; 156 to 1250 μ g/mL for the BTCE; 625 to 1250 μ g/mL for the BTME and 625 μ g/mL to 2500 μ g/mL for the BTEE. The BTME and BTCE showed the best antimicrobial potential with no significant difference between their average MFC values ($p > 0.05$). A moderate negative correlation was observed between the MAR indexes of all strains and MIC ($\rho = -0.39$) or MFC ($\rho = -0.33$) values of the

Table 3. The anti-*Candida albicans* activity of extracts from *B. tetraphylla* leaves.

<i>C. albicans</i> strains	MAR index	<i>B. tetraphylla</i> extracts											
		Ethyl acetate			Chloroform			Hexane			Methanol		
		MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC
F01	0.25	1250	>5000	>4	625	5000	8	625	1250	2	625	1250	2
F02	0.5	1250	5000	4	1250	2500	2	2500	5000	2	625	2500	4
F03	0	2500	>5000	>2	625	2500	4	625	2500	4	1250	2500	2
F08	0.5	625	>5000	>8	625	1250	2	1250	5000	4	625	1250	2
F11	0.5	1250	2500	2	625	1250	2	156	1250	8	625	1250	2
F14	0	625	5000	8	625	1250	2	625	>5000	>8	625	1250	2
F22	0	1250	5000	4	625	2500	4	1250	2500	2	625	2500	4
F23	0	2500	5000	2	625	1250	2	1250	2500	2	1250	2500	2
F27	0	625	1250	2	625	1250	2	1250	2500	2	625	2500	4
UFPEDA 1007	0	625	2500	4	156	312	2	1250	5000	4	625	1250	2
Average MIC		1250 ± 721 µg/mL			641 ± 260 µg/mL			1078 ± 636 µg/mL			750 ± 264 µg/mL		
Average MFC		4125 ± 1450 µg/mL			1096 ± 1305 µg/mL			3250 ± 1581 µg/mL			1875 ± 659 µg/mL		

^aMIC e MMC is expressed at µg/mL; MAR index: multiple antibiotic resistance index; UFPEDA: Microbial Collection of the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

BTME, indicating this extract was slightly more active against the resistant strains. Moderate and weak positive correlations were found between the MAR indexes and MIC ($p=0.51$) or MFC ($p=0.14$) values of the BTCE. Additionally, the MFC/MIC ratios ranged from 2 to 4 for the BTME, thus it was a fungicidal agent against all tested strains. Both fungicidal and fungistatic effects were observed for the BTCE (MFC/MIC ratios ranged from 2 to 8), but fungicidal action was more prominent (for nine strains). Since the BTME showed the strongest activity it was chosen for further biological activity assays.

Combinatory effects of the BTME and fluconazole

The combinatory effects of the BTME and fluconazole are shown in Figure 1. The extract had the ability to increase the action of fluconazole in most strains through additive (20% of strains; $\Sigma\text{FIC}=0.75$) or synergistic (60% of strains; ΣFIC values of 0.375 and 0.5) effects. Non-interaction was observed against one strain ($\Sigma\text{FIC}=2$).

Morphological changes induced by the BTME

The morphological alterations induced by the BTME in the fluconazole-resistant F08 strain were evaluated using scanning electron microscopy. This strain was chosen because it presents a high degree of cell surface hydrophobicity *in vitro* (data not shown), a property related to the increase of *C. albicans* adherence and virulence (Blanco et al., 2009; Silva-Dias et al. 2015). After 12 h of cultivation, untreated samples (Figures 2(a–c)) showed a predominance of budding blastoconidial cells with a normal elliptical shape, smooth surface and formation of hyphal structures exhibiting a homogeneous, elongated shape without constrictions (Figure 2(a)). BTME-treated cells (Figures 2(d–f)) showed intense deposition of flocculated material on the cell surface, more elongated blastoconidial morphology with several scars (Figure 2(e)). However, no filamentation could be observed and hyphal structures were not seen in treated samples. Cells presenting depressions on the cell surface could also be observed (Figure 2(f)). No ruptured cells or alterations on the yeast cell surface were detected.

Effects of the BTME on cell viability and NO production

The treatment of J774 macrophages with different concentrations of the BTME resulted in significant production of NO at

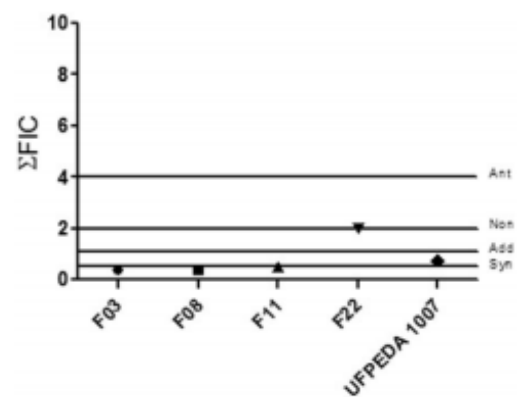


Figure 1. Combinatory effects of BTME and fluconazole against *Candida albicans*. non: non-interactive effect; add: additive effect; syn: synergistic effect; ant: antagonistic effect.

concentrations from 312.5 to 2500 µg/mL ($p > 0.05$), in a dose-dependent manner (Figure 3). Regarding cytotoxicity, the BTME extract showed IC_{50} values of 981 µg/mL against J774 macrophages and 3935 µg/mL against erythrocytes.

Discussion

C. albicans is the most prevalent pathogen associated with vulvovaginal candidiasis, and it is estimated that it affects approximately 75% of women at least once during their lifetime. This pathology represents significant health issues for women of child-bearing age, as well as diabetic and immuno-deficient patients. Vulvovaginal candidiasis is associated with considerable morbidity, increased healthcare costs, distress, pain and sexual dysfunction (Cassone 2014). *C. albicans* strains isolated from vaginal secretions have shown increased resistance towards antifungal agents, especially fluconazole. It is important to highlight that the breakpoint of *in vitro* susceptibility for strains isolated from vaginal secretions has been suggested to be 1 µg/mL instead of 8 µg/mL, this is due to the specific pharmacokinetic characteristics of the vagina (Sobel et al. 2003; Marchaim et al. 2012). In this context, this work evaluated the antifungal action of extracts from leaves of *B. tetraphylla* against fluconazole-resistant and fluconazole-sensitive strains of *C. albicans* isolated from human vaginal secretions.

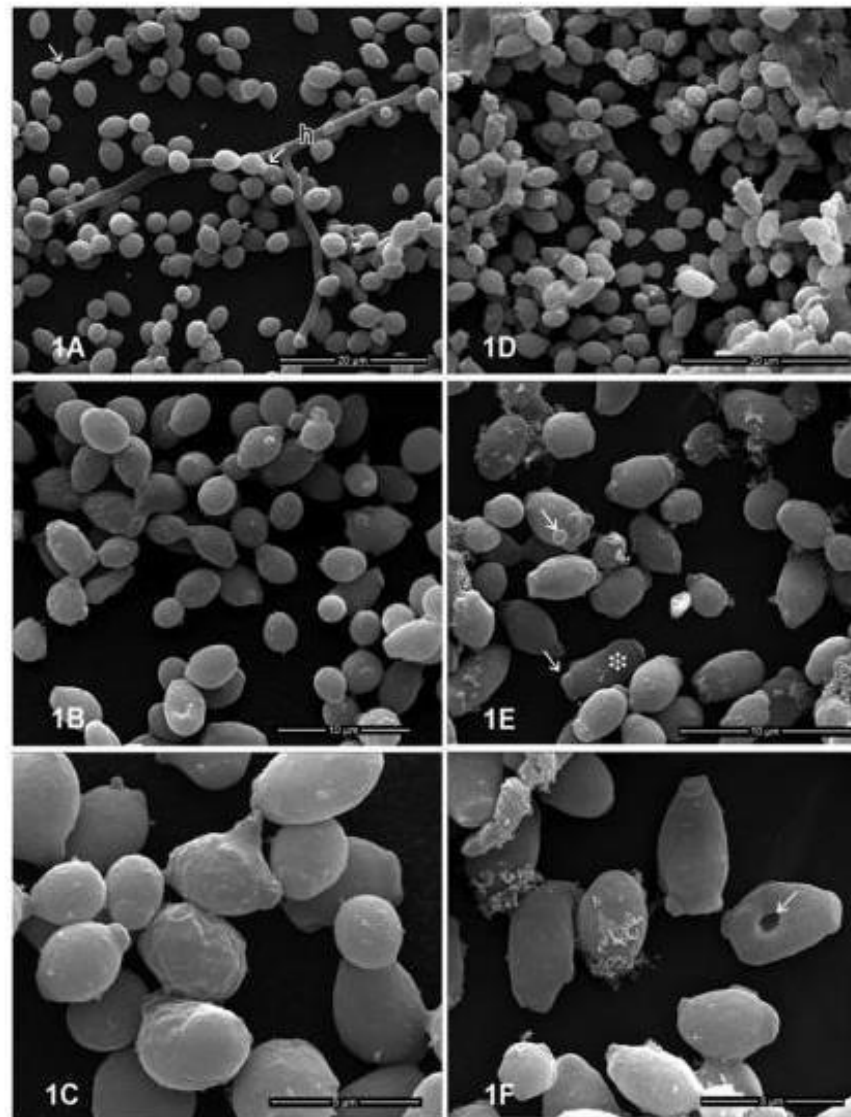


Figure 2. Effects of BTME on *C. albicans*. (a–c) Control cells; (d–f) cells treated with BTME at MIC for 12 h. (a–c) Ultrastructural aspects of untreated *C. albicans* culture at low (a) and high magnification (b–c) showing the presence of single and budding yeast cells with evident fragile blastoconidial septum (white arrow). (h) True hyphal structures could be also observed. Treated *C. albicans* culture at (d) low and (e–f) high magnifications. Note in (e) the presence of elongated cells (white asterisk) with multiple scars (white arrow). (f) Cells presenting surface depressions are indicated in white arrow.

It has been reported that *B. tetraphylla* leaves are a source of compounds with anti-*C. albicans* activity (Oliveira et al. 2012). Furthermore, Teodoro et al. (2015) found remarkable anti-*Candida* activity of another member of the *Buchenavia* genus, *B. tomentosa*. All the extracts were also effective against the clinical isolates tested. Furthermore, the extraction method used in this present paper increased the antifungal potential of this plant, as the average MIC values of the standard strain were up to 40 times lower than those reported by Oliveira et al. (2012). Among the extracts, the BTME and BTCE showed the best activity and no significant differences were observed between their MIC or MFC values. The BTME is more effective against

the fluconazole-resistant strains than the BTCE, as confirmed by correlation analysis (the Pearson coefficient for their MIC values was -0.032 ; and 0.076 for their MFC values). Two mammalian cell types were used to determine the cytotoxic potential of each extract: human erythrocytes and mice macrophages. Both models are widely used to assess the toxicity of plant-derived products (Oliveira et al. 2012; Santos Aliança et al. 2014; Sant'Anna da Silva et al. 2016). In the cytotoxicity assays, the BTME showed IC_{50} values of 981 and $3935 \mu\text{g/mL}$ against J774 macrophages and human erythrocytes, respectively. These values are higher than the average MIC of the BTME ($625 \mu\text{g/mL}$). Therefore, it was decided to evaluate the morphological changes

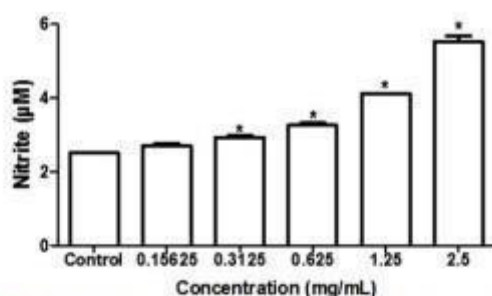


Figure 3. Effect of BTME on nitric oxide production by J774 macrophages. *Significant differences in relation to control ($p < 0.05$).

induced by the BTME and its effects when in combination with fluconazole.

Fluconazole is recommended as the first choice for treating pathologies caused by *C. albicans*, mainly due to its high efficiency and good pharmacokinetic properties (Pappas et al. 2015). However, the appearance of fluconazole resistance represents an enormous limitation for its use in the treatment of candidiasis (Morschhäuser 2016). Consequently, combination therapy has been indicated as a useful alternative to manage *Candida* infections (Cui et al. 2015). Measurement of the combinatory effects of natural products and antimicrobial agents has been taken as a new strategy in the battle against drug resistance (Hemaiswarya et al. 2008; Wagner & Ulrich-Merzenich 2009; Cui et al. 2015) and a range of plant-derived products have been used to increase or restore the action of some antifungal agents such as fluconazole (Khan & Ahmad 2012; Avijgan et al. 2014; da Silva et al. 2014). The BTME was able to increase fluconazole activity against the five resistant strains by additive and synergetic effects. Compounds from both flavonoid and tannin classes (same classes detected in the BTME) are reported as enhancers of fluconazole activity (Endo et al. 2010; da Silva et al. 2014).

Depending on environmental conditions, *C. albicans* can assume three different morphotypes during its development: blastoconidial, pseudohyphal and hyphal forms. Furthermore, *C. albicans* easily develops into a biofilm on surfaces, which when compared to planktonic cells, displays stronger resistance to a wide variety of antifungal agents (Staniszewska et al. 2012; Ma et al. 2015). Different from the control cells, morphological observation showed a predominance of single, isolated blastoconidia over the budding cells and no true hyphal development. These results suggest that the BTME substantially affected the morphogenetic transition of *C. albicans*, which is crucial to its virulence (Staniszewska et al. 2012). The ability to produce hyphae (and then switch between yeast and filamentous forms) is of extreme importance to the pathogenesis of candidiasis and is considered the central virulence attribute (Berman & Sudbery 2002; Dalle et al. 2010; Mayer et al. 2013). The yeast-to-hyphae transition is related to tissue damage and invasion and the host inflammatory response, as well as mediating *Staphylococcus aureus* co-infection (Peters et al. 2014; Schlecht et al. 2015). The ability of the BTME to inhibit hyphal formation can be considered an attractive characteristic for anti-*C. albicans* therapy, especially during biofilm formation (Jacobsen et al. 2012).

Finally, the BTME induced the significant production of NO from macrophages. NO is a reactive oxygen nitrogen species which is recognized as a marker of macrophage activation, playing an essential role in antimicrobial defence. Specifically, NO suppression is a mechanism used by *C. albicans* to evade the

immune system response, thus macrophage function modulation is a potential aim for antifungal therapy (Collette et al. 2014).

In conclusion, this study demonstrated that *B. tetrphylla* is a great source of antimicrobial compounds able to enhance the action of fluconazole against different *C. albicans* strains. The methanol extract induced significant morphological changes in treated cells and enhanced NO production *in vitro*. Therefore, it is presented as a promising source of antifungal agent(s) for the treatment of *C. albicans*. The identification, molecular and *in vivo* studies of the active substance(s) will be areas of important future research aimed at finding alternative, new strategies for controlling *C. albicans* infections using natural products from the Caatinga.

Acknowledgements

The authors are grateful to the following Brazilian agencies: the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (CAPES).

Disclosure statement

The authors confirm that there is no conflict of interest in this article content.

Funding

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [10.13039/501100003593], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [10.13039/501100002322], Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco [10.13039/501100006162].

ORCID

Luís Cláudio Nascimento da Silva  <http://orcid.org/0000-0002-4206-0904>

References

- Agra MF, Baracho GS, Silva KN, Basílio IJLD, Coelho VPM. 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraíba, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 111:383–395.
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2008. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. *Braz J Pharmacog.* 18:472–508.
- Avijgan M, Mahboubi M, Nasab MM, Nia EA, Yousefi H. 2014. Synergistic activity between *Echinophora platyloba* DC ethanolic extract and azole drugs against clinical isolates of *Candida albicans* from women suffering chronic recurrent vaginitis. *J Mycol Med.* 24:112–116.
- Berman J, Sudbery PE. 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 3:918–932.
- Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giráldez C, Gómez-García AC. 2009. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 27:195–199.
- Cassone A. 2014. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG.* 122:785–794.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st edn) Wayne: M100-S21. Clin Lab Std Inst. 30.
- Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. 2014. *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. *PLoS One.* 9:e96203.

- Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H, Zhang L. 2015. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*. 6:362–371.
- da Silva CR, de Andrade Neto JB, de Sousa Campos R, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HI, Cavalcanti BC, Gaspar DM, de Andrade GM, Lima IS, et al. 2014. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 58:1468–1478.
- Dalle F, Wächter B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labrière C, Bonnin A, Hube B. 2010. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 12:248–271.
- Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol*. 161:534–540.
- Fadda ME, Podda GS, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S. 2015. Prevalence of *Candida* species in different hospital wards and their susceptibility to antifungal agents: results of a three-year survey. *J Prev Med Hyg*. 49:69–74.
- Gow NA, Hube B. 2012. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*. 15:406–412.
- Gulati M, Noble CJ. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 16:1–30.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15:639–652.
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächter B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 1:85–93.
- Khan MAS, Ahmad I. 2012. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 67:618–621.
- Krumpalman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol*. 46:165–170.
- Ma C, Du F, Yan L, He G, He J, Wang C, Rao G, Jiang Y, Xu G. 2015. Potent activities of roemerine against *Candida albicans* and the underlying mechanisms. *Molecules*. 20:17913–17928.
- Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. 2012. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*. 120:1407–1414.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 4:119–128.
- Morschhäuser J. 2016. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol*. 54:192–201.
- Oliveira YLC, Silva LCN, Silva AG, Macedo AJ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. 2012. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). *Sci World J*. 2012:1–6.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Zaoutis TE. 2015. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 62:e1–50.
- Peters BM, Palmer GE, Nash AK, Lilly EA, Fidel PL, Noverr MC. 2014. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun*. 82:532–543.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 36:1–53.
- Sant'Anna da Silva AP, Nascimento da Silva LCN, Martins da Fonseca CS, de Araújo JM, Correia MT, Cavalcanti MS, Lima VL. 2016. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of organic extracts from *Cleome spinosa* Jacq. *Front Microbiol*. 7:963.
- Santos Aliança AS, Anjos KF, Vasconcelos Reis TN, Higino TM, Brelaz-de-Castro MC, Bianco EM, Figueiredo RC. 2014. The *in vitro* biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*. 19:14052–14065.
- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 62:10–24.
- Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hensch GM, Filler SG, Shirliff ME. 2015. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 161:168–181.
- Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQD, da Silva MV, Correia MTDS. 2013. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res*. 27:1492–1496.
- Silva LN, Trentin DDS, Zimmer KR, Treter J, Brandelli CLC, Frasson AP, Macedo AJ. 2014. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharm Biol*. 53:464–468.
- Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2015. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol*. 6:1–8.
- Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, Panzer H. 2003. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida vaginitis*: clinical implications. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:34–38.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Siennicka K, Kurzatowski W. 2012. Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Pol J Microbiol*. 61:129–135.
- Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Khouri S, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. 2015. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiol*. 10:917–927.
- Vuuren SV, Viljoen A. 2011. Plant-based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Med*. 77:1168–1182.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16:97–110.
- Weaver PL. 1991. *Buchenavia tetraphylla* (Vahl.) Eichler: Granadillo. New Orleans (LA): Department of Agriculture, Southern Forest Experiment Station.

6. ARTIGO 2

Artigo aceito da revista:

Pharmaceuticals

ISSN: 1424-8247

Volume 13, 2020 – Issue 3

DOI: 10.3390/ph13030046

Fator de Impacto: 4.286

Products derived from *Buchenavia tetraphylla* leaves have *in vitro* antioxidante activity and protect *Tenebrio molitor* larvae against *Escherichia coli*-induced injury

Autores:

Tiago Fonseca Silva,
José Robson Neves Cavalcanti Filho
Mariana Mirelle Lima Barreto Fonseca,
Natalia Medeiros dos Santos,
Ana Carolina Barbosa da Silva,
Adrielle Zagmignan,
Afonso Gomes Abreu,
Ana Paula Sant'Anna da Silva,
Vera Lúcia de Menezes Lima,
Nicácio Henrique da Silva,
Lívia Macedo Dutra,
Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida,
Márcia Vanusa Silva,
Maria Tereza dos Santos Correia,
Luís Cláudio Nascimento da Silva.



Article

Products Derived from *Buchenavia tetraphylla* Leaves Have In Vitro Antioxidant Activity and Protect *Tenebrio molitor* Larvae against *Escherichia coli*-Induced Injury

Tiago Fonseca Silva ¹, José Robson Neves Cavalcanti Filho ^{1,2},
 Mariana Mirelle Lima Barreto Fonsêca ^{1,3}, Natalia Medeiros dos Santos ¹,
 Ana Carolina Barbosa da Silva ⁴, Adrielle Zagmignan ^{5,6}, Afonso Gomes Abreu ⁶,
 Ana Paula Sant'Anna da Silva ¹, Vera Lúcia de Menezes Lima ¹ , Nicácio Henrique da Silva ¹,
 Livia Macedo Dutra ⁷, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida ⁷ , Márcia Vanusa da Silva ¹,
 Maria Tereza dos Santos Correia ^{1,†} and Luís Cláudio Nascimento da Silva ^{4,6,*,†}

- ¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE 50670-901, Brazil; tiagotfs89@gmail.com (T.F.S.); robsonncavalcanti@gmail.com (J.R.N.C.F.); marianamirelle@gmail.com (M.M.L.B.F.); natmmedeiros@gmail.com (N.M.d.S.); annapsantanna@hotmail.com (A.P.S.d.S.); lima.vera.ufpe@gmail.com (V.L.d.M.L.); nhsilva@uol.com.br (N.H.d.S.); marciavanusa@yahoo.com.br (M.V.d.S.); mtscorreia@gmail.com (M.T.d.S.C.)
- ² Faculdade de Odontologia, Universidade de Pernambuco, Camaragibe/PE 54756-220, Brazil
- ³ Curso de Farmácia, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife/PE 51150-000, Brazil
- ⁴ Curso de Biomedicina, Universidade Ceuma, São Luís/MA 65075-120, Brazil; carolinabsilva07@gmail.com
- ⁵ Curso de Nutrição, Universidade Ceuma, São Luís/MA 65075-120, Brazil; adrielle.zagmignan@ceuma.br
- ⁶ Programas de Pós-graduação, Universidade Ceuma, São Luís/MA 65075-120, Brazil; afonso.abreu@ceuma.br
- ⁷ Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina/PE 56304-205, Brazil; liviamdutra@gmail.com (L.M.D.); jackson.guedes@univasf.edu.br (J.R.G.d.S.A.)
- * Correspondence: luiscn.silva@ceuma.br
- † These authors contributed equally to this work.

