

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

Verônica Figueiredo Vasconcelos

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, TOXICOLÓGICA E ANGIOGÊNICA DO FRUTO  
*Eugenia stipitata* MC VAUGH

Manaus-AM

2020

Verônica Figueiredo Vasconcelos

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, TOXICOLÓGICA E ANGIOGÊNICA DO FRUTO

*Eugenia stipitata* MC VAUGH

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito para a  
obtenção do título de Farmacêutica do  
Curso de Farmácia, da Universidade  
do Estado do Amazonas- UEA  
Orientadora: Profa. Dra. Nádia  
Cristina Falcão Bucker

Manaus-AM

2020

### **Ficha Catalográfica**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

V331a Vasconcelos, Verônica Figueiredo  
Avaliação microbiológica, toxicológica e angiogênica do  
fruto eugenia stipitata Mc Vaugh / Verônica Figueiredo  
Vasconcelos. Manaus : [s.n], 2020.  
41 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Farmácia - Universidade do  
Estado do Amazonas, Manaus, 2020.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Nádia Cristina Falcão Bucker

1. Eugenia stipitata. 2. Toxicidade . 3.  
Angiogênese. I. Nádia Cristina Falcão Bucker (Orient.).  
II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Avaliação  
microbiológica, toxicológica e angiogênica do fruto  
eugenia stipitata Mc Vaugh

**Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463**

Verônica Figueiredo Vasconcelos

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, TOXICOLÓGICA E ANGIOGÊNICA DO FRUTO

*Eugenia stipitata* MC VAUGH

BANCA EXAMINADORA



**Profa. Dra. Nádya Cristina Falcão Bucker – Orientador**  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA



**Prof. Dr. Augusto Bucker – Membro**  
Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA



**Profa. Ma. Siglia Braga Neves – Membro**  
Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA

**MANAUS**  
**2020**

*Dedico este trabalho aos  
meus pais, irmãos, à minha avó  
Ilza e a meus tios.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me presentear com o dom da vida. Ao Seu Filho amado, Jesus Cristo e a nossa mãezinha Maria, intercessora.

Aos meus pais, Joel e Alcimarina, que tanto me incentivam a alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Ítalo Jorge e David e à minha irmã Giovana, que são minha alegria. Ao meu namorado Adegilson, pelo apoio, carinho e amor.

Às minhas queridas tias, em especial aos meus tios Nely e Raimundo, bem como seus filhos, Noemi e Giovani, meus primos, que me acolheram em seu lar quando precisei e também pelo incentivo.

A equipe de pesquisa de TCC formada por Klíndia, Iara, Juliana, e em especial às minhas amigas Ingrid e Yanne, na qual foram companheiras nesta jornada.

Gostaria de agradecer também ao Gabriel, Amanda, Wendell, David, Maitê, e demais pela ajuda que nos deram durante todo esse processo de trabalho nos laboratórios.

À Profa. Dra. Nádia Falcão Bucker, minha orientadora, por todo apoio, ensinamentos e paciência para a realização deste trabalho. A Dra. Cecília Verônica Nunez por permitir o trabalho junto ao seu grupo de pesquisa. Agradecer ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA por possibilitar a execução deste projeto.

## RESUMO

*Eugenia stipitata* Mc Vaugh é uma espécie frutífera presente na região amazônica ocidental, que apresenta propriedades anti-hipertensivas e antidiabéticas, além da presença de substâncias que atuam como antimicrobianos e antivirais, como os flavonóides. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar estudo de avaliação microbiológica e angiogênica de extratos de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh. A polpa do fruto foi liofilizada, macerada e então feita a extração com água. Um microextrato hidroalcoólico foi feito para a obtenção do perfil cromatográfico. Microextratos também foram preparados para as avaliações microbiológicas e angiogênica. Pela análise do perfil fitoquímico por CCD, sugere-se a presença de flavonoides, compostos aromáticos e alcalóides. O extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh nas concentrações 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 60µg/mL e 30µg/mL não apresentou toxicidade frente à *Artemia salina*. O extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh na concentração 1000µg/mL apresentou, frente à bactéria *Salmonella enteritidis*, “inibição fraca”, com <25%. Na avaliação da atividade antiangiogênica, o extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh na concentração 100µg/mL não apresentou potencial antiangiogênico nos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica do embrião de ovos de galinha. Com este estudo foi possível verificar o perfil cromatográfico, a atividade antimicrobiana, a toxicidade e atividade antiangiogênica desta espécie frutífera.

**Palavras-chave:** *Eugenia stipitata*, Toxicidade, Antiangiogênese

## ABSTRACT

*Eugenia stipitata* Mc Vaugh is a fruit species present in the western Amazon region, which has antihypertensive and anti-diabetic properties, in addition to the presence of substances that act as antimicrobials and antivirals, such as flavonoids. Thus, this study aimed to carry out a study of microbiological and angiogenic evaluation of extracts of *Eugenia stipitata* Mc Vaugh. The fruit pulp was lyophilized, macerated and then extracted with water. The fruit pulp was lyophilized, macerated and then extracted with water. A hydroalcoholic microextract was made to obtain the chromatographic profile. Microextracts were also prepared for microbiological and angiogenic evaluations. By analyzing the phytochemical profile using CCD, the presence of flavonoids, aromatic compounds and alkaloids is suggested. The *Eugenia stipitata* Mc Vaugh extract at concentrations of 1000µg / mL, 500µg / mL, 250µg / mL, 125µg / mL, 60µg / mL and 30µg/mL did not present toxicity against *Artemia salina*. The extract of *Eugenia stipitata* Mc Vaugh at a concentration of 1000µg / mL presented, compared to the bacterium *Salmonella enteritidis*, "weak inhibition", with <25%. In the evaluation of antiangiogenic activity, *Eugenia stipitata* Mc Vaugh extract at 100µg / mL concentration did not show antiangiogenic potential in the blood vessels of the chorioallantoic membrane of the chicken egg embryo. With this study it was possible to verify the chromatographic profile, antimicrobial activity, toxicity and antiangiogenic activity of this fruit species.

**Keywords:** *Eugenia stipitata*, Toxicity, Antiangiogenesis.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Acetato de Etila/ Metanol/ Água (8:2:3gotas) antes e depois das reações. Fonte: próprias do autor.....34**
- Figura 2 DCM/Metanol/Água (7:3:3gotas) antes e depois das reações. Fonte: próprias do autor. ....35**
- Figura 3 Metanol/Água (1:1). Fonte: própria do autor. ....35**
- Figura 4 Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM).....36**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Toxicidade do extrato aquoso de <i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh frente à Artemia salina após 24h de exposição.....	31
Tabela 2 Atividade Antimicrobiana do extrato de <i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh.	32
Tabela 3 Resultado das reações obtidas pelos reveladores .....	34

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 Fator de Retenção .....	27
-----------------------------------	----

## LISTA DE SIGLAS

CAM – Membrana Corioalantóica

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CE – Célula Endotelial

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal 50%

CN – Controle Negativo

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

FGF – Fator de Crescimento

Flk-1 – Fetal liver kinase 1

Flt-1 – Gene Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

KDR – Receptor de Domínio de Inserção de Cinase

MMPS – Metaloproteinases da Matriz

NP/PEG – Difetilboriloxietilamina/Poli(etileno)glicol

TAS – Toxicologia frente à *Artemia salina*

TIMPS – Inibidores de Teciduais de Metaloproteinases

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGF (-A) – Fator de Crescimento Endotelial Vascular A

