



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL
PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS - PPGCTAL**

VIVIANE DALASTRA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS
EXTRAÍDOS DA GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg)**

LARANJEIRAS DO SUL

2018

VIVIANE DALASTRA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS
EXTRAÍDOS DA GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal da Fronteira Sul - UFFS, como requisito para
obtenção do título de Mestre, sob a orientação do Prof. Dr.
Ricardo Key Yamazaki.

**LARANJERIAS DO SUL
2018**

VIVIANE DALASTRA


TÍTULO: "Avaliação Química e Biológica de compostos bioativos extraídos da Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa Berg*)".

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - **Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** – PPGCTAL da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos, defendido em 02/08/2018.

Presidente da Banca: Prof. Dr. Ricardo Key Yamazaki

Aprovado em: 02 / 08 / 2018

BANCA EXAMINADORA


Dr. Ricardo Key Yamazaki/UFFS


Drª. Silvia Romão/UFFS


Dr. Thiago Bergler Bitencourt/UFFS

Laranjeiras do Sul/PR, agosto de 2018

Dedico este trabalho a minha mãe
Mariane Ema Fuchs Dalastra (*in memoriam*),
por ter sonhado com esta conquista para mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui.

A minha família, ao meu pai, Valdecir Antonio Dalastra, que tornou possível minha formação acadêmica. As minhas irmãs Jaqueline e Emanuele por sempre torcerem por mim. Vocês são minha inspiração.

Ao professor Ricardo Key Yamazaki, pela orientação, dedicação e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos professores Luciano Tormen, Thiago Bergler Bitencourt, Silvia Romão, Vânia Zanella Pinto, pelo apoio científico prestado.

Aos professores Fauze Jacó Anaissi (UNICENTRO), Vânia Zanella Pinto e Luciano Tormen, pelo empréstimo de reagentes.

Ao professor Sandro José Ribeiro Bonattoe Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, sem o qual os ensaios com as linhagens celulares não seriam possíveis.

À aluna de Iniciação Científica da Faculdade Pequeno Príncipe, Caroline Kael, pelo suporte e auxílio nos ensaios celulares.

À aluna de Engenharia de Alimentos (UFFS) Cintia Uliana, pelo auxílio nas análises de compostos fenólicos totais.

À minha amiga e colega de mestrado Daniela Pilatti, pela colaboração nas análises químicas dos compostos bioativos e nos ensaios de DPPH e ABTS, além de todo apoio psicológico, nas tantas noites e finais de semanas que passamos nos laboratórios.

Aos técnicos dos laboratórios de Alimentos da UFFS, Edmilson Jose Kleinert, Fernanda Arpini Souza, Silvia Tormen, Ellen Bernardi, pela amizade, apoio e ensinamentos prestados nos laboratórios. Ao técnico Diogo José Siqueira, pela identificação da espécie *C. xanthocarpa*.

À minha grande amiga Naiara Southier, por ter me incentivado a entrar no programa de mestrado, sua dedicação tornou isso possível, como já te falei outras vezes, a culpa é sua!

Às amigas e colegas do mestrado, Cintia, Jakelynye, Franceline, Gleiciéli e Jussara, por todos os momentos que passamos juntas, por serem mais que amigas. Palavras não são o suficiente para agradecer!

RESUMO

A *C. xanthocarpa* Berg é uma planta nativa, comum na Região Sul do Brasil. O interesse por compostos bioativos de origem natural com alta capacidade antioxidante aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas, principalmente devido ao seu potencial na prevenção e tratamento auxiliar de doenças inflamatórias crônicas. Em vista deste fato, o presente estudo buscou avaliar as atividades anti-inflamatória e citotóxica da planta guabirobeira. Os extratos foram elaborados com as folhas e polpa da *C. xanthocarpa*, através de dois métodos extrativos, sob refluxo em aparelho Soxhlet a 78,4 °C utilizando como solvente o etanol70% (SP-et e SF-et) e sob agitação magnética a 37°C utilizando os solventes etanol70% (P-et e F-et) e n-hexano (F-hex e P-hex). Os compostos bioativos dos extratos (compostos fenólicos totais, flavonoides, clorofilas, carotenoides, cumarinas e taninos) foram determinados por espectrofotometria. Foi realizada avaliação da atividade antioxidante pela captação dos radicais livres DPPH e ABTS. Atividade citotóxica dos extratos foi testada pelo ensaio de viabilidade celular da linhagem celular H295R pelo método MTT. A capacidade de adesão, atividade fagocitária e volume lisossomal foram verificados em macrófagos da linhagem RAW264.7. O extrato F-et apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais, flavonoides, cumarinas e taninos; F-hex apresentou maiores concentrações de clorofilas e carotenoides; em relação aos extratos da polpa, P-et apresentou maiores concentrações de compostos fenólicos, cumarinas e taninos. A extração por Agitação magnética foi mais eficiente para compostos fenólicos totais, flavonoides, cumarinas e taninos da folha; na polpa, a extração por Soxhlet foi mais eficiente para compostos fenólicos totais e flavonoides. A maior capacidade antioxidante baseada na captação dos radicais DPPH e ABTS foi detectada no F-et. O grupo F-hex apresentou efeito na viabilidade celular nas células H295R, enquanto o grupo P-hex apresentou efeito biológico nas células RAW264.7. Os compostos bioativos observados no presente estudo apresentaram maior concentração no extrato da folha da *C. xanthocarpa* extraída pelo solvente etanol70%. Este grupo demonstrou relação positiva nos ensaios de capacidade antioxidante (DPPH e ABTS), porém o mesmo não foi observado nas análises *in vitro*.

Palavras-chaves: Macrófagos RAW 264.7; tumor de córtex adrenal; guabiroba; antioxidante; anti-inflamatório.

ABSTRACT

The *C. xanthocarpa* Berg is a native plant, common in southern Brazil. The interest in natural bioactive compounds with high antioxidant capacity has increased considerably in the last two decades, mainly due to its potential in the prevention and auxiliary treatment of chronic inflammatory diseases. In view of this fact, the present study sought to evaluate the anti-inflammatory and cytotoxic activities of the guabirobeira plant. The extracts were elaborated with the leaves and pulp of *C. xanthocarpa*, by means of two extractive methods, under reflux in Soxhlet apparatus at 78.4 °C using as solvent 70% ethanol (SP-et and SF-et) and under magnetic stirring at 37 °C using the solvents 70% ethanol (P-et and F-et) and n-hexane (F-hex and P-hex). The bioactive compounds of the extracts (total phenolic compounds, flavonoids, chlorophylls, carotenoids, coumarins and tannins) were determined by spectrophotometry. An evaluation of the antioxidant activity was performed by the DPPH and ABTS free radicals. Cytotoxic activity of the extracts was tested by the cell viability assay of the H295R cell line by the MTT method. The adhesion capacity, phagocytic activity and lysosomal volume were verified in RAW 264.7 macrophages. The F-et extract showed a higher amount of total phenolic compounds, flavonoids, coumarins and tannins; F-hex presented higher concentrations of chlorophylls and carotenoids; in relation to pulp extracts, P-et presented higher concentrations of phenolic compounds, coumarins and tannins. Magnetic stirring extraction was more efficient for total phenolic compounds, flavonoids, coumarins and leaf tannins; in the pulp, Soxhlet extraction was more efficient for total phenolic compounds and flavonoids. The highest antioxidant capacity based on DPPH and ABTS uptake was detected in F-et. The F-hex group had an effect on cell viability in H295R cells, whereas the P-hex group had a biological effect on RAW 264.7 cells. The bioactive compounds observed in the present study had a higher concentration in the extract of *C. xanthocarpa* leaf extracted by solvent ethanol 70%. This group showed a positive relation in the antioxidant capacity tests (DPPH and ABTS), but the same was not observed in the in vitro analyzes.

Keywords: Macrophages RAW 264.7; tumor of the adrenal cortex; guabiroba; antioxidant; anti-inflammatory.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma

ABTS – 2,2-AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonicacid) diammoninumsalt

DPPH – 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

F-et – extrato da folha extraído com etanol 70% sob agitação magnética

F-hex – extrato da folha extraído com n-hexano sob agitação magnética

H295R – células da linhagem celular de adenocarcinoma humano

mL – microlitro

MTT - Brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]

ng- nanograma

NO – óxido nítrico

P-et – extrato da polpa extraído com etanol 70% sob agitação magnética

P-hex – extrato da polpa extraído com n-hexano sob agitação magnética

RAW 264.7 - células da linhagem celular de macrófagos de ratos

SF-et – extrato da folha extraído com etanol 70% sob refluxo em Soxhlet

SP-et – extrato da polpa extraído com etanol 70% sob refluxo em Soxhlet

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO GERAL	14
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. REFERENCIAL TEÓRICO	15
4.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	15
4.1.1 Frutas	15
4.1.2 Guabiroba (<i>Campomanesia spp</i>)	16
4.2 COMPOSTOS BIOATIVOS	17
4.3 CÂNCER	19
4.3.1 Câncer.....	19
4.3.2 Fitoquímicos e Câncer.....	20
4.3.3 Tumor de cortéx adrenal.....	21
4.4 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS	22
4.4.1 Sistema Imunitário.....	22
4.5 CULTURA CELULAR	26
4.6 TIPOS DE EXTRAÇÃO	27
5. METODOLOGIA	29
5.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	29
5.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	30
5.2.1 Extração Sob Agitação Magnética	30
5.2.2 Extração por Soxhlet	30
5.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	31
5.3.1 Compostos Fenólicos Totais.....	31
5.3.2 Clorofilas e Carotenoides	32
5.3.3 Flavonoides.....	32
5.3.4 Cumarinas.....	33
5.3.5 Taninos	33
5.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES	34

5.5.1 Radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil)	34
5.5.2 Radical ABTS (2,2-AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonicacid) diammoninumsalt)	35
5.6 LINHAGENS CELULARES	36
5.6.1 Toxicidade dos extratos - teste de MTT	37
5.6.2 Atividade Fagocitária de Macrófagos.....	37
5.6.3 Volume Lisossomal/ Captação do Vermelho Neutro	38
5.6.4 Ensaio de Adesão de Macrófagos.....	38
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	40
6.1.1 Compostos Fenólicos Totais.....	40
6.1.2 Clorofilas	43
6.1.3 Carotenoides	46
6.1.4 Flavonoides.....	48
6.1.5 Cumarinas.....	51
6.1.6 Taninos	54
6.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES	56
6.2.1 Radical DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil).....	56
6.2.2 Radical ABTS (2,2azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)	59
6.3 LINHAGENS CELULARES	62
6.3.1 Toxicidade dos extratos - teste de MTT	62
6.3.2 Atividade Fagocitária dos Macrófagos	64
6.3.3 Ensaio de Volume Lisossomal	66
6.3.4 Ensaio de Adesão de Macrófagos.....	68
7. CONCLUSÕES.....	71
8 REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO	93

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm abordado uma relação positiva de fatores ambientais como atividade física e uma dieta saudável, na redução do desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (diabetes, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças neurodegenerativas entre outras) (RUIZ-NÚÑEZ *et al.*, 2013). Portanto, a adoção de um estilo de vida saudável, com consumo de alimentos funcionais, nutritivos e seguros, juntamente com a prática de atividade física, é fundamental na promoção do bem-estar e na prevenção de diversas doenças. O aumento no consumo de vegetais e frutas, por exemplo, possui efeito anti-inflamatório e, conseqüentemente, reduz o desenvolvimento destas doenças (OLIVEIRA-CAMPOS *et al.*, 2013).

O Brasil é conhecido por sua biodiversidade, com mais de 40.000 espécies de plantas, o que representa aproximadamente 20% da flora mundial. Parte desta riqueza biológica pode ser explorada a partir de estudos em plantas que apresentem quantidades significativas de compostos bioativos (OLIVEIRA *et al.*, 2012), os quais promovem benefícios à saúde humana por apresentarem efeitos gastroprotetor, antibacteriano, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antialérgico, antiviral, antitrombótico, vasodilatador, hipoglicemiante, hipocolesterolêmico e antitumoral (ALI *et al.*, 2013; BIAVATTI *et al.*, 2004; MIZGIER *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2015).

Uma das formas atuais de promover o desenvolvimento sustentável é através de estudos da biodiversidade agrícola, os quais possibilitam explorar o potencial bioativo de plantas nativas e que até o momento foram negligenciadas e/ou sub utilizadas. Sob outro ponto de vista, estes estudos também contribuem para a valorização da cultura local e identidade territorial (BARBIERI, 2014). No entanto, estudos científicos são essenciais para elucidar a real eficácia, biodisponibilidade e segurança dos compostos bioativos, promovendo o consumo e desenvolvimento de novos produtos com propriedades benéficas para o ser humano.

2. JUSTIFICATIVA

Um estudo da região do Território da Cidadania Cantuquiriguaçu – PR, realizou um levantamento sobre a presença de frutas nativas, sendo a Guabiroba (*C. xanthocarpa* Berg) a fruta que apareceu com maior frequência (BETEMPS *et al.*, 2013). A *C. xanthocarpa* Berg é comum na Região Sul do Brasil e outros locais como Argentina, Paraguai e Uruguai (AMARAL *et al.*, 2016). A busca por compostos bioativos de origem natural com alta capacidade antioxidante aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas, principalmente devido ao seu potencial na prevenção e tratamento auxiliar de doenças inflamatórias crônicas como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies de plantas, várias das espécies já registradas apresentam potencial como alimento funcional, e muitas outras espécies são desconhecidas ou ainda não foram submetidas a qualquer estudo, a fim de verificar seus benefícios para a saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Oliveira e colaboradores (2012) realizaram levantamento bibliográfico e encontraram 47 plantas nativas já estudadas em laboratório com benefícios à saúde. As propriedades registradas foram atividades anti-oxidativa, antitumoral, antimutagênica, antidiabética, anti-inflamatória e propriedades cardioprotetoras, atividade antigênica e utilidade no tratamento de hipovitaminose, propriedades laxativas, hepatoprotetoras e hipolipidêmicas.

Frutas silvestres têm ganhado aceitação tecnológica, as quais são comercializadas na forma de sucos, doces, sorvetes e balas, porém á muitas ainda são sub-exploradas (RUFINO *et al.*, 2010). Estudos mostraram que essas frutas têm diferentes substâncias bioativas que podem agir isoladamente ou em conjunto sobre vários alvos fisiopatológicos de doenças crônicas. O consumo de frutas tropicais está aumentando no mercado doméstico e mercados internacionais devido ao crescente reconhecimento de seu valor para saúde humana (SAKLANI, KUTTY, 2008).

Com base na literatura e em resultados bem sucedidos com plantas medicinais procurou-se com este trabalho, identificar compostos bioativos e avaliar o efeito biológico dos extratos da *C. xanthocarpa* em células de Tumor de córtex Adrenal (H295R) bem como em células do sistema de defesa (RAW 264.7 – macrófagos).

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi quantificar os compostos bioativos e avaliar as atividades anti-inflamatória e citotóxica da planta Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração de polpa e folha da Guabiroba;
- Determinar a concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides, clorofilas, carotenoides, cumarinas e taninos;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos pelos ensaios de captação dos radicais livres DPPH e ABTS;
- Comparar a extração de compostos bioativos e atividade antioxidante, dos extratos de Folha e Polpa da guabirobeira, extraídos com solvente etanol70% por dois métodos diferentes (Agitação Magnética e Sob Refluxo em Soxhlet);
- Avaliar a atividade citotóxicados extratos, pelo ensaio de viabilidade celular da linhagem H295R em ensaio colorimétrico de MTT;
- Avaliara capacidade de adesão, atividade fagocitária e volume lisossomal (vermelho neutro) de células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 dos extratos.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais eram usadas desde a antiguidade, e até hoje é um importante recurso terapêutico para o tratamento de doenças (FREITAS, 1999). Registros antigos apontam conhecimento de várias propriedades medicianais de plantas, o qual a utilização foi passada de geração em geração (SIMÕES *et al.*, 2007). De acordo com Verpoorte (2000), cerca de 6% das plantas do mundo foram selecionadas pela atividade biológica e destas apenas 15% foram fitoquimicamente avaliadas. O Brasil possui grande diversidade étnica e cultural, a qual agrega considerável conhecimento tradicional, no uso medicinal de plantas, principalmente pelos povos indígenas, que utilizam as florestas como farmácia (MARTINS *et al.*, 1998).

Várias plantas são utilizadas na medicina tradicional indígena para o tratamento de diferentes doenças, bem como para tratar os sintomas da pele e da membrana mucosa associados a gripe, febre, icterícia e diarreia, entre outros. Muitos destes efeitos foram cientificamente comprovados, porém o uso indiscriminado de plantas medicinais, sem saber se as mesmas apresentam eficácia e segurança, representando riscos sérios para população (MOURA-COSTA *et al.*, 2012).

4.1.1 Frutas

O Brasil é reconhecido pela grande variedade de frutas frescas produzidas anualmente, em todas as regiões do país e destacam-se também como grande exportador das mesmas para vários países, segundo dados da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas (ABRAFRUTAS). Devido à sua extensão territorial, solo e condições climáticas, o país apresenta vasta riqueza ecológica (IBRAF, 2015; MALTA *et al.* 2013; SEBRAE, 2015), a qual proporciona um grande número de espécies de frutas nativas, selvagens e exóticas, com grande potencial para indústria de alimentos, e que em sua maioria, não são exploradas comercialmente (NERI-NUMA *et al.*, 2013). Neste sentido, estudos focados na capacidade antioxidante das frutas e seus respectivos benefícios e na redução da perda durante colheita e pós-colheita são importantes para o desenvolvimento cultural, social, tecnológico e econômico da região.

4.1.2 Guabiroba (*Campomanesia* spp)

Entre as plantas nativas, as mirtáceas estão presentes em todo o domínio fitogeográfico brasileiro, representando uma das maiores famílias, com 23 gêneros e cerca de 100 espécies (LORENZI, 2002). O gênero *Campomanesia*, recebe destaque entre a família Myrtaceae, apresentando 25 espécies, sendo destas, 15 espécies nativas brasileiras, apreciadas popularmente, além de servir como recurso alimentar de várias aves, peixes, répteis e animais silvestres (BIAVATTI *et al.*, 2004).