Received: 28 December 2019; Accepted: 29 February 2020; Published: 16 March 2020



Abstract: The relevance of oxidative stress in the pathogenesis of several diseases (including inflammatory disorders) has traditionally led to the search for new sources of antioxidant compounds. In this work, we report the selection of fractions with high antioxidant action from *B. tetraphylla* (BT) leaf extracts. *In vitro* methods (DPPH and ABTS assays; determination of phenolic and flavonoid contents) were used to select products derived from *B. tetraphylla* with high antioxidant action. Then, the samples with the highest potentials were evaluated in a model of injury based on the inoculation of a lethal dose of heat-inactivated *Escherichia coli* in *Tenebrio molitor* larvae. Due to its higher antioxidant properties, the methanolic extract (BTME) was chosen to be fractionated using Sephadex LH-20 column-based chromatography. Two fractions from BTME (BTFC and BTFD) were the most active fractions. Pre-treatment with these fractions protected larvae of *T. molitor* from the stress induced by inoculation of heat-inactivated *E. coli*. Similarly, BTFC and BTFD increased the lifespan of larvae infected with a lethal dose of enteroaggregative *E. coli* 042. NMR data indicated the presence of aliphatic compounds (terpenes, fatty acids, carbohydrates) and aromatic compounds (phenolic compounds). These findings suggested that products derived from *B. tetraphylla* leaves are promising candidates for the development of antioxidant and anti-infective agents able to treat oxidative-related dysfunctions.

Keywords: oxidative stress; natural products; medicinal plants; anti-infective agents; alternative infection models

1. Introduction

A substantial amount of evidence has indicated the key role of free radicals and reactive oxygen species (ROS) in the etiology of degenerative pathologies associated with aging (Parkinson's and Alzheimer's diseases), cancer, cardiovascular diseases, and diabetes [1–7]. Free radicals are highly reactive molecules characterized by having unpaired electrons in the last valence layer, thus becoming potent oxidizing agents [8,9]. These entities are produced as a result of normal cellular metabolism and play an important role in cell function and signaling; however, they can also damage important macromolecules (DNA, proteins, and lipids), thereby impairing cellular functions and leading to cell death [2,3,8].

Due to the reactivity of free radicals, organisms have developed an efficient antioxidant defense system formed by enzymes (such as superoxide dismutase and catalase) and proteins (glutathione reductase, thioredoxin) [8,9]. However, in many situations, this system cannot cope with the overproduction of reactive species, generating a so-called oxidative stress state, which is related to the clinical manifestations described above [1]. An alternative way of combatting the damage caused by free radicals is the use of exogenous substances collectively called antioxidants [4,8,10].

The antioxidants (natural or synthetic) can act through different mechanisms in the organism, such as: (i) direct neutralization of free radicals; (ii) expression of molecules from the host antioxidant defense systems; (iii) inhibition of oxidant enzymes (leading to reduction of free radicals' generation/propagation) [10–13]. These compounds can also be used in the food industry to maintain the physical-chemical quality of fruits, meat, and other foods [14–16]. Due to the side effects of synthetic antioxidants, those from natural sources are preferred; this context leads to a constant search for plant-derived compounds with this property [4,10–12,14–18].

In addition, antioxidant compounds have been related to the therapeutic properties of the species considered medicinal. In fact, substances with antioxidant actions have been detected in different products derived from plants (juices, teas, extracts, infusions) used in the treatment and prevention of diseases [10–12,14,17]. However, the antioxidant potential of some medicinal plants is still unexploited; and the neotropical species called *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (synonymy *Buchenavia capitata*; Combretaceae family) is a good example. This plant is distributed from Cuba (Central America) to southeastern Brazil (South America). *B. tetraphylla* is popularly known as “tanimbuca” in Brazil, where it has ethnomedicinal importance for communities in the northeast region [19]. It is also known to have a broad spectrum of antimicrobial activity, inhibiting bacteria, fungi, and virus [20–22]. Buchenavianine and two derivatives (O-demethylbuchenavianine, N,O-bis-(demethyl)buchenavianine) have been isolated from *B. tetraphylla*. These compounds are classified as flavoalkaloids with a piperidine moiety at carbon 8 [20,23].

The antioxidant potential of plant products has been traditionally characterized by in vitro methods; however, the biological relevance of these tests has been contested by several works [10,24,25]. In general, in vitro methods have been limited to sample prospection and compound isolation. Thus, the need to employ cell-based methods and in vivo models for a better understanding of the pharmacological action of a candidate as an antioxidant agent is evident [10]. In this work, in vitro methods were used to select products derived from *B. tetraphylla* with antioxidant action. Then, the samples with the highest potentials were evaluated in alternative models of stress based on *Tenebrio molitor* larvae inoculated with *Escherichia coli*.

2. Results

2.1. Comparison of the Antioxidant Activity of Extracts Obtained from *B. tetraphylla* Leaves

Initially, the phenolic and flavonoid contents were compared in different extracts of *B. tetraphylla* (BTHE: hexane extract; BTCE: chloroform extract; BTEE: ethyl acetate extract; BTME: methanolic extract) (Table 1). Among the extracts, BTME presented higher concentrations of both classes of compounds with values of 123.03 ± 1.51 mg of gallic acid equivalent (GAE) per mg of dry extract (mg GAE/mg) and 108.90 ± 0.07 mg of quercetin equivalent (QE) per mg of dry extract (mg QE/mg) ($p < 0.05$). A Pearson coefficient of 0.71 was found between the phenolic and flavonoid contents, indicating a strong correlation.

Table 1. Comparative analysis of total phenolic compounds, flavonoid content, and DPPH radical scavenging of the crude extracts from the leaves of *Buchenavia tetraphylla*.

	BTHE	BTCE	BTEE	BTME	Trolox
Yield (%)	5.30	14.48	10.45	14.44	-
Phenolic compounds content (mg GAE/mg)	9.45 ± 1.29^a	26.53 ± 0.50^b	116.65 ± 10.26^c	123.03 ± 1.23^c	-
Flavonoid content (mg QE/mg)	10.03 ± 0.14^a	14.28 ± 0.48^b	24.92 ± 0.45^c	108.89 ± 0.06^d	-
DPPH (EC₅₀ µg/mL)	6826.45	3779.98	562.75	79.04	44.10

Legend: BTHE: hexane extract; BTCE: chloroform extract; BTEE: ethyl acetate extract; BTME: methanolic extract. In each row, the values with significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different superscript letters (^a, ^b, ^c, ^d). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation, calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$).

The antioxidant potential of the extracts and fractions was evaluated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) and ABTS ((2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) radical) methods. In the DPPH assay, the highest in vitro antioxidant activity was observed for BTME with an EC₅₀ (half maximal effective concentration) of 79.04 µg/mL (Table 1) and higher scavenging action in almost all tested concentrations in relation to other extracts ($p < 0.001$). The EC₅₀ found for Trolox was 44.10 µg/mL (positive control). Similarly, in the ABTS assay, a greater scavenging action was observed for BTME (approximately 100%; $p < 0.05$), followed by BTEE (approximately 50%) (Figure 1A). Strong correlations were also found between the levels of phenolic compounds and the scavenger actions towards DPPH (0.96) and ABTS radicals (0.89). The flavonoid contents were moderately correlated with DPPH scavenging (0.68) and strongly correlated with ABTS scavenging (0.95). The results for both antioxidant assays were strongly related (0.85).

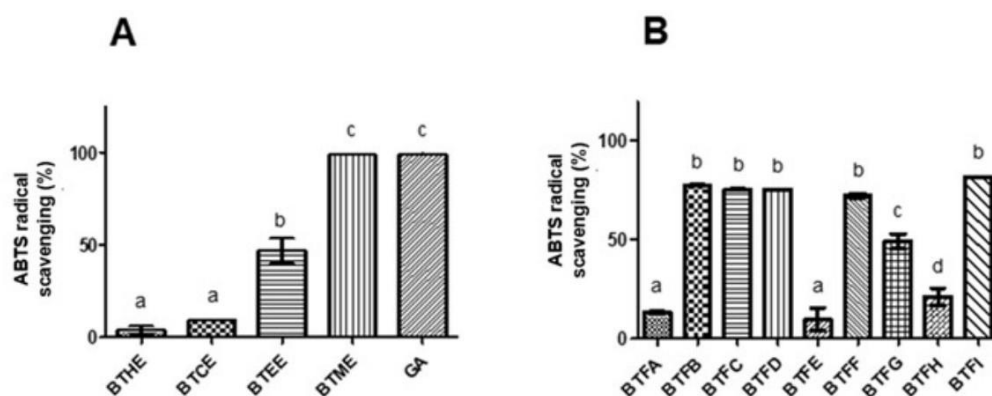


Figure 1. Comparative evaluation of antioxidant activity by the ABTS assay of the crude extracts (**A**) and fractions (**B**) of *Buchenavia tetraphylla* leaves. BTHE: hexane extract; BTCE: chloroform extract; BTEE: ethyl acetate extract; BTME: methanolic extract; BTFA: Fraction A; BTFB: Fraction B; BTFC: Fraction C; BTFD: Fraction D; BTFE: Fraction E; BTFF: Fraction F; BTFG: Fraction G; BTFH: Fraction H; BTFI: Fraction I. In each graph, values with significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different superscript letters (^a, ^b, ^c). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$).

2.2. Comparison of Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Fractions Obtained from Methanolic Extract of *B. tetraphylla* Leaves

Since a higher level of antioxidant activity was observed in BTME, it was submitted to fractionation using Sephadex LH-20 column chromatography. A total of 9 non-repetitive fractions were obtained (BTFA to BTFI). Among them, the highest phenolic content was detected in BTFD ($168.99 \pm 2.22 \mu\text{g GAE}/\mu\text{g}$), followed by BTFC ($156.02 \pm 4.51 \mu\text{g GAE}/\mu\text{g}$), BTFG ($127.62 \pm 19.11 \mu\text{g GAE}/\mu\text{g}$), and BTFI ($110.15 \pm 0.78 \mu\text{g GAE}/\mu\text{g}$) (Table 2). Almost the same pattern was observed for the flavonoid content; in this case, BTFC had the highest values ($68.26 \pm 2.87 \mu\text{g QE}/\mu\text{g}$) ($p < 0.0001$), followed by BTFD ($56.01 \pm 5.54 \mu\text{g QE}/\mu\text{g}$), BTFG ($45.27 \pm 4.13 \mu\text{g QE}/\mu\text{g}$), and BTFI ($39.29 \pm 2.89 \mu\text{g QE}/\mu\text{g}$) (Table 2). A strong correlation (Pearson coefficient of 0.88) was observed among the concentration of phenolic and flavonoid compounds in the fractions obtained from BTME. Following, the antioxidant action of each fraction was investigated, and BTFC showed the highest activity against the DPPH radical (EC_{50} : $50.41 \mu\text{g}/\text{mL}$), followed by BTFD (EC_{50} : $237.7641 \mu\text{g}/\text{mL}$), BTFG (EC_{50} : $294.38 \mu\text{g}/\text{mL}$), and BTFI (EC_{50} : $376.25 \mu\text{g}/\text{mL}$). On the other hand, the fractions BTFB, BTFC, BTFD, BTFE, and BTFI scavenged approximately 80% of the ABTS radical ($p < 0.05$), and no statistical differences were observed between them (Figure 1B).

Table 2. Comparative analysis of total phenolic compounds and flavonoid content and DPPH radical scavenging of the crude extracts from leaves of *Buchanania tetraphylla*.

	BTFA	BTFB	BTFC	BTFD	BTFE	BTFF	BTFG	BTFH	BTFI
Yields (%)	0.10	0.29	1.22	2.53	2.04	0.96	0.46	0.56	0.98
Phenolic contents ($\mu\text{g GAE}/\mu\text{g}$)	49.44 $\pm$ 1.86 ^a	107.20 $\pm$ 7.23 ^b	155.67 $\pm$ 3.40 ^c	168.98 $\pm$ 1.81 ^c	49.80 $\pm$ 6.52 ^a	72.83 $\pm$ 1.13 ^d	127.62 $\pm$ 15.60 ^e	55.61 $\pm$ 3.01 ^a	110.10 $\pm$ 0.62 ^b
Flavonoid contents ($\mu\text{g QE}/\mu\text{g}$)	16.80 $\pm$ 1.76 ^a	12.65 $\pm$ 0.76 ^a	68.27 $\pm$ 2.35 ^b	56.01 $\pm$ 4.52 ^c	14.01 $\pm$ 1.72 ^a	4.28 $\pm$ 0.11 ^d	45.27 $\pm$ 3.37 ^e	0.86 $\pm$ 0.21 ^d	39.29 $\pm$ 2.36 ^e
DPPH (EC₅₀ $\mu\text{g}/\text{mL}$)	2480.22	562.75	50.41	237.76	4132.98	2355.09	294.38	2578.18	376.25

Legend: BTFA–BTFI: Fractions obtained from *Buchanania tetraphylla* methanolic extract. In each row, the values with significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different superscript letters (^{a, b, c, d, e}). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$).

2.3. Evaluation of the Hemolytic Effects of Extracts and Fractions from *Buchenavia tetraphylla* Leaves

Further, the hemolytic potential of each extract or fraction was evaluated using human erythrocytes (Figures 2 and 3). BTHE, BTCE, and BTEE induced toxic effects when tested at the highest concentrations (500 $\mu\text{g/mL}$ and 1000 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 2A–C). In contrast, it was observed that the BTME and its fractions did not induce significant hemolytic activity, even at the highest tested concentrations (Figures 2D and 3).

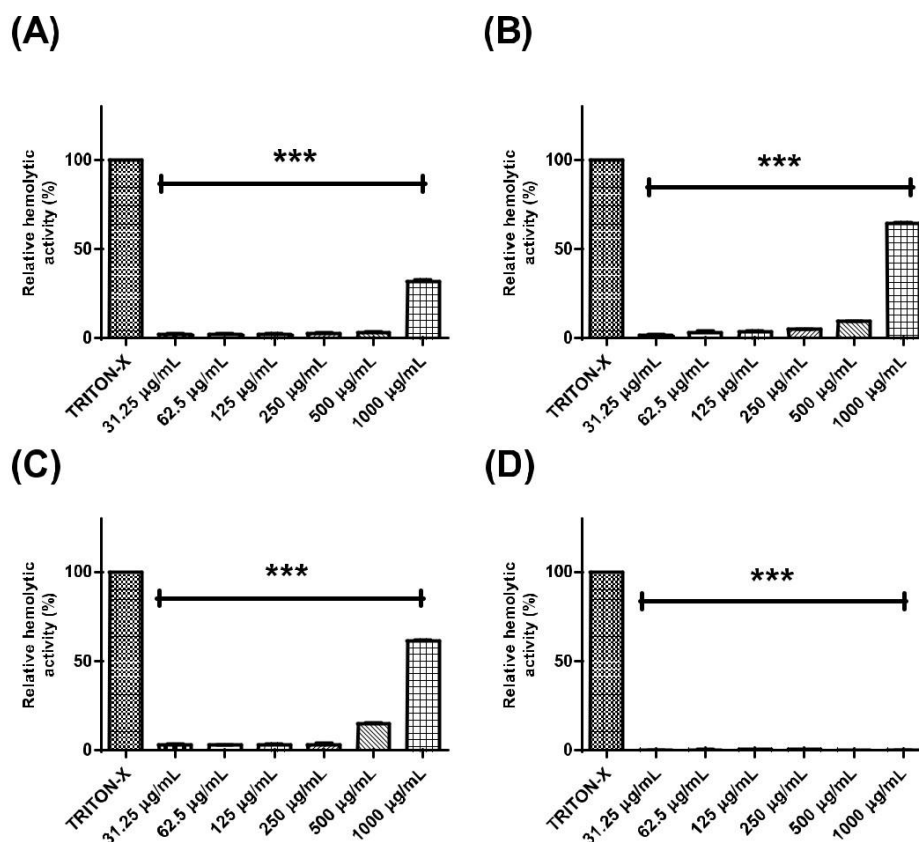


Figure 2. Hemolytic activity of the crude extracts of *Buchenavia tetraphylla* leaves. (A) BTHE (hexane extract); (B) BTCE (chloroform extract); (C) BTEE (ethyl acetate extract); (D) BTME (methanolic extract). *** Significant differences in relation to triton-X ($p < 0.0001$). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in quadruplicate ($n = 4$).

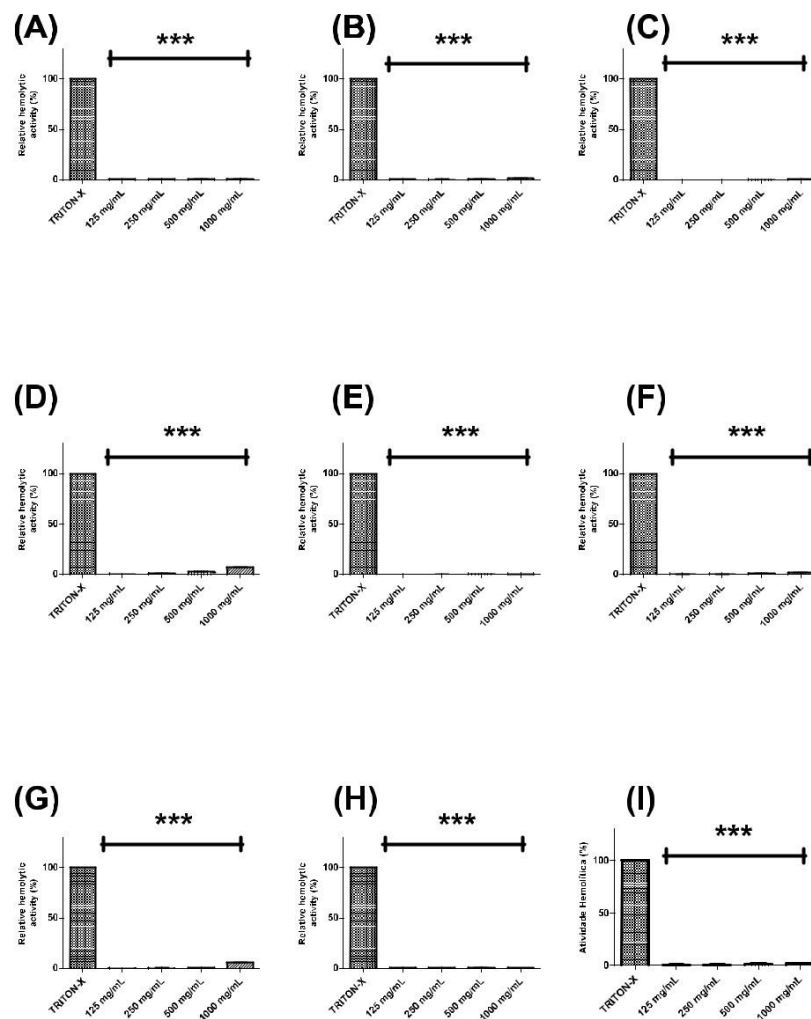


Figure 3. Hemolytic activity of the fractions obtained from the methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves. (A) BTFA (Fraction A); (B) BTFB (Fraction B); (C) BTFC (Fraction C); (D) BTFD (Fraction D); (E) BTFE (Fraction E); (F) BTFF (Fraction F); (G) BTFG (Fraction G); (H) BTFH (Fraction H); (I) BTFI (Fraction I). *** Significant differences in relation to triton-X ($p < 0.0001$). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in quadruplicate ($n = 4$).

2.4. Effects of Extracts and Fractions from *Buchenavia tetraphylla* Leaves on the Survival of *Tenebrio molitor* larvae Submitted to Stress Induced by Heat-Killed *Escherichia coli*

Based on the results presented in the above activities, we decided to evaluate the effects of the methanolic extract and its most active fractions (BTFC and BTFD) in a model of stress induced by heat-killed *E. coli* OP50 in *T. molitor* larvae. The heat treatment was used to ensure that larval death was not induced by bacterial growth; it was caused by the components present in the bacteria, such as lipopolysaccharide (LPS). Additionally, we used the nonpathogenic *E. coli* OP50 strain [26]. In this sense, at this point, we did not evaluate the antimicrobial action of the extract/fractions, but the ability of these to inhibit stress pathways induced by the presence of the bacteria. First, we evaluated the effects of several concentrations (measured at OD₆₀₀ (optical density at 600 nm)) of heat-killed *E. coli* OP50 (data not shown). The best results were obtained with the suspension at an OD₆₀₀ of 0.7; this dose induced the death of 50% of the larvae after 15 h and of 90% after 30 h. These larvae presented typical myelination points related to stress induction in this organism. The pre-treatment with BTME at 10 mg/kg was able to inhibit animal death, with survival rates of 100%, 70%, and 50% after 15 h, 30 h,

and 60 h of infection, respectively. The concentration of 20 mg/kg showed no significant protective action (Figure 4A).

The results obtained with BTFD were even more significant. The group treated with 20 mg/kg exhibited viability rates of 90% and 80% after 45 h and 60 h, respectively. Similar results were obtained with BTFD at 10 mg/kg, where viability remained at 80% after 45 h and 70% after 60 h (Figure 4C). Regarding BTFC, the best protective action was observed for the dose of 10 mg/kg. In this case, survival rates remained at 70% up to 45 h and ended at 60% (60 h). In the case of the 20 mg/kg dose, after 15 h, 80% of the larvae remained viable, and this rate progressively decreased to 50% (30 h), 40% (45 h), and reached 30% after 60 h (Figure 4B).

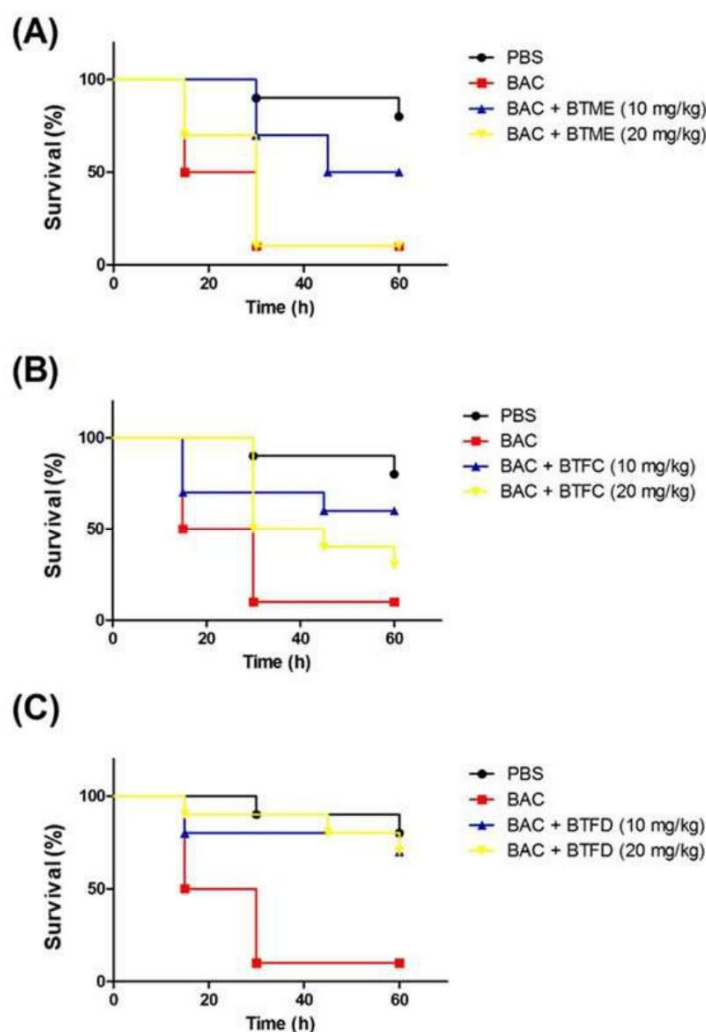


Figure 4. Effects of methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves (BTME) and its fractions (BTFC and BTFD) on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with heat-killed *Escherichia coli* OP50. (A) Effects of BTME on the survival of *T. molitor* larvae challenged with heat-killed *E. coli* OP50; (B) effects of BTFC on the survival of *T. molitor* larvae challenged with heat-killed *E. coli* OP50; (C) effects of BTFD on the survival of *T. molitor* larvae challenged with heat-killed *E. coli* OP50. The larvae ($n = 10/\text{group}$) were pre-treated with each sample (at 10 mg/kg or 20 mg/kg) 12 h prior to inoculation of heat-killed bacteria. Larvae treated with phosphate-saline buffer (PBS) or *E. coli* OP50 (BAC) were used as negative or positive controls, respectively. In this set of assays, larvae survival was recorded each 12 h. The experiment was repeated three times.