VEGFR-1 – Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1

VEGFR-2 – Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular 2

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	Plantas Medicinais .....	15
2.2	Angiogênese .....	16
2.2.1	Regulação Angiogênica .....	17
2.3	Antiangiogênese.....	18
2.3.1	Inibidores da Angiogênese .....	18
2.4	<i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh .....	19
2.5	Fitoquímica da Planta.....	20
2.6	Antibióticos.....	21
2.7	Toxicidade.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo geral .....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	METODOLOGIA .....	25
4.1	Higienização dos Frutos .....	25
4.2	Destilação de Solventes.....	25
4.3	Ensaio Toxicológicos.....	26
4.3.1	<i>Artemia salina</i> .....	26
4.4	Cromatografia de Camada Delgada (CCD) .....	27
4.5	Ensaio microbiológico .....	28
4.5.1	Avaliação Antibacteriana .....	28
4.5.1.1	Microorganismos.....	28
4.5.1.2	Preparação dos Meios de Cultura .....	28
4.5.1.3	Preparo das Amostras .....	29
4.5.1.4	Ativação das Bactérias .....	29

4.6	Atividade Antiangiogênica.....	29
4.6.1	Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM).....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1	Ensaio Toxicológico.....	31
5.1.1	<i>Artemia salina</i> .....	31
5.2	Ensaio Microbiológico .....	32
5.2.1	Atividade Antimicrobiana .....	32
5.3	Cromatografia de Camada Delgada (CCD) .....	33
5.4	Atividade Antiangiogênica.....	35
5.4.1	Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM).....	35
6	CONCLUSÃO .....	37
	REFERÊNCIAS .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

*Eugenia stipitata* Mc Vaugh, conhecido como araçá-boi, é um fruto nativo da região amazônica ocidental. Este fruto é cultivado em vários países, como Colômbia, Peru, Bolívia, Equador e Brasil, que fazem parte daquela localidade. (CUELLAR et al., 2013; KUMAR et al., 2016).

É um fruto utilizado para a fabricação de alimentos industrializados como sucos, sorvetes, geleias e néctares por possuir gosto exótico e um aroma característico. Seu consumo *in natura* é baixo por ser um fruto muito azedo, o que o torna ideal para a indústria de alimentos e com grande potencial econômico (BALDINI et al., 2017; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000; KUMAR et al., 2016).

Estudos mostram que este fruto possui propriedades medicinais anti-hipertensivas e potencial antidiabéticas, ou seja, pode ser considerado como planta de uso medicinal (GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; LIZCANO et al., 2010).

As plantas medicinais são empregadas para fins terapêuticos, e seu uso datam desde a antiguidade. Atualmente, sua utilização é marcante em países em desenvolvimento. Geralmente, países que utilizam plantas como forma de tratamento são compostos por populações carentes sem acesso à saúde básica (BRASIL, 2006; SOUZA; MELLO; LOPES, 2012).

Porém, muitas plantas são capazes de oferecer reações tóxicas e efeitos adversos para quem as consomem, e devem ser utilizadas com bastante cuidado, pelo fato de terem suas ações tóxicas desconhecidas, bem como sua correta indicação terapêutica. Dessa forma, estudos feitos com plantas da medicina tradicional trazem ao meio científico mais informações e esclarecimentos a respeito destas (CARNEIRO et al., 2014).

Uma forma de testar a toxicidade de compostos isolados e de extratos de plantas é por meio do bioensaio de Toxicidade frente à *Artemia salina* (TAS) e atividade antiangiogênica. Simples, barato e muito eficiente, o bioensaio de Toxicidade frente à *Artemia salina* é muito utilizado em laboratórios de fitoquímica por apresentar essas vantagens. A angiogênese é a geração de novos vasos sanguíneos oriundos de vasos sanguíneos pré-existentes. Em casos de patologias como o câncer, a angiogênese é a principal responsável pela metástase, e sua inibição é uma forma de retardar o crescimento de tumores.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Plantas Medicinais

Planta medicinal é definida pela ANVISA (BRASIL, 2010) como toda “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos”. E de acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), “desde o quarto século a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais”. Logo, o uso de plantas medicinais para reestabelecimento da saúde é uma prática muito antiga na humanidade.

Nos países em desenvolvimento a medicina tradicional é muito presente, e cerca de 80% da população depende desse tipo de prática para a atenção primária, sendo a utilização de plantas ou a sua preparação de 85% dentre as técnicas utilizadas, apesar da medicina moderna se encontrar no mundo num estado bem avançado (BRASIL, 2006).

Isso se deve ao fato de muitas populações carentes não terem acesso básico necessário à saúde, como atendimentos hospitalares, exames e medicamentos, por exemplo. Logo, a aquisição facilitada somada ao conhecimento das tradições de plantas medicinais tornam possível e comum a utilização destas neste tipo de população (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Mas, plantas medicinais podem carregar substâncias com potencial agressivo que acarretam em reações tóxicas e efeitos adversos, observados ao longo dos anos por seu uso. Sabendo dessa informação, a utilização de plantas medicinais deve ser feita com bastante cautela, respeitando os riscos de toxicidade (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Genotoxicidade e embriotoxicidade são exemplos de ações que plantas medicinais podem apresentar, provocando má formação fetal e até abortos. Barbatimao (*Stryphnodendron adstringens*), arnica (*Arnica montana*), artemísia (*Artemisia vulgaris*) e boldo (*Plectranthus barbatus*) são plantas com esses tipos de características (CARNEIRO et al., 2014).

Estudos apontam também que substâncias como apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos, são causadores de efeitos hepatotóxicos. Outros ainda com ação tóxica renal por substâncias como saponinas e terpenos. Espécies vegetais ricas em lactonas sesquiterpênicas, causam alguns tipos de dermatites. Ácido oxálico, nitrato e ácido erúxico, se fazem presentes em muitas plantas de uso comercial. Estudos mostram várias substâncias isoladas de vegetais vistos como medicinais



apresentam ação citotóxica ou genotóxicas e indicam sua relação com incidência tumoral (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Sendo o Brasil o portador da maior biodiversidade da Terra, em torno de 15 a 20%, relacionado à diversidade étnica e cultural, que possui vasto conhecimento tradicional referente ao uso de plantas medicinais, tornando-se um forte aliado ao meio científico para a realização de pesquisas nas mais diversas formas (BRASIL, 2006).

A flora do Brasil é bastante diversificada, e muitos produtos são oriundos das plantas brasileiras, onde se pode encontrar frutos com muito potencial econômico, com sabores diversos e marcantes. As plantas nativas do Brasil vêm ganhando destaque no mundo a fora, principalmente pela introdução de plantas e frutos exóticos, sendo que muitos dele são oriundos da Amazônia (CUNHA, 2014; SANTOS et al., 2017).

As plantas da Amazônia chamam bastante atenção dos pesquisadores e produtores, devido às suas variedades de componentes que contem, onde muitos podem ajudar a retardar o envelhecimento e como cicatrizante. Esses componentes são bem vistos na indústria cosmética, e atualmente vem crescendo mais. Com o crescimento de produtos sustentáveis no mercado, a indústria cosmética vem inovando a cada ano em busca de alternativas que possibilitem menor agressão ao meio ambiente. E isso requer medidas sustentáveis. Verificar a cadeia produtiva de um produto é de extrema importância, e acompanhar a origem das matérias-primas é essencial para que produtos sejam fabricados da forma mais segura e ecológica (GONÇALVES; HENKES, 2016; MIGUEL, 2009).

## 2.2 Angiogênese

A angiogênese é um importante processo do organismo, isto é, tem como função a geração de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos já existentes. A formação desses novos vasos pode ocorrer de duas maneiras: por divisão ou por brotamento. Formação por divisão decorre de excesso de tensão de cisalhamento microvascular em que um único microvaso linear, torna-se em dois. Quanto a angiogênese por brotamento, um novo vaso brota lateralmente de um vaso pré-existente. (CHO et al., 2019; TAHERGORABI; KHAZAEI, 2012; WILLIAMS et al., 2006)

O surgimento de novos vasos tem um papel fundamental no processo fisiológico, dessa forma ajuda no crescimento do tecido, cicatrização de feridas, na atividade reprodutiva dos órgãos femininos que incluem a ovulação, desenvolvimento folicular, a formar o corpo lúteo, crescimento endometrial, assim como é primordial na organogênese, desenvolvimento embrionário e fetal na fase avançada (CHO et al., 2019; TAHERGORABI; KHAZAEI, 2012).