A *Campomanesia xanthocarpa* apresenta duas variedades distintas, sendo a *littoralis* com altura variando entre 0,20 e 1,50 metros, apresentando sempre porte arbustivo. A *C. xanthocarpa* Berg medindo até 20 metros de altura, com ramificações irregulares, tronco com casca de coloração parda acinzentada, suas folhas medem aproximadamente 5x3 cm, podendo chegar a 10 cm de comprimento e 5 cm de largura (BIAVATTI *et al.*, 2004). A *C. xanthocarpa* Berg aparece com maior frequência na Região Sul do Brasil e outros locais como Argentina, Paraguai e Uruguai (AMARAL *et al.*, 2016) e pode se desenvolver em solos pobres em nutrientes.

Betemps *et al.* (2013) realizou um levantamento sobre a presença de frutas nativas com potencial produtivo em 93 pequenas propriedades da região do Território da Cidadania Cantuquiriguaçu – PR, com o objetivo de valorizar, fortalecer a economia local, aumentar a disponibilidade de frutas frescas e contribuir com a segurança alimentar. De acordo com os resultados obtidos, a Guabiroba apareceu em maior destaque.

Os frutos da planta do gênero *Campomanesia* (Myrtaceae), popularmente conhecidos como “guavirova”, “guabiroba”, “gabiroba” ou “guavira”, são, geralmente, consumidos *in natura* e suas folhas e raízes utilizadas popularmente, em infusões, para prevenção e tratamento de diversas enfermidades, como diabetes, dislipidemias, efeitos antiplaquetários, efeitos antiulcerogênicos e para redução peso corporal (FERREIRA *et al.*, 2013; KLAFKE *et al.*, 2010; PALOZZA *et al.*, 2012; VINAGRE *et al.*, 2010). A guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*. Berg), é popularmente utilizada com diferentes propósitos como tratamento de úlceras, diarreia, artrite reumatoide, perda de peso, e redução das concentrações de colesterol sanguíneo (ALVES *et al.*, 2013; BALLVE *et al.*, 1995). No entanto, maiores investigações são necessárias na elucidação dos efeitos da *Campomanesia* em diferentes doenças, suas concentrações e identificação dos compostos bioativos presentes na planta, responsáveis por tais efeitos (ESPINDOLA *et al.*, 2016; PASCOAL *et al.*, 2011).

No presente estudo, a planta *Campomanesia xanthocarpa* Berg, será chamada de Guabirobeira, e seu fruto de Guabiroba.

4.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

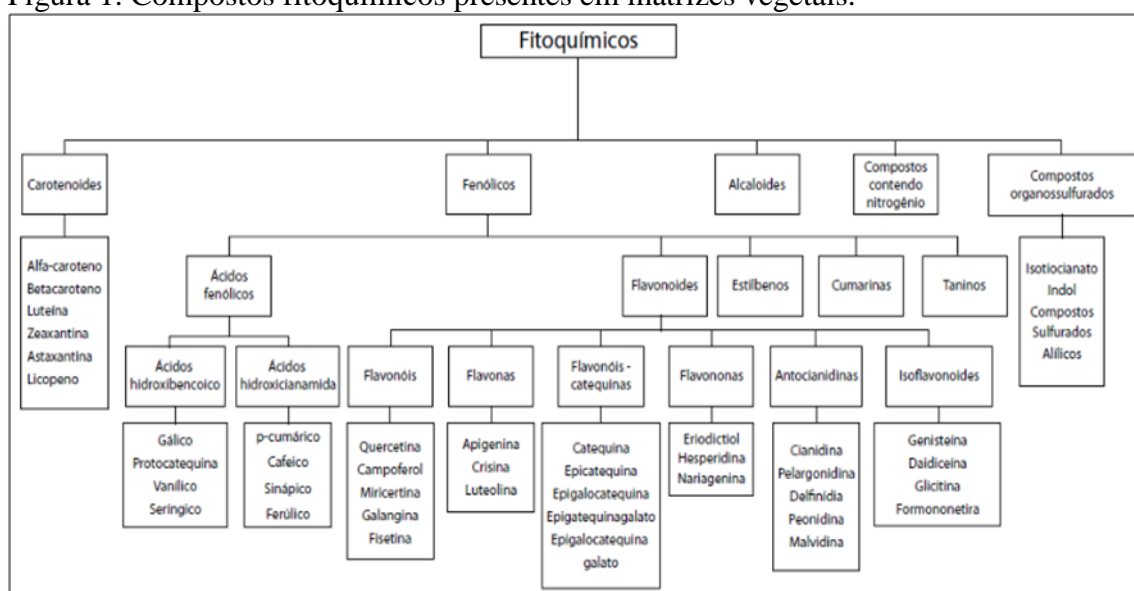
O consumo de frutas e vegetais tem sido associado à redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório, ambos relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas. Este efeito benéfico é vinculado em parte pela presença dos compostos bioativos presentes nestas plantas (KAULMANN *et al.*, 2014).

Os compostos bioativos são metabólitos secundários, produzidos pelas plantas que contribuem no processo de adaptação e resistência da mesma ao meio ambiente (ROCHA *et al.*, 2011). Agem como antioxidantes e tem efeitos importantes na promoção da saúde e prevenção de doenças no ser humano, atuando como antibacterianos, anti-inflamatórios, anti-alérgicos, antivirais, antitrombóticos, vasodilatadores e anticancerígenos (XIE *et al.*, 2015). Os agentes antioxidantes têm a capacidade de prevenir e reparar danos causados pela oxidação, e podem estar presentes em alguns nutrientes (vitaminas e minerais) e em substâncias não nutricionais como os fitoquímicos (BETA, DUODU, 2016) (Figura 1). Um dos mecanismos pelos quais estes compostos exercem seus efeitos benéficos a saúde, é através da eliminação de radicais livres, substâncias capazes de causar danos em diferentes estruturas celulares (BACANLI *et al.*, 2015). Dentre os vários compostos, os flavonoides (principalmente as antocianinas) os carotenoides (como a luteína), e a vitamina C, foram os que apresentaram maior capacidade antioxidante e anti-inflamatória de acordo com estudo de Kaulmann *et al.* (2014).

Os carotenoides, juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes antioxidantes em sistemas biológicos e são responsáveis pelo poder curativo e preventivo de certos alimentos (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993). As clorofilas são muito utilizadas como pigmentos e antioxidantes, a substituição dos pigmentos sintéticos pela clorofila contribui muito para a produção de alimentos mais saudáveis (STREIT *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos apresentam anel aromático e pelo menos um grupo hidroxila na sua estrutura química, variando de uma simples molécula fenólica a um complexo polímero, são responsáveis pela pigmentação e proteção das plantas contra microorganismos e insetos, além de serem essenciais para seu crescimento e reprodução (IGNAT, VOLF, POPA, 2011). Ao ingerir alimentos que possuem compostos fenólicos, os mesmos podem trazer benefícios à saúde, pois no organismo humano atuam como antioxidantes, auxiliando na eliminação de

radicais livres (MARTINS *et al.*, 2011). Podem ser classificados em dois grupos principais, os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os flavonoides podem ser considerados o maior grupo, com aproximadamente 4 mil estruturas identificadas e classificadas (KARAKAYA, 2004; LIU, 2004). Dentre os compostos fenólicos, destaca-se as antocianinas, pigmentos naturais, responsáveis pelas cores atraentes de flores, frutas e verduras, que apresentam propriedades antioxidantes capazes de reduzir ou prevenir eventuais efeitos nocivos, causados pelos radicais livres ao corpo humano (MIZGIER *et al.*, 2016). De modo geral, os compostos fenólicos também podem exercer efeitos antimicrobiano, anticarcinogênico e antiproliferativo (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2011). A presença de cumarinas nas plantas, pode estar relacionada à atividade anti-inflamatória, vasodilatadora, e ainda atividade anticarcinogênica (LU *et al.*, 2013; VITORINO *et al.*, 2013). De acordo com Chung e colaboradores (1998), os taninos apresentam duplo efeito na saúde humana, podendo apresentar efeito benéfico como ação antitumoral e antimicrobiana e efeitos antinutricionais, quelando vitaminas e minerais.

Figura 1. Compostos fitoquímicos presentes em matrizes vegetais.



Fonte: LIU (2004).

Os compostos fitoquímicos encontrados nas *Campomansia spp* são os carotenoides, os alcaloides e os fenólicos, dentro deste último as chalconas, os taninos, cumarinas, os flavonoides e os ácidos fenólicos, tais como os ácidos gálico, elágico e hidroxibenzoico. Ao verificar os flavonoides, encontra-se os flavonóis (quercetina e miricetina), as flavonas, os flavanóis (catequina, epicatequina e proantocianidina) e as flavanonas (ARAÚJO *et al.*, 2016;

CARDOSO *et al.*, 2013; DONADO-PESTANA *et al.*, 2015; HAAS, 2011; KLAFKE *et al.*, 2010; MADALOSSO *et al.*, 2012; MICHEL *et al.*, 2013; OLIVEIRA FERNANDES *et al.*, 2015; SANTOS, 2011; VISCARDI *et al.*, 2016).

Neste contexto, plantas que apresentam ação anti-inflamatória podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos (MOLDOVAN *et al.*, 2016). Auxiliando a promoção da saúde do consumidor, ao permitir acesso permanente a frutas e produtos hortícolas, e conseqüentemente, aumentando a freqüência do consumo destes alimentos ao longo do ano (ANDRES *et al.*, 2016; NOWICKA, WOJDYLO e SAMOTICHA, 2016).

4.3 CÂNCER

4.3.1 Câncer

O termo câncer descreve mais de 100 doenças, caracterizadas por alterações no comportamento normal das células, fazendo com que as mesmas se dividam descontroladamente, crescendo rápido e podendo espalhar-se a outros tecidos ou ainda ir para a corrente sanguínea e/ou linfática levando a formação de tumores secundários em qualquer parte do organismo, comprometendo suas funções normais (INCA, 2014; WHO, 2013). As células tumorais possuem anormalidades genéticas em seus sistemas reguladores que resultam em perda do controle do crescimento. As alterações no DNA das células somáticas podem ser decorrentes de fatores externos como substâncias químicas, radiação e vírus, ou de fatores internos como predisposição genética herdada pelas células germinativas, desequilíbrios hormonais e deficiências do sistema imunitário (FILHO, PEREIRA, GUIMARÃES, 2009; STRICKER, KUMAR, 2008; LOPES, OLIVEIRA, PRADO, 2002).

Em geral, o processo tumoral se caracteriza por acúmulo sucessivo de alterações genéticas em determinadas linhagens celulares. Estas alterações causam um mau funcionamento para a célula, escapando dos mecanismos fisiológicos de controle do crescimento e proliferação celular (LERARI, MENDONÇA, LIN, 2005). As células tumorais adquirem progressivamente, habilidades que as distinguem das células normais, conforme alterações genômicas são acumuladas ao longo do tempo. As habilidades adquiridas comuns em todas as neoplasias são: auto-suficiência de sinais proliferativos, insensibilidade a sinais inibitórios, potencial replicativo ilimitado, escape do mecanismo de apoptose (morte celular), e ao referir-se a tumores malignos, além das demais, também apresentam habilidade de invasão e metástases (HANAHAN, WEINBERG, 2000). Os tumores são classificados

utilizando-se critérios clínico (maligno ou benigno), morfológico (análise microscópica) e origem (FILHO, PEREIRA, GUIMARÃES, 2009).

Segundo estudo realizado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se 596 mil novos casos de câncer em 2016, com maior incidência entre mulheres 300.800, que em homens 295.200. Ainda segundo a mesma pesquisa, os tumores pediátricos corresponderiam a 3%, estimando-se assim cerca de 12.600 novos casos de câncer em crianças e adolescentes até 19 anos.

De acordo com o documento da Organização Mundial da Saúde (OMS), denominado *World Cancer Report 2014 da International Agency for Researchon Cancer (Iarc)*, o câncer é inquestionavelmente problema de saúde pública (OMS - IARC, 2014). Estudo realizado em 2012 pelo projeto Globocan/Iarc estima que 60% dos novos casos câncer e 70% dos óbitos previstos ocorrem em países em desenvolvimento. Este número vem aumentando rapidamente devido ao envelhecimento da população, sedentarismo, dietas pouco saudáveis e poluição, além disso, em países menos desenvolvidos ocorrem dificuldades em diagnosticar estas neoplasias em estágio inicial e deficiências no tratamento (OMS – GLOBOCAN/IARC, 2012). O câncer é a segunda maior causa de morte no Brasil, atrás apenas das mortes causadas por doenças cardiovasculares (INCA, 2014).

4.3.2 Fitoquímicos e Câncer

A possibilidade de que alguns compostos bioativos, presentes em plantas medicinais, possam apresentar efeitos que contribuem na prevenção e/ou tratamento do câncer traz como resultado intensa pesquisa por diferentes laboratórios em todo o mundo (COSTA-LOFUTO *et al.*, 2010; VIZZOTO, FETTER, 2009).

O tratamento de combate ao câncer pode envolver diferentes estratégias como excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, variando de acordo com o tipo de tumor e estágio de seu desenvolvimento. Um ponto importante a ser levado em consideração em relação a estes tratamentos convencionais, é que eles apresentam efeitos colaterais como náusea, vômito e caquexia, devido a danos ocasionados a células e tecidos saudáveis. Por esta razão e pelo fato de que esta doença apresenta altos índices de mortalidade, há uma contínua busca por compostos que possam contribuam no tratamento desta doença, buscando uma ação mais eficiente nas células cancerosas e menos agressivas às células não tumorais (ALI *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2015).

Os fitoquímicos alcaloides, saponinas, triterpenos, glicosídeos, polifenóis, entre outros, apresentam propriedades antitumorais (GAUTAM, MANTHA, MITALL, 2014). Em estudo, a *Campomanesia adamantium* demonstrou potencial no tratamento de câncer de próstata, pâncreas e mama, decorrente da presença do D-limoneno (VALLILO, BUSTILLOS, AGUIAR, 2006).

4.3.3 Tumor de córtex adrenal

O córtex adrenal faz parte da glândula adrenal, a qual está localizada na parte superior dos rins, composto por três regiões funcionais distintas. A zona glomerulosa é regulada pela angiotensina II e pelo potássio, secreta o hormônio aldosterona, responsável pela regulação do balanço eletrolítico. A zona fasciculada sintetiza o hormônio glicocorticóide, cortisol, o qual ajuda o organismo a controlar o estresse, reduzir inflamações, contribuir para o funcionamento do sistema imune e manter os níveis de açúcar no sangue e a pressão arterial constantes. A zona reticular é responsável pela produção de hormônios esteroides androgênicos (hormônios sexuais), Desidroepiandrosterona (DHEA) e Sulfato de Desidroepiandrosterona (S-DHEA), ambos regulados pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (SILVA, 2005; FREITAS, 2007).

Os tumores das glândulas adrenais são oriundos de diversos tipos histológicos, apresentam manifestações clínicas variadas, dependendo da produção ou não de hormônios. O tumor de córtex adrenal (TCA) é uma doença rara, correspondendo a cerca de 0,02% de todas as neoplasias, que pode ocorrer em qualquer idade, porém atinge principalmente a faixa etária abaixo de cinco anos ou acima de cinquenta anos. O TCA em crianças possui características parecidas em muitos países. No Paraná e em São Paulo, a doença possui na maioria dos casos, como origem principal, a mutação germinativa do gene supressor tumoral TP53 (PINTO *et al.*, 2011; ROMAN, 2006).

A incidência anual de Tumor de Córtex Adrenal em crianças no estado do Paraná é aproximadamente 15 vezes maior que a descrita em outros países, como exemplo nos Estados Unidos (PEREIRA *et al.*, 2004). As eventuais falhas em tratamentos, bem como a presença de efeitos colaterais indesejados, são em geral ocasionadas pela falta de especificidade do medicamento, o que direciona a procura por compostos mais específicos e acessíveis (ALMEIDA *et al.*, 2010).

De acordo com estudos dos Tumores Adrenais, identificam-se quatro estágios da doença. O estágio I e II corresponde a uma doença local que se diferenciam pelo tamanho do

tumor. O estágio III é considerado uma invasão local e metástase para os linfonodos e estágio IV, uma doença avançada, com metástases distantes do local de origem (LEE *et al.*, 1995; LONDON, 2011).

4.4 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

4.4.1 Sistema Imunitário

A principal função do sistema imunitário é proteger o organismo, eliminando ou neutralizando moléculas estranhas e ao mesmo tempo reconhecendo e tolerando partículas que pertencem ao organismo (TOBIN, 2006). O organismo inicia uma resposta inflamatória, assim que é exposto a um agressor, é um evento em que as células e mediadores trabalham para neutralizar e eliminar estímulos nocivos e manter a homeostase (MEDZHITOV, 2010; COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2006). A resposta não ocorre somente frente a um processo infeccioso, mas também diante de estímulos como radiação ultravioleta, danos mecânicos, substâncias tóxicas e alérgicas, alterações hormonais e estresse (ABBAS, 2008; KANITAKIS, 2002). Esta resposta é caracterizada por febre, leucocitose, migração de células inflamatórias e aumento na produção de proteínas pelo fígado (WAITZBERG, 2009). Embora seja um processo fisiológico e benéfico, os processos inflamatórios podem causar lesões teciduais quando respondem de maneira exacerbada ao agente agressor, estando envolvidos na patogênese e progressão de muitas doenças como asma, rinite, artrite, aterosclerose, esclerose múltipla, entre outras (ELTZSCHIG e ECKLE, 2011; MANDHANE, SHAH e THENNATI, 2011; VAN-ASSCHE *et al.*, 2011).

As inflamações são caracterizadas como sendo agudas ou crônicas inflamações agudas, menor tempo de exposição do agressor, permanecem por horas ou dias e apresentam-se com fenômenos exsudativos, permeabilidade vascular com formação de edema (acúmulo de líquido na região inflamada), fibrina, leucócitos e hemácias, a mesma pode evoluir para quadro de inflamação crônica. As inflamações crônicas persistem por semanas e meses, apresentando fenômenos proliferativos, com migração e proliferação local de monócitos e linfócitos (MONTENEGRO e FECCHIO, 1999).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra as infecções e pode muitas vezes, eliminar o agressor. Os mecanismos de imunidade inata encontram-se naturalmente no organismo, e são rapidamente ativados pelo agressor, antes do desenvolvimento das respostas imunes adaptativas. Consistem em barreiras físicas e mecânicas que retardam a entrada de

agentes agressores, tais como a pele, trato respiratório, membranas, mucosas, fluidos corporais, barreiras fisiológicas que inibem e eliminam o crescimento de microorganismos como a temperatura corporal, acidez gástrica; mediadores químicos que rompem as paredes celulares do agressor (lisozimas, interferon), barreiras celulares que eliminam o agressor (linfócitos “*Natural-Killer*”-NK, neutrófilos e macrófagos) (CRUVINEL *et al.*, 2010; ABBAS, 2008).