2.5. Effects of Fractions from *Buchenavia tetraphylla* Leaves in the Lifespan of *Tenebrio molitor* larvae Infected by Enteroaggregative *Escherichia coli*

We also evaluated the efficacy of BTFC and BTFD in a model of infection provoked by Enteroaggregative *E. coli* 042. The larvae were treated with each fraction 2 h after the infection. *E. coli* 042 killed most of the larvae in less than 24 h (median survival of one day). In contrast, the group treated with *B. tetraphylla* had median survivals of two days (Figure 5). It is important to highlight that these fractions did not have antimicrobial activity towards *E. coli*.

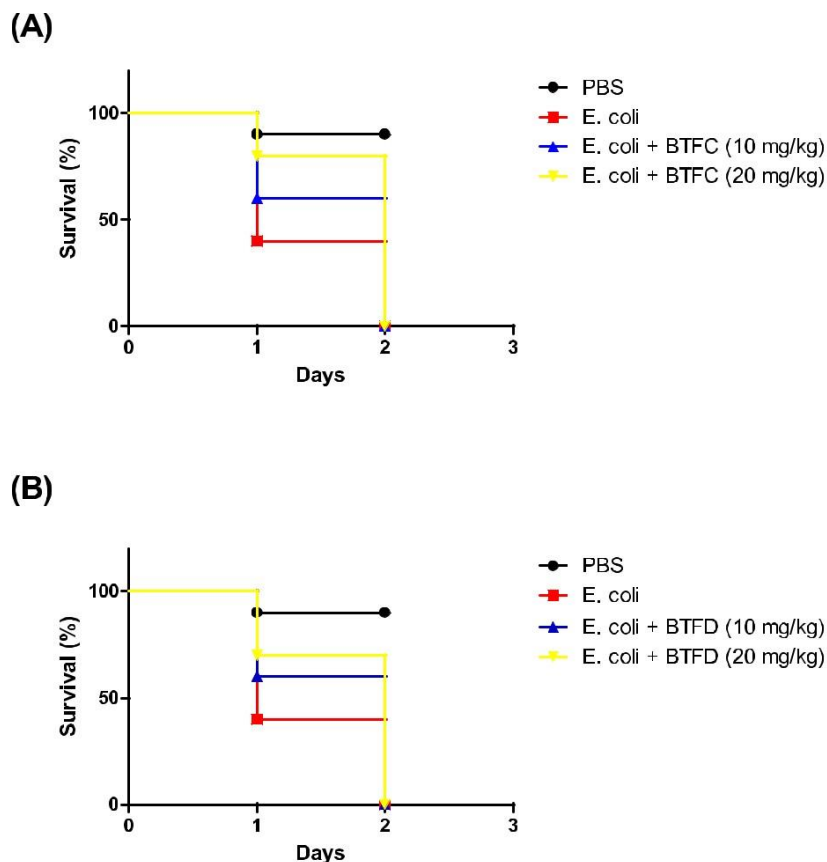


Figure 5. Effects of fractions from methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves (BTFC and BTFD) on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with *Escherichia coli* 042. **(A)** Effects of BTFC on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with *E. coli* 042. **(B)** Effects of BTFD on the survival of *Tenebrio molitor* larvae challenged with *E. coli* 042. The larvae ($n = 10/\text{group}$) received a lethal dose of EAEC 042 and after 2 h were treated with fraction BTFC and BTFD (at 10 mg/kg or 20 mg/kg). Larvae treated with phosphate-saline buffer (PBS) or EAEC 042 were used as negative or positive controls, respectively. In this set of assays, larvae survival was recorded each 24 h. The experiment was repeated three times.

2.6. Nuclear Magnetic Resonance Analysis of *Buchenavia tetraphylla* Leaves

The ^1H NMR analysis and two-dimensional experiments revealed similar profiles for BTFC and BTFD. The intense overlapping made difficult the identification of metabolites; however, it was possible to suggest the presence of some classes of compounds. The fractions showed signals in spectral regions related to aliphatic and aromatic compounds (Figure 6). The signals at δ 0.50–5.90 ppm attributed to an aliphatic compound (such as terpenoids, fatty acids, carbohydrates) were more expressive in comparison to the signals at δ 6.00–8.50 ppm related to aromatic compounds (such as phenolic compounds). This was observed mainly in the BTFD fraction.

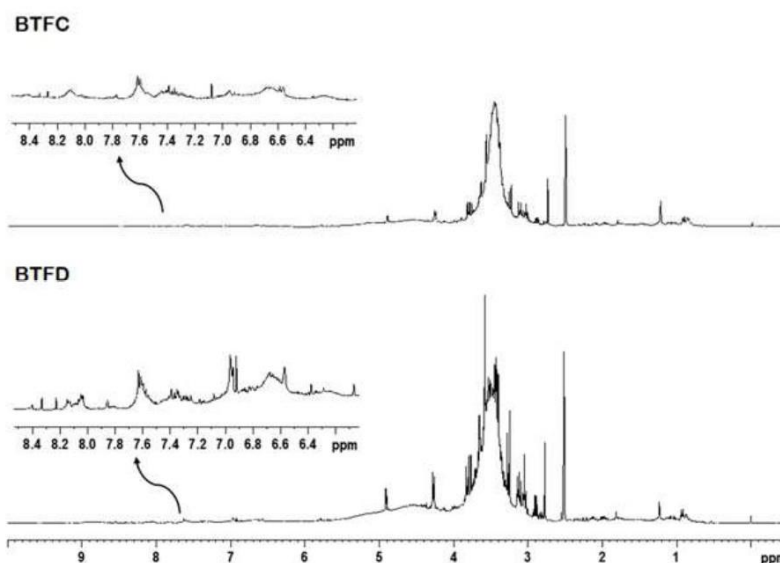


Figure 6. Representative ^1H NMR spectrum of the active fractions (BTFC and BTFD) obtained from the methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla* leaves.

3. Discussion

The role of oxidative stress in the development of severe clinical conditions has promoted the search for new antioxidant agents from natural products [1,2,10,24,25]. Herein, we report the selection of high antioxidant fractions from *B. tetraphylla* leaf extracts using in vitro and in vivo approaches. Products derived from this plant have been shown as potential candidates for the development of new antimicrobial agents [20–22]; however, their antioxidant actions have not been properly addressed. The in vitro results obtained in this study showed that the methanolic extract (BTME) had a higher antioxidant activity, and this effect was correlated with its higher phenolic and flavonoid content. Among the fractions obtained from this extract, the best potentials were found for BTFC and BTFD (these fractions also exhibited greater levels of phenolic compounds). Furthermore, these agents were not toxic towards human erythrocytes.

These samples were selected to be evaluated in a model of stress induced by heat-killed *E. coli* in *T. molitor* larvae. This insect has been used as a model organism in studies of microbial pathogenesis and drug development (antimicrobial, antivirulence, and immunomodulator agents) [27–29]. Several factors have supported the use of this animal. First, *T. molitor* is susceptible to pathogens such as *Candida albicans*, *E. coli*, and *Staphylococcus aureus*, which are able to persist within the infected insect, and cause changes in tissues, hemolymph, and phagocytes [30–32]. Second, the immune system of this insect has some known signaling pathways, such as the Toll pathway, the prophenoloxidase cascade, and the autophagy pathway [33–36].

The antioxidant defense system of *T. molitor* is composed of several antioxidant and detoxifying enzymes such as superoxide dismutases, peroxidases, catalases, as well as tyrosinase, acetylcholinesterase, carboxylesterase, and glutathione S-transferase [37–39]. Previous studies have shown that during infection, the *T. molitor* larvae overproduce reactive species in response to the pathogen presence, leading to increased activity of several antioxidants and detoxifying enzymes that are correlated with larvae death [37,38,40].

The ability of *T. molitor* to produce reactive species in response to deleterious stimulus makes this insect a potential model for the study of antioxidant substances. Despite these advantages, no study has exploited *T. molitor* larvae for the screening of plant-derived antioxidant compounds. The protective action of the agent is evidenced by the increased survival of the treated larvae compared to untreated larvae. This approach using larvae could bring more information than those traditionally used for

antioxidant prospecting, based on the chemical interaction of compounds and without biological relevance [10,24].

Since *T. molitor* is a multicellular organism, this approach also presents advantages over those that use cells as some insights into the toxicity of the antioxidant agent can also be assessed. Furthermore, the use of this insect offers some advantages in relation to *Caenorhabditis elegans*, the invertebrate organism traditionally used for in vivo antioxidant evaluation [41,42], such as ease of handling and direct inoculation of the compound agent in the larvae. In our in vivo model of stress induced by heat-killed *E. coli* (OP50 strain), BTFD induced higher protective effects than BTME and BTFC. However, in our assays using the live EAEC strain, the fractions had similar results (both increasing the larvae median survival in one day). It is important to highlight that BTFC and BTFD did not display antimicrobial activity *in vitro* (data not shown), suggesting that their protective effects are related to the antioxidant properties. In this sense, we showed the efficacy of two fractions rich in antioxidants to reduce the deleterious effects of *E. coli*-induced injury in *T. molitor* larvae.

Previous works reported the predominant presence of flavonoids and alkaloids in *B. tetraphylla* and other species from the same genus [20,21,43,44]. In this present research, the most bioactive fractions (BTFC and BTFD) showed a similar chemical composition with the presence of aliphatic (terpenes, fatty acids, carbohydrates) and aromatic compounds (phenolic compounds). In general, the pharmacological potentials of some terpenes are associated with their antioxidant action [45,46]. These studies were reviewed by Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos [45], who highlighted some structural features involved in the antioxidant action of each type of terpene.

Among the classes of compounds detected, phenolic compounds are the most usually related to antioxidant activity. The high antioxidant abilities of phenolic compounds are related to their phenolic hydroxyl groups that can donate hydrogen atom or transfer electrons, resulting in the scavenging of harmful free radicals (such as hydroxyl radicals). The aromatic groups present in the phenolic acids can also delocalize the unpaired electron [47,48]. According to Dai and Mumper [47], the flavonoids are able to perform electron transfer (mainly due to the ortho-dihydroxy structure on the B ring) and electron delocalization (the 2,3-double bond with a 4-oxo function in the C ring, which relocates from the B ring). The authors also highlighted the essential role of 3- and 5-hydroxyl groups with the 4-oxo function in A and C rings and 3-hydroxyl groups.

4. Material and Methods

4.1. Collection and Extract Preparation

Leaves of *B. tetraphylla* were collected in November 2013, in Catimbau National Park (Pernambuco, Brazil). The samples were processed according to the taxonomic techniques, identified, and deposited in the Herbarium of Agronomic Institute of Pernambuco (voucher: IPA 80349). The leaves of *B. tetraphylla* were subjected to drying at room temperature and then pulverized using a Macsalab mill (Model 200 LAB). This material was stored in a closed, dark container until used.

For extraction, 25 g of the powder were mixed with 100 mL of the first solvent (hexane; for BTHE) on a rotary shaker table (125 rpm) at 25 °C. After 72 h, the sample was filtered, and the extracted liquid was dried in a rotary evaporator (45 rpm) at 50 °C. The remaining leaf residue was further extracted with 100 mL of chloroform (BTCE), and the above procedure was repeated completely, subsequently performed with ethyl acetate (BTEE), and finally, with methanol (BTME).

4.2. Fractionation of the Methanolic Extract

The methanolic extract (2 g) was fractionated by chromatography using a column (80 cm × 2.5 cm) incorporated with Sephadex LH-20 (GE Healthcare®, Chicago, IL, USA; 60 cm high). The systems of eluents were based on the combination of methanol and ethyl acetate (as shown below). A total of 120 fractions (7 mL each) were obtained and analyzed by fluorescent black light (25W; 127V; Empalux®, Curitiba, Brazil) and thin layer chromatography (POLYGRAM® SIL G60/UV₂₅₄; 20 × 20 cm; 0.20 mm;

Macherey-Nagel®, Düren, Germany). After these procedures, fractions with similar phytochemical profiles were gathered, resulting in 9 different fractions: BTFA (Fractions 1–4), BTFB (Fractions 5–11), BTFC (Fractions 12–18), BTFD (Fractions 19–26), BTFE (Fractions 27–36), BTFF (Fractions 37–54), BTFG (Fractions 55–61), BTFH (Fractions 62–69), and BTFI (Fractions 70–120). The elution systems (methanol:ethyl acetate; *v/v*) for obtaining each fraction were: 7:3 for BTFA; 6:4 for BTFB, BTFC, BTFD, BTFE, BTFF; 5:5 for BTFG; 6:4 for BTFH and BTFI.

4.3. Total Phenolic Content

Obtaining the total phenolic compounds in crude extracts and fractions was performed using the Folin-Ciocalteu reagent [49]. Samples of each extract/fraction (200 µL at 1000 µg/mL) were mixed with 1.0 mL of Folin-Ciocalteu reagent, and 800 µL of 20% sodium carbonate were added after 3 min. The mixture was incubated at room temperature, protected from light, and allowed to stand for 2 h. The absorbance of the mixture was measured at 765 nm (GeneQuant 1300, GE Healthcare). The total phenolic content was calculated in mg of gallic acid equivalent (GAE) per mg of dry extract using a calibration curve obtained with gallic acid ($y = 0.0043x + 0.0153$; $R^2 = 0.9932$). The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$).

4.4. Flavonoid Content

For flavonoid content, 100 µL (at 1000 µg/mL) of each sample were mixed with 100 µL of the reagent solution (2 g of aluminum chloride diluted in 2% ethanol solution). The mixture was incubated at room temperature and protected from light, and after 60 min, the absorbance was measured at 420 nm [50]. The content of flavonoids was calculated in mg of quercetin equivalent (QE) per mg of dry extract using a calibration curve constructed with standard quercetin solution ($y = 0.004x + 0.0121$; $R^2 = 0.993$). The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$).

4.5. DPPH Assay

An aliquot of 250 µL of 1 mM DPPH solution (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich) was added to 40 µL of different sample concentrations (31.25–1000 µg/mL) and homogenized. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm [51]. Trolox was used as the control compound. The DPPH sequestering activity was calculated using the formula below. The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$).

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = (\text{Ac} - \text{As})/\text{Ac} \times 100$$

where: Ac = absorbance control; As = sample absorbance

4.6. ABTS Assay

The ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)) radical cation was prepared 16 h prior to the assay by mixing 5 mL of the stock solution (7 mM) with 88 µL of the 140 mM potassium persulfate solution. Aliquots (20 µL) of each extract/fraction and 2 mL of the ABTS radical were mixed, and the absorbance of the solutions was monitored at 734 nm after 6, 15, 30, 45, 60, and 120 min, respectively [52]. Gallic acid was used as the positive control. The ABTS scavenging was calculated using the formula below. The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation calculated from three independent assays performed in triplicate ($n = 3$).

$$\text{ABTS scavenging (\%)} = (\text{Ac} - \text{Aa})/\text{Ac} \times 100$$

where Ac (control absorbance) and Aa (sample absorbance).

4.7. Hemolytic Activity

Blood (5–10 mL) was obtained from healthy, non-smoker volunteers by venipuncture, after signing a free informed consent form. Human erythrocytes from citrated blood were immediately isolated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min. After removal of the plasma, the erythrocytes were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), and then, a suspension of 1% erythrocytes was prepared as the same buffer. Following, an aliquot of 1.1 mL of erythrocyte suspension was mixed with 0.4 mL of each extract/fraction (concentration range: 125 to 1000 µg/mL). The negative control and positive control received 0.4 mL of PBS and Triton X, respectively. After 60 min of incubation at room temperature, the cells were centrifuged, and the supernatant was used to measure the absorbance of hemoglobin released at 540 nm [21]. The hemolytic activity was expressed in relation to the action of Triton X-100 and calculated using the formula below. The results were expressed as the mean ± standard deviation calculated from three independent assays performed in quadruplicate ($n = 4$).

$$\text{Hemolytic activity (\%)} = [(Aa - Ab) \times 100] / (Ac - Ab)$$

where: Aa is sample absorbance; Ab is the absorbance of the negative control; and Ac is the absorbance of the positive control.

4.8. Toxicity Model Using Heat-Killed *E. coli*

Larvae of *T. molitor* (~100 mg) were randomly allocated into groups ($n = 10$). After anesthesia and disinfection, 10 µL of the most active samples (methanolic extract or fractions C and D; at 10 mg/kg or 20 mg/kg) were injected in the ventral membrane between the second and third abdominal segments (tail to the head) [29]. One hour after the sample inoculation, the larvae received 10 µL of heat-killed *E. coli* OP50 (optical density at 600 nm: 0.7). The viability of the larvae was evaluated after 15, 30, 45, and 60 h (by evaluation the lack of movement after mechanical stimulus). Larvae inoculated with the microorganism and treated with PBS were used as the negative control; while larvae that received two doses of PBS were the positive control. The experiment was performed in three independent assays.

4.9. Infection Model Using Enteroaggregative *E. coli*

Larvae ($n = 10$) were prepared as described above and infected with 10 µL of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) 042 (optical density at 600 nm: 0.1). After two hours, each animal received 10 µL of BTFC or BTFD (at 10 mg/kg or 20 mg/kg). Larvae inoculated with *E. coli* 042 and treated with PBS were used as the negative control; while larvae that received two doses of PBS were the positive control. The experiment was repeated three independent assays.

4.10. Nuclear Magnetic Resonance Analysis

The chemical characterization of the most active fractions (BTFC and BTFD) was performed by nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. 1D and 2D NMR data were acquired at 298 K in DMSO- d_6 on a Bruker AVANCE III 400 NMR spectrometer operating at 9.4 T, observing ^1H and ^{13}C at 400 and 100 MHz, respectively. The NMR spectrometer was equipped with a 5 mm direct detection probe (BBO) with a z -gradient. One-bond (^1H - ^{13}C HSQC) and long-range (^1H - ^{13}C HMBC) NMR correlation experiments were optimized for average coupling constant $^1J_{(\text{C,H})}$ and $^{\text{LR}}J_{(\text{C,H})}$ of 140 and 8 Hz, respectively. All ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts (δ) were given in ppm related to the TMS signal at 0.00 as an internal reference and the coupling constants (J) in Hz.

4.11. Statistical Analysis

The results were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Statistical significance was determined by one-way ANOVA or two-way ANOVA followed by Tukey and Bonferroni tests. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. Determination of EC_{50} (half maximal effective

concentration) was performed by linear regression. Correlations were assessed using the Pearson coefficient. The larvae survival assays were analyzed using the Kaplan–Meier method to calculate survival fractions, and the log-rank test was used to compare survival curves.

5. Conclusions

In this study, the use of in vitro antioxidant assays allowed the selection of fractions from a methanolic extract with a high activity and low toxicity. The fractions (BTFC and BTFD) were able to extend the lifespan of *T. molitor* larvae submitted to stress induced by heat-killed *E. coli* significantly. The therapeutic treatment with these fractions had also positive effects on the infection induced by the pathogenic strain *E. coli* 042 (EAEC). ¹H NMR data indicated the presence of aliphatic (terpenes, fatty acids, carbohydrates) and aromatic compounds (phenolic compounds). These findings suggested that products derived from *B. tetraphylla* leaves are a promising candidate for the development of antioxidant agents able to treat the oxidative-related dysfunctions.

Author Contributions: T.F.S., M.V.d.S., M.T.d.S.C., and L.C.N.d.S. conceived of the study and performed the study design. T.F.S., V.L.d.M.L., N.H.d.S., J.R.G.d.S.A., M.V.d.S., M.T.d.S.C., and L.C.N.d.S. provided the reagents and equipment for all assays. J.R.N.C.F., M.M.L.B.F., N.M.d.S., and A.P.S.d.S. prepared the extracts and performed the in vivo and in vitro antioxidant assays. A.C.B.d.S., A.Z., and A.G.A. performed the anti-infective assays with *T. molitor*. J.R.G.d.S.A. and L.M.D. performed the chemical characterization of the extracts. All authors interpreted and discussed the results. T.F.S., J.R.G.d.S.A., L.M.D., A.C.B.d.S., M.T.d.S.C., and L.C.N.d.S. drafted and revised the manuscript. All authors approved the final version of this manuscript.