Quando o crescimento acelerado e desenfreado dos vasos sanguíneos acontece, gera um grande impacto na saúde, contribuindo na patogenia de diversos distúrbios, visto que, a angiogênese é a responsável pelo crescimento de tumores e pela metástase das células cancerígenas, sendo ela a peça chave para a malignidade. Além do câncer, a psoríase, a artrite, a cegueira são alguns exemplos de doenças causadas pela angiogênese descontrolada, bem como os mais comuns como a obesidade, aterosclerose, asma e doenças infecciosas (CARMELIET, 2003; SARAVANAN et al., 2019).

Apesar de ser fisiológica e patológica a angiogênese é considerada terapêutica, ou seja, é utilizada para tratamentos de doenças como cardiopatia isquêmica, doença cerebrovascular e atraso na cicatrização de feridas por meio de agentes biológicos e materiais bioativos, uma vez que, ativam o surgimento de novos vasos sanguíneos. Também é importante destacar que a inibição da angiogênese seria de grande valia para tratamentos neoplásicos (ZYGMUNT et al., 2003).

### **2.2.1 Regulação Angiogênica**

Segundo Zygmunt et al. (2003) a angiogênese “é regulada por uma mudança no equilíbrio local entre fatores angiogênicos e seus inibidores”. Com efeito, Saravanan et al. (2019) destacam que diversas moléculas de proteínas e radicais livres já foram identificados como ativadores e inibidores angiogênicos. Logo, o desencadeamento e regulação da angiogênese acontecem devido a existência desses diversos fatores.

Zygmunt et al. (2003) afirmam que citocinas, hormônios, fatores de crescimento, hipóxia, hipoglicemia, tensão de cisalhamento, metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores de tecido (TIMPs), fibrina, células inflamatórias, são exemplos de reguladores da angiogênese, porém o VEGF (fator de crescimento

endotelial vascular), o FGF e as angiopoietinas são considerados os reguladores positivos angiogênicos de maior interesse.

Os vasos sanguíneos são constituídos de células endoteliais (CE) e estudos feitos apontam o VEGF um dos fatores de grande importância incluídos na angiogênese, causando efeitos nas CE por meio de transmissões entre essas células, gerando assim a formação de novos vasos (CARMELIET, 2003; WILLIAMS et al., 2006).

O VEGF (-A) é um dos cinco membros da família dos VEGF, é um mitogênio mais específico para as CE. Os VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR / análogo murino Flk-1) são receptores específicos para VEGF presentes nas células endoteliais, e na forma solúvel no soro materno. O agente de ações mitogênicas, anti-apoptóticas e permeabilidade do VEGF é o VEGFR-2. Já o VEGFR-1 é visto como um regulador negativo das ações do VEGF (ZYGMUNT et al., 2003).

## 2.3 Antiangiogênese

### 2.3.1 Inibidores da Angiogênese

Sendo a angiogênese fundamental para o crescimento sólido do tumor, invasão vascular e metástase, para o controle desta, existem dois jeitos: o por vias diretas e outro por vias indiretas. A direta consiste em suprimir as etapas de proliferação e migração de CE vasculares ao responderem às proteínas angiogênicas, como o VEGF. A indireta, no entanto, é modificação da expressão de proteínas angiogênicas e suas atividades, como regulação de CE (SARAVANAN et al., 2019).

A angiostatina e a trombospodina são considerados os inibidores naturais mais potentes da angiogênese. A angiostatina, que é um fragmento proteolítico do plaminogenio, apresenta ação antiproliferativa nas CE, e em estudos feitos em camundongos se observou o efeito de suprimir o crescimento de tumores primários. Já a trombospodina tem ação antiproliferativa nas células endoteliais e modula a adesão destas quando se encontra na forma solúvel. Também possui efeito antiangiogênico *in vivo* e *in vitro*. No entanto, sua forma ligada exibe respostas angiogênicas (ZYGMUNT et al., 2003).

De acordo com Zygmunt et al., (2003), “várias técnicas *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidas para estudar e quantificar com segurança a resposta angiogênica”, sabendo que a angiogênese está relacionada com processos fisiológicos e

patológicos. Dentre os métodos utilizados, os de maior importância estão: método microcirúrgico de bolsa corneana, ensaio de membrana carioalantóica de ovos embrionados, ensaio de angiogênese para implantação de disco subcutâneo, ensaio de angiogênese mesentérica-janela, e ensaio de angiogênese *in vitro*.

As terapias para o câncer buscam atingir os vasos sanguíneos dos tumores, pelo fato de apresentarem variabilidade genética. Sabendo disso, o ensaio *in vivo* da membrana carioalantóica é bastante utilizado, pois é preciso e econômico e tem a capacidade de testar os efeitos antiangiogênicos de compostos isolados e extratos de plantas, oferecendo também informações sobre a eficácia das amostras, bem como a toxicidade (SARAVANAN et al., 2019).

#### 2.4 *Eugenia stipitata* Mc Vaugh

*Eugenia stipitata* Mc Vaugh é o nome científico do araçá-boi, este que é um fruto nativo da região amazônica ocidental, cultivado em diversos países desta importante localidade como Peru, Colômbia, Bolívia, Equador e Brasil (CUELLAR et al., 2013; KUMAR et al., 2016).

Segundo Falcão et al., (2000), é uma espécie semi-domesticada na Amazônia ocidental e é pouco conhecida na Amazônia brasileira e de acordo com Calvi et al., (2017), ocorre ao longo do Rio Amazonas. Também encontrada no Mato Grosso e Bahia, mas sem exploração comercial (VIANA et al., 2012)

*Eugenia stipitata* Mc Vaugh é caracterizado como um arbusto médio a grande, apresentando muitas ramificações, podendo chegar a 4 metros de altura (CALVI et al., 2017; FALCÃO et al., 1988, 2000).

Pertencente à família Myrtaceae, o fruto é esférico pesando até 420g com aproximadamente 12cm de diâmetro e sendo sua coloração amarelo canário. Sua casca é delicada, contendo uma espessura em torno de 1mm. O araçá-boi tem um sabor ácido, possuindo a polpa branca amarelada, apresenta de 6 a 15 sementes (AGUIAR, 1983; BALDINI et al., 2017; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000; KUMAR et al., 2016).

A *Eugenia stipitata* Mc Vaugh tem importância na área industrial, gerando grande potencial para a economia. Seu gosto exótico, aroma característico, sua suculência, porcentagem elevada de polpa, e como não é comum ser consumido por ser um fruto muito azedo, torna-se ideal para ser utilizado na indústria para a

fabricação de sucos, sorvetes, geleias, néctares (BALDINI et al., 2017; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000; KUMAR et al., 2016).

Contém ainda, propriedades medicinais como anti-hipertensivo (LIZCANO et al., 2010), bem como potencial anti-diabético pela presença de substâncias que capazes de provocar a alta inibição da  $\alpha$ -glucosidase (GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010). Em um estudo feito por Álvarez et al., (2018) revelou que as sementes deste fruto podem ser usadas como complemento alimentar.

No Brasil, a família Myrtaceae contém cerca de 23 gêneros e mil espécies (ROMAGNOLO; DE SOUZA, 2006; STADNIK; OLIVEIRA; ROQUE, 2016), e é a família que representa, da melhor forma, as diversas formações vegetacionais desse país (ARAGÃO; CONCEIÇÃO, 2008; ROMAGNOLO; SOUZA, 2004).