As respostas imunológicas adaptativas, mais poderosas, operam por último em uma infecção e são altamente específicas para o patógeno que as induz (DIEAMANT *et al.*, 2008). Mediada pelos linfócitos B e T, apresentam especificidade respondendo especificamente ao agressor, memória imunológica, respostas subsequentes ao mesmo antígeno são mais rápidas, maiores e melhores que a primeira, respondem por vias distintas a diferentes antígenos, aumentando a eficiência da defesa, possuem capacidade de auto limitar a resposta, pois produzem moléculas que auxiliam no término da resposta imune, para linfócitos B são as imunoglobulinas G4 (IgG4) e para T são as interleucinas IL-4 e IL-10 (CRUVINEL *et al.*, 2010; ABBAS, 2008).

Os leucócitos circulantes são ativados quando ocorre a entrada do patógeno no corpo humano, os mesmos desempenham sua função de defesa aderindo-se ao endotélio vascular e posteriormente migrando para o tecido intersticial até o local da lesão, através da sinalização dos mediadores quimiotáticos (citocinas e leucotrienos), fagocitando o agente agressor e o tecido que foi lesado durante a infecção (COUTINHO, MUZITANO, COSTA, 2009). As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por influenciar resposta inflamatória à infecção ou à sepse, as mais importantes são a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), sintetizadas por macrófagos e outros tipos celulares (linfócitos B e células dendríticas como precursores). Além da resposta inflamatória na fase aguda a IL-1 ativa as células dendríticas apresentadoras de antígenos, tendo como principais funções a diferenciação e proliferação de linfócitos B e T, de células “*Natural-Killer*”, indução de febre e proliferação de células da medula óssea. A produção aumentada de IL-1 e TNF- α por macrófagos e monócitos leva a um aumento da atividade fagocítica de macrófagos, podendo gerar choque, na sepse grave. Estas citocinas também atuam na resposta imunológica a tumores, aumentando a citotoxicidade às células tumorais (RUBEL *et al.*, 2011; WAITZBERG, 2009; COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2006; LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2008).

Os macrófagos são formas maduras de monócitos, e constituem um dos tipos de fagócitos, distribuindo-se amplamente nos tecidos, onde passam a desempenhar um papel

crítico na imunidade inata. Macrófagos defendem a homeostase local e sistêmica, iniciando uma série de eventos celulares e bioquímicos. Apesar de serem considerados componentes do sistema inato, possuem importante papel tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (celular e humoral) e estão claramente envolvidos nas respostas pró e anti-inflamatórias, pois secretam proteínas de sinalização, que ativam outras células do sistema e as recrutam para a resposta imune, além de atuarem como células de limpeza, eliminando células mortas e restos celulares (BOWDISH, *et al.*, 2007; JANEWAY *et al.*, 2002).

Os macrófagos também desempenham função como agentes de defesa contra tumores, pois produzem mediadores inflamatórios incluindo diferentes citocinas, óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido O_2^- e peróxido de hidrogênio H_2O_2) (COUSSENS, WERB, 2002; RUBEL *et al.*, 2010). O NO é um radical gasoso de curta duração e um potente metabólito reativo, uma das principais moléculas das células imunes contra células tumorais e outros patógenos. Apesar da produção de NO ter por princípio a proteção do hospedeiro a infecções, a produção excessiva de NO durante uma infecção causa danosos tecidos endoteliais, conferindo a esta molécula características de proteção e destruição de estruturas celulares (CHI *et al.*, 2003; MACMICKING, XIE, NATHAN, 1997). A atividade antimicrobiana e citotóxica do NO são aprimoradas por outros produtos dos macrófagos, como ácidos, glutathione, cisteína, peróxido de hidrogênio e superóxido. As espécies reativas de oxigênio são formadas por uma sequência de eventos bioquímicos, que acompanham o processo fagocitário tanto de macrófagos quanto de neutrófilos, que acarreta na absorção de oxigênio seguido pela formação de produtos reativos de oxigênio, reação normalmente chamada explosão oxidativa. A primeira reação que ocorre neste processo é a redução de um elétron de oxigênio, formando o superóxido (O_2^-), catalisado por NADPH oxidase ou NADH oxidase, diferindo pelo uso dos substratos (NADPH ou NADH), posteriormente convertido em H_2O_2 , pela enzima superóxido dismutase (ROOT, 1977). A produção do radical livre Ânion superóxido é uma das reações mais imediatas da resposta imune, o qual contribui para o estresse oxidativo em sítios inflamatórios, é necessário para a oxidação do LDL mediada por monócitos e altera as funções celulares como adesão e proliferação (RUEDA *et al.*, 2013). O controle da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também é importante para o funcionamento da resposta imune, pois elimina bactérias e previne infecções (CHO, HUNT, HUSSAIN, 2001). Estes Reativos de Oxigênio desempenham excelente papel antitumoral, porém possuem capacidade de induzir danos aos tecidos (RUBEL *et al.*, 2011). A habilidade dos macrófagos de produzir espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico pode aumentar a

sobrecarga oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e podem acelerar o processo de aterosclerose (WOO *et al.*, 2005).

4.4.3 Dieta e Sistema Imunitário

A recuperação de hábitos alimentares saudáveis é uma importante estratégia de promoção da saúde, mas, apesar do elevado número de opções, poucos incentivos para o consumo de espécies nativas são fornecidos pelas agências governamentais brasileiras, como exemplo o Guia Alimentar da População Brasileira (BRASIL, 2005), quanto a utilização de alimentos de espécies nativas, recomenda apenas o uso de mandioca, abacaxi e os frutos como goiaba e jabuticaba. A inclusão no consumo de plantas alimentícias nativas, além de aumentar o número de opções alimentares ricas em nutrientes capazes de prevenir doenças degenerativas, também promove o uso destas que muitas vezes são desperdiçadas (OLIVEIRA *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2008). Consumo de frutas está intimamente ligado à preocupação com a saúde, devido ao conteúdo nutricional dos mesmos, além de nutrientes essenciais, apresentam quantidades consideráveis de micronutrientes, como minerais, fibras, vitaminas e compostos bioativos, e as evidências que trazem a importância desses micronutrientes para a saúde humana são crescentes. (VASCO, RUALES, KAMAL-ELDIN, 2008).

Segundo alguns estudos a composição do microbioma intestinal é modulada por uma série de fatores, como características genéticas, hábitos de higiene e estilo de vida, bem como a ingestão de nutrientes (SEKIROV *et al.*, 2010; TURNBAUGH *et al.*, 2007). Desta forma o consumo de alimentos ricos em polifenóis atuam positivamente na microbiota humana, as bactérias digerem os fenólicos em metabólitos fisiologicamente relevantes e por outro lado, os polifenóis podem modular a composição microbiana (PARKAR, TROWER, STEVENSON, 2013; VALDES *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2016).

A disbiose da microbiota intestinal tem sido associada a um número crescente de doenças, obesidade, diabetes, doença inflamatória intestinal, asma, alergia, câncer e inclusive distúrbios neurológicos ou comportamentais. Uma microbiota saudável leva a um desenvolvimento humano saudável, este deve ocorrer nos primeiros anos de vida, começando durante a fase fetal (XIMENES, TORRES, 2017; SEKIROV *et al.*, 2010).

Estudos sugerem uma contribuição microbiana para o início ou progressão de doenças autoimunes. A microbiota intestinal e seus metabólitos demonstraram influenciar as funções imunológicas e a homeostase imune tanto no intestino quanto sistematicamente, também há

diferenças específicas de gênero na imunidade, com a formação da microbiota intestinal e concomitantemente pelo ambiente hormonal que governa as diferenças entre os sexos, pesquisas apontam relações hormonais e microbiota intestinal, onde bactérias são capazes de produzir hormônios (serotonina, dopamina e somatostatina), respondem aos hormônios do hospedeiro (estrogênios) e regulam a homeostase dos hormônios do hospedeiro, sugerem que a modulação da microbiota pode proteger contra doença autoimune (HIV). A composição da microbiota intestinal através do consumo dietético tem o potencial de resolver a inflamação crônica não controlada, através da alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal (RIZZETTO *et al.*, 2018).

4.5 CULTURA CELULAR

A Cultura celular pode ser compreendida como um conjunto de técnicas que permitem manter células ou tecidos isolados fora do organismo, mantendo suas características fisiológicas. Este tipo de técnica pode ser utilizado com diferentes propósitos, sendo um deles para estudos *in vitro*, os quais permitem verificar possíveis efeitos biológicos de diferentes compostos. A cultura celular primária é composta por células obtidas diretamente de um tecido humano ou animal e apresentam um tempo de vida curto, enquanto a cultura celular contínua é composta por linhagens celulares contínuas, cujas células sofreram processo de imortalização, adquirindo a capacidade de se multiplicar indefinidamente. As células de linhagens contínuas apresentam menor variação nos resultados obtidos, oferecendo maior reprodutibilidade e fidelidade dos dados (FRESHNEY, 2006).

Linhagens celulares mantidas a partir de células tumorais são utilizadas em estudos visando o desenvolvimento de novas abordagens para as doenças (BERZOFSKY *et al.*, 2004) e através destes estudos *in vitro* podem-se conhecer melhor os efeitos causados por agentes químicos e estimar os efeitos em humanos, pois apresentam reações e alterações a partir de estímulos, semelhantes aos encontrados no corpo humano (NOWICKA, WOJDYLO, SAMOTICHA, 2016; VALADARES, 2006). Os estudos que utilizam modelos celulares permitem uma série de investigações com diferentes aplicações.

A linhagem celular do Adenocarcinoma Humano H295R (tumor do córtex adrenal), a qual é uma variação da linhagem NCI-H295R, com características fisiológicas de células adrenais do feto humano e com capacidade de produzir os hormônios esteroidais encontrados no córtex adrenal adulto (GAZDAR *et al.*, 1990; STAELS *et al.* 1993; HARVEY, EVERETT, 2003; RAINEY, SANER, SCHIMMER, 2004), constitui um modelo útil para a

investigação *in vitro* dos efeitos citotóxicos de alguns extratos de planta, que podem ter resultados promissores no tratamento do carcinoma adrenocortical.

A linhagem celular de macrófagos peritoneais RAW 264.7, derivada de camundongos Balb/c, células imuno efectoras que desempenham papel relevante na defesa do organismo frente a patógenos, modelo celular útil para ensaios fagocitários, retenção lisossomal e adesão de macrófagos (DECS, 2018).

4.6 TIPOS DE EXTRAÇÃO

A obtenção de extratos vegetais pode ser realizada por diferentes métodos extrativos os quais incluem maceração, agitação magnética, percolação, decocção, refluxo (Soxhlet), extração em contra-corrente, extração assistida por microondas, ultra-som, fluido supercrítico e turbólise. De acordo com Tiwari *et al.* (2011), alguns fatores influenciam na extração, tais como a parte do vegetal utilizada, grau de processamento, teor de umidade, tamanho da partícula, capacidade de intumescimento, tempo de extração, temperatura, tipo e polaridade do solvente, bem como concentração do solvente utilizado.

A extração por Soxhlet é bastante utilizada em matrizes sólidas como na extração de substâncias em plantas. Este tipo de extração acontece de forma contínua, onde as partes da planta desejada são imersas no solvente, o qual entra em ebulição em aparelho acoplado a um condensador, de forma que o solvente evaporado durante o processo seja recuperado e retorne ao conjunto. Extração altamente eficiente empregando quantidade reduzida de solvente, mas devem ser tomadas precauções com a temperatura. Técnicas de extração que utilizam altas temperaturas podem ocasionar a destruição de compostos termossensíveis presentes nas matrizes sólidas dos vegetais (OLIVEIRA, *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2010).

Através da agitação magnética pode-se manter o material exposto ao solvente durante todo o período de extração, mantendo o mesmo sob agitação constante e com temperatura controlada o que possibilita melhor extração e evitando perdas de substâncias através de altas temperaturas (TOYOHARA *et al.*, 2015). Este é considerado um processo simples, pois consiste em empregar calor e agitação a fim de realizar a dissolução das substâncias presentes na amostra para o solvente extrator (CASTRO, CAPOTE, 2010).

A polaridade do solvente utilizado pode afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, interferindo diretamente na extração de polifenóis e outros metabólitos secundários e conseqüentemente na capacidade antioxidante que este extrato irá desempenhar (ROCKENBACH *et al.*, 2008; VONGSAK *et al.*, 2013; BAMPOULI *et al.*, 2014;

KARABEGOVIĆ *et al.*, 2014). Oliveira *et al.* (2016) concluiu em seu estudo que as técnicas de extração e a natureza do solvente extrator afetam diretamente nos rendimentos extrativos e no teor de metabólitos presentes, podendo interferir em atividades biológicas e farmacológicas.

Nas matrizes vegetais caules, raízes, polpas e folhas são encontrados os compostos fenólicos, que são um dos maiores responsáveis pela atividade antioxidante (KOOLEN *et al.*, 2013). O teor desses compostos pode ser influenciado por fatores como espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de maturação, condições de colheita e armazenagem (VIEIRA *et al.*, 2011). O tipo de solvente utilizado, assim como as condições de extração (tempo, temperatura, por exemplo) tem efeito na eficiência de extração dos compostos fenólicos da matriz alimentícia. Os solventes com maior eficiência de extração são os hidroalcoóis, tais como metanol70% e etanol70%, podendo ocorrer variações devido a grande diversidade de compostos fenólicos (BATAGLION *et al.*, 2014) e por apresentarem diferentes graus de polarização (NACZK, SHAHIDI, 2004), influenciando na eficiência de extração. Vale ressaltar que as diferenças podem ser atribuídas à metodologia de extração utilizada, a quantidade de reagentes, as condições de reação e ao comprimento de onda de leitura. Quando se faz a extração com álcool (por exemplo etanol ou metanol), obtêm-se os compostos fenólicos presentes na fração hidrofílica da polpa, enquanto a extração usando hexano, obtêm-se os compostos fenólicos presentes na fração lipofílica do vegetal.

O solvente n-hexano é um solvente pouco polar, e seus extratos apresentam compostos bioativos da classe dos terpenos, com os sesquiterpenos, triterpenos e esteróis (DE PASCUAL *et al.*, 1985; HA *et al.* 2009; CÁCERES-CASTILLO *et al.*, 2008), estes apresentam atividade tóxica frente a alguns organismos como *Artemia Salina* (crustáceo) (ADOUM, 2009), triterpenos ácidos como o ácido oleanólico e ácido ursólico também apresentam grande capacidade tóxica (MOREIRA *et. al.*, 2003; LEE *et al.*, 2002). Algumas espécies de plantas apresentam atividade antibacteriana e antifúngica somente em suas frações hexânicas, como é o caso da *E. catharinae* que apresentou atividade tóxica somente no extrato bruto de etanol e nas frações insolúvel de hexano, outras espécies da Família Mirtaceae, testadas também apresentaram a fração hexano como a mais ativa contra fungos (MORESCO, PIZZOLATTI, BRIGHENTE, 2012). No extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens* foram encontrados duas chalconas e quatro flavanonas (CARDOSO *et al.*, 2010). Segundo estudos de Bandgar *et al.* (2010), flavanonas e chalconas são conhecidas por apresentarem várias atividades farmacológicas entre elas citotóxica, anti-inflamatória, antiangiogênica, antipirética, analgésica.

5. METODOLOGIA

5.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Os frutos e as folhas da *Campomanesia xanthocarpa* Berg, foram coletados no município de Laranjeiras do Sul, localizado na região Centro-Sul do Estado do Paraná (25° 24' 28" S 52° 24' 57" O), no mês de Dezembro de 2016. Coletados no primeiro horário do dia, de forma manual, com temperatura ambiente variando em torno de 23 ± 2 °C, durante a coleta.

A coleta dos materiais (folhas e frutos) foi realizada por Amostragem ao acaso, estratificada, de forma representativa atingindo todas as partes da árvore (frutos e folhas dos 4 sentidos cardeais da planta, alto, baixo e no interior da mesma), as amostras foram retiradas de várias árvores. Em relação aos frutos, foram colhidos maduros, em estágio considerado adequado para o consumo, com coloração da casca predominantemente amarela/laranjada, pois como há evidências, frutos neste estágio de maturação, possuem maior quantidade de compostos bioativos (SANTOS *et al.*, 2011). Foi coletado aproximadamente 1 kg de frutos e 100 unidades de folhas, em cada árvore.

O material utilizado foi identificado como pertencente à *Campomanesia xanthocarpa* Berg, pelo Técnico Laboratorista Diogo José Siqueira (Biólogo e Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável), a partir da avaliação morfológica dos ramos, folhas, flores e frutos, e comparados com descrições existentes na literatura, posteriormente o mesmo foi armazenado no Herbário da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus de Laranjeiras do Sul- PR (UFFS-LS).

Após a coleta, tanto os frutos, quanto as folhas, foram selecionados de acordo com ausência de injúrias, super amadurecimento, presença de furos ou quaisquer danos. Efetuou-se a sanitização com hipoclorito de sódica concentração de 15 mL/L, imersos por 15 minutos, seguido de enxague em água destilada.

Os frutos foram separados em porções de 100 g e embalados em embalagens de polietileno, posteriormente armazenados em ultrafreezer à temperatura de congelamento de - 80 °C, até o momento de sua utilização. As folhas passaram por processo de desidratação, em Estufa de Secagem e Esterilização com circulação e renovação de ar, por 37 h a 35 °C. Posteriormente, o material foi pulverizado em Moinho de Rotor Martelo. Em seguida,

embalado em polietileno recoberto com alumínio, desta forma evitando-se o contato com a luz ambiente, mantidas em temperatura ambiente até sua utilização.

Para o despulpamento, os frutos foram descongelados em refrigerador convencional ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) e posteriormente a polpa foi separada das cascas e sementes com o auxílio de peneira de 0,6 mm, previamente higienizada.