Funding: This work was funded by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA; BEPP-02241/18), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Acknowledgments: The authors thank the support given by the Laboratory of Natural Products and the Laboratory of Molecular Biology, Department of Biochemistry, of the Federal University of Pernambuco (UFPE/Universidade Federal de Oer).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Poprac, P.; Jomova, K.; Simunkova, M.; Kollar, V.; Rhodes, C.J.; Valko, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 592–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Vallejo, M.J.; Salazar, L.; Grijalva, M. Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A review on in vitro models for plant-derived compounds. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 4586068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chikara, S.; Nagaprashantha, L.D.; Singhal, J.; Horne, D.; Awasthi, S.; Singhal, S.S. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Lett.* **2018**, *413*, 122–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. De Andrade Teles, R.B.; Diniz, T.C.; Costa Pinto, T.C.; de Oliveira Junior, R.G.; Gama, E.S.M.; de Lavor, E.M.; Fernandes, A.W.C.; de Oliveira, A.P.; de Almeida Ribeiro, F.P.R.; da Silva, A.A.M.; et al. Flavonoids as therapeutic agents in alzheimer's and parkinson's diseases: A systematic review of preclinical evidences. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 7043213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Reddy, P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in asthma: Implications for mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Pharmaceuticals* **2011**, *4*, 429–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sillar, J.R.; Germon, Z.P.; DeJuliis, G.N.; Dun, M.D. The role of reactive oxygen species in acute myeloid leukaemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6003. [[CrossRef](#)]
7. Teixeira, J.P.; de Castro, A.A.; Soares, F.V.; da Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C. Future therapeutic perspectives into the alzheimer's disease targeting the oxidative stress hypothesis. *Molecules* **2019**, *24*, 4410. [[CrossRef](#)]
8. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84. [[CrossRef](#)]
9. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* **2015**, *4*, 180–183. [[CrossRef](#)]

10. Nascimento da Silva, L.C.; Bezerra Filho, C.M.; Paula, R.A.; Silva, E.S.C.S.; Oliveira de Souza, L.I.; Silva, M.V.; Correia, M.T.; Figueiredo, R.C. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. *Free Radic. Res.* **2016**, *50*, 801–812. [\[CrossRef\]](#)
11. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* **2012**, *70*, 257–265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Da Silva, L.C.; Alves, N.M.; de Castro, M.C.; Higino, T.M.; da Cunha, C.R.; Pereira, V.R.; da Paz, N.V.; Coelho, L.C.; Correia, M.T.; de Figueiredo, R.C. pCramoll and rCramoll as new preventive agents against the oxidative dysfunction induced by hydrogen peroxide. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 520872. [\[PubMed\]](#)
13. Cacciatore, I.; Fornasari, E.; Baldassarre, L.; Cornacchia, C.; Fulle, S.; Di Filippo, E.S.; Pietrangelo, T.; Pinnen, F. A potent (R)-alpha-bis-lipoyl derivative containing 8-hydroxyquinoline scaffold: Synthesis and biological evaluation of its neuroprotective capabilities in sh-sy5y human neuroblastoma cells. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 54–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Marranzano, M.; Rosa, R.L.; Malaguarnera, M.; Palmeri, R.; Tessitori, M.; Barbera, A.C. Polyphenols: Plant sources and food industry applications. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 4125–4130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Ribeiro, J.S.; Santos, M.; Silva, L.K.R.; Pereira, L.C.L.; Santos, I.A.; da Silva Lannes, S.C.; da Silva, M.V. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Sci.* **2019**, *148*, 181–188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Lourenco, S.C.; Moldao-Martins, M.; Alves, V.D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules* **2019**, *24*, 4132. [\[CrossRef\]](#)
17. da Silva, L.C.; da Silva, C.A., Jr.; de Souza, R.M.; Jose Macedo, A.; da Silva, M.V.; dos Santos Correia, M.T. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 2222–2228. [\[CrossRef\]](#)
18. Teles Fujishima, M.A.; Silva, N.; Ramos, R.D.S.; Batista Ferreira, E.F.; Santos, K.; Silva, C.; Silva, J.O.D.; Campos Rosa, J.M.; Santos, C. An Antioxidant Potential, Quantum-Chemical and Molecular Docking Study of the Major Chemical Constituents Present in the Leaves of *Curatella americana* Linn. *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 72. [\[CrossRef\]](#)
19. Agra, M.F.; Baracho, G.S.; Nurit, K.; Basilio, I.J.; Coelho, V.P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 383–395. [\[CrossRef\]](#)
20. Beutler, J.A.; Cardellina, J.H., 2nd; McMahon, J.B.; Boyd, M.R.; Cragg, G.M. Anti-HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 207–213. [\[CrossRef\]](#)
21. De Oliveira, Y.L.; Nascimento da Silva, L.C.; da Silva, A.G.; Macedo, A.J.; de Araujo, J.M.; Correia, M.T.; da Silva, M.V. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 849302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Cavalcanti Filho, J.R.; Silva, T.F.; Nobre, W.Q.; Oliveira de Souza, L.I.; Silva, E.S.F.C.S.; Figueiredo, R.C.; de Gusmao, N.B.; Silva, M.V.; Nascimento da Silva, L.C.; Correia, M.T. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1521–1527. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Blair, L.M.; Calvert, M.B.; Sperry, J. Flavoalkaloids-Isolation, Biological Activity, and Total Synthesis. *Alkaloids Chem. Biol.* **2017**, *77*, 85–115. [\[PubMed\]](#)
24. Becker, K.; Schroecksadel, S.; Gostner, J.; Zaknun, C.; Schennach, H.; Uberall, F.; Fuchs, D. Comparison of in vitro tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 164–171. [\[CrossRef\]](#)
25. Pellegrini, N.; Vitaglione, P.; Granato, D.; Fogliano, V. Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: Merits and limitations. *J. Sci. Food Agric.* **2018**. [\[CrossRef\]](#)
26. Yun, E.J.; Lee, S.H.; Kim, S.; Kim, S.H.; Kim, K.H. Global profiling of metabolic response of *Caenorhabditis elegans* against *Escherichia coli* O157: H7. *Process. Biochem.* **2017**, *53*, 36–43. [\[CrossRef\]](#)
27. Canteri de Souza, P.; Custodio Caloni, C.; Wilson, D.; Sergio Almeida, R. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. *J. Fungi* **2018**, *4*, 125. [\[CrossRef\]](#)
28. Guo, Z.; Pfohl, K.; Karlovsky, P.; Dehne, H.W.; Altincicek, B. Dissemination of *Fusarium proliferatum* by mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204602. [\[CrossRef\]](#)
29. Czarniewska, E.; Urbanski, A.; Chowanski, S.; Kuczer, M. The long-term immunological effects of alloferon and its analogues in the mealworm *Tenebrio molitor*. *Insect Sci.* **2018**, *25*, 429–438. [\[CrossRef\]](#)
30. McGonigle, J.E.; Purves, J.; Rolff, J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *59*, 34–38. [\[CrossRef\]](#)

31. Seong, J.H.; Jo, Y.H.; Seo, G.W.; Park, S.; Park, K.B.; Cho, J.H.; Ko, H.J.; Kim, C.E.; Patnaik, B.B.; Jun, S.A.; et al. Molecular Cloning and Effects of Tm14-3-zeta-Silencing on Larval Survivability Against, *E. coli* and *C. albicans* in *Tenebrio molitor*. *Genes* **2018**, *9*, 330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. De Souza, P.C.; Morey, A.T.; Castanheira, G.M.; Bocate, K.P.; Panagio, L.A.; Ito, F.A.; Furlaneto, M.C.; Yamada-Ogatta, S.F.; Costa, I.N.; Mora-Montes, H.M.; et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *118*, 182–186. [\[CrossRef\]](#)
33. Johnston, P.R.; Makarova, O.; Rolff, J. Inducible defenses stay up late: Temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. *G3* **2013**, *4*, 947–955. [\[CrossRef\]](#)
34. Park, S.J.; Kim, S.K.; So, Y.I.; Park, H.Y.; Li, X.H.; Yeom, D.H.; Lee, M.N.; Lee, B.L.; Lee, J.H. Protease IV, a quorum sensing-dependent protease of *Pseudomonas aeruginosa* modulates insect innate immunity. *Mol. Microbiol.* **2014**, *94*, 1298–1314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Tindwa, H.; Jo, Y.H.; Patnaik, B.B.; Lee, Y.S.; Kang, S.S.; Han, Y.S. Molecular cloning and characterization of autophagy-related gene *TmATG8* in *Listeria*-invaded hemocytes of *Tenebrio molitor*. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *51*, 88–98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Yang, Y.T.; Lee, M.R.; Lee, S.J.; Kim, S.; Nai, Y.S.; Kim, J.S. *Tenebrio molitor* Gram-negative-binding protein 3 (*TmGNBP3*) is essential for inducing downstream antifungal Tenecin 1 gene expression against infection with *Beauveria bassiana* JEF-007. *Insect Sci.* **2018**, *25*, 969–977. [\[CrossRef\]](#)
37. Zhu, J.Y.; Ze, S.Z.; Stanley, D.W.; Yang, B. Parasitization by *Scleroderma guani* influences expression of superoxide dismutase genes in *Tenebrio molitor*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2014**, *87*, 40–52. [\[CrossRef\]](#)
38. Li, X.; Liu, Q.; Lewis, E.E.; Tarasco, E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 4485–4494. [\[CrossRef\]](#)
39. Gulevsky, A.K.; Relina, L.I.; Grishchenkova, Y.A. Variations of the antioxidant system during development of the cold-tolerant beetle, *Tenebrio molitor*. *Cryo Lett.* **2006**, *27*, 283–290.
40. Medina-Gomez, H.; Farriols, M.; Santos, F.; Gonzalez-Hernandez, A.; Torres-Guzman, J.C.; Lanz, H.; Contreras-Garduno, J. Pathogen-produced catalase affects immune priming: A potential pathogen strategy. *Microb. Pathog.* **2018**, *125*, 93–95. [\[CrossRef\]](#)
41. Peixoto, H.; Roxo, M.; Silva, E.; Valente, K.; Braun, M.; Wang, X.; Wink, M. Bark Extract of the Amazonian Tree *Endopleura uchi* (Humiriaceae) Extends Lifespan and Enhances Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* **2019**, *24*, 915. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Rohn, I.; Raschke, S.; Aschner, M.; Tuck, S.; Kuehnelt, D.; Kipp, A.; Schwerdtle, T.; Bornhorst, J. Treatment of *Caenorhabditis elegans* with small selenium species enhances antioxidant defense systems. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63*, e1801304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Teodoro, G.R.; Brighenti, F.L.; Delbem, A.C.; Delbem, A.C.; Khouri, S.; Gontijo, A.V.; Pascoal, A.C.; Salvador, M.J.; Koga-Ito, C.Y. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-albicans. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 917–927. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Teodoro, G.R.; Gontijo, A.V.L.; Salvador, M.J.; Tanaka, M.H.; Brighenti, F.L.; Delbem, A.C.B.; Delbem, A.C.B.; Koga-Ito, C.Y. Effects of acetone fraction from *Buchenavia tomentosa* aqueous extract and gallic acid on *Candida albicans* biofilms and virulence factors. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 647. [\[CrossRef\]](#)
45. Gonzalez-Burgos, E.; Gomez-Serranillos, M.P. Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5319–5341. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Xu, D.P.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Zhang, J.J.; Li, H.B. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 96. [\[CrossRef\]](#)
47. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352. [\[CrossRef\]](#)
48. Castaneda-Arriaga, R.; Perez-Gonzalez, A.; Reina, M.; Alvarez-Idaboy, J.R.; Galano, A. Comprehensive investigation of the antioxidant and pro-oxidant effects of phenolic compounds: A double-edged sword in the context of oxidative stress? *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 6198–6214. [\[CrossRef\]](#)
49. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **1965**, *16*, 144–158.
50. Woisky, R.G.; Salatino, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.* **1998**, *37*, 99–105. [\[CrossRef\]](#)

7. ARTIGO 3

Artigo a ser submetido em revista:

Extrato metanólico das folhas de *Myrcia hirtiflora* DC. protege o *Tenebrio molitor* de infecção causada por *Staphylococcus aureus*

Autores:

Tiago Fonseca Silva
Mariana Mirelle Lima Barreto Fonseca
Telma Cristina Cavalcanti Nogueira
Adrielle Zagmignan
Ana Paula Sant'Anna da Silva
Vera Lúcia de Menezes Lima
Lívia Macedo Dutra
Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Márcia Vanusa Silva
Luís Cláudio Nascimento da Silva
Maria Tereza dos Santos Correia

EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *MYRCIA HIRTIFLORA* DC. PROTEGE O *TENEBRIO MOLITOR* DE INFECÇÃO CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

RESUMO: A eficiência da disseminação do *Staphylococcus aureus* se deve, em parte, à sua grande versatilidade em adquirir genes relacionados à virulência e resistência a drogas. Diante da alta incidência de linhagens multirresistentes e altamente virulentas, se faz necessário a busca por novos compostos que sejam capazes de inibir o crescimento desses microrganismos. O papel do estresse oxidativo no desenvolvimento de condições clínicas graves levou à busca de novos agentes antioxidantes a partir de produtos naturais. Este estudo tem por objetivo determinar o extrato da folha de *Myrcia hirtiflora* DC capaz de inibir a infectividade de *S. aureus*. Os extratos de diferentes polaridades que apresentaram ação *in vitro* foram selecionados para a avaliação do efeito anti- infectivo *in vivo*, larvas do inseto *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) foram infectadas e sua viabilidade avaliada diariamente, pela ausência de movimento, como: carga bacteriana, conteúdo de melanina e o número de hemócitos na hemolinfa das larvas tratadas. Com base na avaliação da atividade anti-*S. aureus* com ação antioxidante mais alta o extrato de melhor resultado foi submetido a análise de RMN, sendo detectada a presença de catequinas, composto que pertence ao grupo dos flavonoides. Esse estudo indica que extratos derivados de folhas da *Myrcia hirtiflora* DC. possuem compostos bioativos capazes de inibir ou tratar infecções causadas por *S. aureus*.

Palavra-chave: Catequina, Planta medicinal, Produtos naturais, Anti-*Staphylococcus aureus*, Myrtaceae.

INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas e agentes estressores ainda representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre seres humanos, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. Atualmente atingimos um ponto crítico em que novas drogas não estão sendo desenvolvidos no ritmo necessário para conter esta capacidade natural dos patógenos de adquirir resistência e defender-se contra os antibióticos [1]. E também é necessário o desenvolvimento de novas soluções para reduzir os efeitos deletérios do envelhecimento e, portanto prolongar o tempo de vida saudável [2,3].

No Brasil há uma biodiversidade singular, isto configura uma possibilidade de desenvolvimentos de novos compostos capazes de inibir o crescimento antimicrobiano, como ênfase em inibição da virulência ou imunomodulação, e bloquear o processo oxidativo interagindo com os radicais livres, devido aos compostos presentes nos extratos derivados de plantas medicinais [4, 5].

Apesar de ser encontrado na microbiota humana colonizando principalmente a pele e as cavidades nasais, *S. aureus* pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até enfermidades mais graves, como: pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, sepse, abscessos e lesões necróticas graves [6]. Esta bactéria tem a capacidade de segregar inúmeras enzimas e toxinas que elevam a patogenicidade e permitem a aderência, resistência à fagocitose e lise de células eucarióticas, entre outros [7,8,9]. Os produtos de tais genes são responsáveis pela formação de cápsula, síntese de proteína A, estafiloxantina e coagulase [10].

Também encontra em organismos humanos radicais livres reativos, que são combatidos por um eficiente sistema de defesa antioxidante, formados de enzimas e proteínas [11,12]. Esse sistema, em algumas situações, não consegue inibir a superprodução de espécies reativas, gerando o estresse oxidativo [13].

Os radicais livre podem ser inibidos com o uso de substâncias exógenas chamadas de antioxidantes [14,11,15].

As moléculas consideradas como compostos modificadores da resposta biológica pertencem à essas atividades, e são agentes que modificam a resposta biológica do organismo por meio da estimulação ou inibição do sistema imunológico, podendo resultar em efeitos terapêuticos [16]. Diante da diversidade do país, podem-se delimitar focos de regiões com potencial para a prospecção de fitoterápicos.

Assim, esse ambiente torna-se favorável para o desenvolvimento da prospecção biológica. Para tanto, foi estabelecido neste trabalho um modelo alternativo de infecção usando larvas de *Tenebrio molitor*. Este inseto vem sendo aplicado em alguns estudos de patogenicidade microbiana, especialmente em países como o Brasil, onde a comercialização das larvas de *Galleria mellonella* (modelo mais utilizado) não é realizada. A larva de *T. molitor*, como a larva de *G. mellonella*, pode ser mantida a temperaturas entre 25 ° C e 37 ° C, o que o torna adequado para o estudo de agentes patogénicos à temperatura do corpo [17]. Outra vantagem refere-se à forma de inoculação, que é realizado por injeção direta na larva de *T. molitor* [18].

Portanto, este estudo tem por objetivo selecionar extratos naturais derivados da *Myrcia hirtiflora* capazes de inibir a infectividade de *S. aureus*. Dessa maneira, investigar a ação dos compostos nas vias de longevidade e do sistema imune das larvas.

MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

Coleta e Armazenamento da planta

Folhas de *Myrcia hirtiflora* foram coletadas em novembro de 2013, no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil). As amostras foram processadas conforme as técnicas taxonômicas, identificadas e depositadas no Herbário IPA (voucher: 80347), do Instituto Agronômico de Pernambuco. As folhas de *Myrcia hirtiflora* foram submetidas à secagem em temperatura ambiente e em seguida, moídas para padronização do tamanho de partículas do pó da planta através de moinho de facas Macsalab mil (Model 200 LAB). Este material foi armazenado em um recipiente âmbar fechado a 4°C até ser utilizado.

Obtenção do extrato

A extração foi realizada seguindo a série eluotrópica como os seguintes solventes: Ciclohexano (CHX), Clorofórmio (CLO), Acetato de etila (ACT) e Metanol (MET). O material (25 g da folha triturada) foi transferido para um Erlenmeyer (500 mL) ao qual foram adicionados 250 mL do primeiro solvente da série, sendo deixado em agitação por 72 horas numa mesa agitadora sob rotação de 125 rpm a 25 °C. Após 72 horas, a amostra foi filtrada, o resíduo de folhas restante foi submetido à nova extração seguindo a série dos solventes. Os líquidos extraídos, após cada extração, foram rotaevaporados sob rotação (45 rpm) a 50 °C obtendo os extratos de *Myrcia hirtiflora*: Ciclohexano (EHMH), Clorofórmio (ECMH), Acetato de etila (EAMH) e Metanol (EMMH).

Teor Total de fenóis e flavonoides

Dosagem de Compostos Fenólicos

A dosagem de compostos fenólicos presente nos extratos brutos da *M. hirtiflora* foi realizada pela metodologia segundo Folin-Ciocalteu [19] com algumas modificações. Amostras com 20 µL (1000 µg/mL) foram colocadas em

placa de 96 poços e 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1: 1 v / v) adicionado, após 3 minutos foi acrescentado 80 uL de carbonato de sódio (20%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, sem incidência de luz e em repouso por 2 horas. A absorção da mistura foi medida utilizando o comprimento de 765 nm (GeneQuant 1300, GE Healthcare). A quantidade de fenóis totais foi calculada em µg/mL de ácido gálico equivalentes (EAG), utilizando a curva de calibração da solução padrão de ácido gálico. Para o ácido gálico, a absorbância da curva em função da concentração é descrita pela equação $y = 0,0043X + 0,0153$ ($r^2 = 0,9932$).

Dosagem de Flavonoides

A dosagem de flavonoides presente nas amostras da *M. hirtiflora* foi realizada segundo Woisky e Salatino [20] com algumas modificações. Foi utilizada 100 µL das amostras (1000 µg/mL) e 100 µL da solução reagente (2g de Cloreto de Alumínio diluído em solução de etanol a 2%), a mistura final foi distribuída em placa de 96 poços. A placa foi incubada durante 60 min à temperatura ambiente sem incidência de luz. A absorção medida por espectrofotometria à 420nm [21]. A quantidade de flavonóides calculada em µg/mL equivalente de Quercitina (EQ). Para a quercitina, a absorbância da curva em função da concentração é descrita pela equação $y = 0,004X + 0,0121$ ($r^2 = 0,993$).

Ensaaios antioxidantes in vitro

Ensaio DPPH

Neste ensaio a atividade sequestrante de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) dos extratos foi realizada segundo a metodologia descrita por

Blios [22]. Uma alíquota de 250 uL de solução de DPPH (1mM) foi misturada com 40 µl de diferentes concentrações das amostras (31,25 - 1000µg/mL). Trinta minutos mais tarde, a absorbância foi medida a 517 nm. O trolox foi utilizado como o composto de referência. A atividade sequestrante de radicais livres foi expressa em porcentagem por comparação ao composto de referência e calculada usando a seguinte fórmula:

$$[\text{DPPH}] (\%) = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Onde: Ac = controle de absorção; As = Absorbância da Amostra

Avaliação antioxidante in vivo

O modelo biológico utilizado nesse estudo foram larvas de *Tenebrio molitor* com aproximadamente 100 mg que foram previamente randomizadas em grupos de 10 indivíduos. Com o auxílio de uma seringa de insulina, 1 UI do extrato metanólico na concentração 250 µg/mL foi injetado nas larvas. Após 1 hora da inoculação do extrato, foi adicionado 1 UI do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

A viabilidade das larvas foi avaliada após 15, 30, 45 e 60 horas pela ausência de movimento. Larvas inoculadas com o H₂O₂ e tratadas com salina foram utilizadas com controle negativo, enquanto larvas tratadas apenas com salina utilizadas como controle positivo.

Atividade Hemolítica

O sangue (5-10 mL) foi obtido a partir de voluntários saudáveis, não-fumantes, por punção venosa, após consentimento informado por escrito. Eritrócitos humanos partir de sangue citratado foram imediatamente isolados por centrifugação a 1500 rpm por 10 min. Após a remoção do plasma, os eritrócitos

foram lavados três vezes com tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,4) e depois uma suspensão de eritrócitos a 1% foi preparada como mesmo tampão.

A atividade hemolítica foi realizada seguindo a metodologia deescrita por Oliveira *et al* (2012) [19]. Uma alíquota de 1,1 mL de suspensão de eritrócitos foi homogeneizada a 0,4 mL das amostras em várias concentrações (125 – 1000 µg/mL). O controle negativo e controle positivo receberam 0,4 mL de tampão fosfato-salina e de Triton X-100, respectivamente. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e osobrenadante foi usado para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 540 nm. O valor médio foi calculado a partir dos ensaios em quadruplicata. A atividade hemolítica foi expressa em relação à ação do Triton X-100 e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = [(A_a - A_b) \cdot 100] / (A_c - A_b)$$

Sendo, A_a - absorbância da amostra, A_b - absorbância do controle negativo (fosfato-salina) e A_c - absorbância do controle positivo (Triton X-100).

Atividade antimicrobiana

Identificação das bactérias

Foram utilizadas seis linhagens ATCC's clínicos de *S. aureus*: 6538, 3602, 5801, 6902, 8702 e 9706, cedidas pelo Departamento de Microbiologia da Universidade CEUMA.

Estoque e preparo dos inóculos

O estoque das bactérias e o preparo dos inoculos foram realizados através das recomendações do protocolo M07-A8 [18]. As bactérias foram estocadas em microtubos (Cral[®]) contendo caldo nutriente adicionado de 20% de glicerol, e

armazenadas em freezer a -20°C . Os inoculos foram preparados a partir desses estoques, onde uma alíquota foi transferida para tubos de ensaio contendo meio Mueller Hinton Broth (DIFCO-Becton Dickinson; MHB) e incubados a 37°C por 24 horas, para reativação das bactérias. Posteriormente, cada uma foi semeada em estrias compostas em placas de Petri (Cral[®]) contendo ágar Mueller Hinton (DIFCO-Becton Dickinson; MHA) e novamente incubadas para o isolamento das colônias. Com o auxílio de uma alça de platina, retirou-se de 2 a 3 colônias isoladas, transferindo-as para uma solução salina (NaCl) 0,85%. A turbidez da solução obtida foi ajustada com uma solução padrão de MacFarland 0,5, o que representa aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro), obtendo-se assim o inóculo bacteriano padronizado para os testes de suscetibilidade microbiana.

Preparo e estoque dos antibióticos

Estoques de soluções dos antibióticos Ciprofloxacina (Sigma[®]) e Vancomicina (Sigma[®]) foram preparados a uma concentração de 1000 µg/mL, esterilizados por filtração, e armazenados a -20°C .

Caracterização do potencial antibacteriano

O potencial antimicrobiano do extrato metanólico de *M. hirtiflora* foi caracterizado por meio de ensaios *in vitro*, utilizando a técnica de microdiluição em caldo e análises em biofilme monoespécie.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras em teste foi realizada pela técnica proposta pelo NCCLS (2003), utilizando microplacas (Cral[®]) de 96 poços com fundo chato para microdiluição.