Quanto à gêneros, o gênero *Eugenia* é o mais abundante que a família Myrtaceae apresenta. Contém aproximadamente 1000 espécies, porém outros estudos o apresentam como contendo 5000 espécies, aproximadamente, sendo que 400 dessas espécies se encontram no Brasil, que são distribuídas por todo o país. As espécies deste gênero possuem grande potencial econômico e farmacológico. Além de diversas publicações científicas, percebe-se que há uma grande exploração comercial de seus frutos comestíveis, da madeira, dos óleos essenciais e até usadas como plantas ornamentais (SARDI et al., 2017; VELOSO, 2016).

## 2.5 Fitoquímica da Planta

Segundo Sardi et al., (2017) os efeitos avaliados no gênero *Eugenia* spp. em vários estudos incluem anti-inflamatório, antibacteriano, citotóxicos, antioxidantes, antitumorais, antivirais, tripanocidas, hipoglicemicos e liberadores de insulina, o que torna essa informação importante para dos estudos com *Eugenia stipitata* Mc Vaugh.

Do ponto de vista fitoquímico, possuem quantidades significativas, como ácidos orgânicos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, polifenóis e minerais; geralmente são uma baga, e contém características e propriedades importantes que tornam esta família fortes concorrentes para a comercialização em escala industrial ou não (FARIAS et al., 2020)

Para as espécies do gênero *Eugenia*, o perfil fitoquímico é bastante amplo e os compostos podem variar de espécie para espécie. Há presença de compostos fenólicos, flavonoides, leucociantocianidina (polifenol pertencente à classe dos

bioflavonoides), esteroides, triterpenos, ácidos graxos,  $\beta$ -pineno, limoneno, cineol, pulegona, cânfora e compostos sesquiterpênicos, sendo de grande importância para a medicina, como os flavonoides, que contém propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, possui efeito vaso dilatador, ação antialérgica, atividade antitumorais, antiulcerogênica, ação antimicrobianas e antivirais. Já os triterpenos apresentam ação anti-fertilizante e anti-hiperglicêmica (VELOSO, 2016).

Segundo Baldini et al., (2017), as propriedades biológica e a composição química da *Eugenia stipitata* Mc Vaugh apresentam compostos voláteis, compostos solúveis em água, fibras, vitamina C, além de apresentarem carotenóides como luteína, zeaxantina,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno (GARZÓN et al., 2012).

Possui altos teores de flavonoides como miricetina, quercetina e kaempfero em polpa fresca; compostos fenólicos como ácido gálico, ácidos fenólicos, celulose hexosídeo de ácido vanílico, pentosídeo de ácido metil elágico, hexosídeo de ácido metil elágico (ARAÚJO et al., 2019). A presença de altos teores de derivados de quercetina glicosilada tem uma ação antidiabética devido a inibição das enzimas  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase. Estudos com este fruto mostram atividades antimutagenicas e antigenotóxica (BALDINI et al., 2017; NERI-NUMA et al., 2013).

## 2.6 Antibióticos

Classificadas como procariontes e unicelulares, por serem microorganismos constituídos de uma única célula e não apresentarem núcleo que envolva seu material genético, as bactérias são responsáveis pela maior parte de doenças infecciosas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Estas possuem parede celular, que se caracteriza pela presença de peptídeoglicanos em todas as formas de bactérias, com exceção da bactéria *Mycoplasma*; a membrana plasmática, que se localiza após a parede celular, tem a função de permeabilidade seletiva oferecendo transporte específicos para diversos nutrientes. A ausência de esteróis na membrana plasmática das bactérias pode alterar o acesso de componentes químicos no interior da célula (RANG et al., 2016).

Para a diferenciar a estrutura de uma bactéria é utilizada a técnica de Gram, que consiste na aplicação de coloração às bactérias. Dependendo da cor apresentada pela célula, estas podem ser classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas. Nos organismos Gram-positivos, a parede celular é considerada simples, quando

comparadas aos Gram-negativos, pelo fato de estes apresentarem parede celular mais complexa. Essa complexidade é uma das razões que confere resistência a antibacterianos e difícil penetração de antibióticos (RANG et al., 2016).

Os estudos com antimicrobianos surgiram após a descoberta de Alexandre Fleming, em 1928, quando observou que uma placa com colônias bacterianas sofreu contaminação fúngica, e que ao redor do fungo havia inibição do crescimento bacteriano. Com seus estudos posteriores, ao isolar o fungo, notou-se que este era capaz de produzir um componente antibacteriano, o qual se deu o nome de penicilina, devido ao gênero do fungo: *Penicillium* (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; RANG et al., 2016).

Utilizados para inibição de crescimento (bacteriostático) ou morte (bactericida) de fungos e bactérias, os antibióticos são provenientes de compostos naturais ou sintéticos. (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os antimicrobianos foram importantes na redução de coeficientes de morbidade e mortalidade após serem inseridos à medicina moderna. E os antibióticos representam o grupo de fármacos que têm bastante influência na saúde das populações (BRASIL, 2010).

Com o passar do tempo, muitas bactérias causadoras de doenças foram capazes de desenvolver resistência aos antibacterianos, sendo considerado um dos problemas de saúde mais significativo, causado principalmente pelo uso indiscriminado desses agentes. Desta forma, os estudos da ação de novos agentes combatentes de infecções são de extrema importância para este cenário (COSTA et al., 2008).

## 2.7 Toxicidade

As plantas têm a capacidade de produzir diversas substâncias químicas, dentre elas substâncias tóxicas que podem ser danosas para quem as consomem. Àquelas acabam sendo utilizadas para fins terapêuticos pelas populações que não possuem acesso a produtos industrializados (CAMPOS et al., 2016).

O uso de plantas como forma terapêutica é mais recomendado quando já existe conhecimento sobre ela, caso contrário, o risco de intoxicação por espécies desconhecidas é maior. Os metabólitos secundários, presentes em plantas tóxicas

com forma de proteção, através das vias respiratórias por exemplo, podem causar patologias, distúrbios no organismo e até provocar morte (CAMPOS et al., 2016).

Dessa forma, o presente trabalho buscou estudar nos extratos da espécie *Eugenia stititata* Mc Vaugh a sua ação toxicológica, antiangiogênica, através bioensaio de Toxicidade frente à *Artemia salina*, ensaio da Membrana Corioalantóica de ovos embrionados, respectivamente; sua atividade antibacteriana e estudo do perfil cromatográfico por meio da cromatografia de camada delgada.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Realizar avaliação microbiológica, toxicológica e angiogênica do fruto de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar o perfil cromatográfico do extrato aquoso de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh;
- Avaliar a toxicidade de extratos de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh frente à *Artemia salina*;
- Avaliar a Atividade Antibacteriana de extratos de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh em culturas bacterianas;
- Avaliar o potencial antiangiogênico de extratos de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh em ovos embrionados de galinha.

## 4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA. Para realizá-lo, foram utilizados extratos de Araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). Os ensaios empregados neste estudo foram: ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*, verificação do perfil cromatográfico, atividade antibacteriana e atividade antiangiogênica.

### 4.1 Higienização dos Frutos

Os frutos selecionados foram lavados em água corrente, e sanitizados com solução de hipoclorito por 15 minutos. Após o procedimento de lavagem, os frutos foram despulpados manualmente, pesados e submetidos a congelamento em freezer por 48h, na temperatura de 18°C.

A polpa congelada passou pelo processo de liofilização à temperatura de -40°C por aproximadamente 65h. Feita a liofilização, realizou-se a maceração da polpa utilizando grau e pistilo para se obter um pó, para posterior obtenção do extrato. Foi realizada a extração com água para se obter um extrato aquoso.

Primeira passagem: utilizou-se água em um Erlenmeyer, já com a amostra liofilizada, até que ficasse submersa. Após esse procedimento, foi levado para o ultrassom por vinte minutos. Após os vinte minutos foi feita a filtração, usando um erlenmeyer, funil e papel de filtro. Repetiu-se por mais duas vezes. Foi realizado, ao todo, 3x o mesmo procedimento para obter o microextrato.