5.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As análises químicas de quantificação e extração de compostos bioativos, bem como a quantificação da atividade antioxidante por radicais sintéticos foram realizadas nos laboratórios de Alimentos de UFFS-LS. Já as análises com linhagens celulares foram realizadas no Laboratório do Instituto Pelé Pequeno Príncipe em Curitiba/PR. Para pesquisa foram utilizados somente reagentes P.A.

5.2.1 Extração Sob Agitação Magnética

Para elaboração dos extratos brutos utilizou-se como solventes o etanol 70% e n-hexano realizada no Laboratório de Alimentos da UFFS-LS, sob proteção da luz e com temperatura condicionada a 25°C . Seguiu-se a metodologia utilizada por Oliveira Fernandes *et al.* 2015, com adaptações, onde utilizou-se 10 g da amostra folha ou/e 20 g da amostra polpa, submetidos a 100 mL de solvente (etanol 70% ou n-hexano), sob agitação magnética constante, no período de 1 hora e com temperatura controlada de 37°C , a mistura foi filtrada com o auxílio de papel filtro, o resíduo da filtração foi extraído mais duas vezes com 100 mL do respectivo solvente. Posteriormente os filtrados foram combinados e concentrados em Rotaevaporador com pressão reduzida. Em seguida o extrato concentrado foi levado para estufa, a 37°C visando à evaporação total de todos os solventes e obtendo-se assim os extratos secos da Folha (**F-et70 e F-hex**) e da Polpa (**P-et70 e P-hex**). Todos os extratos foram armazenados em frascos âmbar, protegidos da luz, umidade e altas temperaturas, para posteriores análises.

5.2.2 Extração por Soxhlet

Método descrito por Franz Von Soxhlet em 1879, onde, o solvente extrator é continuamente renovado na câmara de extração, por destilação, convertido em um líquido que goteja no filtro contendo o material que sofre respectivas lavagens (Percolação).

A elaboração dos extratos brutos foi realizada no Laboratório de Alimentos da UFFS-LS, realizada sob proteção da luz e a temperatura condicionada a 25 °C. Foi utilizado como solvente extrator o etanol 70% (v/v). Onde foram utilizados 10 g das folhas e 20 g da polpa, submetidas a 200 mL de solvente, o qual inicia o processo com as amostras imersas em solvente e envoltas por papel filtro, evitando que as mesmas extravasassem, o refluxo manteve-se por 3 horas (SKALICKA-WOZNIAKGLOWNIAK, 2012).

Após os extratos foram filtrados com o auxílio de papel filtro e concentrados em Rotaevaporador com pressão reduzida. Em seguida o extrato concentrado foi levado para estufa á 37 °C, visando à evaporação total do solvente e obtendo-se assim os extratos secos da Folha (**SF-et70**) e da Polpa(**SP-et70**). Todos os extratos foram armazenados em frascos âmbar, protegidos da luz, umidade e altas temperaturas, para posteriores análises.

Rendimento dos extratos brutos

Para determinação da quantidade de extrato obtido, a partir de cada solvente foi utilizada a equação: $REB = MF / MI \times 100$.

Onde:

REB - rendimento de extrato bruto, em %

MF - massa final em g

MI - massa inicial em g

5.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

5.3.1 Compostos Fenólicos Totais

Realizada através do método de *Folin-Ciocalteu* (BUCIC-KOJIC *et al.*, 2007) com modificações. Onde utilizou-se como reagente *Folin-Ciocalteu* 10% e os extratos secos foram diluídos em seus respectivos solventes (1:1 v:v). Para determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se a microplaca com poços de 280 µL, em cada poço foram pipetados 209 µL de água, em seguida adicionou-se as amostras de extratos, sendo 5 µL dos extratos de F-et, F-hex e P-et, e 44 µL de *Folin-Ciocalteu* a 10 %, após 4 min adicionou-se 22 µL de

Carbonato de Sódio a 7,5%. A placa foi mantida em repouso, na ausência da luz, por 2 h e posteriormente, realizada a leitura, com leitor de microplacas, em comprimento de onda de 765 nm, descontando o valor do branco de cada medida (todos os reagentes menos o extrato). Para quantificação de compostos fenólicos presentes no extrato P-hex, foi necessário utilizar 50 µL de amostra, reduzindo-se desta forma a quantidade de água adicionada ao poço para 164 µL, as demais substâncias mantiveram as mesmas medidas de adição. O experimento foi realizado em triplicata.

Uma curva padrão foi elaborada com ácido gálico nas concentrações de 0; 4,46; 8,92; 17,85; 35,7 e 71,42 mg de EAG/L. Os resultados foram expressos em µg Equivalente de Ácido Gálico/g de amostra (KWIATKOWSKI *et al.*, 2010).

5.3.2 Clorofilas e Carotenoides

Realizada através do método de Lichtenthaler (1987), onde utilizou-se os extratos secos. Para quantificação utilizou-se 2 mg de cada extrato e homogeneizou-se com 5 mL de acetona a 80% (v:v). O material foi centrifugado com Força G de 1788,80 g (Força Gravitacional) por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se esse volume com acetona a 80% (v:v). Para valor de branco utilizou-se leitura de acetona 80%. A absorbância da solução foi obtida por espectrofotometria a 647, 663 e 470 nm. Os teores de clorofilas totais, 'a', 'b' e de carotenoides totais foram calculados através de equações abaixo (eq.1, 2, 3 e 4) estabelecidas por Lichtenthaler (1987), quando utiliza-se acetona 80% (v:v):

$$\text{Clorofilas totais} = 7,15 (A_{663}) + 18,71 (A_{647})$$

$$\text{Clorofilas 'a'} = 12,25 (A_{663}) - 2,79 (A_{647})$$

$$\text{Clorofilas 'b'} = 21,50 (A_{647}) - 5,10 (A_{663})$$

$$\text{Carotenoides totais} = [1000 (A_{470}) - 1,82 \text{ Chl 'a'} - 85,02 \text{ Chl 'b'}] / 198$$

Ao final multiplicaram-se os resultados pelo volume de amostra. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em ng/gdeextrato.

5.3.3 Flavonoides

Os flavonoides totais foram quantificados através da metodologia de Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), onde utilizou-se 175 μL de cada extrato diluídos em seus respectivos solventes (v:v 1:1). Em microplaca adicionou-se 25 μL de água destilada, 175 μL de extrato, exceto ao branco onde adicionou-se metanol P.A no lugar do extrato, seguindo-se com adição de 9 μL de Nitrito de Sódio a 10% (NaNO_2) aguardou-se 5 minutos, posteriormente adicionado 9 μL de Cloreto de Alumínio (AlCl_3) aguardou-se 6 minutos, seguindo com adição de 60 μL de Hidróxido de Sódio (NaOH), a leitura foi efetuada em comprimento de onda de 510 nm.

Uma curva padrão foi elaborada com padrão de Catequina, nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 μg de Equivalente de Catequina/g de extrato.

5.3.4 Cumarinas

A curva de cumarina foi realizada com padrão primário (1,2-benzopirona – 99%), utilizando 8 (oito) concentrações diferentes 0 μg ; 4,8 μg ; 5,76 μg ; 6,72 μg ; 7,68 μg ; 8,64 μg ; 9,60 μg e 10,56 $\mu\text{g/g}$, as quais foram diluídas em solução estoque de metanol 80% (metanol/água 80:20).

A quantificação deste composto foi realizada através da metodologia de Amaral *et al.*, (2009) com algumas modificações, onde utilizou-se 0,5 mL de cada extrato diluídos em seus respectivos solventes (v:v 1:1). Em um balão volumétrico de 25 mL adicionou-se 0,5 mL de extrato e completou-se com a solução estoque de metanol 80%, os quais foram agitados. Para leitura de branco utilizou-se apenas a solução estoque sem adição de extrato. Realizou-se a leitura em triplicata, utilizando-se cubetas de quartzo em espectrofotômetro comprimento de onda de 275 nm. Resultados expressos em μg de Equivalente de Cumarina/g de extrato.

5.3.5 Taninos

Os teores de taninos nos extratos foram obtidos por dissolução de cada extrato bruto em seus solventes (v:v 1:1). Em tubos falcon de 15 mL foram adicionados os extratos (F-et e S-Fet 0,1 mL de extrato; F-hex, P-et e SP-et adicionados 0,5 mL de extrato; e P-hex 2 mL de extrato) adicionou-se água destilada em cada tubo até completar, juntamente com os extratos, 3 mL de solução. Posteriormente adicionou-se 1 mL do reagente de Folin-Denis e a solução resultante foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 3 min. Seguindo-se com a

adição de 1 mL de carbonato de sódio a 8%, esta mistura foi agitada e permaneceu em repouso por 2 h. Seguindo-se este tempo a amostra foi centrifugada com Força G de 4,47 g para a remoção de matérias em suspensão, e posteriormente a mesma foi plaqueada em placas de poços para leitura em comprimento de onda de 725 nm (SIEGLER *et al.*, 1986). Para confecção da curva de calibração foram preparadas soluções de 0; 0,004; 0,01; 0,04; 0,2 e 0,2 g/mL de ácido tânico P.A diluído em água. Para o branco utilizou-se 3 mL de água destilada, 1 mL de Folin-Denis e 1 mL de carbonato de sódio a 8%. Resultados expressos em µg de Equivalente de Ácido Tânico / g de amostra.

5.5 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* ATRAVÉS DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES

5.5.1 Radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil)

A atividade antioxidante pode ser expressa pela capacidade de certos compostos presentes na planta em eliminar radicais livres e evitar assim, o estresse oxidativo o qual causa danos às células. Com finalidade de determinar a capacidade antioxidante presente nos extratos da polpa e da folha da *Campomanesia xanthocarpa*, foram realizadas análises para capturar o radical estável DPPH, levando-o ao estado reduzido, conseqüentemente diminuindo a sua absorbância, de modo que a partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que as amostras apresentam, ou não, potencial antioxidante.

A Atividade antioxidante frente ao Radical DPPH, vou verificada através do método descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.*, (1995), onde utiliza-se uma solução mãe de DPPH (24 mg de DPPH em 100 mL de metanol P.A.). Para curva de calibração utilizou-se uma solução mãe de Trolox 4000 µM (5 mg de trolox diluído em metanol até completar um balão volumétrico de 5 mL). Utilizou-se como concentrações para os pontos da curva 0; 60; 400; 600; 800; 1000 e 2000 µM de Trolox.

Para realizar as análises a solução de trabalho de DPPH foi ajustada para 1,08 a 1,12 nm em comprimento de onda de 515 nm. Adicionou-se 273 µL do radical DPPH ajustado e 7 µL de cada extrato na microplaca (extratos diluídos em seus próprios solventes - v:v), os mesmos foram agitados por 30 s e a leitura realizada em absorbância de 515 nm em intervalos de 2 minutos até estabilizar a leitura. Ressalta-se que os extratos provenientes da Folha da *Campomansia xanthocarpa*, que utilizaram como solvente etanol 70% sofreu dissolução de

50 vezes. Para leitura de branco utilizou-se etanol 70% e n-hexano P.A. no lugar dos extratos. Leituras realizadas em triplicata. Resultados expressos em μg de Equivalente de Trolox/g de extrato.

5.5.2 Radical ABTS (2,2-AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonicacid) diammoniumsalt)

Um dos métodos utilizados para medir a atividade antioxidante é através da geração do radical ABTS, de cor azul esverdeada, formado pela reação de persulfato de potássio com 2,2-azino-bis(3-etilbezotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS), produzindo a sua oxidação. A atividade antioxidante da amostra é determinada pela descoloração do ABTS⁺, medindo-se a redução do radical a uma absorvância de 734 nm, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Utilizou-se como solução estoque de ABTS 7 mM (192 mg de ABTS em água destilada e completar o volume para 50 mL em um balão volumétrico com água destilada) para solução de persulfato de potássio 140 mM (378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada e completar o volume para 10 mL em um balão volumétrico). Para o preparo do radical ABTS⁺ utilizou-se 5 mL da solução estoque de ABTS 7 mM com 88 μL da solução de persulfato de potássio 140 mM. Manteve-se esta mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluir 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorvância de $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm (RE *et al.*, 1999). A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução de Trolox 4000 μM (5 mg de trolox e diluído em metanol P.A., transferida para um balão volumétrico de 5 mL até completar o volume. Os pontos da curva foram 0; 60; 100; 400; 800 e 2000 μL de Trolox.

Para verificar a atividade antioxidante dos extratos utilizou-se a solução de ABTS ajustada a absorvância para $0,70 \pm 0,05$ nm a 734 nm. Adicionou-se 3 μL dos de cada extrato na microplaca (extratos diluídos em seus próprios solventes – v:v) seguido pela adição de 277 μL do radical ABTS⁺ recentemente preparado. Agitou-se por 5 segundos diretamente do leitor de microplacas. Permanecendo no escuro por 6 minutos em temperatura ambiente, leu-se a absorvância a 734 nm. Para leitura de branco utilizou-se os solventes (etanol 70% e n-hexano P.A.), leituras realizadas em triplicata. Ressalta-se que os extratos provenientes da Folha, que utilizaram como solvente etanol 70% sofreram diluição de 10 vezes. Os resultados foram expressos em μg de Equivalente de Trolox/g de extrato.

5.6 LINHAGENS CELULARES

A sub-linhagem H295R (tumor de córtex adrenal) e a linhagem RAW 264.7 (macrófagos murinos), foram cedidas pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, localizado na cidade de Curitiba – Paraná. Os testes e ensaios com as linhagens celulares também foram realizados no Instituto citado.

As duas linhagens celulares, células H295R e células RAW 264.7, foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com Soro Fetal bovino a 10% (SFB) e 1% de antibiótico (Estreptomicina e penicilina). Foram incubadas $8 \cdot 10^4$ células por poço, durante 24 horas, para permitir a aderência das células nestes poços. Após a aderência, as células foram tratadas com os extratos F-et70, F-hex, P-et70 e P-hex, os quais foram diluídos sob agitação em meio de cultura (1:1 mg:mL), e posteriormente filtrados com auxílio de filtro de seringa com membrana de poros de $0,22 \mu\text{m}$ (o extrato F-hex foi submetido a 0,2% de etanol absoluto e mantido sob agitação por 20 h, porém não foi possível solubilizar todo o extrato, permanecendo cerca de 5% da amostra no falcon). Para testar seus efeitos foram utilizadas quatro concentrações diferentes (100 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$), sendo as células da linhagem RAW 264.7 incubadas por 24 horas e a linhagem H295R por 48 horas, ambas a 37°C , utilizando-se incubadora de atmosfera modificada (UV 37°C e 5% de CO_2) e posterior realização dos ensaios. As células foram preparadas e submetidas aos extratos em fluxo laminar.

5.6.1 Toxicidade dos extratos - teste de MTT

O método MTT é utilizado para quantificar a citotoxicidade para o crescimento ativo de alvos *in vitro*, suas principais vantagens são a sensibilidade, a reprodutibilidade e a eliminação do uso de compostos radioativos (FERRARI, FORNASIERO, ISETTA, 1990; MOSMANN, 1983). Células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em formazan de cor púrpura. Células mortas não possuem a capacidade de converter MTT em formazan, desta forma a formação de cor é utilizada como um marcador para células viáveis, a quantidade de sinal gerado depende de vários parâmetros, como a concentração de MTT, a duração do período de incubação, o número de células viáveis e sua atividade metabólica. Este ensaio tem como princípio a absorção do sal {Brometo de [3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]} pelas células viáveis, que o reduzem, no interior da mitocôndria (RISS *et al.*, 2016; MOSMANN, 1983; SLADOWSKI *et al.*, 1993).

Atoxicidade dos extratos foi mensurada pela viabilidade celular da linhagem H295R em ensaio MTT, com metodologia adaptada de Santos (2010). Para este ensaio foi aspirado o conteúdo de todos os poços e adicionado aos mesmos a solução de MTT 0,5 mg/mL, incubou-se a placa por 3 horas a 37 °C. Após este tempo aspirou-se novamente o conteúdo dos poços e foi adicionado 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) aos mesmos. A placa permaneceu para incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente bateu-se levemente na placa para auxiliar a dissolução dos grumos de corante, seguida pela leitura com Leitora de Microplaca em comprimento de onda de 595 nm.

5.6.2 Atividade Fagocitária de Macrófagos

A atividade fagocitária em macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi realizada através da quantificação de zimosan incorporados pelas células de acordo com Pipe *et al.* (1995).

Para realização do experimento foi plaqueado 100 µL de solução de células, com exceção do branco onde adicionou-se PBS, foram incubadas por 1 hora a 37 °C, posteriormente descartado o sobrenadante e lavado com 100 µL de PBS, seguido pela adição de 10 µL de Zimosan corado com vermelho neutro (Solução para fagocitose), inclusive no branco. Incubou-se por 30 minutos a 37 °C, e foi adicionado 100 µL de Fixador de Baker, inclusive no branco, incubado por mais 30 minutos a 37 °C. Centrifugado por 5 minutos em Força G de 251,55 g e descartar o sobrenadante. Adicionou-se 100 µL de solução de extração,

inclusive no branco, e incubado por 30 minutos. Posteriormente realizou-se a leitura com Leitora de Microplaca em comprimento de onda de 550 nm.

5.6.3 Volume Lisossomal/ Captação do Vermelho Neutro

O ensaio da captação do vermelho neutro pelas células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi realizado através da metodologia de Pipe *et al.*, (1995). Onde plaqueou-se 100 μ L de solução de células e adicionado 100 μ L de PBS no branco, foram incubados por 1 hora a 37 °C, posteriormente adicionou-se 20 μ L de vermelho neutro 2%, inclusive no branco e novamente levado para incubadora durante 30 minutos a 37 °C. Centrifugou-se por 5 minutos em Força G de 251,55 ge o sobrenadante foi descartado. Seguido pela adição de 100 μ L de Solução de Extração, inclusive no branco, incubados por mais 30 minutos a 37 °C. Após este período foi realizado a leitura com Leitora de Microplaca, em comprimento de onda de 550 nm.