No primeiro poço foram adicionados 150 µL do meio de cultura Mueller Hinton líquido e 50 µL do extrato metanólico de *M. hirtiflora* em seus respectivos poços, para um volume final de 200 µL. Os extratos foram diluídos de forma seriada de razão 2, em duplicata, a fim de se obter poços com concentrações variando de 25 mg/mL a 0,04 mg/mL. Após a realização da diluição seriada, foram inoculados 10 µL da suspensão bacteriana. Para cada teste foi reservado um poço como controle negativo, onde foram adicionados 100 µL de DMSO estéril a 0,01%, meio de cultura e inóculo; uma coluna como controle de esterilidade, contendo meio de cultura; e uma coluna como controle positivo, com meio de cultura e inóculo das bactérias a serem testadas. Em seguida as placas foram acondicionadas em incubadora bacteriológica a 37 °C, durante 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano visível, confirmado pela adição de 30 µL de solução de 0,03% de resazurina sódica (Sigma-Aldrich®), um indicador de óxido-redução, onde quarenta minutos após a sua aplicação, sofre um processo de redução, sendo transformada em resofurina, apresentando uma cor rósea nos poços com crescimento microbiano. O mesmo procedimento foi adotado para determinação da CIM dos antibióticos, vancomicina e ciprofloxacina.

Concentração Bactericida Mínima

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato metanólico de *M. hirtiflora* uma alíquota de 3 µL foi transferida dos poços onde a inibição foi observada e semeada em placas de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton Ágar. Após 24h de incubação a 37°C, a CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento visível dos microrganismos [18].

Atividade antibiofilme

Para avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilme do extrato metanólico de *M. hirtiflora*, foi utilizado o método de impregnação do Cristal Violeta (CV), descrito por [24]. O método é colorimétrico e tem a propriedade de mensurar a quantidade de biomassa formada (matriz de polissacarídeos).

Na formação do biofilme foi utilizado o meio nutritivo MHB e 20 µL do inóculo. Adicionadas as concentrações subinibitorias (CIM/2 e CIM/4) da CIM dos extratos ativos, para o tratamento. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas sob condições estéreis para adesão celular. Decorrido o tempo, as placas foram lavadas duas vezes com 200 µL de solução salina estéril, para remoção das células não aderidas. Seguida da adição de 200 µL de metanol 99% por 15 minutos, para fixação das células aderidas. O metanol foi removido e as placas foram secas ao ar. Aliquotas de 200 µL de solução de CV a 0,5% foram adicionadas aos poços, para coloração do biofilme. Após 20 minutos, o excesso de CV foi removido lavando-se as placas com água corrente. Finalmente, o CV impregnado foi liberado pela adição de 250 µL de etanol 96%. A leitura foi realizada, em leitora de placas TP-Reader® (ThermoPlate) a densidade óptica de 550 nm (OD550nm). Foram considerados positivos para inibição de biofilme os extratos capazes de reduzir a formação do biofilme em no mínimo 50%.

Diferença da coloração dos poços na placa de 96 poços. No CP (Controle positivo) nota-se um impregnado de CV mais forte, no CN (Controle negativo) nota-se uma coloração mais clara, e nos poços com tratamento um impregnado de CV com coloração mediana.

Concentração Inibitória Fracionada (CIF)

Os extratos que apresentaram atividade de inibição foram submetidos ao teste de sinergismo com os antibióticos (Vancomicina e Ciprofloxacina), através da técnica de “checkerboard”, que consiste na avaliação do efeito da combinação de dois agentes antimicrobianos sobre um determinado microrganismo, para derivação do índice de concentração inibitória fracionada.

A partir dos valores obtidos na determinação da CIM, os extratos ativos foram adicionados na primeira coluna de cada placa, na concentração de $4 \times \text{CIM}$, onde foi realizada uma diluição, no sentido horizontal, de forma a ter concentrações nas colunas com os respectivos valores de $\text{CIM} \times 4$, $\text{CIM} \times 2$, CIM, $\text{CIM}/2$, $\text{CIM}/4$, $\text{CIM}/8$, $\text{CIM}/16$ e $\text{CIM}/32$. Em outra placa, foi realizado o mesmo procedimento, no entanto com antibióticos, onde foram adicionados na primeira linha e diluídos no sentido vertical. Em seguida, foram combinadas as placas para variação das concentrações de cada um dos antimicrobianos ao longo dos eixos, assegurando, assim, que cada poço das placas contenham uma combinação diferente de concentrações dos compostos. Por fim, foram adicionadas alíquotas de 10 μL da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por 24 horas, a 35°C . Posteriormente, foi adicionada à resazurina a 0,03% onde, após 40 minutos de reincubação, a leitura foi realizada.

Para interpretação dos resultados destas interações utilizamos o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que consiste na soma de $\text{CIF}^{\text{A}} + \text{CIF}^{\text{B}}$, sendo que A representa cada um dos extratos e B cada um dos antibióticos. O ICIF de cada é representado de acordo com seguinte fórmula:

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM do extrato} + \text{CIM do antibiótico}}{\text{CIM do extrato}} + \frac{\text{CIM do extrato} + \text{CIM do antibiótico}}{\text{CIM do antibiótico}}$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Vuuren e Viljoen, 2011, as interpretações podem ser sinérgicas ($IFIC \leq 0,5$), aditiva ($0.5 < ICIF \leq 1$), indiferente ($1 < ICIF < 4$) ou antagonista ($ICIF \geq 4$).

Seleção de compostos anti-infectivos

Ensaio de sobrevivência

Na avaliação do efeito anti-infectivo foram utilizadas larvas do inseto *T. molitor* (Tenebrionidae). Larvas com aproximadamente 100 mg foram randomizadas em grupos de no mínimo 10 indivíduos. Antes da inoculação, as cutículas foram limpas com álcool 70%. Foram injetados 10 μ L da suspensão microbiana (OD 1.3 a 630nm) no segmento próximo a calda das larvas, estas foram incubadas a 37°C. Após 2 horas, grupos de larvas receberam 10 μ L de cada extrato em diferentes concentrações. A viabilidade foi avaliada diariamente pela ausência de movimento. Larvas inoculadas com o microrganismo e tratadas com PBS (tampão fosfato salino) foram utilizadas como controle negativo, enquanto larvas não infectadas foram o controle positivo. A morte de todas as larvas do grupo experimental ou a transição para forma de pupa determinaram o término do experimento.

Quantificação de microrganismos na hemolinfa

Larvas foram divididas em grupo (n=30 larvas) e infectadas e tratadas como descrito anteriormente. Após 24 horas, cinco larvas de cada grupo foram anestesiadas (em gelo), e perfuradas com uma agulha (33G x 25 mm) na parte posterior da cabeça para a retirada da hemolinfa. Diluição seriadas da hemolinfa foram preparadas em PBS e 2,5 μ L de cada diluição foram plaqueados em meio

ágar específico e cultivado por 24 horas a 37°C. Após este período, as colônias formadas foram enumeradas e os resultados expressos como UFC/mL.

Análise da melanização da hemolinfa

Para quantificação da melanização, a hemolinfa foi colocada na placa de 96 poços (n = 8) e diluída em IPS (50 µL de hemolinfa em 50 µL de IPS). Após 5 min, foi realizada a leitura da absorbância a 405 nm.

Contagem total dos hemócitos

Após centrifugação da hemolinfa, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de IPS gelado (tampão anticoagulante estéril: 150 mM de cloreto de sódio, 5 mM de cloreto de potássio, 10 mM de tris-HCl, pH 6,9, 10 mM de EDTA e 30 mM de citrato de sódio). Em seguida, foi realizada centrifugação (9500 xg/ 10 min a 4°C) e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de IPS. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão, utilizando azul de tripan.

LC-ESI-IT-MS/MS and FIA-ESI-IT-MSⁿ from the methanol extract from the leaves *Myrcia hirtiflora*

For the HPLC-ESI-IT-MS/MS and FIA-ESI-IT-MSⁿ a clean-up step was performed to remove any contaminants; the solution was purified by solid phase extraction (SPE) using Phenomenex Strata C18 cartridges (500 mg of stationary phase) that were previously activated with 5 mL of MeOH and equilibrated with 5 mL of MeOH : H₂O (1 : 1, v/v). The compounds were eluted from cartridges using 1 mL of MeOH : H₂O (1 : 1, v/v) with a final volume of 5 mL. The samples were then filtered through a 0.22 µm PTFE filter and dried. The extract

was diluted to 10 µg/mL in HPLC solvent. Aliquots of 20 µL were injected directly into the LC-ESI-IT-MS.

The analysis was performed on an online LC-ESI-IT-MS in a mass spectrometer LCQ Fleet, Thermo Scientific®. The analytical column used for LC separation, was a Kinetex® C18 (2.1 x 100 mm, 100 Å and 5µm). The analysis was carried out with water containing 0.1% formic acid (A) and acetonitrile + 0.1% formic acid (B) added 0.1% formic acid in exploratory gradient starting with 10% to 100% B in 6 minutes at a flow rate of 0.4 ml / min. The sample was infused into the mass spectrometer from the HPLC system, where the sample were analyzed on-line by ESI-MS in negative mode and UV detector associated. The Mass spectra data were obtained in the same Fleet LCQmass spectrometer from Thermo Scientific ®.

For the FIA-ESI-IT-MSⁿ assay, direct flow infusion of the samples was performed on a Thermo Scientific LTQ XL linear ion trap analyzer equipped with an electrospray ionization (ESI) source, in negative mode (Thermo, San Jose, CA, USA). It was used a stainless steel capillary tube at 280 °C, spray voltage of 5.00 kV, capillary voltage of -90 V, tube lens of -100 V and a 5 µL min⁻¹ flow. Full scan analysis was recorded in *m/z* range from 100-1000. Multiple-stage fragmentations (ESI-MSⁿ) were performed using the collision- induced dissociation (CID) method against helium for ion activation. The first event was a full-scan mass spectrum to acquire data on ions in that *m/z* range. The second scan event was an MS/MS experiment performed by using a data- dependent scan on the [M-H]⁻ molecules from the compounds of interest at a collision energy of 30% and an activation time of 30 ms. The product ions were then submitted to further fragmentation in the same conditions, until no more fragments were observed. The identification of the different compounds in the chromatographic profile of the methanol extract was done by comparing their retention times and UV spectra with literature data.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando testes paramétricos ou não paramétricos (Tukey, teste de Mann-Whitney, etc.), dependendo do tipo de experimento. Os experimentos foram realizados em duplicata e em 2 ensaios independentes. Todos os resultados foram expressos em valores médios dos grupos e foram analisados considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Comparação do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides em extratos obtidos de folhas de *Myrcia hirtiflora*

Inicialmente, foi realizada a análise quantitativa dos teores de compostos fenólicos e flavonoides dos diferentes extratos de *M. hirtiflora*. O extrato metanólico apresentou maiores concentrações para compostos fenólicos e flavonoides, 48,27 μg EAG/g e 49,92 μg EQ/g, respectivamente. Os demais extratos apresentaram: acetato de etila 19,81 μg EAG/g e 43,24 μg EQ/g, extrato clorofórmico 11,07 μg EAG/g e 33,84 μg EQ/g e o extrato hexânico 14,42 μg EAG/g e 13,77 μg EQ/g (Figura 1A e 1B).

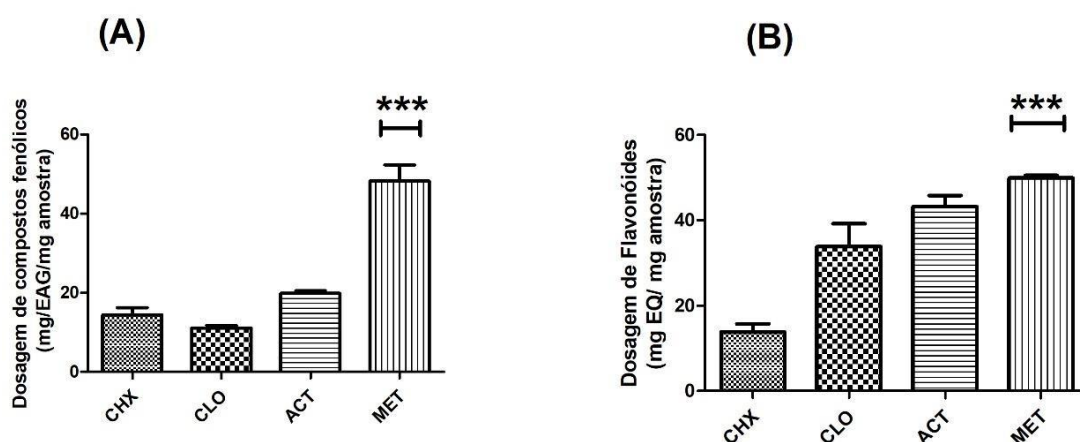


FIGURA 1. Conteúdo de compostos fenólicos (A) e flavonóides (B) (concentração de 1000 µg/mL) dos extratos brutos obtidos de folhas *Myrcia hirtiflora*. CHX: extrato ciclohexânico; CLO: extrato clorofórmico; ACT: extrato de acetato de etila; MET: extrato metanólico.

Extratos de folha de Myrcia hirtiflora possuem atividade antioxidante in vitro pelo ensaio com DPPH

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado utilizando o método de sequestro de radicais livres DPPH. (Figura 2). Foram testadas diferentes concentrações de cada extrato. A maior atividade antioxidante *in vitro* foi observada para o extrato metanólico, sendo mais de 50% do radical DPPH inibido na concentração de 250 µg/mL ($p < 0,0001$), seguido do extrato de acetato de etila. Ambos os extratos apresentaram inibição dose-dependente (Figuras 2C e 2D). Os extratos CLO e CHX não apresentaram ação dose-dependente, e não inibiram mais que 25% do radical (Figuras 2A e 2B).

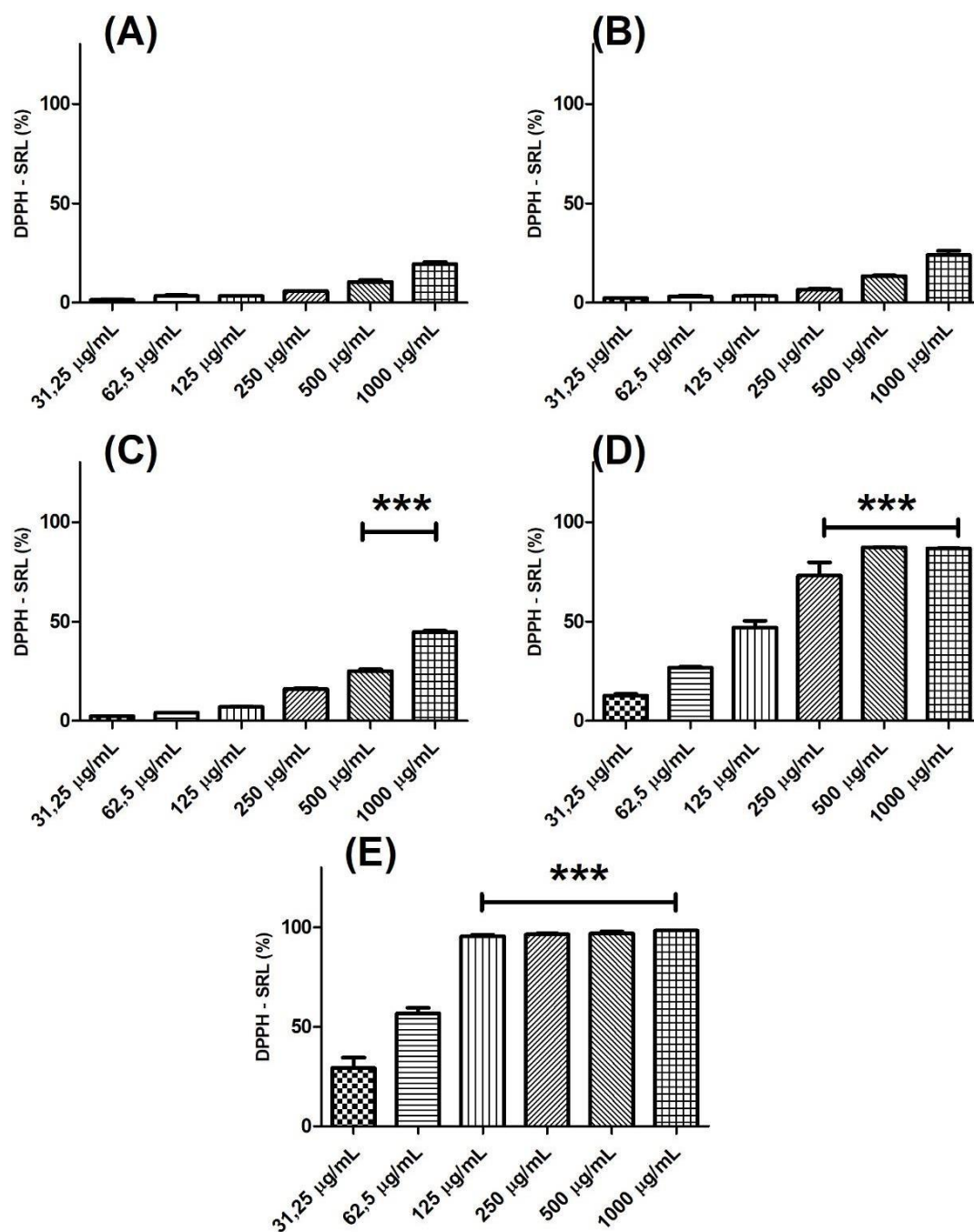


FIGURA 2. Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do DPPH dos extratos bruto da *Myrcia hirtiflora* e Trolox. (A) Extrato Ciclohexano; (B) Extrato Clorofórmio; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico; (E) Trolox. CHX: extrato ciclohexano; CLO: extrato clorofórmio; ACT: extrato de acetato de etila; MET: extrato metanólico.

Extratos de folha de Myrcia hirtiflora possuem atividade antioxidante in vivo

Diante dos resultados obtidos nas atividades *in vitro*, o extrato metanólico foi escolhido para ser avaliado nas larvas de *Tenebrio molitor* quanto a sua capacidade antioxidante. A concentração escolhida foi de 250 µg/mL, devido a sua capacidade sequestrar o radical DPPH em mais de 50%, como demonstrado na figura 2D. Assim foi observado que a taxa de sobrevivência foi de 70% após 30 horas para o grupo tratado com o extrato metanólico e 25% após 45 horas para o grupo tratado com o H₂O₂ (Figura 3).

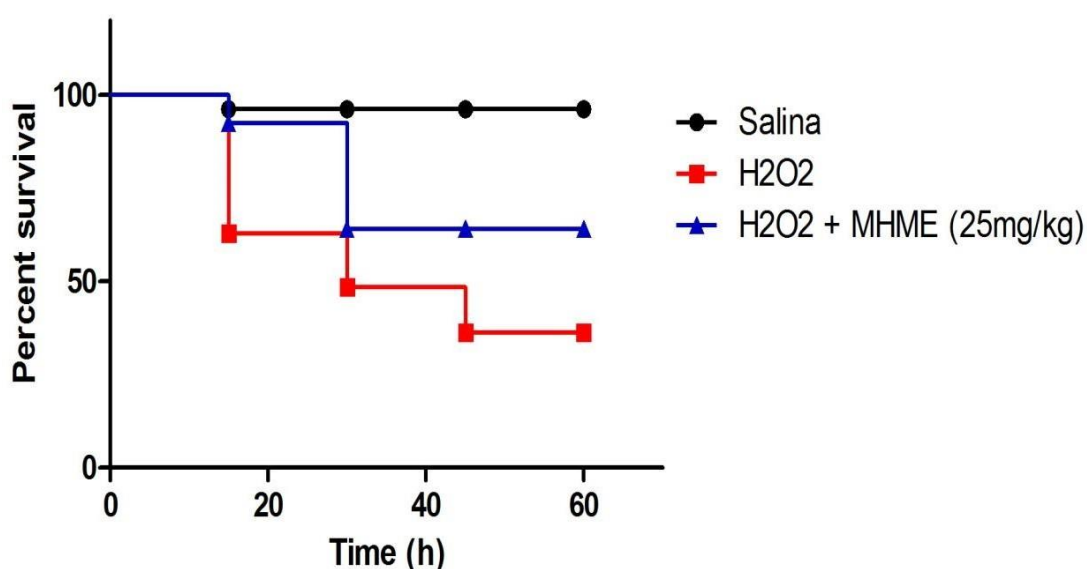


FIGURA 3. Avaliação de sobrevivência do *Tenebrio molitor* tratado com o extrato metanólico após o estresse causado pelo H₂O₂.

Em adição, o potencial hemolítico dos extratos foi avaliado utilizando eritrócitos humanos. O extrato metanólico da *M. hirtiflora* não induziu hemólise significativa ($p < 0,0001$), mesmo nas concentrações mais elevadas (Figuras 4).

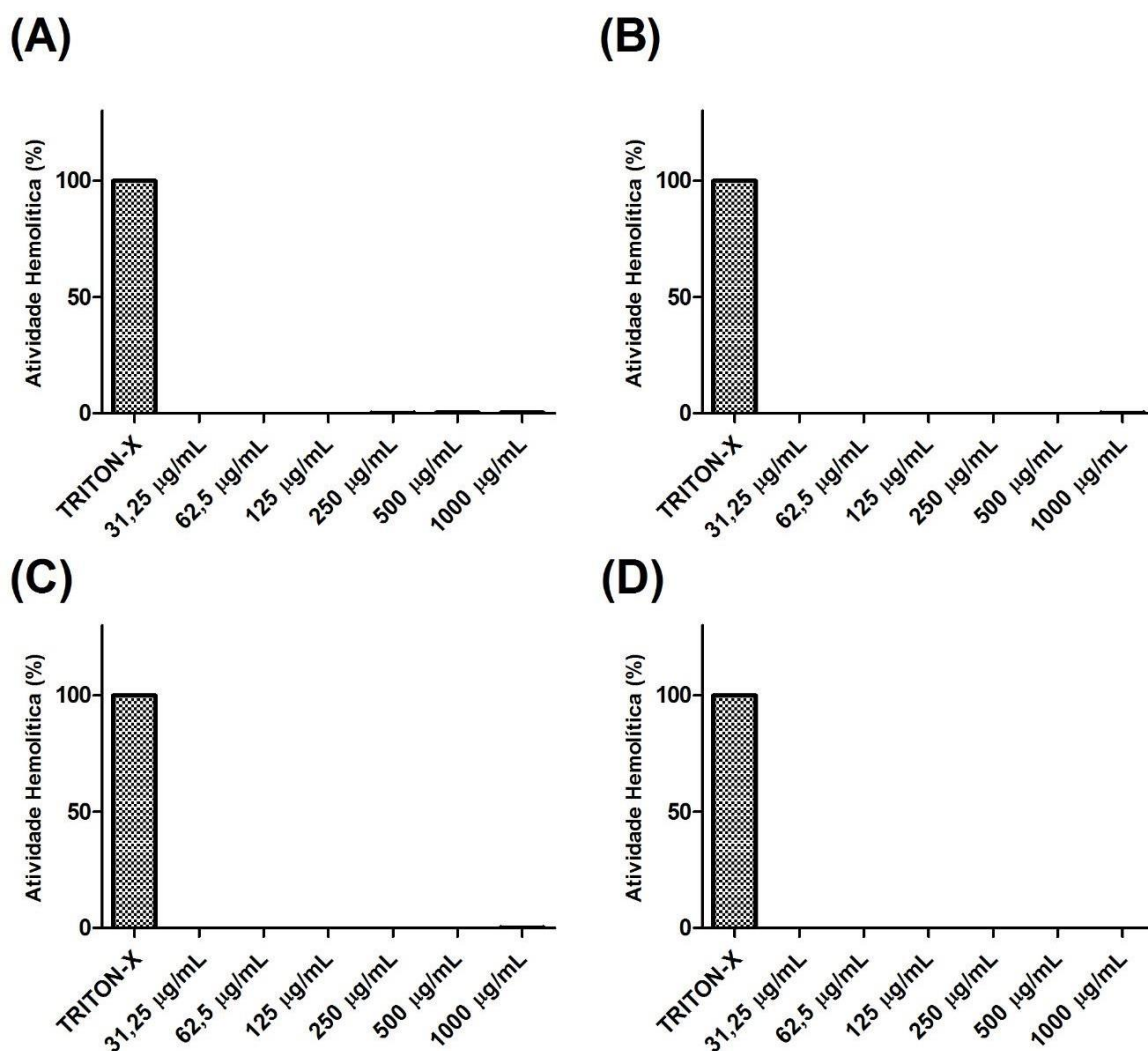


FIGURA 4. Atividade hemolítica dos extratos brutos da *Myrcia hirtiflora*. (A) Extrato Hexânico; (B) Extrato Clorofórmico; (C) Extrato Acetato de Etila; (D) Extrato Metanólico.