### 4.2 Destilação de Solventes

Os solventes utilizados durante todo o trabalho foram obtidos através da destilação fracionada, que é um método responsável pela separação de solventes com pontos de ebulição próximos. Este procedimento ocorreu no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA.

Para a montagem do sistema de destilação fracionada foram utilizados os seguintes materiais: manta aquecedora, balão de destilação de fundo redondo, coluna vidreaux, termômetro, condensador, balão receptor, garras, grade, cabeça de destilação (Y), e pérolas de vidro.

Após o preparo do sistema o líquido a ser destilado foi posto no balão de destilação. Verificou-se o encaixe das peças, e só então o sistema foi ligado. O

primeiro equipamento a ser ligado foi o banho-maria, para o resfriamento do sistema através do condensador. Aproximadamente 20 minutos depois a manta aquecedora foi ligada, começando a destilação do solvente.

Esse procedimento foi seguido para ambos os solventes, diferenciando somente a temperatura da manta aquecedora, uma vez que o ponto de ebulição do solvente Metanol é de 64,7°C e do solvente Acetato de Etila é de 77,1°C.

### 4.3 Ensaio Toxicológicos

#### 4.3.1 *Artemia salina*

Para testes toxicológicos podem ser utilizados vários métodos com objetivo de ajudar a avaliar ou prever os efeitos tóxicos de substâncias bioativas submetidas a estudos. Desde a década de 90 o ensaio de letalidade feito com larvas de *Artemia salina* se popularizou e foi introduzido no meio científico devido suas vantagens (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006; LIMA et al., 2009).

O teste de toxicidade de *Artemia salina* (TAS) é um método que possui sensibilidade a substâncias tóxicas, e passou a ser utilizado como alternativa para detecção de toxicidade (LIMA et al., 2011).

É um bioensaio de baixo custo, possui rapidez, fácil manipulação laboratorial, não exige técnicas assépticas. Por essas razões a TAS passou a ser utilizada na rotina dos laboratórios fitoquímicos, pela sua simplicidade (SIQUEIRA et al., 1998)

A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca. Os cistos são de baixo custo, encontrados com facilidade no comércio, permanecem viáveis por anos em estado seco. Este microcrustáceo já foi utilizado anteriormente em diversos sistemas de bioensaio (LIMA et al., 2009; MEYER; FERRIGNI; PUTNAM, 1982)

Para o preparo das soluções das amostras foi utilizado 10mg de extrato solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) a 10%, ou seja, DMSO 10%= 100uL DMSO + 900uL de água destilada totalizando 1mL. Seguindo a ordem para a solubilização, a amostra do extrato aquoso bruto de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh foi colocada em um eppendorf, acrescentando-se então o DMSO para solubilizar a amostra. Adicionou-se a água destilada e logo em seguida foi colocado no banho ultrassônico.

Para a oclusão das larvas, foi preparado uma solução com sal marinho na concentração de 19g/500mL usando água destilada, na qual foram colocados 10mg

de artemia para cada ½ litros de água. Após 48h em aeração e iluminação se observou a eclosão das larvas.

Em uma placa com 24 poços foram colocadas 10 larvas de *Artemia salina* juntamente com a solução salina preparada e o microextrato bruto em seis concentrações distintas (30µg/mL, 60µg/mL, 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 1000µg/mL), em triplicata a ser testado.

Para o controle negativo utilizou-se o DMSO, enquanto para o controle positivo somente a água salinizada.

As larvas foram mantidas sob luz fluorescente durante 24h. Após esse tempo foi feita a contagem das larvas vivas e mortas em todos os poços. Para o cálculo de Concentração Letal 50% (CL<sub>50</sub>), utilizando-se o *Software* PRISMA.

#### 4.4 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A cromatografia é uma técnica muito utilizada na físico-química como um método de separação. Baseia-se na migração de componentes químicos em uma mistura, devido às interações entre as fases móvel e estacionária, sendo estes imiscíveis. A cromatografia teve um grande avanço a partir da década de 30, quando foi redescoberta, e serve para a identificação de composto, comparação de padrões previamente existentes, separação de componentes de uma mistura. Há diferentes formas de cromatografia, das mais simples às mais sofisticadas tecnologias para aplicação em diversas áreas da ciência (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A cromatografia empregada neste estudo foi a CCD, sendo uma técnica de adsorção líquido-sólido, em que a separação está relacionada à diferença afinidade de substâncias da amostra pela fase estacionária. O mais importante da CCD é o fator de retenção (R<sub>f</sub>), razão entre a distância percorrida pela substância analisada e a distância percorrida pela fase móvel (Equação 1). Os valores 0,4 e 0,6 são os valores de referência para o R<sub>f</sub> (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Equação 1 Fator de Retenção

$$R_f = \frac{ds}{dm}$$

As amostras dos extratos de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh passaram por análise em CCD, usando placas de sílica-gel com fase estacionaria. O extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh a ser utilizado foi preparado solubilizando uma pequena parte do

extrato bruto em duas gotas de metanol e duas gotas de água (extrato hidroalcolico). Como fase móvel, utilizou-se uma mistura de solventes nas seguintes proporções, para eluição da amostra:

- Acetato de Etila/ Metanol/ Água (8:2:3gotas)
- DCM/Metanol/Água (7:3:3gotas)
- Metanol/Água (1:1)

Após a preparação, com o auxílio de um capilar de vidro, foi realizada a transferência amostra para a placa cromatográfica. Em seguida, as placas foram observadas em lâmpada 365nm e reveladas utilizando reveladores NP/PEG (difetilboriloxietilamina/polietilenoglicol), Cloreto Férrico (FeCl<sub>3</sub>), Dragendorff.

Revelador NP/PEG indica a presença de flavonoides, sendo intensificado ao visualizar em lâmpada no  $\lambda$  365nm, após a aplicação do deste revelador. Os compostos aromáticos podem ser observados após ser aplicado o revelador Cloreto Férrico. Para a verificar a presença de alcalóides no extrato de araquá-boi, foi utilizado o revelador Dragendorff.

#### 4.5 Ensaio microbiológico

##### 4.5.1 Avaliação Antibacteriana

###### 4.5.1.1 Microorganismos

Na avaliação antibacteriana foram utilizados os seguintes isolados bacterianos: *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophilas*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Edwardsiella tarda*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*.

###### 4.5.1.2 Preparação dos Meios de Cultura

Foi utilizado 11,5g de meio de cultura Mueller Hinton [Typical Formula (g/L) Meat Extract 2,0/ Casamino Acids 17,5/ Starch 1,5/ Agar 1,5/ pH 7,3 a 25°C Marca: KASVI].

Este meio foi solubilizado em 500mL de água destilada em 2min30seg no micro-ondas, que foi esterilizado juntamente com outros materiais a serem utilizados em autoclave a 121°C por 15min.

#### 4.5.1.3 Preparo das Amostras

Para o preparo das amostras foram utilizadas 10mg do extrato aquoso de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh. Logo após, foi realizada a solubilização em 250uL de DMSO com o auxílio do ultrassom.

#### 4.5.1.4 Ativação das Bactérias

Para a ativação dos microorganismos, utilizou-se 5mL de meio de cultura Mueller Hinton, mais 100uL do microorganismo a ser testado em cada tubo de ensaio, ou seja, 10 tubos com meio de cultura para as diferentes bactérias. Este procedimento ocorreu dentro de um fluxo contínuo em luz branca.

Os tubos de ensaio foram incubados em aerobiose por um período de 18h de 30 a 37°C, após incubação foi feita a verificação por meio de leitura.