5.6.4 Ensaio de Adesão de Macrófagos

Para realização do ensaio de Adesão de Macrófagos, utilizou-se a linhagem RAW 264.7, e seguiu-se a metodologia de Rosen e Gordon (1987). Foi plaqueado 100 μ L da solução de células e no branco adicionar 100 μ L de PBS, incubar por 1 hora a 37 °C. Descartou-se o sobrenadante e os poços foram lavados com 200 μ L de PBS duas vezes, procurando tirar os grumos com cuidado. Foi adicionado 150 μ L de Metanol 50%, inclusive no branco e novamente a placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Descartado o sobrenadante, adicionou-se 100 μ L de solução de Giemsa 0,2%, inclusive no branco. E incubou-se por 40 minutos em temperatura ambiente. Após este período os poços foram novamente lavados com 200 μ L de PBS duas vezes, e adicionado 200 μ L de Metanol 50%, inclusive no branco. Incubou-se por mais 30 minutos em temperatura ambiente. E seguiu-se com a leitura com Leitora de Microplaca, em comprimento de onda de 550 nm.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por análise de variância One-Way ANOVA, seguida por pós Teste de Tukey, com significância estatística $p < 0,05$. Utilizou-se o programa estatístico/software Graph Pad Prism 5.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos dos extratos brutos obtidos das folhas e das polpas da guabirobeira podem ser observados na Tabela 1, os extratos com maior rendimento foram os produzidos com solvente etanol 70%, destes os da folha apresentaram maior percentual ao final da extração.

Tabela 1. Rendimentos dos extratos brutos etanólicos e hexânicos (g e%) da *Campomanesia xanthocarpa* Berg.

Parte da Planta	Massa (g)	Método de Extração	Solvente	Rendimento do extrato (g)	Rendimento do extrato (%)	Sigla
Folha	10	Ag. Mag.	Etanol 70%	5,246	52,46	F-et
Folha	10	Ag. Mag.	n-hexano	0,125	1,5	F-hex
Polpa	20	Ag. Mag.	Etanol 70%	4,160	20,8	P-et
Polpa	20	Ag. Mag.	n-hexano	0,312	1,56	P-hex
Folha	10	Soxhlet	Etanol 70%	0,577	5,77	SF-et
Polpa	10	Soxhlet	Etanol 70%	0,393	3,93	SP-et

Fonte: Autor, 2018.

6.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

6.1.1 Compostos Fenólicos Totais

A análise quantitativa dos compostos fenólicos nos diferentes extratos da Folha e da Polpa da *Campomanesia xanthocarpa* Berg apresentou diferenças significativas entre os extratos da folha (F-et e F-hex) e polpa (P-et e P-hex) e entre os extratos Etanol e Hexano ($p < 0,05$). A extração com Etanol 70% teve maior eficiência na obtenção deste composto bioativo, pois ambas as partes da planta apresentaram maiores quantidades em comparação com a extração por Hexano (Figura 2). A concentração de compostos fenólicos encontrada no grupo F-et foi $228,1 \pm 3,77 \mu\text{g EAG/g}$ de extrato, sendo consideravelmente maior que as concentrações dos demais grupos. O grupo P-et, apresentou redução de 89% em comparação ao grupo F-et ($25,71 \pm 0,51 \mu\text{g EAG/g}$ de extrato), e o grupo P-hex apresentou redução de 99% na concentração quando comparado ao grupo P-et. O teor de compostos fenólicos dos grupos F-hex e P-hex, foram respectivamente, $3,61 \pm 0,2 \mu\text{g EAG/g}$ e $0,1 \pm 0,01 \mu\text{g EAG/g}$ de extrato.

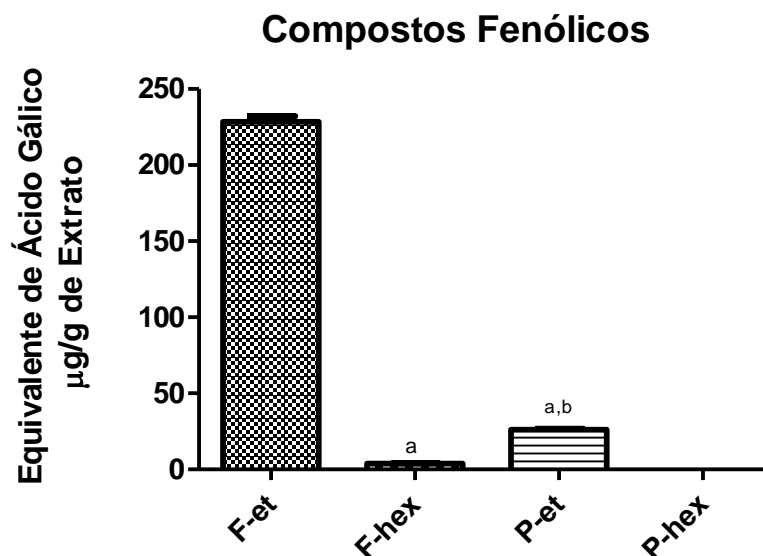


Figura2. Compostos Fenólicos presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha extraída com n-hexano (F-hex), Polpa extraída com etanol 70% (P-et) e Polpa extraída com n-hexano (P-hex).

Onde^a apresenta diferença significativa quando comparado ao grupo F-et ($p < 0,05$); b apresenta diferença significativa quando comparado ao grupo P-hex ($p < 0,05$).

O método de extração é uma variável importante na obtenção de compostos ativos. A Figura 3 demonstra resultados obtidos a partir de diferentes métodos de extração, sendo os grupos F-et e P-et extraídos sob Agitação Magnética a 37 °C, enquanto os grupos SF-et e SP-et foram extraídos sob Refluxo em Aparelho Soxhlet à temperatura de ebulição do solvente (aproximadamente 78,4 °C). Para os extratos de folha, os resultados obtidos demonstraram que a extração sob agitação magnética foi 51% maior do que a extração por Soxhlet (F-et = 228,1 ± 3,77 µg EAG/g; SF-et = 151,1 ± 1,81 µg EAG/g). No entanto, para os extratos de polpa, a extração por agitação magnética foi 49 % menor em comparação ao outro método (P-et = 25,71 ± 0,51 µg EAG/g; SP-et = 50,35 ± 0,77 µg EAG/g).

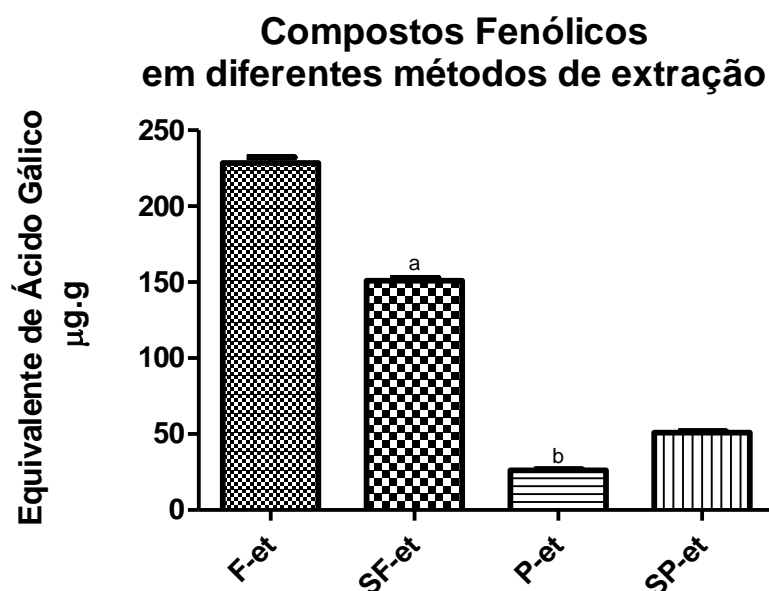


Figura 3. Compostos Fenólicos presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg, extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%). Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et). Onde ^a $p < 0,05$ comparado com F-et. ^b $p < 0,05$ comparado a SP-hex.

Estudos recentes encontraram altas concentrações de compostos fenólicos em polpa de Guabiroba (ALVES *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2011). Em extrato hidroalcolico (metanol 50%) da polpa da *C. xanthocarpa*, o valor de compostos fenólicos encontrado foi 32 vezes maior que o presente estudo (817 µg/g de massa fresca) (SOUZA, FASSINA e SARAIVA, 2018). Compostos fenólicos (8510 µg/g) extraídos de frutos da *Campomanesia cambessedeanana* Berg, em acetona 80% apresentaram ação antioxidante e antiproliferativa em linhagem celular HepG2 (tumor hepático humano) (MALTA *et al.*, 2013). DONADO-PESTANA e colaboradores encontraram concentrações de 2,26 mg EAG/mL a 4,01 mg EAG/mL, extraídos por etanol 80% do fruto da *C. Phae* O.Berg (DONADO-PESTANA *et al.*, 2015). A espécie *Eugenia stipitata*, pertencente à família *Myrtaceae*, possui frutos ricos em terpenos, compostos voláteis, fibras e vitamina C, a qual apresentou concentrações de polifenóis totais de 1840,5 µg/g, em extrato etanólico determinado pelo Método de *Folin-Ciocalteu* (NERI-NUMA *et al.*, 2013). A extração com hexano em frutos de *C. pubescens* também encontrou concentrações altas de compostos fenólicos totais (85,09 µg EAG/mL) (CARDOSO *et al.*, 2013).

BATISTA *et al.*, (2017) também encontrou altas concentrações de compostos fenólicos totais em extração por metanol 80% presentes na polpa (1582,60 µg/g) e nas folhas

(53770,8 µg/g) de *Syzygium malaccense*, planta da mesma família da *Campomanesia xanthocarpa*. LIMBERGER *et al.* investigaram a composição química e efeito hipotensor em ratos Wistar de folhas de *C. xanthocarpa* extraídas por infusão encontrando concentração de compostos fenólicos de 3,7360 mg de EAG/mL (LIMBERGER *et al.*, 2016).

Coutinho *et al.* (2008) realizou extrações com metanol (100%) de folhas de *C. adamantium* e encontrou valores de compostos fenólicos totais variando entre 7200 a 21200 µg/g de extrato. Em extração aquosa (100 °C) de folhas da *C. xanthocarpa*, SANT'ANNA *et al.* encontraram valores superiores (3730 µg EAG/mL) aos encontrados no presente estudo (SANT'ANNA *et al.*, 2017). Em estudo sobre os efeitos antioxidantes e anti-hiperlipidêmicos da *C. adamantium* também foi testada quanto ao seu perfil químico, através de extrato aquoso onde foram identificados a presença de ácido gálico e ácido elágico, 2,83±0,01 e 15,48±0,50 µg/mg de extrato, respectivamente (ESPINDOLA *et al.*, 2016).

Os valores encontrados na literatura podem ter sido diferentes dos apresentados por este estudo devido a diferenças metodológicas. Por exemplo, alguns estudos foram realizados em plantas de Cerrado, local cujo solo apresenta baixas concentrações em nutrientes, situação onde o estresse pode ativar a síntese de metabólitos secundários como os compostos fenólicos (IGNAT, VOLF, POPA, 2011; CARVALHO, MARCO JÚNIOR, FERREIRA, 2009). Outras variáveis a serem consideradas são o tipo de solvente de extração (ex: metanol 70%) e espécie estudada (ex: *Campomanesia adamantium*).

6.1.2 Clorofilas

O teor de clorofila encontrado nos diferentes extratos das folhas e da polpa da guabirobeira apresentou diferenças significativas, o extrator hexano mostrou-se mais eficiente para extração de clorofila da folha quando comparado ao etanol 70%, o grupo F-hex foi o que apresentou maior teor de clorofila, 62% a mais que o grupo F-et e 92% mais que o P-hex (Figura 4). O extrato P-et por sua vez, foi mais eficiente na extração de clorofila da polpa, extraíndo aproximadamente 42% mais quando comparado ao grupo P-hex, porém obteve menor teor de clorofila quando comparado com o F-et. Como esperado as folhas apresentaram mais clorofila que a polpa. (F-hex 88,11±1,7 ng/g de extrato; F-et 33,19±0,95 ng/g de extrato; P-et 12,28±1,46 ng/g de extrato e P-hex 7,13±0,93 ng/g de extrato).

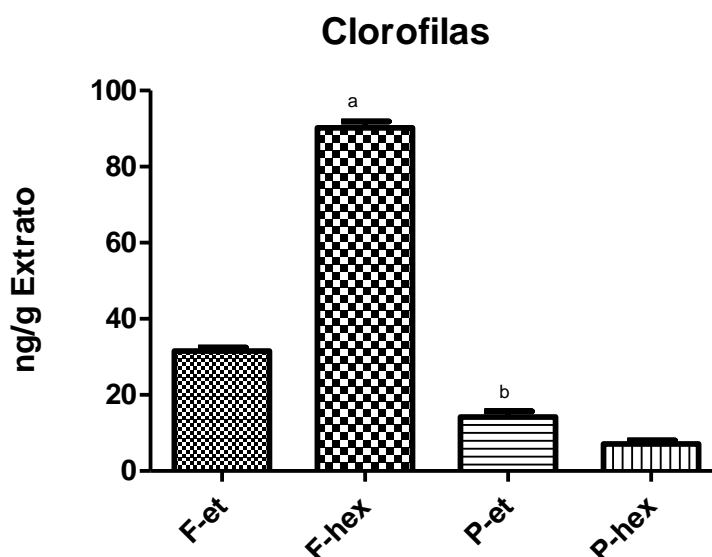


Figura 4. Clorofilas presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex).

Onde ^a^b $p < 0,05$ comparado com F-et e P-hex.

As concentrações de clorofila obtidas a partir de diferentes métodos de extração podem ser observadas na Figura 5. Não foi possível observar diferença significativa entre os extratos da mesma amostra, porém o método extrativo com aparelho Soxhlet extraiu maior quantidade do composto (SF-et $34,68 \pm 3,31$ ng/g de extrato; F-et $33,19 \pm 0,95$ ng/g de extrato; SP-et $16,77 \pm 3,09$ ng/g de extrato e P-et $12,28 \pm 1,46$ ng/g de extrato).

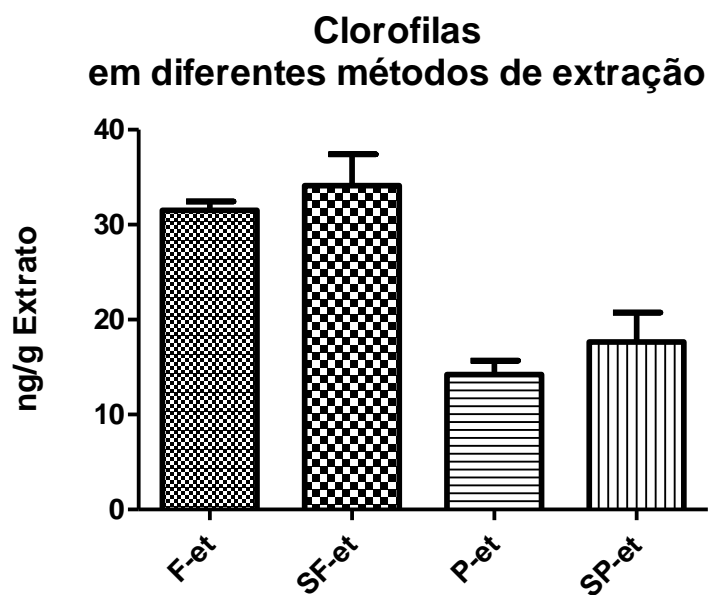


Figura 5. Clorofilas presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg, extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%). Folha e Polpa extraída com Etanol70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et).

O principal pigmento natural presente nas plantas são as clorofilas, as quais encontram-se nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais, o pigmento clorofila é o mesmo nas diversas espécies de plantas, sendo as diferenças visíveis de cor no vegetal decorrentes da presença e da distribuição de outros pigmentos associados, como os carotenoides (ELBE, 2000). A clorofila relaciona-se diretamente com a atividade fotossintética e estado nutricional das plantas (TAIZ, ZEIGER, 2004). A clorofila *a* é a mais abundante e importante, correspondendo a 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais. Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b*, os carotenoides e as ficobilinas, onde os três últimos são chamados pigmentos acessórios. Existe correlação alta entre os teores de clorofila total e carotenoides, o que possibilita que concentrações de clorofila possam ser utilizadas como indicadores indiretos do teor de carotenoides (GROSS, 1991).

Quanto à extração deste tipo de composto, o caráter hidrofílico/hidrofóbico influencia diretamente na escolha do solvente para extração. Solventes polares como a acetona, o metanol, o etanol e o acetato de etila são mais eficazes para a extração, enquanto solventes apolares como o hexano são menos eficientes. Feoforbídeo e feorfítina são produtos da degradação da clorofila *a* que podem interferir na determinação da clorofila *a*, pois podem absorver luz e fluorecer na mesma região do espectro (BARROSO, 1998). Isso poderia explicar os resultados encontrados no extrato da Folha com solvente hexano (F-hex), tendo em vista que apresentou significativamente mais clorofila que a mesma amostra extraída com etanol70%.

Estudo recente em *Psidium myrtoides*, planta pertencente à família Myrtaceae, encontrou maiores concentrações de clorofila extraídas com acetona 80% ($79,24 \cdot 10^6$ a $10,62 \cdot 10^7$ ng/g de extrato) que o presente estudo (CARNEIRO, CASTRO e ISAIAS, 2014). Em extração por hexano, outro trabalho também encontrou concentrações maiores ($65,3 \cdot 10^3$ ng/g de extrato) em folhas de *Syzygium malaccense* (outra planta da família Myrtaceae) (BATISTA *et al.*, 2017).

Silva *et al.* encontrou valores maiores de clorofila total na polpa da *Campomanesia pubescens* em estágio final de maturação ao utilizar acetona como extrator, aproximadamente 200 ng/g, segundo o autor a variável clorofila total apresentou queda em sua concentração

durante as fases do amadurecimento (SILVA *et al.*, 2009). Novamente, as diferenças encontradas nos resultados da literatura em relação ao presente estudos, podem ser explicados por variações no método de extração e tipo de solvente (acetona). Durante a maturação das frutas, os cloroplastos se desintegram, ocorrendo perda rápida da clorofila e da cor verde dos tecidos (CHITARRA, CHITARRA, 2006). No processo de amadurecimento, as frutas diminuem as quantidades de clorofila, devido a processos de degradação e oxidação, enquanto as antocianinas se acumulam nas células vegetais, promovendo mudanças na pigmentação da fruta (PATEL, RAO, 2014). Por estas razões, a menor concentração de clorofila nas polpas em comparação às folhas já era esperada.