Potencial antimicrobiano

O EMMh submetido à avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) apresetou atividade antibacteriana frente a linhagem padrão do *S. aureus* ATCC's. Nas concentrações variando entre 0.78 mg/mL e 1.56 mg/mL, respectivamente, frente as ATCC's de *S. aureus* (ver tabela 1).

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de *Myrcia hirtiflora* contra diferentes linhagens de *S. aureus*.

Linhagem	Extratos							
	Ciclohexano		Clorofórmico		Acetato de etila		Metanol	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> 6538	>25	-	.25	-	0,39	3,12	0,78	1,56
<i>S. aureus</i> 3602	>25	-	>25	-	0,78	1,56	1,56	3,12
<i>S. aureus</i> 5801	>25	-	>25	-	0,78	1,56	1,56	3,12
<i>S. aureus</i> 6902	>25	-	>25	-	0,78	1,56	1,56	3,12
<i>S. aureus</i> 8702	>25	-	>25	-	0,78	1,56	1,56	3,12
<i>S. aureus</i> 9706	>25	-	>25	-	0,78	1,56	1,56	3,12

Os valores estão expressos em mg/mL.

Extratos de Myrcia hirtiflora reduzem a formação de biofilme

Os extratos ativos de *M. hirtiflora* não só são capazes de inibir o crescimento de microrganismos, como também inibem a formação de biofilme por *S. aureus*. O extrato metanolico apresentou inibição na produção de biofilme, os valores são comparados ao grupo controle, e os de maior significância estatística apresentam $p < 0,05$, demonstra a média de três experimentos (Figura 5).

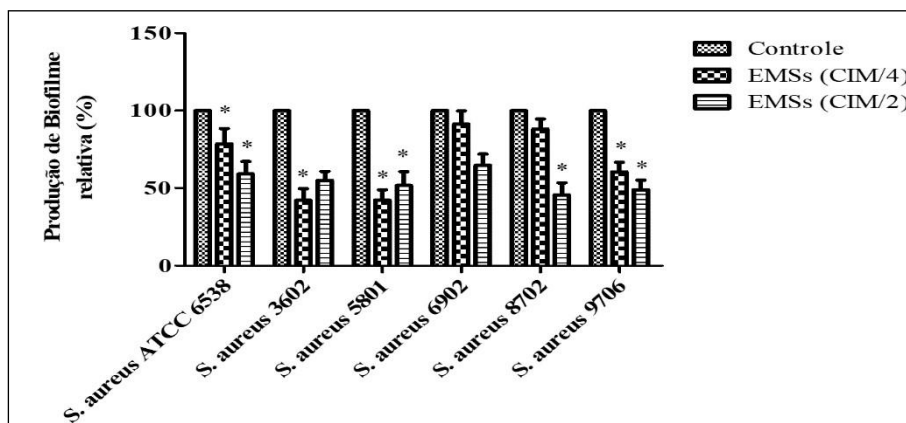


Figura 5. Avaliação da atividade antibiofilme de concentrações subinibitórias do extrato de metanólico de folhas de *M. hirtiflora* contra diferentes linhagens de *S. aureus*. EMMH: Extrato Metanolico; considerando * como $p < 0,05$ para significância estatística.

Extratos de M. hirtiflora apresentam efeito sinérgico com vancomicina e ciprofloxacina contra S. aureus

Considerando o enfoque do trabalho, a CIM foi determinada para dois importantes antibióticos (Tabela 2): ciprofloxacina e vancomicina, para posterior combinação dos extratos ativos com os antibióticos. Sendo possível observar através do ICIF que os antibióticos apresentaram efeito sinérgico para o extrato metanólico. Pode-se concluir também que o ICIF da ciprofloxacina é maior que o ICIF da vancomicina (Tabela 3).

Tabela 2. Valores de concentrações inibitórias mínimas obtidas para os antibióticos ciprofloxacina e vancomicina frente *S. aureus* ATCC 6538.

Antibióticos	Concentração inibitória mínima
Ciprofloxacina	0,62
Vancomicina	0,039

Os valores estão expressos em μ g/mL.

Fonte: Autores (2018).

Tabela 3. Concentração inibitória fracionada do extrato metanólico combinados com drogas ciprofloxacina e vancomicina frente *S. aureus* ATCC 6538.

Extratos	ICIFC	Interpretação	ICFV	Interpretação
Metanol	0,33	Sinergismo	0,35	Sinergismo

ICIFC: Índice de concentração inibitória fracionada para ciprofloxacina; ICFV: Índice de concentração inibitória fracionada para vancomicina.

Tenebrio molitor é suscetível à infecção por *Staphylococcus aureus*

Para estabelecer nosso modelo de infecção tivemos que inicialmente determinar a concentração da suspensão bacteriana capaz de matar as larvas de *T. molitor*. Nossos resultados mostraram que *T. molitor* é suscetível à infecção por *S. aureus* de forma dependente da dose. Os resultados mais reproduzíveis foram encontrados quando as larvas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana correspondente a OD 1.3 a 630 nm (dados não ilustrados). Nestas condições, as larvas tiveram uma sobrevivência média de 2 dias (figura 2).

Avaliação da eficácia do extrato metalólico das folhas de *Myrcia hirtiflora* durante infecção por *S. aureus*

Avaliamos a ação do extrato EMMh em *T. molitor* durante a infecção por *S. aureus*. Observamos que o extrato apresentou baixa toxicidade sendo observado um decréscimo na taxa de sobrevivência das larvas nos dois primeiros dias (Figura 6), no entanto se mantiveram estáveis a partir do dia seguinte. No grupo sem tratamento após 2 dias de infecção todas as larvas estavam mortas (sobrevivência média de 1 dia). EMMH induziu um aumento de 50% na sobrevivência das larvas, e esta taxa se manteve por mais de 10 dias, não sendo possível definir a sobrevivência média das larvas (Figura 6).

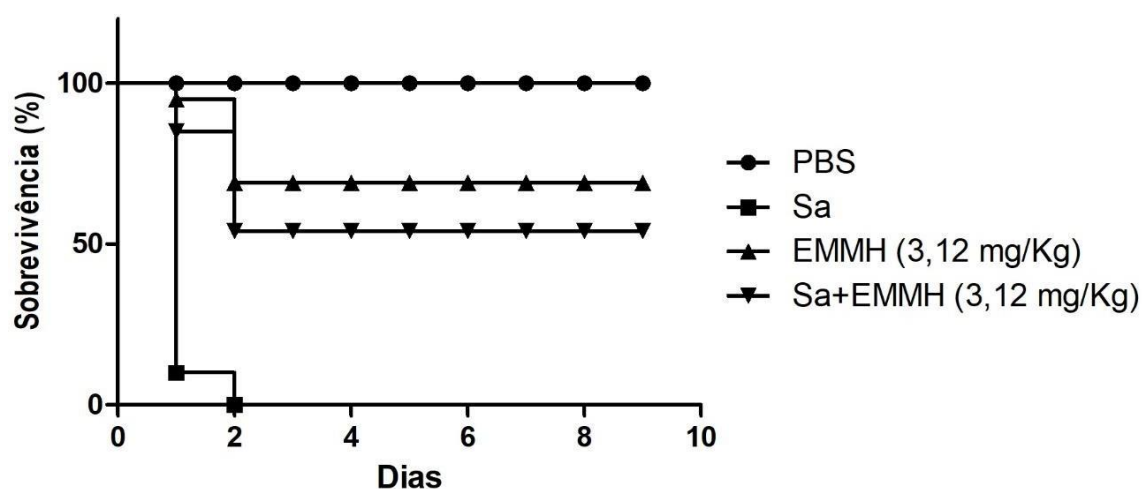


Figura 6: Avaliação da eficácia do extrato metanolico (EMMH) obtido da folha de *M. hirtiflora* na sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *S. aureus* ATCC 6538. As larvas foram tratadas com o extrato EMMH na dose de 3,12 mg/Kg, respectivamente. Foram incluídos no ensaio grupos de controle negativo injetadas com PBS.

Avaliação do efeito de EAMH e EMMH na carga de bactéria na hemolinfa das larvas infectadas por S. aureus

Buscando avaliar o efeito do EMMH durante a infecção por *S. aureus* foi realizado a quantificação de bactérias na hemolinfa de larvas infectadas com *S. aureus*. Foi verificada uma redução significativa no número de colônias após 24 horas no grupo tratado com EMMH (3,12 mg/Kg). (Figura 7).

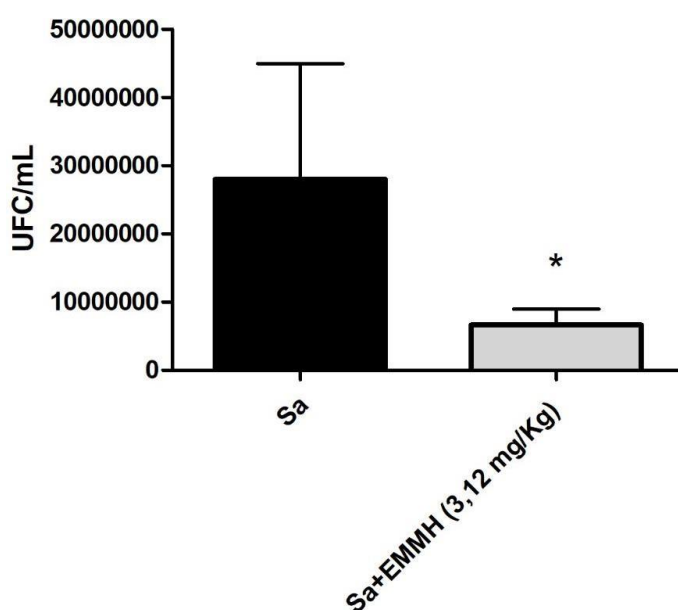


Figura 7: Avaliação do efeito do extrato metanólico (EMMH) obtidos da folha de *M. hirtiflora* na carga bacteriana na hemolinfa de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas com *S. aureus* ATCC 6538 (Sa). (*) Diferenças estatística em relação as larvas infectadas e não-tratadas.

Extrato metanólico de Myrcia hirtiflora induz aumento na densidade de hemócitos de T. molitor

Por fim, foi avaliado o efeito do extrato EMMh sobre a densidade de hemócitos na hemolinfa do hospedeiro invertebrado. Foi constatado aumento

significativo no número de hemócitos tratados com EMMh (Figura 8B) em relação ao grupo tratado com PBS.

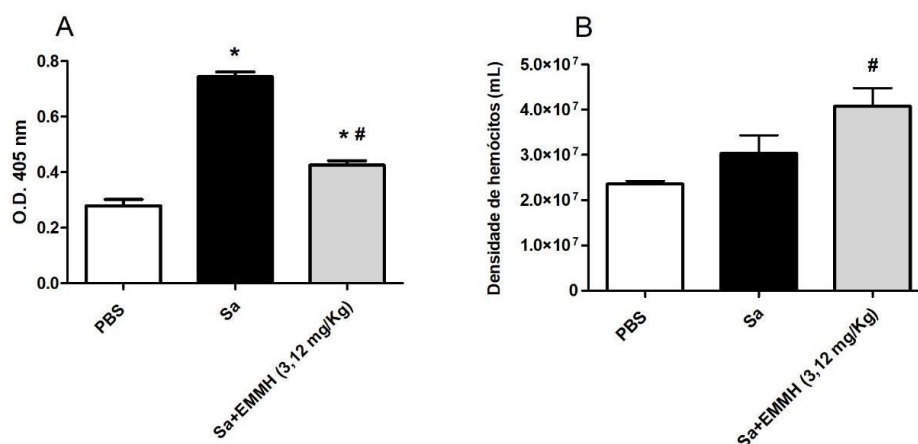


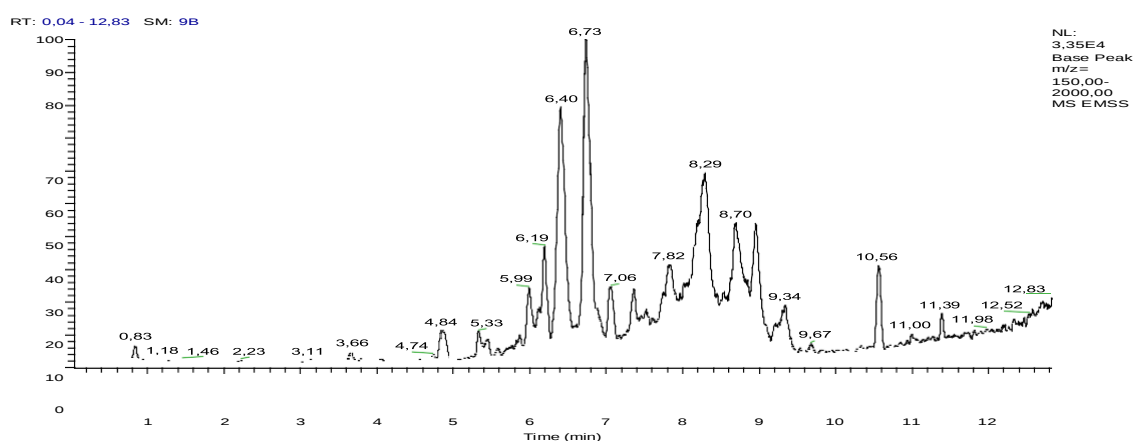
Figura 8. Efeito do tratamento do extrato metanólico das folhas de *Myrcia hirtiflora* na melanização (A) e densidade de hemócitos (B) de *T. molitor* infectados com *S. aureus* ATCC 6538 (Sa). (*) Diferenças estatística em relação as larvas não infectadas. (#) Diferenças estatística em relação as larvas infectadas e não-tratadas.

LC-ESI-IT-MS/MS and FIA-ESI-IT-MSⁿ from the methanol extract from the leaves *Myrcia hirtiflora*

Foi identificado vários compostos (**Tabela 4 e Figura 9**) e no tempo de 6.73 temos uma catequina. Diante desses resultados apresentados tudo aponta que o extrato metanólico possui atividade antioxidante e antimicrobiana por causa da presença da catequina.

Table 4: Identification of compounds in *Myrcia hirtiflora* by FIA-ESI-IT/MSⁿ

TR (min)	[M-H] ⁻	MS ⁿ fragments	Compound
6.19	305	287;179	(epi)Gallocatechin
6.40	529	179, 289, 511	(ent)Cassiaflavan-(epi)catechin
6.73	593	441; 289	(epi)Catechin digallate
7.06	593	575; 305	(epi)Gallocatechin-(epi)catechin
7.82	289	245; 179	(epi)Catechin
8.29	785	289, 545, 675	(ent)Cassiaflavan-(epi)guibourtinidol-(epi)catechin
8.70	1009	769; 529; 289	(ent)cassiaflavan-(ent)cassiaflavan-(ent)cassiaflavan-(epi)catechin
8.79	785	305, 545, 767	(ent)Cassiaflavan-(ent)cassiaflavan-(epi)gallocatechin
9.01	769	529;289	(ent)cassiaflavan-(ent)cassiaflavan-(epi)catechin

**Figure 9:** Total Ion Chromatogram from the methanol extract *Myrcia hirtiflora* acquired by LC-ESI-MS (m/z : 100–2000 Da) and proposed structures compounds identified by HPLC-DAD-ESI-MS and FIA-ESI-IT-MSⁿ

DISCUSSÃO

O extrato metanólico das folhas de *M. hirtiflora* apresentou o melhor resultado para atividade antioxidante *in vitro*. Esta eficácia pode estar relacionada a presença de altos conteúdos de compostos fenólicos. Quando comparado ao extrato acetato de etila, o extrato metanólico também apresentou maiores concentrações de fenol e flavonoides. Pesquisas recentes têm correlacionado a presença de metabólitos secundários derivados de compostos fenólicos a alta atividade antioxidante de plantas da família da *M. hirtiflora* [25,26].

Os compostos fenólicos possuem grande importância para sistemas biológicos. Doenças causadas por reações oxidativas se tornam alvo de terapias cujo finalidade seja minimizar ou diminuir o estresse oxidativo que origina a doença. Evidências tem comprovado que a ingestão de antioxidantes naturais obtidos durante a alimentação podem neutralizar ou inibir os danos provocados pelas reações oxidativas [27].

Estudos realizados com espécies da família Myrtaceae demonstram quem as contribuições percentuais de compostos fenólicos nem sempre correspondem proporcionalmente ao teor de flavonoides. Os extratos de ciclohexano, clorofórmio e acetato de etila apresentaram teor inferior a 20% (1mg/mL EAG/g) de compostos fenólicos. Já a contribuição percentual de flavonoides foi maior que 30% (1mg/mL EQ/ g) no percentual total de fenol [28].

A capacidade do sequestro do radical DPPH pode ser classificado como forte (70%), moderada (50%-70%) ou fraca (abaixo de 50%) de acordo com o percentual obtido. De acordo com essa classificação, os extratos metanólico e acetato de etila possuem moderada capacidade de sequestro. Já os extratos clorofórmico e ciclohexânico são classificados como possuindo fraca capacidade de sequestro [29].

Os resultados obtidos para atividade antioxidante total pelo método de redução da complexação do fosfomolibdênio para o extrato clorofórmico diferiram dos resultados obtidos através do método DPPH, observou-se que esse extrato possuía uma baixa atividade no método DPPH. Esses resultados sugerem que essa atividade biológica avaliada pela redução do fosfomolibdênio se deve a presença de composto fenólicos, no caso do extrato clorofórmico, principalmente a presença de flavonoides, que está em maior concentração [30].

A diferença apresentada entre os extratos na avaliação da atividade antioxidante total por diferentes métodos sugere que cada ensaio determina diferentes aspectos da capacidade antioxidante. Embora os métodos aplicados nesse trabalho estejam baseados em propriedades de inibição, diferentes reações químicas estão acontecendo com radicais diversos. Essas diferenças significativas comprovam o que outros autores sugerem quando afirmam que diferentes antioxidantes contribuem de forma diferente para a atividade antioxidante total em um extrato dependendo do método utilizado [31].

Assim como muitos organismos, o *Tenebrio molitor* possui mecanismos de defesa para neutralizar as espécies reativas que estiverem em excesso. Estes mecanismos são compostos por diversas enzimas com função antioxidante e desintoxicante [32]. Diversos estudos têm demonstrado que quando as larvas de *T. molitor* são submetidas a estresse oxidativo ocorre um aumento significativo da produção de espécies reativas e isso está relacionado a danos moleculares e consequentemente induzem as vias de morte celular [32,33].

Diante do estresse oxidativo ocasionado pela inoculação de peróxido de hidrogênio, a ação protetora do extrato metanólico foi avaliada pelo aumento da sobrevivência das larvas previamente tratadas com o extrato em comparação com a sobrevivência das larvas não tratadas [34]. Também é possível avaliar a toxicidade do extrato testado. Até o presente momento não existe descrição na literatura

científica de investigação do potencial antioxidante da *M. hirtiflora* em larvas do *T. molitor*.

Entretanto, conhecido os mecanismo de defesa antioxidante do inseto e os mecanismos oxidativos ocasionados pelo estresse é possível sugerir algumas hipóteses. As enzimas presentes nas larvas do *T. molitor* reagem quimicamente com o peróxido de hidrogênio e isso provoca a liberação de átomos de oxigênio [34]. Essa liberação é uma reação altamente instável e termina na liberação de átomos de oxigênio instáveis que levam a formação de espécies reativas.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os extratos das folhas de *M. hirtiflora* apresentam considerável teor de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante *in vivo* sobre larvas de *T. molitor* e *in vitro*. No entanto, investigações adicionais são necessárias para uma melhor elucidação dos mecanismos de ação pelo qual esta espécie vegetal exerce sua potencial atividade antioxidante *in vivo*, avaliando também sua citotoxicidade para garantir a segurança de seu uso medicinal.

Doenças infecciosas ainda representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre seres humanos. *Staphylococcus aureus* um dos patógenos infecciosos de grande interesse científico, que se caracteriza como um dos patógenos humanos mais importantes podendo causar infecções clinica pela corrente sanguínea e adquirida na comunidade [35,36,37].

A bacteremia por *S. Aureus* é tratada com antibióticos com alta atividade anti-estafilocócica [38]. No entanto, com o uso inadequado de antimicrobianos estão surgindo cepas multirresistentes que se originaram em ambiente hospitalar e na comunidade, diante disso o uso de produtos naturais têm grande importância na prospecção de novos agentes farmacológicos visando inibir ou tratar as infecções clínicas deste patógeno [39,40]. Na busca desses agentes tem se estudado os metabólitos secundários produzidos pelas plantas sob estresse ambiental que tem a finalidade de proteção a fatores bióticos e abióticos, desta

maneira produzindo moléculas biologicamente ativas que possuem propriedades biológicas contra agentes infecciosos [41,42].

Myrtaceae representa esse grupo de planta com propriedades biológicas, de acordo com estudos foi observada atividade antimicrobiana em diversos extratos dos gêneros *Psidium*, *Eugenia* e *Myrcia* [43,44,45,46] o que foi observado no presente estudo, diante da propriedade antimicrobiana dos extratos de *Myrcia hirtiflora*. Em estudos realizados demonstra que extratos e frações de produtos naturais existe moléculas ativas que possuem esta atividade metabólitos secundários que apresentam atividade antimicrobiana está relacionado com a presença do grupo polifenóis, principal classe os flavonoides [47,48,49]. No extrato metanólico de *Myrcia hirtiflora* uma classe muito presente foi a de flavonoides e após caracterização foi detectado como majoritário a catequina, comum a outros gêneros da família Myrtaceae, como *Eugenia* e *Feijoa* [48,50].