### 4.6 Atividade Antiangiogênica

#### 4.6.1 Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM)

O modelo experimental a ser utilizado é o da Membrana Corioalantóica de ovos embrionados. É um método alternativo viável para minimizar o sofrimento de animais. Consiste na incubação dos ovos até sua fase embrionária, e depois uma janela é aberta para o implante de um disco de metilcelulose, com o composto a ser estudado.

A metodologia utilizada para a avaliação da atividade antiangiogênica dos extratos está de acordo com o que foi descrito pelos autores Nguyen, Shing e Folkman (1994).

Para a realização da avaliação da atividade antiangiogênica, foram utilizados neste teste, ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus*. Os ovos foram colocados, na posição horizontal, em uma incubadora automática e digital Chocmaster® a temperatura de 37°C e sob umidade relativa do ar a 33%.

Ao passar 48h da incubação (idade embrionária E2), abriu-se uma janela com cerca de 5mm de diâmetro na casca dos ovos, na área onde a câmara de ar se encontra no ovo, para que então fosse retirada uma quantidade de 5mL da clara com o intuito de evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares. E também, fez-se uma nova janela com aproximadamente 15mm foi aberta na região da membrana corioalantóica dos ovos.

As janelas foram vedadas com fita adesiva e isolante para a diminuição da perda de umidade. Feito isto, deu-se continuidade a incubação, por 72h até chegarem a fase embrionária de 6 dias (E6). Nessa fase, os ovos foram abertos e então ocorreu a implantação dos discos de metilcelulose adsorvidos com os compostos para o estudo, no terço externo da membrana corioalantóica.

As aberturas usadas para a implantação do disco foram fechadas para continuar a incubação por 48h até que fossem alcançados 8 dias (E8) de experimento. Ao término do experimento a atividade antiangiogênica foi avaliada, utilizando-se uma câmera fotográfica para o registro dos ovos. As imagens foram utilizadas para a contagem dos vasos sanguíneos interceptados e vasos sanguíneos presentes, em uma área de 0,9cm. Os resultados foram expressos como percentual de vasos  $\pm$  desvio-padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio Toxicológico

#### 5.1.1 *Artemia salina*

Para este estudo, foram utilizadas as seguintes concentrações de extrato aquoso de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh: 30µg/mL, 60µg/mL, 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, 1000µg/mL.

Após 24 horas de exposição, foi realizada a contagem das *Artemias salinas* vivas e mortas nos 24 poços da placa.

Neste ensaio foi possível observar que em todas as concentrações testadas: 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 60µg/mL e 30µg/mL, obteve-se 100% de viabilidade de *Artemias salinas* nos 3 poços de cada concentração analisada. Com isso, sugere-se que *Eugenia stipitata* Mc Vaugh não apresenta toxicidade frente a *Artemias salinas*, como pode ser observado na Tabela 1.

Em um estudo feito foram considerados os seguintes parâmetros para TAS: baixa toxicidade ( $CL_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ ), toxicidade moderada ( $CL_{50}$  entre 100 a 500 µg/mL), e muito tóxica quando  $CL_{50} < 100\mu\text{g/mL}$  (MEYER; FERRIGNI; PUTNAM, 1982).

*Tabela 1 Toxicidade do extrato aquoso de Eugenia stipitata Mc Vaugh frente à Artemia salina após 24h de exposição.*

Concentrações	Toxicidade
1000µg/mL	-
500µg/mL	-
250µg/mL	-
125µg/mL	-
60µg/mL	-
30µg/mL	-

- = concentrações não apresentaram citotoxicidade frente à *Artemia salina*.

Fonte: Elaborada pelo autor



## 5.2 Ensaio Microbiológico

### 5.2.1 Atividade Antimicrobiana

O uso irracional de antimicrobianos se tornou uma prática comum, e isso tem ocasionado um crescimento acelerado da resistência e propagação de agentes fúngicos e bacterianos, causando sérios problemas de saúde. As plantas possuem uma variedade de componentes químicos capazes de promover atividade biológica, estes por sua vez, são utilizados no desenvolvimento de fármacos, sendo necessário na busca de novos agentes antimicrobianos (SOUZA et al., 2014).

Na avaliação da atividade antibacteriana, como mostra a tabela 2, observou-se que o extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh não apresentou atividade antimicrobiana em alguns dos microorganismos testados, exceto frente à bactéria *Salmonella enteritidis* onde foi percebido “inibição fraca”, com <25%.

Pertencente à família das Enterobacteriaceae, a bactéria *Salmonella enteritidis* é classificada como Gram-negativa. Causador de infecção alimentar, este patógeno, em casos raros, pode ocasionar infecções severas nos seres humanos, bem como provocar morte (RANG et al., 2016; BRASIL, 2020).

Tabela 2 Atividade Antimicrobiana do extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh

Microorganismos	Inibição do extrato <i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh na concentração de 1000ug/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Echerichia coli</i>	-
<i>Salmonella Enteritidis</i>	w

X = com inibição do crescimento microbiano; w = inibição fraca <25%; wM = inibição média entre 49 e 35%; - = sem inibição do crescimento microbiano.

Fonte: Elaborada pelo autor

Segundo Souza et al., 2014, óleos essenciais, extratos e compostos isolados, têm capacidade de inibição e retardamento do crescimento microbiano, devido à presença de metabólitos secundário, como alcalóides e compostos fenólicos. No presente estudo, na verificação do perfil cromatográfico, sugere-se a presença destas substâncias na planta estuda.

A inibição do crescimento da bactéria mesmo sendo fraca, pode ser proveniente das ações de compostos, como descrito acima. O mais relevante neste estudo, foi o resultado frente a uma bactéria gram-negativa, pelo fato desta apresentar parede celular considerada complexa. Para mais detalhes sobre os componentes que originaram este efeito, seria interessante estudos mais avançados.

### 5.3 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Neste estudo, na abordagem fitoquímica dos perfis cromatográficos, não foram obtidas as separações de compostos, como mostram as Figuras 1, 2 e 3. Para melhor observação, sugere-se que houve retenção das amostras adsorvidas na fase estacionária (sólida).

Geralmente, as fases estacionárias mais empregadas neste tipo de cromatografia são altamente polares. Segundo Degani, Cass e Vieira (1998) não é recomendado o uso de solventes pouco polares, pois isso afeta na remoção dos compostos do local em que foi aplicado. O uso de solventes muito polares para fases móveis também não devem ser usados, pois de acordo com os mesmos autores, fazem com que compostos sejam arrastados até a extremidade superior da placa, ocorrendo a não serão separados.

Observando a Tabela 3, podem-se verificar as reações obtidas pelos reveladores utilizados. O extrato hidroalcoólico (MeOH/Água 1:1) eluído com fase móvel Acetato de Etila/Metanol/Água 8:2:3gotas (Amostra 1) e fase móvel DCM/Metanol/Água 7:3:3gotas (Amostra 2) ao serem revelados com NP/PEG (Difenilboriloxietilamina/ Polietilenoglicol), sugere-se a presença de flavonóides, já que foi observada intensidade na fluorescência mesmo sendo pequena, após a aplicação do revelador, como se pode verificar na Figura 1 e Figura 2. Flavonóides são compostos da classe dos compostos aromáticos, tem ação na diminuição da

permeabilidade capilar, ação vasoprotetora, anti-inflamatória e é um antioxidante natural (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012)

Em seguida, ao revelar utilizando Cloreto Férrico, observaram-se manchas escuras nas amostras 1 e 2, inclusive na amostra 3, cujo extrato hidroalcoólico foi eluído com Metanol/Água 1:1, indicando possíveis presença de compostos aromáticos/fenólicos. Estes compostos são encontrados em várias espécies vegetais, conferindo-lhes sabor, odor e coloração. Para estes compostos, atribui-lhes atividade antibacteriana e antiviral, de ésteres de ácido caféico (HYACIENTH; SUSAN; ALMEIDA, 2015)

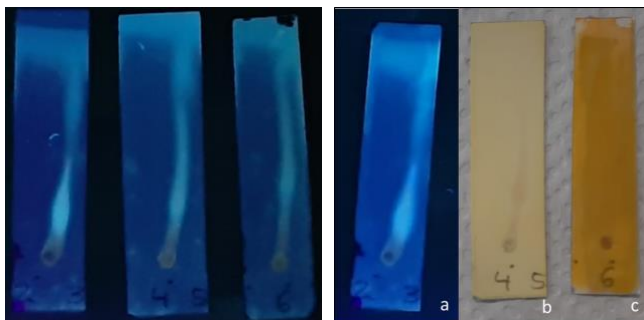
Logo após, foi realizada a revelação com o reagente Dragendorff, cuja reação sugeriu possíveis presenças de compostos alcalóides apenas na amostra 2 (DCM/Metanol/Água 7:3:3gotas), onde se observou manchas alaranjadas. Os alcaloides são metabólitos secundários, e possuem várias propriedades, as quais podem ser antifúngicas, antibacteriana (HYACIENTH; SUSAN; ALMEIDA, 2015).