6.1.3 Carotenoides

A maior concentração de carotenoide seguiu o mesmo padrão das clorofilas, onde o grupo F-et apresentou 51 % menos deste composto que o grupo F-hex (F-hex $16,48 \pm 0,83$ ng/g e F-et $8 \pm 0,32$ ng/g de extrato), e 3 vezes mais que o P-hex (P-hex $5,52 \pm 0,17$ ng/g de extrato). Em relação ao grupo P-et não observa-se diferença significativa ao comparar com F-et (P-et $7,63 \pm 0,59$ ng/g de extrato), quando comparado ao F-et, já o grupo P-hex apresenta 27% menos carotenóides ao ser comparado com P-et (Figura 6).

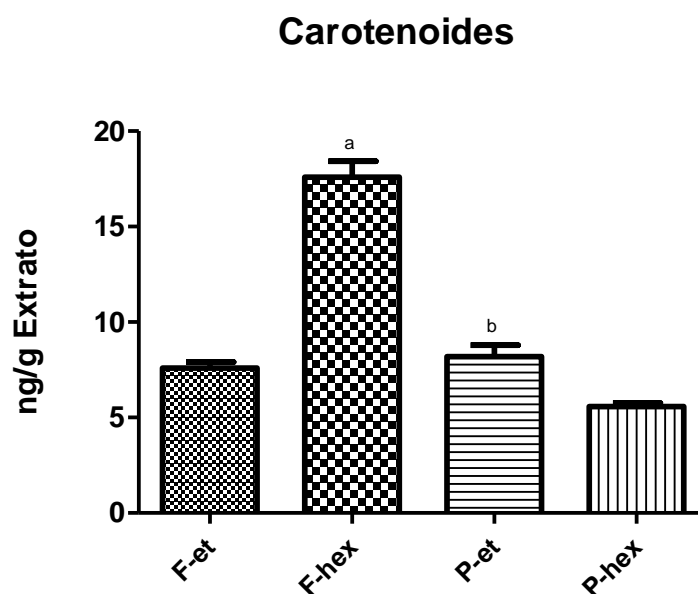


Figura 6. Carotenoides presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex).

Onde ^a $p < 0,05$ comparado com F-et e P-hex. ^b $p < 0,05$ comparado com P-hex.

A quantidade de carotenoides extraídos pelo Etanol 70% através de diferentes métodos de extração (Sob Agitação Magnética e Sob Refluxo em Soxhlet) pode ser observada na Figura 7. Não houve diferenças significativas entre os métodos de extração (F-et $8,06 \pm 0,32$ ng/g e SF-et $6,84 \pm 0,30$ ng/g) e entre folha e polpa (P-et $7,63 \pm 0,59$ ng/g e SP-et $8,08 \pm 0,29$ ng/g).

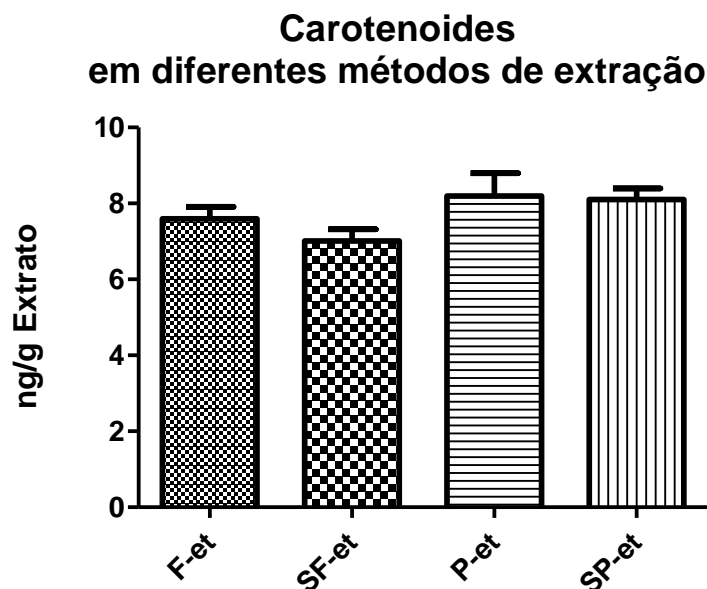


Figura 7. Carotenoides presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg, extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%). Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et).

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais sintetizados por vegetais, como frutas, verduras e flores, estão presentes em todos os organismos fotossintetizadores, sendo responsáveis por uma ampla faixa de coloração, que vai do amarelo ao vermelho. Estão localizados nos plastídeos onde são sintetizados (FRASER, BRAMLEY, 2004). Já foram identificados e caracterizados cerca de 600 tipos de carotenoides, os principais são os carotenos precursores da vitamina A e o licopeno, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (GAZZONI, 2003; RAO, RAO, 2007). O β -caroteno além de ser o mais abundante dos carotenoides, é um potente antioxidante com ação protetora contra radicais livres causadores de várias doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares (RODRIGUEZ-AMAYA, 1993; AMBROSIO, CAMPOS, FARO, 2006; SILVA, MURA, 2010). Fazem parte do sistema de defesa antioxidante em humanos e animais, devido à sua estrutura atua

protegendo as estruturas lipídicas da oxidação ou através do sequestro de radicaislivres gerados no processo foto-oxidativo (SIES, STAHL, 2003).

A concentração de carotenoides encontrado nas folhas de *Psidium myrtoides*, extraída com acetona 80% foi superior aos resultados encontrados no presente estudo ($10,98.10^6$ a $5,94.10^6$ ng/g) (CARNEIRO *et al.*, 2014). A quantificação de carotenoides da polpa e da folha de uma espécie *Syzygium malaccense* (Myrtaceae) extraída com solvente hexano encontrou respectivamente $4,6.10^2$ e $39,3.10^3$ ng/g de extrato (BATISTA *et al.*, 2017). Em *C. xanthocarpa*, foi encontrado um único estudo que quantificou carotenoides em doce de guabiroba, elaborado com os frutos, onde obteve os seguintes resultados $123,47\pm 2,35$ µg/g de β-caroteno, $55,61\pm 1,45$ µg/g de α-caroteno, $0,91\pm 0,07$ µg/g de licopeno, $93,09\pm 2,91$ µg/g β-criptoxantina $14,92\pm 0,24$ µg/g de luteína e $2,84\pm 0,09$ µg/g de violaxantina (SANTOS *et al.*, 2013).

6.1.4 Flavonoides

Obteve-se maior concentração de flavonoides totais no extrato bruto da Folha com solvente Etanol 70% (F-et) $60,2\pm 1,24$ µg de catequina/g de extrato, o qual apresentou 242% mais flavonoide quando comparado ao grupo F-hex ($17,57\pm 1,12$ µg de catequina/g de extrato), o grupo F-et também apresentou maior quantidade de flavonóide quando comparado ao grupo P-et ($5,23\pm 0,51$ µg de catequina/g de extrato). O grupo P-hex apresentou 52% a menos deste composto bioativo ($8,43\pm 0,61$ µg de catequina/g de extrato) quando comparado ao grupo F-hex (Figura 8).

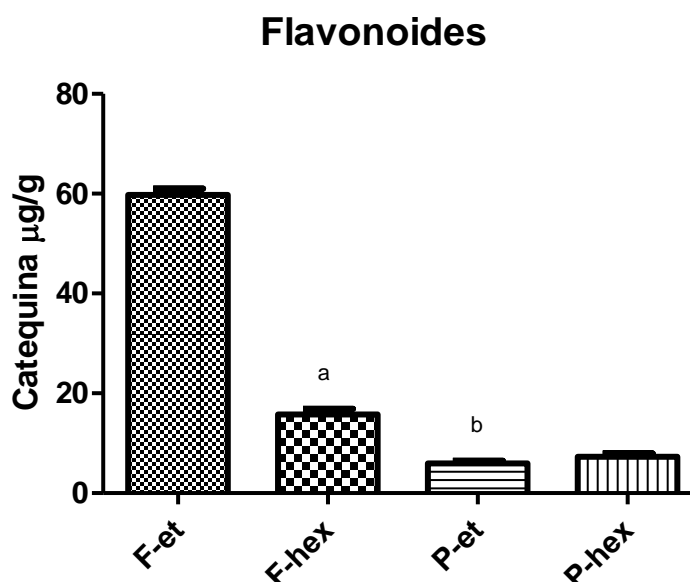


Figura 8. Flavonoides presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg. Folha extraída com Etanol 70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex).

Onde ^a $p < 0,05$ comparado com F-et e P-hex. ^b $p < 0,05$ comparado com F-et.

A figura 9 representa resultados obtidos para flavonoides a partir de diferentes métodos de extração (Agitação Magnética e Refluxo por Soxhlet), utilizando-se somente o solvente Etanol 70%. Em relação à folha o extrato obtido por agitação magnética apresentou 14% mais flavonoides (F-et $60,2 \pm 1,24$ µg de catequina/g de extrato) comparado ao extrato obtido por refluxo em Soxhlet (SF-et) $52,64 \pm 1,22$ µg de catequina/g de extrato. Os extratos da polpa da Guabirobeira (P-et e SP-et) não apresentaram diferença significativa quando comparado os dois métodos de extração ($5,23 \pm 0,51$ µg de catequina/g e $7,18 \pm 0,44$ µg de catequina/g de extrato).

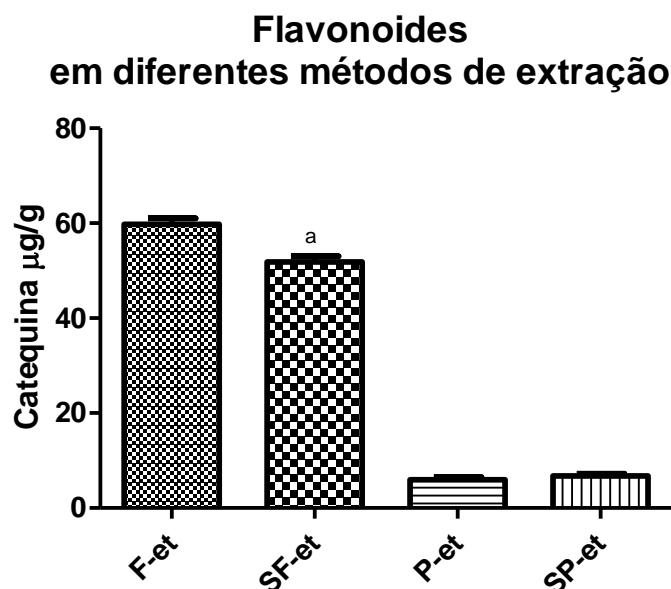


Figura 9. Flavonoides presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg, extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%). Folha e Polpa extraída com Etanol70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et). Onde ^ap<0,05 comparado com F-et.

Os flavonoides podem apresentar atividades biológicas, com efeitos anti-inflamatórios, citotóxicos e protetores da mucosa gástrica (SANDHAR *et al.*, 2011). Em estudo realizado com as folhas da *C. xanthocarpa*, o extrato etanólico foi o que apresentou maior teor de flavonoides totais e efeito inibidor no crescimento de bactérias. Interessantemente, o mesmo estudo encontrou menores valores para flavonoides totais e ausência de efeito antimicrobiano em extrato com hexano (SILVA, CARDOSO, 2010). Outro estudo encontrou resultados divergentes do presente estudo, ao apresentar concentrações mais baixas nos extratos etanólicos, *Campomanesia adamantium* (17,98 µg de quercetina/mg) e *C. guaviroba* (3,04 µg de quercetina/mg) em relação aos extratos hexânicos (19,19 µg de quercetina/mg). Estes resultados foram inesperados pelos autores devido à polaridade do composto e solvente, sendo a hipótese para explicar este resultado a de que alguma substância interferiu na leitura colorimétrica, resultando em um falso-positivo (PASCOAL, 2015). Nos extratos, aquoso e etanólico, das folhas da *C. velutina*, foram encontrados dois flavonoides prevalentes a rutina e miricetrina (ARAÚJO *et al.*, 2016), os quais possuem relatos em várias atividades biológicas. Um exemplo é a myricetin-3-O-rhamnoside foi capaz de modular a produção e liberação de Óxido Nítrico, TNF- α e IL-10 em macrófagos da linhagem RAW 264.7 (FERREIRA *et al.*, 2013a; MICHEL *et al.*, 2013; MEOTTI *et al.*, 2011; SHIMOSAKI *et al.*, 2011). Rutina

também apresentou vários efeitos biológicos, antioxidante, antiinflamatório, anticâncer, antidiabético, antimicrobiano, antifúngico, antialérgico, entre outros (CHUA, 2013; UMAR *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2011). Estudos recentes encontraram concentrações maiores de flavonoides totais (2507 µg de equivalentes de Rutina/g de extrato) em extratos aquosos de folhas da *Campomanesia xanthocarpa* em comparação ao presente trabalho (LIMBERGER *et al.*, 2016; SANT'ANNA *et al.*, 2017). Folhas da *C. lineatifolia* revelaram a presença de flavonoides nos extratos etanólico e na fração de acetato de etila. Na fração de acetato de etila foram isolados 5,7,3, 4-tetra-hidroxilflavan-3-ol (catequina) e quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina) (MADALOSSO *et al.*, 2012).

Kuster não detectou flavonoides em folhas de *C. adamantium* (KUSTER, VALE, 2016). De acordo com estudo realizado por COUTINHO *et al.*, o teor de flavonoides nas folhas de *C. adamantium* é influenciado pela variação sazonal, o que pode explicar a variação dos resultados em diferentes estudos (COUTINHO *et al.*, 2010).

A polpa da *C. xanthocarpa* extraída com etanol 95% apresentou 344 µg/g de massa fresca. Os autores destacaram que frutas de coloração amarela (guabiroba, araçá amarelo e butiá) apresentaram maiores conteúdos de flavonoides quando comparadas a frutas de coloração vermelha/púrpura (palmito juçara, jabuticaba, araçá vermelho e pitanga), as quais apresentam maiores quantidades de antocianinas e compostos fenólicos (SOUZA, FASSINA e SARAIVA, 2018). Extratos de acetona 80% dos frutos da *Campomanesia cambessedeani* Berg, apresentaram 1710 µg de eq. de catequina/g de fruta, valores maiores que o atual estudo (MALTA *et al.*, 2013). Por outro lado, resultados inferiores foram observados em frutos da *C. phae* O. Berg, extraídos com etanol 80%, os quais apresentaram de 3.53±0.4 a 6.44±0.7 µg/mL de derivados de quercitina (DONADO-PESTANA *et al.*, 2015).

6.1.5 Cumarinas

As cumarinas extraídas da Guabirobeira apresentaram maior concentração nos extratos da folha, onde o extrato obtido pelo solvente etanol 70% apresentou aproximadamente 84% mais cumarina em comparação ao extrato obtido com o solvente hexano (F-et 270,6±2,25 µg e F-hex 146,9±4,55 µg de cumarina/g de extrato) (Figura 10). Os extratos da polpa tiveram o mesmo comportamento, porém com menor concentração do composto, grupo P-hex (8,75 ± 0,14 µg de cumarina/g de extrato) apresentou 72% menos que o grupo P-et (31,25±0,77 µg de cumarina/g).

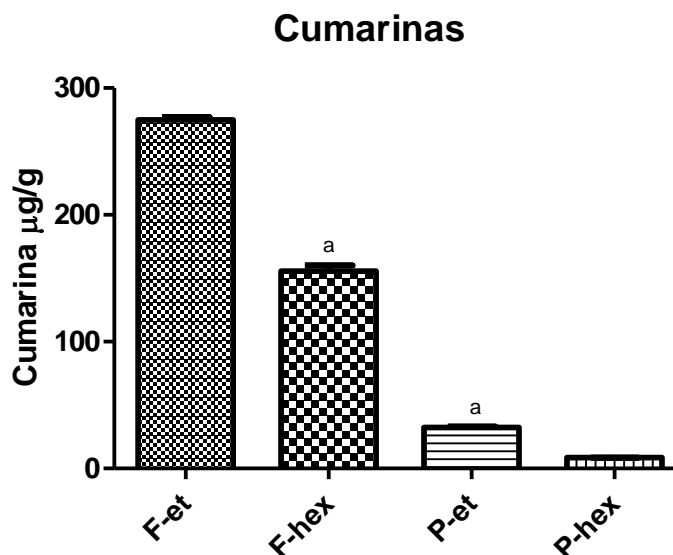


Figura 10. Cumarinas presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex).

Onde ^a $p < 0,05$ comparado com F-et e P-hex.

Na Figura 11, observa-se os resultados dos extratos obtidos através dos diferentes métodos de extração (sob agitação magnética a 37 °C e Refluxo em Soxhlet 74,8 °C), onde ocorre diferença estatística somente nos derivados da folha da *C. xanthocarpa* Berg. A extração sob agitação magnética foi mais eficaz no grupo F-et ($270,6 \pm 2,25$ µg de Cumarina/g) apresentando 11% mais cumarina quando comparado com SF-et ($243,8 \pm 6,16$ µg de Cumarina/g). Os extratos obtidos da polpa não apresentaram diferenças significativas frente aos diferentes métodos de extração.

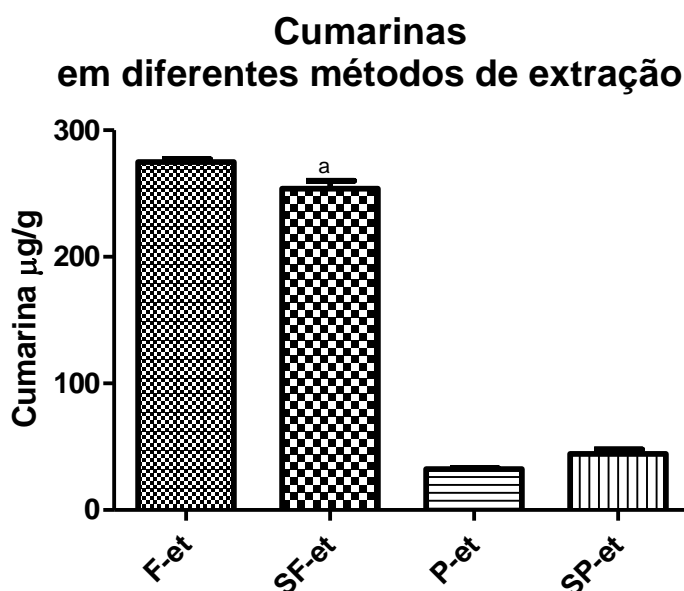


Figura 11. Cumarinas presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg, extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%). Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et). Onde ^ap<0,05 comparado com F-et.