Muitos estudos relataram sobre o avaliação da ação antimicrobiana de extratos vegetais frente a *S. aureus*, mas não associa esses estudos a ação pela formação do biofilme, que é um processo complexo e regulado por várias características do ambiente que influenciam na sua formação, o primeiro fator é adesão bacteriana na superfície intracelular e o segundo a hidrofobicidade [51,52,53,54]. A adesão bacteriana pro *S. aureus* está diretamente associado a síntese das enzimas codificadas pelo cluster de adesão intercelular (ica) [55]. Foi observado no EMMH uma forte inibição na formação do biofilme produzido pelo *S. aureus*, esta ação está relacionado a presença da catequina. O mecanismo de ação na inibição da formação pelos flavonoides está diretamente na inativação do gene ica, que está presente na parede celular do *S. aureus*.

A formação de biofilme pode influenciar na resistência bacteriana, uma vez que as bactérias vão se aderindo a superfícies, como catéteres, chegando a formar quorum sensing, diante dessa estrutura especializada e de difícil

destruição [56,57], faz-se necessário pesquisas na busca de compostos ativos de base natural que tenha o efeito inibitório ou bactericida frente a essas cepas resistentes aos antibióticos, impedindo a formação de biofilme, tornando-se esse um possível agente antibiofilme.

Com a possibilidade de potencializar o efeito antimicrobiano, no caso, seu efeito sinérgico, entre extratos de plantas e agentes antimicrobianos se fez necessário avaliar este efeito. Em estudos realizados podemos comprovar este efeito sinérgico entre extratos de plantas e antibióticos [58,59]. Nesta perspectiva, esse efeito sinérgico foi observado no EMMH quando associado com os antibióticos, Ciprofloxacino e Vancomicina, o que pode estar relacionado com a presença da catequina, componente majoritário do extrato em estudo.

Diante dos ensaios *in vitro* e da identificação do composto avaliamos o extrato metanólico num modelo *in vivo* para testar sua eficácia. Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para avaliar a ação antimicrobiana/antivirulência de novos compostos, dentre eles estão aqueles que usam insetos como *Tenebrio molitor*. Estes animais sistemas fisiológicos conservados como os mecanismos relacionados a imunidade inata (produção de espécies reativas e peptídeos antimicrobianos, fagocitose, etc.). No entanto, *T. molitor* é susceptível a patógenos (como *S. aureus*) que são capazes de persistir dentro do inseto infectado, e provocar alterações em tecidos, hemolinfa, e fagócitos. Estas características têm favorecido o uso deste inseto como modelo alternativo de infecção para estudos de patogenicidade, e de atividade antimicrobiana e antivirulência *in vivo* [60,61].

É importante saber que o *T. molitor* possui capacidade de defesa contra patógenos, apresentando um importante mecanismo de imunidade inata relacionado a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) [62], fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos e reações de melanização [63,64].

A enzima fenoloxidase que é responsável pela cascata da profenoloxidase, catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos para produzir melanina [65]. O monitoramento desse parâmetro pode oferecer uma visão da resposta imune do hospedeiro. Dessa forma, observamos um aumento significativo de melanina nas larvas inoculadas com *S. aureus*, indicando que a melanização é um processo inespecífico que depende da presença de partículas estranhas [66]. Ambos os extratos diminuíram o conteúdo de melanina em relação às larvas infectadas. Contudo, o grupo tratado com EMMH obteve um grau de melanização relativamente maior em comparação com o grupo tratado com EAMH. Esse fenômeno é bastante relevante, uma vez que é possível analisar a diferença na resposta dos dois extratos sobre a reação de melanização durante infecção por *S. aureus*.

Outro fator importante envolvido intrinsecamente nos processos imune das larvas são os hemócitos encontrados na hemolinfa dos artrópodes. A resposta celular é mediada por hemócitos, os quais são responsáveis por reconhecer um corpo estranho tanto pela interação direta dos receptores de superfície dos hemócitos com as moléculas no organismo invasor, como indiretamente, pelo reconhecimento dos receptores humorais que se prendam e opsonizam a superfície do invasor [68]. Existe uma correlação entre a sobrevivência larval e as mudanças na densidade de hemócitos [66]. Em nosso estudo, foi observado que 3 horas após o tratamento com EMMH, houve um aumento significativo no número de hemócitos. Este efeito de EMMH pode estar correlacionado a acentuada diminuição na carga de bactérias na hemolinfa das larvas, resultando no aumento na taxa de sobrevivência. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos de ação antimicrobiana utilizando modelos de insetos [66]. Demonstrando, que a eficácia do EMMH se dá também através de mecanismos imunomodulares do perfil de defesa do hospedeiro, ocasionando subsequente redução no número de *S. aureus* na hemolinfa das larvas de *T. molitor*.

Em análise com o grupo tratado com EAMH, obtivemos valores semelhante ao grupo PBS. Entretanto, quando investigamos o efeito desse extrato numa dose mais elevada (6 mg/Kg), esse valor tende a diminuir abruptamente, elevando também a sua toxicidade *in vivo* (dados não apresentados). Foi demonstrado em um modelo de infecção com *G. Mellonella* que uma baixa taxa de sobrevivência condiz com a densidade reduzida de hemócitos em larvas inoculadas com diferentes isolados fúngicos [67]. Além disso, se correlaciona ao comprometimento na produção de peptídeos antimicrobianos, nos quais aparecem duas a quatro horas após uma infecção [68]. Isso explica a maior proliferação do *S. aureus* na hemolinfa das larvas e diminuição da taxa de sobrevivência quando tratadas com EAMH.

CONCLUSÃO

Neste estudo, podemos observar que o EAMH e EMMH foi capazes de auxiliar o combate de *S. aureus* através da avaliação antimicrobiana e inibição do seu potencial infectivo. O extrato metanólico de *M. hirtiflora* exerce um profundo efeito protetor sobre larvas de *T. molitor* durante infecção por *S.aureus*, induzindo aumento na densidade hemocítica e subsequente redução na carga bacteriana e melanização. Nosso trabalho, demonstra o potencial como agente antimicrobiano e uma possibilidade de uso para o desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- [1] MILLER, R. A. Extending life: scientific prospects and political obstacles. Milbank Q., v. 80, n. 1, p. 155-174, 2002.

[2] VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN. M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

[3] JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEHERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, v. 493, n. 7432, p. 338-345, 2013.

[4] NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; ACHKAR, M. T.; VILEGAS, W. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NOS ORGANISMOS. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 11, n. 2, p. 535-539, ago./dez. 2013.

[5] GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, p. 1-93, 2006.

[6] Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

[7] Bartlett JG. methicillin-resistant staphylococcus aureus infections, *TOP HIV MED* 2008; 16: 151-55

[8] Brosnahan AJ, Mantz MJ, Squier CA, Peterson ML, Schlievert PM. Cytolysins augment superantigen penetration of stratified mucosa. *J. immunol.* 182, 2364-2373. 2009.

[9] De la FUENT, J., ALMAZÁN, C., CANALIS, M., PÉREZ De la LASTRA, J.M., KOCAN, K.M., AND WILLADSEN, P. A then-year review of commercial. Vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *ANIM. HEALTH RES. REV.* 8: 23-28. 2007.

[10] KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2005.

[11] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.

[12] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 2015;4:180-3.

[13] Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2017;38(7):592-607.

[14] de Andrade Teles RB, Diniz TC, Costa Pinto TC, de Oliveira Junior RG, Gama ESM, de Lavor EM, Fernandes AWC, de Oliveira AP, de Almeida

Ribeiro FPR, da Silva AAM and others. Flavonoids as Therapeutic Agents in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: A Systematic Review of Preclinical Evidences. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:7043213.

[15] Nascimento da Silva LC, Bezerra Filho CM, Paula RA, Silva ESCS, Oliveira de Souza LI, Silva MV, Correia MT, Figueiredo RC. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. *Free Radic Res* 2016;50(8):801-12.

[16] BOHN, J.A.; BEMILLER, J.N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, v.28, p.3-14, 1995.

[17] Li X, Liu Q, Lewis EE, Tarasco E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Parasitology research*, 115(12), 4485-4494, 2016.

[18] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, v. 29, n. 2, CLSI document M07-A8, Wayne, PA, USA, 8TH edition, 2009.

[19] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosmolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158. (1965).

[20] Woisky RG, Salatino A. Analysis os própolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. Journal Apicultura Research. (1998).

[21] Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature – International Journal of Science, 181, 1199-1200. (1958).

[22] Blois, MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181, 1199 – 1200 (1958).

[23] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. Analytical Biochemistry, 269, 337-341 (1999).

[24] KALIL, A. J., MEIRA, C. B., THOMAZ, H. T., ARANTES, A. B., ROSA, E. A. R. Avaliação experimental da atividade antibiofilme do digluconato de clorexidina em bases detergentes. Estudos de Biologia, v. 31, n. 73/75, p. 75-80, 2009

[25] Kang KW, Oh SJ, Ryu SY, Song GY, Kim B-H, Kang JS, Kim SK. Evaluation of the total oxy-radical scavenging capacity of catechins isolated from green tea. Food Chemistry, 121, 1089–1094 (2010).

[26] Liu T, Cao Y, Zhao M. Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. major) fruits. Food Chemistry, 119, 1656–1662 (2010).

- [27] Simões CMO, Schennkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 3ª edição. Editora Universidade/UFRGS/Editora da UFSC (2001).
- [28] Lizcano LJ, Bakkali F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. Food Chemistry 119, 1566–1570 (2010).
- [29] Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Nascimento RJ. Capacidade antioxidante de frutas. Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas, v.44, p. 193-201, 2008.
- [30] Ramful D, Aumjaud B, Neergheen VS, Soobrattee MA, Googoolye K, Aruoma OI, Banhorun T. Polyphenolic content and antioxidante activity of *Eugenia pollicina* leaf extract *in vitro* and in model emulsion systems. Food Research International, 44,1190-1196 (2011).
- [31] Singh JP, Kaur A, Singh N, Nim L, Shevkani K, Kaur Harpreet, Arora DS. *In vitro* antioxidante and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. LWT – Food Science and Technology 65, 1025-1030 (2016).
- [32] Li X, Liu Q, Lewis EE, Tarasco E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana*

(Rhabditida: Heterorhabditidae). *Parasitology research*, 115(12), 4485-4494, (2016).

[33] Zhu JY, Ze SZ, Stanley DW, Yang B. Parasitization by *Scleroderma guani* influences expression of superoxide dismutase genes in *Tenebrio molitor*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 87(1), 40-52, (2014).

[34] Da Silva, LCN, Filho, CMB, Paula RAD, Silva CSS, De Souza LIO, Silva MVD, Figueiredo RCBQD. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant- derived products. *Free radical research*, 50(8), 801-812, 2016.

[35] Gatadi S, Madhavi YV, Chopra S, Nanduri S. Promising antibacterial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic Chemistry*. Vol. 92 – 103252, 2019.

[36] Moschou A, Maraki S, Giormezis N, Moraitaki H, Stafylaki D, Militsopoulou M, Spiliopoulou I, Papadakis JA, Samonis G, Kofteridis DP. Prevalence and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in four nursing home residents in Crete, Greece. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2019.

[37] Nambiar K, Seifert H, Rieg Siegbert, Kern WV, Scarborough M, Gordon NC, Kim HB, Song KH, Tilley R, Gott H, Liao CH, Edgewirth, N Emmanuel, Cortés LEL, Morata L, Walker AS, Thwaites G, Llewelyn MJ, Kaasch A. Survival following *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: A prospective

multinational cohort study assessing the impact of place of care. *Journal of Infection*. Vol. 77, 516-525, 2018.

[38] Weis S, Kesselmeier M, Davis JS, Morris AM, Lee S, Scherag A, Hagel S, Platz MW. Cefazolin versus anti-staphylococcal penicillins for the treatment of patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 25- p. 818-827. 2019.

[39] Dacoreggio MV, Moroni LS, Kempka AP. Antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities and surface disinfection of the extract of *Psidium cattleianum* sabine leaves. *Biocaralysis and Agricultural Biotechnology*. Vol. 21 – 101295. 2019.

[40] Amirsoleimani A, Brion GM, Diene SM, François P, Richard EM. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in wastewater treatment plants by whole genomic sequencing. *Water Research*. Vol. 158, p. 193 – 202. 2019.

[41] Paosen S, Saising J, Septama AW, Voravuthikunchai SP. Green synthesis of silver nanoparticles using plants from Myrtaceae family and characterization of their antibacterial activity. *Materials Letters*. Vol. 209 – p. 201 – 206. 2017.

[42] Kauffmann C, Soares APV, Arossi K, Pacheco LA, Buhl B, de Freitas EM, Hoehne L, de Castro LC, Gnoatto SCB, Ethur EM. Potencial antimicrobiano e antibiofilme *in vitro* de espécies do gênero *Eugenia*, Myrtaceae, nativas do Sul do Brasil. *Revista Caderno Pedagógico*, v.14, n.2, 2017.

- [43] Aguiar ALR, Dodou HV, Sales GWP, Rodrigues ML, Bandeira MAM, Nogueira NAP. Atividade antimicrobiana do extrato de *Psidium guajava* L. (goiabeira) e sinergismo com antimicrobianos convencionais. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 24, n. 1, 2019.
- [44] Sato TS, Medeiros TM, Hoscheid J, Prochnau IS. Proposta de formulação contendo extrato de folhas de *Eugenia involucrata* e análise da atividade antimicrobiana. *Revista Fitos*, 12 (1):68-82, 2018.
- [45] Souza LBFC, Silva-Rocha WP, Ferreira MRA, Soares LAL, Svidzinski TIE, Milan EP, Pires RH, Almeida AMF, Mendes-Giannini MJS, Chaves GM. Influence of *Eugenia uniflora* Extract on Adhesion to Human Buccal Epithelial Cells, Biofilm Formation, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida* spp. From the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients. *Molecules*, vol. 23, p. 2418, 2018.
- [46] dos Santos C, Galaverna RS, Angolini CFF, Nunes VVA, de Almeida LFR, Ruiz ALTG, de Carvalho JE, Duarte RMT, Duarte MCT, Eberlin MN. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three *Myrcia* Species. *Molecules*, vol. 23, p. 986, 2018.
- [47] Mosbah H, Chahdoura H, Adouni K, Kamoun J, Boujbiha MA, Gonzalez-Paramas AM, Santos-Buelga C, Ciudad-Mulero M, Morales P, Fernández-Ruiz V, Achour L, Selmi B. Nutritional properties, identification of phenolic compounds, and enzyme inhibitory activities of *Feijoa sellowiana* leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 00:e13012, 2019.

[48] Nazareno LSQ, de Miranda MRA, Pinto MKNA, Lopes MMA, Rufino M do SM. Non-enzymatic and enzymatic antioxidant components of the mature Cambuí metabolism. *Acta Agron*, 68 (1), p. 16-21, 2019.

[49] de Souza AM, de Oliveira CF, de Oliveira VB, Betim FCM, Miguel OG, Miguel MD. Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species – A Review. *Planta Medica*, 84(17), p. 1232-1248, 2018.

[50] Malafaia CB, Jardelino ACS, Silva AG, de Souza EB, Macedo AJ, Correia MT dos S, Silva MV. Effects of Caatinga Plant Extracts in Planktonic Growth and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microbial Ecology*, Vol. 75, p. 555-561, 2018.

[51] Whitehead KA, Verran J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*. Vol. 2, p. 84-91, 2015.

[52] Liu Y, Yang CH, Li J. Adhesion and Retention of a Bacterial Phytopathogen *Erwinia chrysanthemi* in Biofilm-Coated Porous Media. *Environmental Science & Technology*, 42, 159-165, 2008.

[53] Lopez JVM, Roth EP, Martín FC, Gil OD, Batista N, Morales M, Alvarez M. Detection of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Harboring the *ica* Gene Cluster Needed for Biofilm Establishment. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, (4) p.1569-1570, 2002.

[54] Damaceno NB, Farias LR. Relação existente entre biofilmes bacterianos, quorum sensing, infecções e resistência a antibióticos: Uma revisão bibliográfica. *Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde*, 3(1):46-51, 2016.

[55] Bouton J, Hecke KV, Rasooly R, Calenbergh SV. Synthesis of pyrrolidine-based hamamelitannin analogues as quorum sensing inhibitors in *Staphylococcus aureus*. *Beilestein Journal of Organic Chemistry*, Vol. 14, p. 2822-2828, 2018.

[56] Fernandes TG, de Mesquita ARC, Randau KP, Franchitti AA, Ximenes EA. *In Vitro* Synergistic Effect of *Psidium guineense* (Swartz) in Combination with Antimicrobial Agents against Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *The Scientific World Journal*. Vol 2012, p. 7. 2012.

[57] Reda FM, El-Zawahry YA, Omar AR. Synergistic Effect of Combined Antibiotic and Methanol Extract of *Eucalyptus camadulensis* leaf Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, Vol. 5 (4): 486-497, 2017.

[58] McGonigle JE, Purves J, Rolff J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. *Developmental & Comparative Immunology*, Volume 59, pages 34-38, 2016.

[59] Han SR, Lee BS, Jung KJ, Yu HJ, Yun EY, Hwang JS, Moon KS. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague- Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Volume 77, pages 206- 212, 2016.

[60] JO, Y. H. *et al.* Molecular characterization and expression analysis of target of rapamycin (TmTOR) in coleopteran insect *Tenebrio molitor*. *Entomol Res* 46, 139–147, doi: 10.1111/1748-5967.12163 (2016).

[61] Hoffmann, J. A., REICHHART, J. M. & HETRU, C. 1996 Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 8–13.

[62] SIVA-JOTHY, M. T.; THOMPSON, J. J. W. Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology*, v.27, p.206-212, 2002.

[63] DA SILVA, C. C. A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.24, p.68-72, 2002.

[64] BERGIN, D; BRENNAN, M; KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect*, 2003; 5:1389-95.

[65] SCORZONI, L.; DE LUCAS, M.P.; MESA-ARANGO, A.C.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; LOZANO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MENDES-

GIANNINI, M.J.; ZARAGOZA, O. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. *PLoS One* 2013, 8, e60047.

[66] LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.32, p.1295-1309, 2002.

[67] ROWAN, R., MORAN, C., MCCANN, M., Kavanagh, K (2009) Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the *in vivo* anti-fungal activity of [Ag₂(mal)(phen)₃]. *Biometals* 22: 461–467.

[68] KLOWDEN, M. J. Circulatory systems. In: *Physiological systems in insects*. San Diego, California: Academic Press, 2008. p.357-401.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O extrato metanólico das folhas de *Buchenavia tephrophylla* apresentou ação antifúngica e teve ação sinérgica com fluconazol frente a *Candida albicans*;
- Que o extrato metanólico das folhas de *Myrcia hirtiflora* apresentou ação antimicrobiana e teve ação sinérgica com ciprofloxacino e vancomicina frente a *Staphylococcus aureus*;
- Os extratos brutos das folhas de *Buchenavia tephrophylla* e *Myrcia hirtiflora* e frações do extrato metanólico de *Buchenavia tephrophylla* não causam hemólise as células vermelhas;
- Os extratos brutos das folhas de *Buchenavia tephrophylla* e *Myrcia hirtiflora* e frações do extrato metanólico de *Buchenavia tephrophylla* possuem compostos fenólicos e flavonoides;
- Os extratos brutos das folhas de *Buchenavia tephrophylla* e *Myrcia hirtiflora* e frações do extrato metanólico de *Buchenavia tephrophylla* são capazes de sequestrar os radicais livres do DPPH e ABTS, com isso possuem atividade antioxidante;
- Observamos que o extrato metanólico das folhas de *Buchenavia tephrophylla* possuem ação antioxidante em *Tenebrio Molitor*;
- Observamos que o extrato metanólico das folhas de *Myrcia hirtiflora* possuem ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* em *Tenebrio Molitor*

4. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. Use of plant resources in a seasonal dry Forest (Northeastern Brazil). **Acta bot. bras.** 19(1): 27-38. 2005.

ALVALÁ, R.C.S.; CUNHA, A.P.M.A.; BRITO, S.S.B.; SELUCHI, M.E.; MARENGO, J.A.; MORAES, O.L.L.; CARVALHO, M.A. Dought monitoring in the Brazilian Semiarid region. *Anais Academia Brasileira de Ciências* 91: e20170209. Doi:10.1590/0001-3765201720170209.

ALVES, E. O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIEIRA, M. C. Crescimentos e distribuição espacial de *Cronton urucurana* Baill em Dourados. **Revista Caatinga**, v.21, n. 1 p. 83-88, 2008.

AMENI, A. Z.; LATORRE, O. A.; TORRES, L. M. B.; GÓRNIK, S. L. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Braziln Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology**. 175 (2015) 9-13.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Resistência Bacteriana: Mecanismos de Resistência aos antibióticos. v.7, n.3, 2018.

ANTUNES, Patrícia Beleza. Análise comparativa das frações polpa, casca, semente e pó comercial do guaraná (*Paullinia cupana*): caracterização química e atividade antioxidante *in vitro*. Dissertação (Título de Mestre pelo Programa de

Pós-graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada - PRONUT). Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.

ARANDA-SOUZA, M. Â.; SOUZA, R. M.; JÚNIOR, C. A. S.; SILVA, L. C. N.; PEREIRA, D. S. T.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Antioxidant potential and total phenolic content of leaf extracts from *Parkinsonia aculeata* L. cultivated in Brazilian Natural product research biome. Curr. Top. Phytochem, v. 11, p. 95-101, 2012.

BARTLETT, J.G. methicillin-resistant staphylococcus aureus infections, **TOP HIV MED.** 16: 151-55, 2008.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. P. Flavonoide quercertina: Aspectos gerais e ações biológicas. Alim. Nutr., Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BETON, Daniela. **RESSALVA. Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*.** Tese (Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.

BEZERRA, B. M. O.; EVANGELISTA, J. N. B.; PINHEIRO, D. C. S. N. Impacts of oxidative stress in swine: Challenges and Perspectives. A review. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity.** V.9, n.4 (2015) 699-715.

BEZERRA, Beatriz Pinheiro. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de ácido gálico e catequina no fitorático sanativo® por cromatografia líquida de alta eficiência. Dissertação (Título de Mestre pelo programa de Pós-graduação Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 2012.

BESSA, C.M.A. da S.; MERCÊS, P.F.F das; MALAFAIA C.B., NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, M.M.C. da; CÂMARA, C.A.G. da; CORREIA, M.T. dos S.; SILVA, M.V. da; OLIVA, M.L.V. Evaluation of the insecticidal potencial of leaf extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) altschul against *Tetranychus urticae* Koch and *Sitophilus zeamais* mots. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, v. 4, N. 01 (048-056), 2019.

BITU, V. C. N.; BITU, V. C. N.; MATIAS, E. F. F.; LIMA, W. P.; PORTELO, A. C.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. . **Journal of Ethnopharmacology**. 172 (2015) 265-272.

BHUYAN, D. J.; SAKOFF, J.; BOND, D. R.; PREDEBON, M.; VUONG, Q. V.; CHALMERS, A. C.; VAN ALTENA, I. A.; BOWYER, M. C.; SACRLETT, C.J. In vitro anticancer properties of selected Eucalyptus species. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 53, p. 604-615, (2017).