*Tabela 3 Resultado das reações obtidas pelos reveladores*

Grupo Químico	Reveladores	Amostras		
		1	2	3
Flavonóides	NP/PEG	x	x	-
Aromáticos	Cloreto Férrico	x	x	x
Alcalóides	Dragendorff	-	x	-

Legenda: 1= Acetato de Etila/ Metanol/ Água; 2= DCM/Metanol/Água; e 3= Metanol/Água.  
X= Reações positivas. - = Sem reação observada.

Fonte: Elaborada pelo autor



*Figura 1 Acetato de Etila/ Metanol/ Água (8:2:3gotas) antes e depois das reações. Fonte: próprias do autor.*

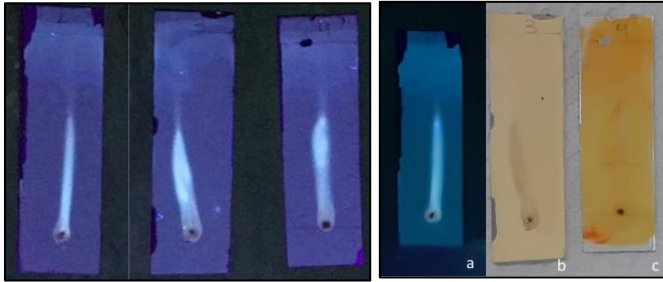


Figura 2 DCM/Metanol/Água (7:3:3gotas) antes e depois das reações. Fonte: próprias do autor.

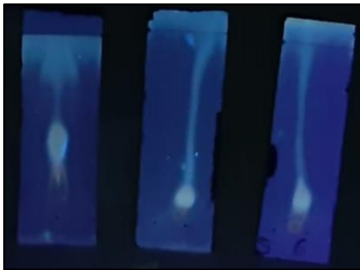


Figura 3 Metanol/Água (1:1).  
Fonte: própria do autor.

## 5.4 Atividade Antiangiogênica

### 5.4.1 Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM)

Representado pela Figura 4, o ensaio nos possibilita verificar a atividade antiangiogênica, ou seja, a inibição do surgimento de novos vasos sanguíneos por meio de vasos pré-existentes. Com 8 dias de idade (E8), pode-se observar que, o extrato aquoso na concentração de 100µg/mL estudada neste ensaio, a qual foi depositada no disco de metilcelulose (identificado pela seta), não foi capaz de exercer potencial antiangiogênico nos vasos sanguíneos do embrião, isto significa que, mantiveram-se 100% dos vasos sanguíneos em comparação ao controle negativo, não ocorrendo, no entanto, inibição da vascularização na membrana corioalantoica do embrião.

Devido à ausência de atividade antiangiogênica neste ensaio, propõe-se que o extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh, na única concentração estudada, não apresente substâncias que sejam capazes de inibir a expressão de VEGF. Outra hipótese é a presença de flavonoides, um composto aromático que tem capacidade de diminuir a permeabilidade capilar.

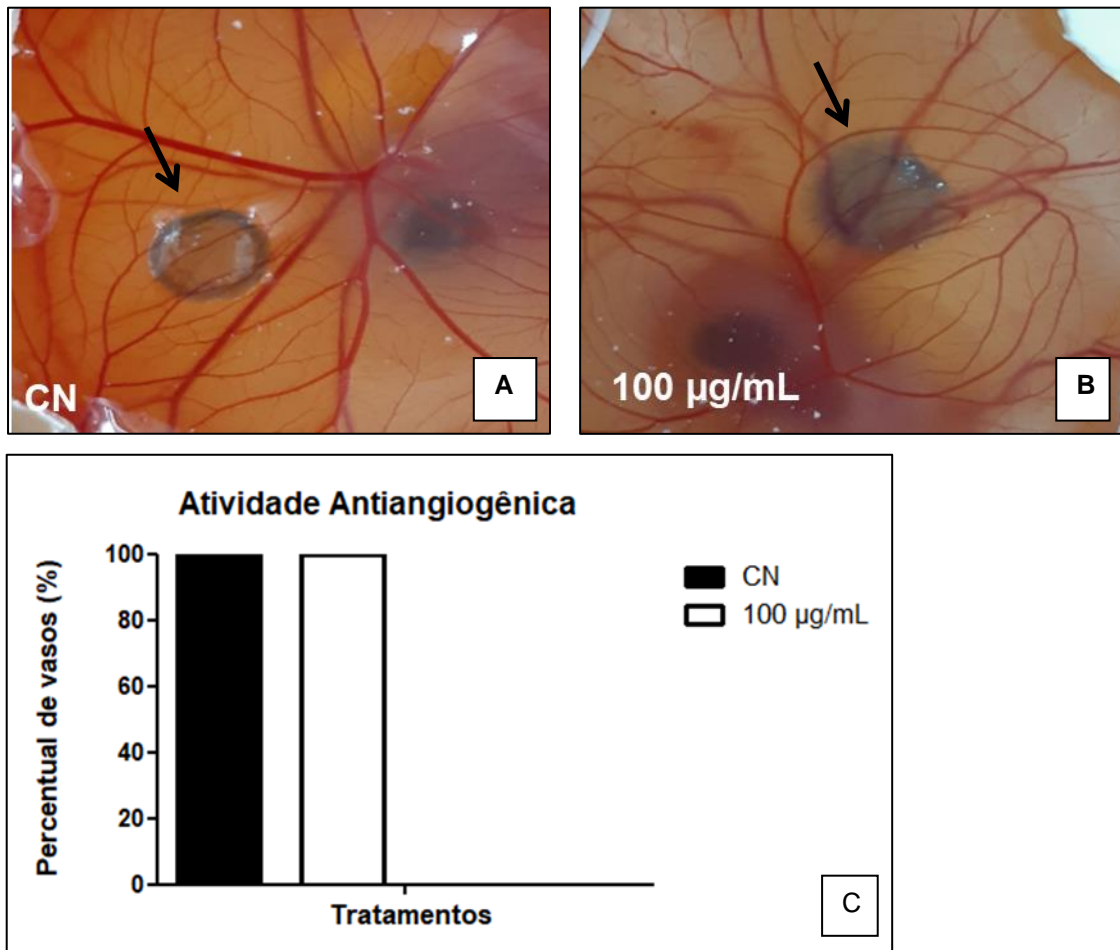


Figura 4 Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM).

Atividade Antiangiogênica apresentada pelo Extrato. As imagens A e B mostram que o extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh não foi capaz de inibir e nem aumentar a formação de vasos sanguíneos. A imagem C expõe o efeito do tratamento quando comparado ao Controle Negativo (CN).

Para obtenção de resultados positivos em relação à atividade antiangiogênica de extratos de *Eugenia stipitata* MC Vaugh, sugere-se estudos futuros deste ensaio, utilizando-se outras concentrações.