As cumarinas compõem uma importante classe de compostos naturais com ampla distribuição no reino vegetal e diversas propriedades, como ação anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana (CASSOLA *et al.*, 2017). Diversos estudos atribuem os efeitos antiinflamatório, imunossupressor, hipolipidêmico, relaxante vascular, anticoagulante, hipotensor, antioxidante, analgésico e baixa toxicidade do guaco à cumarina (PEDROSO *et al.*, 2008; MISSAU, JUNIOR, PIZZOLATTI, 2009). Em estudo com folhas de guaco, observou-se que o calor afeta consideravelmente o conteúdo de cumarinas (MELO, SAWAYA, 2015). Ao ser elaborado xarope de guaco a 80 °C (*Mikania glomerata Sprengel*) apresentou 51,4 µg/mL de cumarina enquanto o preparado a frio extraiu somente a metade do mesmo composto, 26,1 µg/mL (ALMEIDA *et al.*, 1998). Resultados diferentes foram encontrados em extrato do guaco com etanol 50%, onde a concentração de cumarina foi de 3,79 mg/mL (OSÓRIO, MARTINS, 2004). Estes resultados são bem distintos ao comparar com os encontrados no presente estudo, isso pode ser decorrente pela diferença de composição química entre as duas espécies (guaco e guabiroberia), como também sofrer interferência pelo método de extração e solvente utilizado. A fração etanólica obtida da folha da *Campomanesia lineatifolia* foi concentrada e caracterizada qualitativamente por testes específicos onde foram identificados cumarinas, saponinas, taninos e flavonoides (ALMEIDA

et al., 2010). Da mesma forma, a cumarina foi detectada em estudos com a Myrtaceae *Eugenia florida* (NOBREGA *et al.*, 2017), nas folhas de *M. laevigata* e *J. pectoralis* (CASSOLA *et al.*, 2017), porém estes não realizaram análises quantitativas, sendo a presente pesquisa uma das primeiras a quantificar este composto em *Campomanesia xanthocarpa*.

6.1.6 Taninos

A extração com etanol 70% com solvente apresentou maiores concentrações de taninos, sendo que o extrato F-et ($585,2 \pm 8,48$ μg de Ácido Tânico/g de extrato) obteve 1480% mais composto que o F-hex ($36,74 \pm 1,42$ μg de Ácido Tânico/g de extrato). Neste mesmo solvente de extração, as folhas apresentaram maior concentração em comparação à polpa ($57,8 \pm 2,01$ μg de Ácido Tânico/g de extrato). A concentração de taninos na polpa extraída com hexano apresentou concentração extremamente baixa ($0,24 \pm 0,2$ μg de Ácido Tânico/g de extrato) (Figura 12).

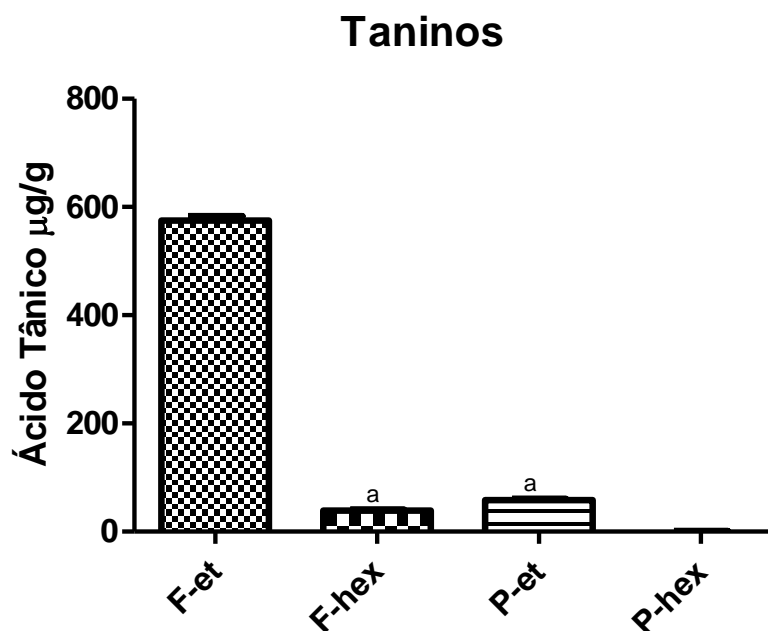


Figura 12. Taninos presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex).

Onde ^a $p < 0,05$ comparado com F-et e P-hex.

As extrações com solvente o etanol 70% com os diferentes métodos (agitação magnética e sob refluxo) apresentaram diferença estatística somente nos extratos da folha, onde o extrato F-et (extração sob agitação magnética) apresentou maior concentração do composto (8%), $585,2 \pm 8,48$ μg para F-et e F-hex $543,6 \pm 9,8$ μg de Ácido Tânico/g de extrato. Para os extratos da polpa não houve diferença estatística entre as duas metodologias de extração (SP-et $67,27 \pm 2,85$ μg ; P-et $57,8 \pm 2,01$ μg) (Figura 13).

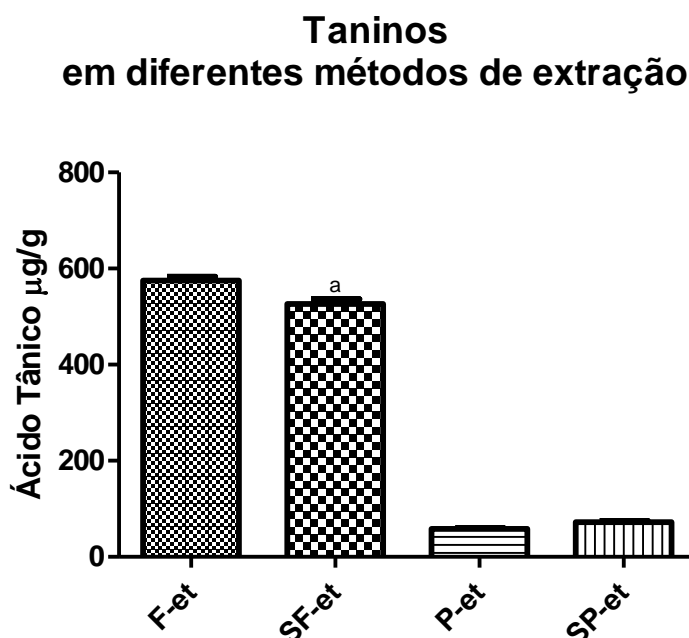


Figura 13. Taninos presentes nos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg, extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%). Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et). Onde ^a $p < 0,05$ comparado com F-et.

Análises qualitativas de compostos bioativos realizadas em folhas da guabirobeira identificaram flavonoides, taninos e outros compostos como triterpenoides, heterosídeos, antociânicos e saponinas, amino grupos, óleos essenciais e ácidos fixos (ABE *et al.*, 2014; GOUVÊA, 2001; MARKMAN, 2002), dados estes que corroboram os resultados obtidos neste trabalho. O extrato hexânico de folhas da *C. pubescens*, apresentou sesquiterpenos e triterpenos, substâncias de baixa polaridade, as quais não foram testadas no presente estudo (CARDODO *et al.*, 2008). Flavonoides, saponinas e taninos presentes em extratos de folhas da *C. xanthocarpa* em etanol 70% estão relacionados ao efeito antiulcerogênico verificado em camundongos (MARKMAN *et al.*, 2004). Os frutos da *Campomanesia phae* O. Berg, apresentaram concentrações de taninos variando de 510 a 1040 μg de equivalente de

taninos/mL em seus extratos etanólicos (etanol 80%), sendo os taninos os principais compostos encontrados dentro da classe dos fenólicos (58 a 60%) (DONADO-PESTANA *et al.*, 2015). Estes resultados para frutos diferem bastante do presente estudo, sendo este comparável aos resultados encontrados na folha da guabirobeira. A maior concentração de taninos observado em extrato etanólico foi encontrada em folhas da *Campomanesia lineatifolia* ($18,7 \pm 0,1\%$) (MADALOSSO *et al.*, 2012).

Os metabólitos de plantas de uma mesma espécie podem variar de acordo com diferentes fatores como sazonalidade, fase de desenvolvimento, tipo de solo no qual a planta foi cultivada (disponibilidade hídrica, nutrientes), temperatura, radiação, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ação de patógenos, bem como cuidados na coleta (GOBBO-NETO, LOPES, 2007), o que pode justificar as diferenças quantitativas encontradas no presente estudo e literatura pesquisada.

O presente estudo demonstra que os extratos da folha obtidos com etanol 70% apresentam maiores quantidades de compostos fenólicos totais, flavonóides, cumarinas e taninos. Por outro lado os extratos da folha com n-hexano apresentam maiores concentrações de clorofilas e carotenóides. Em relação a polpa, os extratos com etanol 70% apresentaram maiores quantidades de todos os compostos, exceto flavonóides, que não apresentou diferenças significativa com o extrato P-hex. No grupo P-hex praticamente não foi encontrado composto fenólico totais e taninos, através do método utilizado. Os métodos extrativos utilizados demonstraram diferenças significativas para alguns dos compostos bioativos testados, onde o método sob agitação magnética extraiu significativamente mais compostos fenólicos totais, flavonoides, cumarinas e taninos para os extratos da folha, por outro lado a extração com Soxhlet da polpa, apresentou maiores quantidades de de compostos fenólicos totais e flavonóides.

6.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* ATRAVÉS DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES

6.2.1 Radical DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil)

Os extratos hexânicos (polpa e folha) apresentaram baixas concentrações de trolox (Polpa $95,29 \pm 1,4$ e Folha $76,85 \pm 1,29$ μmol de Trolox/g de extrato). Em extração com etanol 70%, a polpa também apresentou baixa concentração ($79,96 \pm 1,47$ μmol de Trolox/g de

extrato), sendo o grupo F-et o que se destacou por apresentar grande potencial antioxidante $4690 \pm 100,4$ μmol de Trolox/g de extrato, cerca de 50 a 60 vezes mais que os demais grupos.

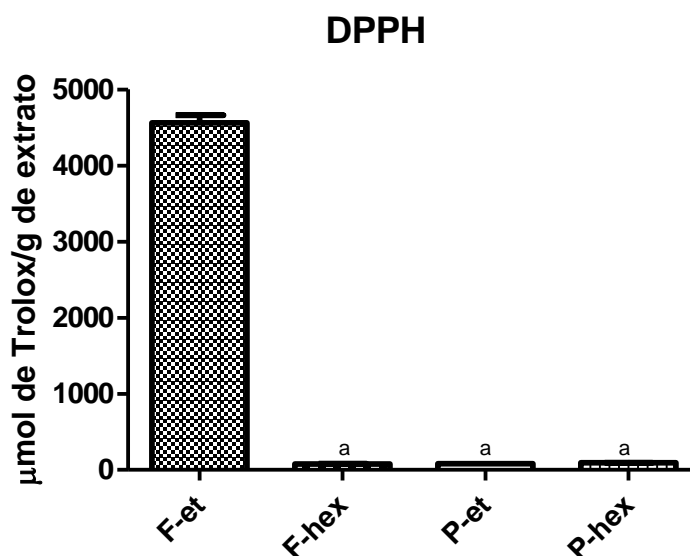


Figura 14. Capacidade antioxidante dos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg expressa pela captura do radical DPPH. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex). Onde ^ap<0,05 comparado com F-et.

Estudos recentes têm reportado o potencial antioxidante de folhas, polpas e sementes de espécies dos gêneros *Eugenia*, *Myrciaria*, *Syzygium* *Psidium*, todos da família Myrtaceae, os quais em sua maioria expressam atividade antioxidante a partir de avaliações com extratos alcoólicos ou aquosos (ANNADURAI *et al.*, 2012; FIGUEIRÔA *et al.*, 2013; STEWART *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). Frações clorofórmica e hexânica das folhas de *C. lineatifolia* (BARBOSA, 2009) e *C. guazumifolia* (Cambess) (ARRUDA *et al.*, 2013) apresentaram menor capacidade antioxidante em comparação com as frações alcoólicas testadas, dados estes que corroboram os resultados encontrados no presente estudo. O extrato hexânico e a fase hexânica dos frutos da *C. pubescens* apresentaram baixo efeito antioxidante de acordo com ensaio DPPH, mesmo apresentando concentrações elevadas de fenóis. Estes resultados podem ser decorrentes de maiores quantidades de flavanonas e chalconas presentes no extrato hexânico, as quais não apresentam atividade antioxidante pelo método do DPPH (CARDOSO *et al.*, 2013). Folhas da *Campomanesia adamantium* testadas nas diferentes estações do ano, apresentaram nos extratos hexânico e acetato de etila pouca variação, enquanto o extrato etanólico mostrou alteração significativa em relação à composição química

durante o ano. Neste mesmo estudo verificou-se que apenas os extratos etanólicos mostraram alta atividade antioxidante frente ao método DPPH (COUTINHO *et al.*, 2010).

Alguns estudos procuram delinear a relação estrutural do composto com sua atividade antioxidante, a qual pode facilitar a neutralização de radicais livres que iniciam processos de oxidação, ou determinar as reações em cadeia radical devido à capacidade doadora de hidrogênio (CAO, SOFIC, PRIOR, 1997). O estudo de três compostos bioativos (quercetina, quercetina-3-O-glucopiranosídeo e a morina) isolados de folhas de goiabeira apresentou diferentes níveis de ação antioxidante, sendo a quercetina o composto que melhor efeito, possivelmente devido ao maior número de hidroxilas (TACHAKITTIRUNGROD, OKONOJI, CHOWWANAPHOONPOHN, 2007). Estes resultados demonstram que a estrutura dos compostos é uma importante característica para eliminação de radicais livres (BORS *et al.*, 1990; FOTI *et al.*, 1996).

A capacidade antioxidante dos extratos da folha e da polpa, utilizando como solvente o etanol 70% e extração por diferentes métodos (agitação magnética e sob refluxo) não apresentou diferença estatística (Figura 15) (F-et 4690±100,4; SF-et 4641±36,77; P-et 79,96±1,47 e SP-et 85,64±0,33 μmol de Trolox/g de extrato).

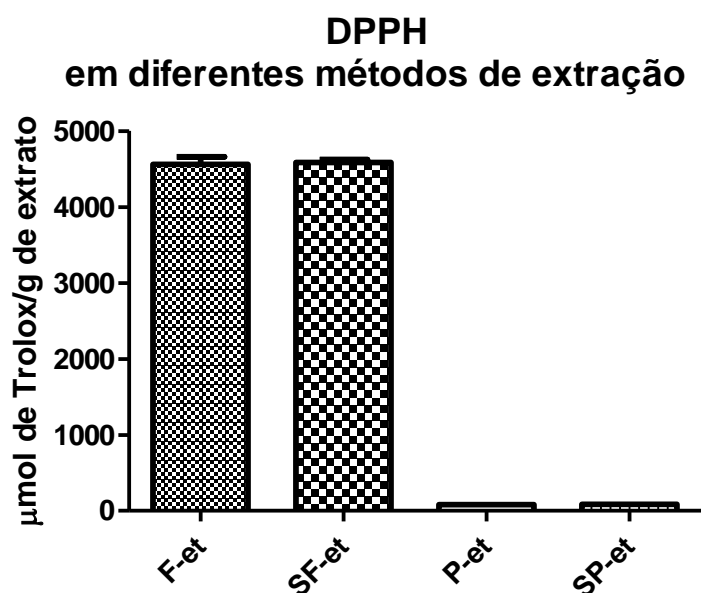


Figura 15. Capacidade antioxidante dos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%), expressa pela captura do radical DPPH. Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol 70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et).

A diferença na metodologia utilizada para extração é um fator importante que pode interferir nos resultados da avaliação da atividade antioxidante (NANTITANON, SAWIMONWAT, OKONOGLI, 2010; TACHAKITTIRUNGROD, OKONOGLI, CHOWWANAPUONPOHN, 2007). A capacidade antioxidante de um extrato pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos em sua composição. Nossos resultados demonstraram que os extratos etanólicos da *C. xanthocarpa* foram os que mais se destacaram na presença deste composto. Os compostos fenólicos, vitaminas C e E, selênio, carotenoides, flavonoides e taninos também têm sido associados a efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, gastroprotetor (LI *et al.*, 2009; GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009; GRABACKA, GAWIN, PIERZCHALSKA, 2014; PRADO *et al.*, 2014; SAEDI *et al.*, 2014).

A polpa da *C. xanthocarpa* em extração hidroalcolica (metanol 50%) apresentou alta capacidade antioxidante mensurada pelo método DPPH (SOUZA *et al.*, 2018). A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroetanólicos (etanol 80%) do fruto da *C. Phae* O.Berg, foi proporcional as concentrações de compostos fenólicos totais, sendo DPPH entre 14.71 ± 1.78 a 29.44 ± 1.52 μmol de Trolox/mL (DONADO-PESTANA *et al.*, 2015), no presente estudo os valores de DPPH para polpa foram cerca de 2,5 vezes maior, neste também verificou-se proporcionalidade entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante frente ao DPPH. Estudos mostraram que não há relação entre o radical DPPH e os carotenoides (MÜLLER, FROHLICH, BOHM, 2011), desta forma os resultados observados são provavelmente decorrentes da ação de outros compostos presentes na planta (PEREIRA *et al.*, 2015), isso justificaria um pouco os resultados encontrados no presente estudo referentes a polpa, já que apresentaram grande quantidade de carotenoides, porém baixa atividade antioxidante.

6.2.2 Radical ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico))

No presente estudo o extrato Folha Etanol 70% (F-et) foi o único que apresentou capacidade antioxidante ($2329 \pm 20,21$ μmol de Trolox/g de extrato), sendo que os grupos F-hex ($242,5 \pm 4,4$), P-et ($270,4 \pm 4,97$) e P-hex ($291,9 \pm 4$ μmol de Trolox/g de extrato) apresentaram baixa atividade antioxidante. Observa-se também que o grupo P-hex apresentou maior atividade ao ser comparado com o F-hex (20%) (Figura 16).