BROSNAHAN, A.J.; MANTZ, M.J.; SQUIER, C.A.; PETERSON, M.L.; SCHLIEVERT, P.M. Cytolysins augment superatigen penetration of stratified mucosa. *J. immunol.* 182, 2364-2373. 2009.

CEPEDA, J. A.; WHITEHOUSE, T.; COOPER, B.; HAILS, J.; JONES, K.; KWAKU, F.; TAYLOR, L.; SHAW, S. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two center study. **The Lancet**, v.365, n.9456, p.295-304, jan. 2005.

CAVALCANTI, E. V. da S.; SILVA, T. de M.; FIGUEIREDO, M. C. F. de; NASCIMENTO, J. M. F. de; MEDEIROS, S. R. A.; OLIVEIRA, A. S. S. de; ALMEIDA, A. A. C. de; CARVALHO, R. B. F. de; FREIRE, J. A. P..

Benefícios das catequinas do chá verde no controle do Diabetes Mellitus tipo 2: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 8, 2020.

CHIN, V.K.; LEE, T.Y.; RUSLIZA, B.; CHONG, P.P. Dissecting Candida albicans Infection from the Perspective of C. albicans Virulence and Omics Approaches on Host– Pathogen Interaction: A Review. *Int J Mol Sci.*, 17 (10): 1643, 2016.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 283–312, Elsevier Editora Ltda, 2013.

CORDEIRO, B.M.P. da C.; SANTOS, N.D. de L.; FERREIRA, M.R.A.; ARAÚJO, L.C.C. de; JUNIOR, A.R.C.; SANTOS, A.D. da C.; OLIVEIRA, A. P. de; FALCÃO, E. P. da S.; CORREIA, M. T. dos S.; ALMEIDA, J.R.G. da S.; SILVA, L.C.N. da; SOARES, L.A.L.; NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, M.V. da;

PAIVA, P.M.G. Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. BMC Complementary and Alternative Medicina, 18:284, 2018.

COSTA, G. F. M.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; TEMPONI, L. G.; NAKAMURA, T. U. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on na indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**. 143 (2012) 631-638.

CLUZET, V.C.; GERBER, J.S.; NACHAMKIN, I.; METLAY, J.P.; ZAOUTIS, T.E.; DAVIS, M.F.; ET, A.L. Duration of colonization and determinants of earlier clearance of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis**. 2015.

CRUZ, A. V. de M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomateceae no Brasil. **Floresta e ambiente**, v. 11, n.1, p.47 – 52, ago./dez. 2004.

CRUZ, L. I. B. **Atividade antifúngica de derivados hidrazino-tiazólicos contra *Candida albicans***. Tese (Título de Doutora pelo programa de Pós- graduação em Microbiologia) Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte 2019.

DAMBORSKY, M. P.; SANDRIGO, Y. T.; BAR, M. E.; OSCHEROV, E. **Ciclo de vida de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) en Condiciones Expecimentales.** Catédra de Artrópodos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. UNNE. 9 de Julio 1449-(3400) Corrientes – Argentina.

DA SILVA, L.C.N.; SANDES, J. M.; PAIVA, M. M.; ARAÚJO, J. M.; FIGUEIREDO R. C. B. Q.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Nat. Prod. Res.**, v. 27, n. 16, p. 1492-1496, 2013.

DA SILVA, L.C.N.; JÚNIOR, C. A. S.; SOUZA, R. M.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrine*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n. 9, p. 2222- 2228, 2011.

DA SILVA, L.C.N.; FILHO, C. M. B; PAULA, R. A. D.; SILVA, C. S. S; DE SOUZA, L. I. O; SILVA, M. V. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. **Free radical research**, 50(8), 801-812, 2016.

DA SILVA, Ana Paula Sant'anna. **Atividade antinociceptiva, Antipirética, Anti-Inflamatória, Antimicrobiana e Antioxidante de extratos e substâncias isoladas de *Cleome spinosa* Jacq.** Tese (Título de Doutora pelo programa de Pós-graduação do Centro de Biociências). Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2016.

DA SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: Uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Rev. Epidemiol. Controle infecç.* Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 4, pp. 472-482, 2018.

DE SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M.; BOCATE, K. P.; PANAGIO, L. A.; ITO, F. A.; ALMEIDA, R. S. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of microbiological methods**, 118, 182-186, 2015.

DE LA FUENT, J.; ALMAZÁN, C.; CANALIS, M.; PÉREZ De la LASTRA, J.M.; KOCAN, K.M.; WILLADSEN, P. A then-year review of commercial. Vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **ANIM. HEALTH RES. REV.** 8: 23-28. 2007.

DIAS, R. S., ZUCCOLI, P. C. Infecção hospitalar por *Staphylococcus aureus* e fatores de risco para o desenvolvimento da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) – Artigo de Revisão. **NBC**, Belo Horizonte, v.2, n.3, ago-set, 2012.

DOS SANTOS, Déborah Yara Alves Cursino. **Botânica Aplicada: Metabólitos Secundários na Interação Planta-Ambiente**. (Título de Livre-Docente pelo Departamento de Botânica na área de conhecimento de recursos Econômicos Vegetais). Universidade São Paulo, São Paulo, 2015.

DUARTE, W. F. R.; JIN, J.; KUROBE, T.; TEH, S. J. Effects of prolonged exposure to low pH on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in Japanese

Medaka (*Oryzias latipes*). **Science of the Total Environment**. 568 (2016) 26- 32.

DUARTE, A. J. M.; SANTOS, R.J.; GENOVESES, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ ácido linoléico emétodo de seqüestro de radiais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26,n. 2, p. 446-452, (2006).

DU TOIT, A. (2014). Immune evasion: *Staphylococcus* slips through the net. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 4-5, 2014.

FARHA, M.A.; BROWN, E.D. Strategies for target identification of antimicrobial natural products. **NAT. PROD. REP.** 4, 668-680, 2016.

FILHO, C.M.B.; SILVA, L.C.N da; SILVA, M.V. da; OLESEN, A.L.; STRUVE, C.; KROGFELT, K.A.; CORREIA, M.T. dos S.; OLIVA, M.L.V. Antimicrobial and Antivirulence action of *Eugenia brejoensis* essential oil *in vitro* and *in vivo* invertebrate models. *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 424, 2020.

FILHO, José Robson Neves Cavalcanti. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia tetraphylla***. Dissertação (Título de mestre pelo programa de Pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2014.

FILHO, J. R. N. C.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

FILHO, José Robson Neves Cavalcanti. **Isolamento, Caracterização e Aplicação de Metabólitos Secundários de folhas de *Buchenavia tetraphylla* R.A. Howard (Combretaceae: Combretoideae).** Tese (Título de Doutor pelo programa de Pós-graduação do Centro de Biociências). Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2018.

GLÓRIA, Elanne Costa. **Caracterização físico-química de frutos de Mirindiba (*Buchenavia tomentosa*) Eichler, do cerrado Tocantinense.** Dissertação (Título de mestre pelo programa de Pós-graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Tocantins, Gurupi 2014.

GONÇALVES, T.P.R.; PARREIRA, A.G.; LIMA, W.G. de; COIMBRA, M.C. Potencial antifúngico e antibacteriano de extratos vegetais da região de Divinópolis/MG. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*. v. 9 – n. 3, 2018.

HAN, S. R.; LEE B.S.; JUNQ K.J.; YU, H.J.; YUN, E.Y.; HWANG, J.S.; MOON, K.S. Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity

in Sprague-Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Volume 77, June 2016, pages 206-212.

HASAN, F. et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect.* 11(8-9):753-761, 2009.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells : virulence factors , host defense , escape strategies , and the microbiota. , v. 54, n. 3, p. 149– 169, 2016

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Reportagem: 1 em cada 4 brasileiros terá mais de 65 anos em 2060, aponta IBGE. 2018. Acesso: <https://g1.globo.com/economia/noticia/2018/07/25/1-em-cada-4-brasileiros-tera-mais-de-65-anos-em-2060-aponta-ibge.ghtml>

JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEHERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 338- 345, 2013.

KLAFKE, J. Z.; PEREIRA, R. L. D.; HIRSCH, G. E.; PARISI, M. M.; PORTO, F. G.; ALMEIDA. A.S.; RIBIN F. H.; SCHMIDT, A.; BEUTLER, H.; NASCIMENTO, S.; TREVISAN, G.; BRUSCO, I.; OLIVEIRA, S. M.; DUARTE, M. M. M. F.; DUARTE, T.; VIECILI, P. R. Z. Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid. **Phytomedicine** 23 (2016) 1227-1234.

KNEZEVIC, P.; ALEKSIC, V.; SIMIN, N.; SVIRCEV, E.; PETROVIC, A.; MIMICA-DUKIC, N. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 125–136, (2016).

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2005.

KNIEHL, E.; BECKER, A.; FORSTER, D. H. Bed, bath and beyond: pitfalls in prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers. **Journal of Hospital Infection**, v.59, n.3, p.180-187, mar. 2005.

LEANDRO, Y.A. da S.; JARDIM, I.N.; GAVILANES, M.L. Uso de plantas medicinais nos cuidados de saúde dos moradores de assentamento no município de Anapu, Pará, Brasil. *Biodiversidade*, V. 16, N2, pág. 30. 2017.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S. G.; ALMEIDA, M. Z.; CANTOS, J.; COELHO, T.; SILVA, P. E. A. Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. **Journal of Ethnopharmacology**. 149 (2013) 513-521.

LEGRAND, C. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas – *Myrciaria*, *Pseudocaryophyllus*, *Blepharocalyx*, espécies suplementares, espécies cultivadas, generalidades. In: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 731-876, 1978.

LI, X.; LIU, Q.; LEWIS, E. E.; TARASCO, E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Parasitology research*, 115(12), 4485-4494, 2016.

LIMA, A. da C. **Insetos do Brasil**. 9º TOMO. Capítulo XXIX. Coleópteros 3ª parte. Escola Nacional de agronomia série didática, Nº 11 – 1955.

LIMA, Duane Fernandes de Souza. **Estudo Filogenéticos e Taxonômicos em *Myrcia* DC. sensu lato (Myrtaceae), com ênfase no clado guianensis**. Tese (Título de Doutora pelo Programa de Pós-graduação do Instituto de Biologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2017.

LIMA, C. C.; BENJAMIN, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. Dos. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: Uma revisão. *Cuidarte Enfermagem*, 11(1): 105-113, 2017.

LINSINGEN, L. V.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na Região Sul do Brasil. **Acta bot. bras.** 23(3): 738-750. 2009.

LOPES, R.S.; OLIVEIRA, L.G.; COSTA, A.F.; CORREIA, M.T.S.; LIMA, E.A.L.A.; LIMA, V.L.M. Efficacy of *Libidibia ferrea* var. *Agave sisalana* extracts against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Coccoidea), Journal of Agricultural Science, vol. 10, n° 4, 2018.

MACHIELA, E.; DUES, D. J.; SENCHUK, M. M.; RAAMSDONK, J. M. V. Oxidative stress is increased in *C. elegans* models of Huntington's disease but does not contribute to polyglutamine toxicity phenotypes. **Neurobiology of Disease**. 96 (2016) 1-11.

MCGONIGLE, J. E.; PURVES, J.; ROLFF, J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. **Developmental & Comparative Immunology**, Volume 59, June 2016, pages 34-38.

MESQUITA, M.O.M. de; PINTO, T.M.F.; MOREIRA, R.F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isoladas de plantas da Caatinga: uma revisão. *Revista Fitos*, Vol.11(2), 119-249, 2017.

MERCÊS, P.F.F das; BESSA, C.M.A. da S.; MALAFAIA C.B., CÂMARA, C.A.G. da; SILVA, M.M.C. da; SILVA, P.C.B.; NAVARRO, D.M. do A.F.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T. dos S.; SILVA, M.V. da; OLIVA, M.L.V. Phytochemical characterization and evaluation of the acaricide and insecticidal potential of the *Hymenaea courbaril* L. var. *courbaril* essential oil on the two-spotted spider mite and maize weevil. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, v. 3, N. 04 (417-428), 2018.

MICHELI, L.; CERRETANI, D.; COLLODEL, G.; MENCHIARI, A.; MOLTONI, L.; FIASCHI, A. I.; MORETTI, E. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in seminal plasma of men with genitourinary infections, varicocele and idiopathic infertility. **Andrology – American Society of Andrology and European Academy of Andrology**, 2016, 4, 456-464.

MILLER, R. A. Extending life: scientific prospects and political obstacles. *Milbank Q.*, v. 80, n. 1, p. 155-174, 2002.

MININEL, Francisco José. **RESSALVA. Estudo Fitoquímico de extratos polares e infusão das folhas *Terminalia catappa* L. (COMBRETACEAE) e avaliação das suas atividades antiulcerogênica e mutagênica.** Tese (Título de Doutor em Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara 2015.

MORAIS, L. M. F.; da Conceição, G. M.; NASCIMENTO J. de M. Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, v.1, n.01; p.317. 2014.

MOREIRA, J. N.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; FERREIRA, M. A.; ARAÚJO, G. G. L.; FERREIRA, R. L. C. SILVA, G. C. Caracteriação da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesq. Agropec. Brás.**, Brasília, v.41, n.11, p.1643-1651, Nov. 2006.

MOREY, A. T.; DE SOUZA, F. C.; SANTOS, J. P.; PEREIRA, C. A.; CARDOSO, J. D.; DE ALMEIDA, R. S. C.; YAMAUCHI, L. M. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on

Candida tropicalis Growth and Adhesion Properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, 17(4), 365-375.), (2016).

NAHAR, K.; RAHMAN, M.; HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M. M.; RAHMAN, A.; SUZUKI, T.; FUJITA, M. Physiological and biochemical mechanisms of spermine-induced cadmium stress tolerance in mung bean (*Vigna radiate* L.) seedlings. **Environ Sci Pollut Res.** (2016) 23:21206-21218.

NÓBREGA, M.S.; FILHO, J.R.C.; PEREIRA, M.S. Evolução da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva. **Rev. Eletr. Enf.** v.15, n.3, p.696-703, jul/set, 2013.

NOGUEIRA, H. S.; XAVIER, A. R. E. de O.; XAVIER, M. A. de S.; CARVALHO, A. A.; MONÇÃO, G. A.; BARRETO, N. A. P. Antibacterianos: Principais classes, mecanismos de ação e resistência. Revista Unimontes Científica, Montes Claros, v. 18, n. 2 – jul./dez., 2016.

NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; ACHKAR, M. T.; VILEGAS, W. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NOS ORGANISMOS. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 11, n. 2, p. 535-539, ago./dez. 2013.

OLIVEIRA, Fabiana Maciel de. **Perfil sérico de estresse oxidativo, antioxidantes e micronutrientes em pacientes com Hanseníase**. Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara 2012.

OLIVEIRA, SUZANE K. R.; ANJOS, D. C. DOS; GONCALVES, L. H.; et al. Prevalence and production of enzymes by *Candida* isolates from vaginal secretion samples. *Revista de Patologia Tropical*, v. 42, n. 2, p. 161–176, 2013.

OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Secreening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal**. Volume 2012.

PEDROSA, Alano Martins. **Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: Influência do tratamento com hidroxiuréia**. Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2013.

PEREIRA, Rafael. Atividade antimicrobiana e antioxidante de metabólitos secundários e óleo essencial de plantas da Caatinga: *Myroxylon peruiferum* L.f e *Combretum leprosum*. Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2018.

PINTO, Paloma Lira. Extração e separação de flavonoides do extrato da casca do maracujá. Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação de Engenharia Química – Área de concentração: Desenvolvimento de processos químicos e bioquímicos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2018.

PORTO, Patrícia Andreia Leita da Silva. **Estudo da Actividade Antioxidante de Catequinas e procianidinas Oligoméricas**. Tese (Título de Doutor pelo Departamento de Química). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto 2002.

RENZ, Sandro Volnei. **Oxidação e Antioxidantes**. Seminário apresentado da disciplina Bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS. 2003.

RIBEIRO, I.;CASTANHEIRA, R. Tratamento e prevenção das infecções e da colonização por *Staphylococcus aureus*. **In Rev Port Pneumol IX** (5): 395-409. Porto, 2003.

RODRIGUES, Patrícia Siqueira de Melo. **Avaliação das atividade antimicrobiana, antioxidante e antineoplásica dos extratos etanólicos da casca e folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc (Combretaceae)**. Dissertação (Título de mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente). Universidade Federal de Tocantins, Palmas 2016.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Antimicrobials, Stress and Mutagenesis. **PLoS Pathogens** 10(10): e1004445, 2014.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A. et al. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6, p. 293-297, 2013.

RUIZ, V. R.; BARZEGARI, A.; ZULUAGA, M.; VAHED, S. Z.; SAADAT, Y. R.; LETOURNEUR, D.; GUEGUEN, V.; DJAVID, G. P. Potential of aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) in blocking the oxidative stress by modulation of signal transduction in human vascular endothelial cells. **Journal of Functional Foods**. 26 (2016) 123-134.

SACRAMENTO, A. C.; ZICKEL, C. S.; JUNIOR, E. B. de A. Aspectos Florísticos da Vegetação de Restinga no Litoral de Pernambuco. **Revista Árvore**, v. 31, n.6, p.1121-1130, 2007.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, B.S. dos; FILHO, C.M.B.; JUNIOR, J.A.A. do N.; BRUST, F.R.; SILVA, P.C.B.; ROCHA, S.K.L. da; KROGFELT, K.A.; NAVARRO, D.M. do A.F.; CORREIA, M.T. dos S.; NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, L.C.N. da; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V. da; PAIVA, P.M.G. Anti-staphylococcal activity of *Syagrus coronata* essential oil: Biofilm eradication and *in vivo* action on *Galleria mellonella* infection model. *Microbial Pathogenesis*, vol. 131, 150-157, 2019.

SANTOS, D.S. dos; RODRIGUES, M.M.F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n.3, p. 29-35, 2017.

SARMENTO, M. B.; da SILVA, A. C. S.; da SILVA C. S. Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no Sula do Brasil. *Magistra*, Crus das Almas, v.24, n.4, p.250-262, out./dez. 2012.

SCHAECHTER, M; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: Mecanismo das doenças infecciosas*. 3ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2009.

SCHIAVON, Diane Bender Almeida. **Resgate etnobotânico de plantas medicinais e validação da sua atividade antibacteriana**. Tese (Título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Veterinária – Área de concentração: Sanidade Animal). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2015.

SEO, G. W.; JO, Y. H.; SEONG, J. H.; PARK, K. B.; PATNAIK, B. B.; TINDWA, H.; HAN, Y. S. The Silencing of a 14-3-3 ϵ Homolog in *Tenebrio molitor* Leads to Increased Antimicrobial Activity in Hemocyte and Reduces Larval Survivability. *Genes*, 7(8), 53, 2016.

SHER, A. Antimicrobial activity of Natural products from Medicinal Plants. **Gomal Journal of Medical Sciencies**, v.7, n.1 p. 72-78, 2009.

SILVA, N. M. F.; VALENTE, M. C. Flora da reversa Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia – Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 56 (86): 131-140, 2005.

SILVA, N.C. de S.; VITOR, A.M.; BESSA, D.H. da S; BARROS, R.M.S. A utilização de plantas medicinais e fitoteráticos em prol da saúde. Única Cadernos Acadêmicos. Ano. 3, Vol. 3.

SILVA, T.F.; FILHO, J.R.N.C.; FONSECA, M.M.L.B.; SANTOS, N.M. dos; SILVA, A.C.B. da; ZAGMIGNAN, A.; ABREU, A.G.; SILVA, A.P.S.; LIMA, V.L. de M.; SILVA, N.H. da; DUTRA, L. M.; ALMEIDA, J.R.G. da S.; SILVA, M.V. da; CORREIA, M.T. dos S.; SILVA, L.C.N. da. Products derived from *Buchenavia tetraphylla* leaves have *In vitro* antioxidante activity and protect *Tenebrio molitor* larvae Against *Escherichia coli*- induced injury. Pharmaceuticals, 13(3), 46, 2020.

SILVEIRA, R.C. Avaliação da atividade antioxidante e determinação do conteúdo de flavonóides em chás comercializados na cidade do Recife. Dissertação (Título de mestre pelo programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2018.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3ª edição. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001.

SANTOS, D.M.; JUNIOR, A.R.C.; CUTRIM, B. da S.; OLIVEIRA, P.V. de; SAMINEZ, W.F. de S.; SILVA, L.C.N da. Novas abordagens experimentais para o combate de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Rev. Investig, Biomed. 10(1): 93-100, 2018.

SIQUEIRA, G. S.; KIERULFF, M. C. M.; ARAÚJO, A. A. Florística das plantas vasculares da reserva natural vale, Linhares, Espírito Santo, Brasil. **Ciência e Ambiente**, 49, jul./dez., 2014.

SOUSA, Thiciana da Silva. **Contribuição ao conhecimento químico de *Combretum fruticosum stuntz* (Combretaceae)**. Dissertação (Título de mestre pelo programa de Pós-graduação de química – Área de concentração em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2010.

THE PLANT LIST, 2018. Version 1.1. Disponível em <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 26 fev. 2020.

TRONCOSO, A. T.; ALENCAR, G. A. De B. C. de. Atualidades em Resistência Bacteriana: Uma revisão Bibliográfica. Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis, v.4, n.1, pp. 22-31, 2020.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN. M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DER VALK, T.; VAN DER MEIJDEN, A. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon**, 88, 38-43.), 2014.

VERRI, A.M.; MOURA, A. de A.; MOURA, V.M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. *Revista UNINGÀ Review*. Vol. 30, n.1, pp.55-61, 2017.

ZAMBERLAN, Daniele Coradini. **Efeito protetor de extratos naturais no envelhecimento e em modelos de doenças de Alzheimer no nematódeo *Caenorhabditis elegans***. Tese (Título de Doutora pela Universidade Federal de Santa Maria – Área de concentração: Bioquímica Toxicológica, Santa Maria, RS 2018.

ZHANG, J.; SHI, R.; LI, H.; XIANG, Y.; XIAO, L.; HU, M., HUANG, Z. Antioxidant and neuroprotective effects of Dictyophora indusiata polysaccharide in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 413-422, 2016.

ZHU, J. Y.; ZE, S. Z.; STANLEY, D. W.; YANG, B. Parasitization by *Scleroderma guani* influences expression of superoxide dismutase genes in *Tenebrio molitor*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 87(1), 40-52, 2014.

WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. *Koneman* Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. Editora Guanabara Koogan, 6ª edição, 2010.

WANG, X.; et al. The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 116, 2015.).

WANG, Q.; HUANG, Y.; QIN, C.; LIANG, M.; MAO, X.; LI, S.; HUANG, Z. Bioactive peptides from *Angelica sinensis* protein hydrolyzate delay senescence in *Caenorhabditis elegans* through antioxidant activities. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016.

WEAVER, P. L. *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. Howard. Granadillo. New Orleans, LA: U.S. **Departament of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station**. 7p. 1991.

WILLIAMS, D. W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S.; MALIC, S.; LEWIS, M. A. O. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000, Feb; 55(1):250, 2011.