## 6 CONCLUSÃO

Os estudos fitoquímicos realizados com o extrato hidroalcoólico, apontaram possíveis presenças de compostos aromáticos, flavonóides e alcaloides, substâncias que estão relacionadas às atividades antimicrobianas e antivirais.

Considerando os estudos aos quais os extratos de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh foram submetidos, na avaliação toxicológica frente à *Artemia salina* o extrato não foi capaz de causar toxicidade nos microcrustáceos com as concentrações às quais foram expostas, podendo o extrato ser atóxico ou pouco tóxico.

No estudo da atividade antibacteriana, o extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh demonstrou fraca inibição frente à bactéria gram-negativa *Salmonella enteritidis*, possibilitando mais pesquisas, sugerindo-se a utilização do extrato em outras concentrações.

Quanto ao Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM), o extrato de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh, utilizado não demonstrou atividade antiangiogênica na concentração de 100µg/mL. Sendo assim, recomenda-se também o estudo do extrato dessa espécie em diversas concentrações.

Com estes resultados, estudos futuros podem ser realizados de modo que se obtenha mais dados sobre a resposta antibacteriana apresentada neste estudo, bem como sobre toxicidade e antiangiogênese da espécie *Eugenia stipitata* Mc Vaugh. A possibilidade de isolamento de substâncias não pode ser descartada para essa espécie frutífera. Sua utilização na cosmetologia também é válida, visando a fabricação de perfumes, cremes, sabonetes, dentre outros produtos naturais, por se apresentar atóxico e não demonstrar atividade antiangiogênica nas concentrações estudadas.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. P. Aracá-boi (*Eugenia stipitata*, McVAUGH) - **Aspectos e dados preliminares sobre a sua composição**. v. 13p. 953–954, 1983.
- ÁLVAREZ, A. et al. Chemical and biological study of *Eugenia Stipitata* mc vaugh collected in the Colombian Andean region. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 12, p. 362–369, 2018.
- ARAGÃO, J. G.; CONCEIÇÃO, G. M. DA. Myrtaceae: Espécies das Subtribos Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae Registradas para o Estado do Maranhão. **Revista Sinapse Ambiental**, p. 7–17, 2008.
- ARAÚJO, F. F. et al. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57–72, 2019.
- BALDINI, T. et al. Elaboration and Characterization of Apple Nectars Supplemented with Araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mac Vaugh—Myrtaceae). **Beverages**, v. 3, n. 4, p. 59, 2017.
- BRASIL. **Resolução - Rdc Nº 10, De 9 De Março De 2010**, 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Formulário Terapêutico Nacional: RENAME 2010**. 2. ed. Brasília: 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Salmonela (Salmonelose): O que é, causa, tratamento e prevenção. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/Salmonella>>. Acesso: 16 ago. 2020
- CALVI, G. P. et al. Analyses of several seed viability markers in individual recalcitrant seeds of *Eugenia stipitata* McVaugh with totipotent germination. **Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 6–13, 2017.
- CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 225–226, 2003.
- CARNEIRO, F. et al. TENDÊNCIAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL Trends of studies for medicinal plants in Brazil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.
- CHO, H. D. et al. Inhibitory Effects of Pectinase-Treated *Prunus Mume* Fruit Concentrate on Colorectal Cancer Proliferation and Angiogenesis of Endothelial Cells. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 11, p. 3284–3295, 2019.

COSTA, J. G. M. et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 583–586, 2008.

CUELLAR, F. A. et al. Research of antioxidant capacity of araza (*Eugenia stipitata* mc vaugh) during the ripening. **Revista Colombiana de Quimica**, v. 42, n. 2, p. 213–325, 2013.

CUNHA, D. C. DA. AVALIAÇÃO DOS FITOQUÍMICOS E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE CELULAR E ANTIPROLIFERATIVA DO SUCO DE ARAÇÁ-UNA (*Psidium eugeniaefolia*) E ARAÇÁ MORANGO (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*). **Implementation Science**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2014.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. 1. Classificação pela forma física do sistema cromatográfico. **Química Nova**, v. 7, n. 7, p. 21–25, 1998.

FALCÃO, M. et al. **Aspectos fenólicos e ecológicos do “araçá-boi” (*Eugenia stipitata* MC VAUGH) na amazonia central** *Acta Amazonia*, , 1988.

FALCÃO, M. DE A. et al. Fenologia e produtividade do araçá-boi (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae) na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 1, p. 9–9, 2000.

FARIAS, D. P et al. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food Chemistry**, v. 306, n. October 2019, p. 125630, 2020.

FRANCO, M. R. B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some brazilian fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), araca-boi (*Eugenia stipitata*), and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1263–1265, 2000.

GARZÓN, G. A. et al. Determination of carotenoids, total phenolic content, and antioxidant activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an amazonian fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4709–4717, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 2010.

GONÇALVES, J. S.; HENKES, J. A. Produção De Cosméticos De Forma Mais Sustentável. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 5, n. 1, p. 473, 2016.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HYACIENTH, D. C.; SUSAN, S.; ALMEIDA, S. DE. *cuspidata* Maas. p. 4–7, 2015.



KUMAR, B. et al. Extracellular green synthesis of silver nanoparticles using Amazonian fruit Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh). **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 26, n. 9, p. 2363–2371, 2016.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158–163, 2006.

LIMA, J. M. et al. Prospecção fitoquímica de *sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *artemia salina*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 7–11, 2009.

LIMA, C. P. et al. Efeito alelopático e toxicidade frente à *Artemia salina* leach dos extratos do fruto de *euterpe edulis martius*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 331–336, 2011.

LIZCANO, L. J. et al. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1566–1570, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982.

MIGUEL, L. M. Experiências sobre a Utilização da Biodiversidade: as bioindústrias de cosméticos na Amazônia brasileira. **12º Encontro de Geógrafos da América Latina–EGAL**, 2009.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013.

NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Microvascular Research**, v. 47, n. 1, p. 31–40, 1994.

RANG, H.P; RITTER, J.M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

ROMAGNOLO, M. B.; DE SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529–548, 2006.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. DE. Os gêneros *Calycorectes* O. Berg, *Hexachlamys* O. Berg, *Myrcianthes* O. Berg, *Myrciaria* O. Berg e *Plinia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 613–627, 2004.

SANTOS, V. A. DOS et al. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE FRUTOS DE

ARAÇÁ-BOI (*Eugenia stipitata* McVAugh) EM LAVRAS – MG. v. 1, p. 530–543, 2017.  
SARAVANAN, M. et al. Antiangiogenic, anti-inflammatory and their antioxidant activities of *Turnera subulata* Sm. (Turneraceae). **Process Biochemistry**, 2019.

SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, 2017.

SIQUEIRA, J. M. et al. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Quimica Nova**, v. 21, n. 5, p. 557–559, 1998.

SOUZA, A. M. et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, 2014.

SOUZA, G. H. B. DE; MELLO, J. C. P. DE; LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletanea Científica**. Ouro Preto-MG: 2012.

STADNIK, A.; OLIVEIRA, M. I. U. DE; ROQUE, N. Levantamento florístico de Myrtaceae no município de Jacobina, Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 43, n. 1, p. 87–97, 2016.

TAHERGORABI, Z.; KHAZAEI, M. A review on angiogenesis and its assays. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 6, p. 1110–1126, 2012.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VELOSO, Juvenal Henrique. **O gênero eugenia: da química à farmacologia**. Universidade Estadual Paulista. departamento de Química. Bauru: 2016.

VIANA, E. D. S. et al. Caracterização Físico-Química E Sensorial. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 34, n. 4, p. 1154–1164, 2012.

WILLIAMS, J. L. et al. Differential gene and protein expression in abluminal sprouting and intraluminal splitting forms of angiogenesis. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 587–595, 2006.

ZYGMUNT, M. et al. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, n. SUPPL., p. 10–18, 2003.