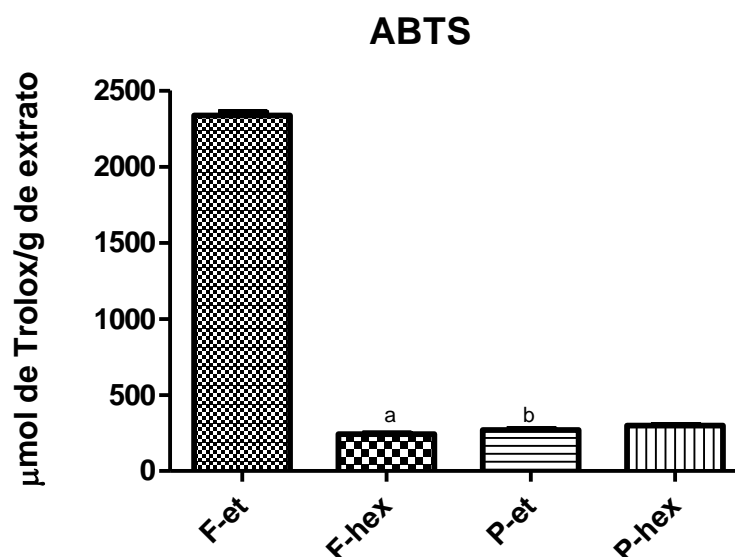


Figura 16. Capacidade antioxidante dos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg expressa pela captura do radical ABTS. Folha extraída com Etanol 70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex). Onde ^ap<0,05 comparado com F-et e P-hex. ^bp<0,05 comparado com F-et.

Em relação aos diferentes métodos de extração (agitação magnética e sob refluxo) com solvente etanol 70%, não houve diferença significativa entre os grupos estudados, os quais apresentaram os seguintes valores F-et 2329±20,21, SF-et 2462±48,89, P-et 270,4±4,97 e SP-et 261±3,95 μmol de Trolox/g de extrato (Figura 17).

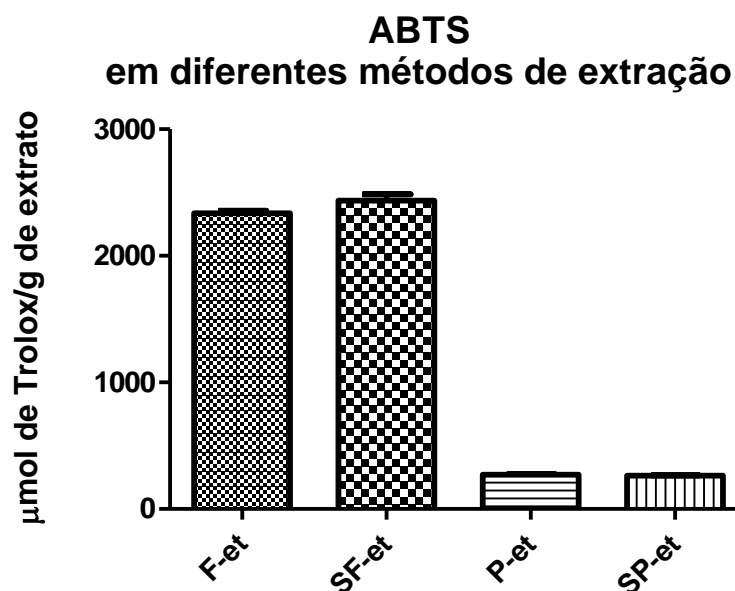


Figura 17. Capacidade antioxidante dos diferentes extratos da *C. xanthocarpa* Berg extraídos por diferentes métodos com a utilização de um mesmo solvente (Etanol 70%), expressa pela captura do radical ABTS. Folha e Polpa extraída com Etanol70% sob Agitação Magnética (F-et e P-et), Folha e Polpa extraída com Etanol70% sob Refluxo em Aparelho Soxhlet (SF-et e SP-et).

Alto valor de equivalente de Trolox indica um alto teor de antioxidantes em comparação com o antioxidante padrão (Trolox) (RE *et al.*, 1999). Estudo com frutos da *C. xanthocarpa* em extratos hidrofóbicos (acetona) encontrou diferenças de atividade antioxidante em métodos extrato livre e encapsulado (PEREIRA *et al.*, 2015). O método de encapsulamento pode reduzir a disponibilidade do extrato e reagir menos com os radicais livres e compostos dos extratos com propriedades antioxidantes por diferentes mecanismos de ação. Frutos da *Campomanesia cambessedeanana* Berg, extração com acetona 80%, também apresentaram capacidade antioxidante pelos métodos ORAC - sequestro do radical Oxigênio e PSC - sequestro do radical Peroxile atividade antiproliferativa em células tumorais hepáticas (HepG2) (MALTA *et al.*, 2013).

Os compostos bioativos dos extratos são responsáveis por conferir diferentes propriedades biológicas a cada extrato, possibilitando que possa oferecer efeitos benéficos ou de risco para saúde. Além disso, a quantidade de compostos e interação entre os mesmos podem ser influenciados por fatores como localização geográfica do plantio e método de extração (KADRI, ZARAI, CHOBBA, 2011; OKOH, SADIMENKO, AFOLAYAN, 2010).

No presente estudo observou-se que os extratos apresentaram grandes diferenças qualitativas e quantitativas de seus constituintes químicos. Os resultados sugerem que a maioria dos compostos biologicamente ativos encontrados nesta espécie de planta estão concentrados nas folhas, com composição química extremamente diferente da polpa, estas diferenças apresentam-se também nas propriedades biológicas em relação aos radicais livres testados (DPPH e ABTS).

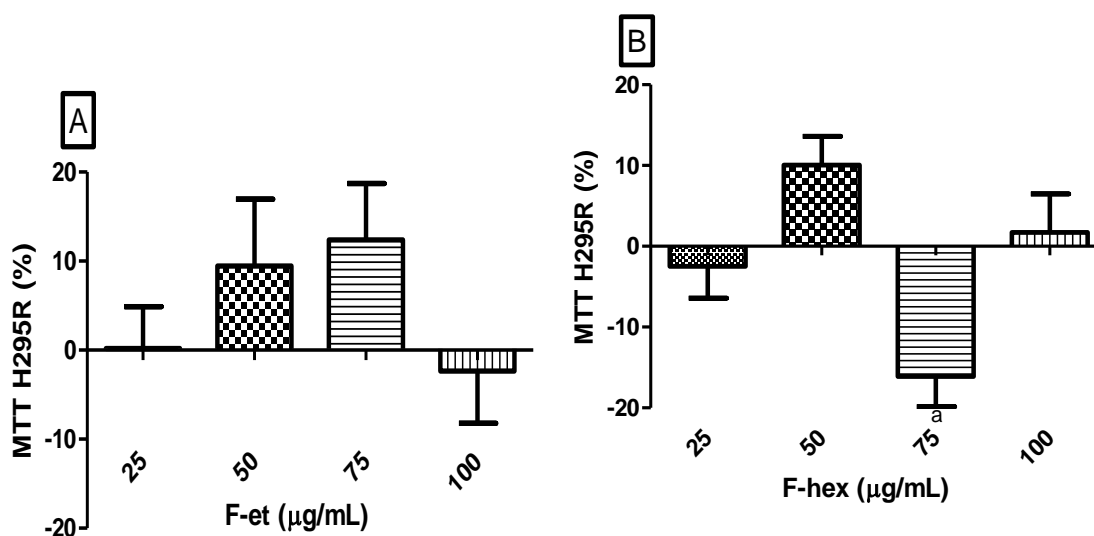
De acordo com Amarante e colaboradores (2017) a relação direta entre maiores concentrações de compostos fenólicos e o aumento da atividade antioxidante determinadas pelos métodos DPPH e ABTS, dados que corroboram os resultados encontrados neste trabalho, tendo em vista que o extrato F-et que apresentou maior concentração de compostos fenólicos também apresentou-se mais eficiente na captação do radical DPPH e ABTS. Os extratos F-hex, P-et e P-hex não apresentaram atividade antioxidante no método DPPH, enquanto que para o método ABTS, o extrato P-hex foi mais eficiente para captação do radical quando comparado ao extrato F-hex.

6.3 LINHAGENS CELULARES

A sub-linhagem H295R (tumor de córtex adrenal) e a linhagem RAW 264.7 (macrófagos murinos), foram submetidas a diferentes concentrações dos extratos da *C. xanthocarpa* (100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 0µg/mL (zero ou controle) para realização dos testes a seguir.

6.3.1 Toxicidade dos extratos - teste de MTT

O ensaio do MTT é um ensaio de proliferação celular que tem como objetivo avaliar a citotoxicidade do extrato da Guabiroleira em células de tumor de cortex adrenal (linhagem H295R). Foram testados 4 extratos (F-et, F-hex, P-et e P-hex) em cinco concentrações 0 (zero), 25, 50, 75 e 100 µg/mL, sendo a concentração zero considerada o controle. Os resultados foram expressos em porcentagem da viabilidade celular, como podem ser observados na Figura 18. Apenas o grupo F-hex (Figura 18-B) apresentou efeito citotóxico a concentração 75 µg/mL, apresentando redução de 17 % em relação ao controle, 22 % frente à concentração 50 µg/mL e 14% frente à concentração 100 µg/mL. Em relação aos extratos F-et, P-et e P-hex não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações testadas (Figura 18- A, C e D).



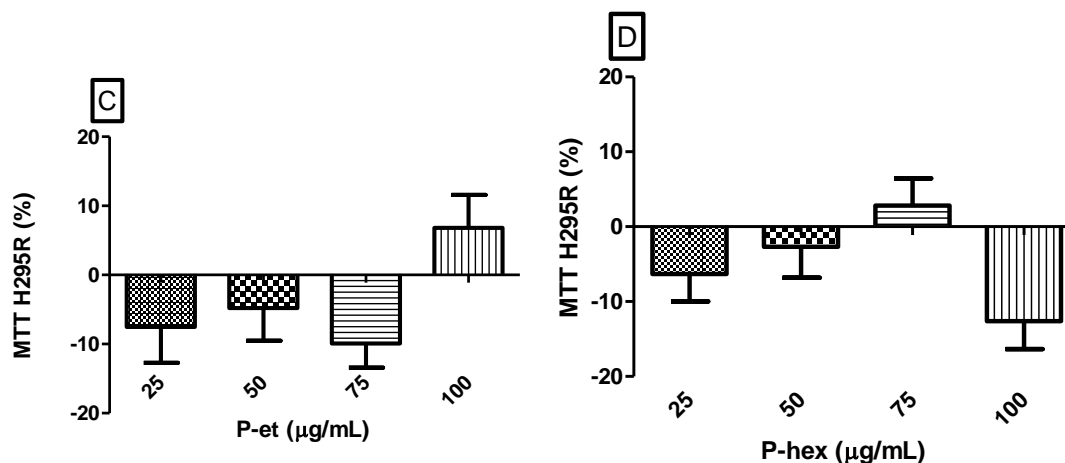


Figura 18. MTT- Toxicidade dos extratos dos extratos da *C. xanthocarpa* Berg frente à linhagem celular H295R (tumor de córtex adrenal), expressa pelo percentual de viabilidade celular. F-et (A), F-hex (B), P-et (C) e P-hex (D). Variação em % em relação ao grupo Controle ($99,2 \pm 4,84$). Concentrações 25, 50, 75, 100 µg/mL.

Nota: Os dados são apresentados como média \pm erro padrão.

Onde $^a p < 0,05$ comparado ao controle e as concentrações 50 e 100 µg/mL.

O extrato etanólico de frutos da *E. stipitata* (Myrtaceae) foi testada *in vitro* quanto à capacidade de inibir o crescimento de nove linhagens celulares tumorais humanas U251 (glioma, CNS) UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (mama – resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (renal), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovariana), HT-29 (cólon) e Vero (rim, linha celular não cancerosa), o qual não apresentou efeito citostático completo contra qualquer das linhagens testadas. Este mesmo estudo constatou efeito antimutagênico ou antigenotóxico do extrato em animais (camundongos Swiss) suplementados com o extrato, sugerindo que este fruto pode ser usado como agente preventivo contra o câncer (NERI-NUMA *et al.*, 2013).

Extratos de folhas da *Psidium guajava* (Myrtaceae) em hexano apresentaram efeitos citotóxicos em células das linhagens OV2008 de câncer de ovário e de leucemia Kasumi-1, dependente da dosagem do extrato, com IC50 determinado em 200 µg/mL (LEVY, CARLEY, 2012). Este resultado corrobora com o presente estudo ao demonstrar que o efeito observado do extrato é dependente da concentração do mesmo. Em folhas da *Calyptanthes grandifolia* O.Berg (Myrtaceae), não foi encontrado efeitos citotóxicos em extratos etanólicos e hexânicos na linhagem epitelial CHO-K1 (ovário de hamster adulto) (DELVING, 2015). Extratos aquosos das folhas e raízes de *C. adamantium* causaram citotoxicidade dependente da concentração em células Jurkat (linfoma das células T), sendo o extrato da folha mais

eficaz quando comparado ao da raiz, sugerindo potencial terapêutico na prevenção e tratamento do câncer (CAMPOS *et al.*, 2017).

A fração acetato de etila em extrato etanólico de folhas da *C. velutina* apresentou efeito citotóxico em macrófagos J774A.1 nas concentrações 640 e 1280 µg/mL, enquanto os extratos brutos em etanol e metanol e a miricitrina isolada não apresentaram efeitos (MICHEL *et al.*, 2013). Estes resultados assemelham-se aos encontrados no presente estudo, tendo em vista os extratos etanólicos (folha e polpa) não apresentaram efeito citotóxico na linhagem celular testada. Um segundo estudo também observou redução da viabilidade de macrófagos J774.A1 na fração acetato de etila do extrato das folhas da *C. adamantium* na concentração 640 mg/mL, enquanto os compostos bioativos isolados da planta, mirricitrina e miricetinã não demonstraram efeito (FERREIRA *et al.*, 2013). Em células THP-1 (monócitos humanos leucêmicos) foi encontrado efeito citotóxico do extrato de guabiroba (*C. xanthocarpa*), concentração de 500 µg/mL, e redução do marcador CD14, molécula envolvida no processo inflamatório associado à aterosclerose (co-receptor das partículas de LDL) (RIBAS, CUNHA, AITA, 2015).

O tetracloreto de Carbono (CCl₄) é amplamente utilizado para induzir o estresse oxidativo e lesão hepática. Estudo em extratos etanólicos (70%) da polpa e da casca/semte da *C. adamantium* demonstrou efeito protetor na viabilidade de células hepáticas HepG2 induzidas por CCl₄ (FERNANDES *et al.*, 2015).

6.3.2 Atividade Fagocitária dos Macrófagos

A capacidade fagocitária, expressa em porcentagem, dos macrófagos (linhagem RAW 264.7) expostos a diferentes concentrações dos extratos da *C. xanthocarpa*, pode ser verificado na Figura 19. Somente o grupo P-hex (Figura 19-D) apresentou estímulo da atividade fagocitária nas concentrações 50, 75 e 100 µg/mL, aumentos de 49%, 50% e 42%, respectivamente quando comparados ao grupo controle. Em relação aos demais extratos, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas (Figuras 19-A, B e C).

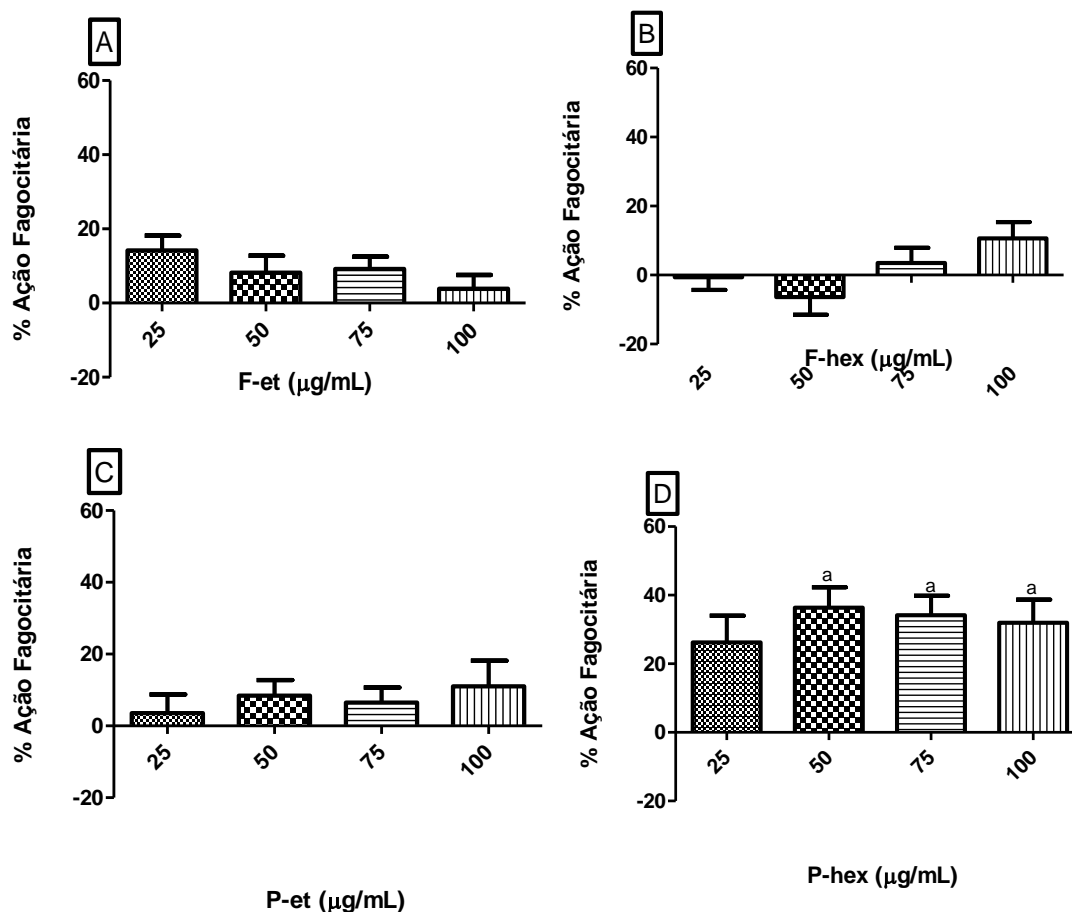


Figura 19. Atividade fagocitária da linhagem de macrófagos (RAW 264.7) frente a ação dos extratos da *C. xanthocarpa* Berg, através das diferentes concentrações, expressa em percentual. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex). Variação em % em relação ao grupo Controle ($100,5 \pm 5,8$). Concentrações 25, 50, 75, 100 µg/mL. Onde ^a $p < 0,05$ comparado ao controle do extrato P-hex.

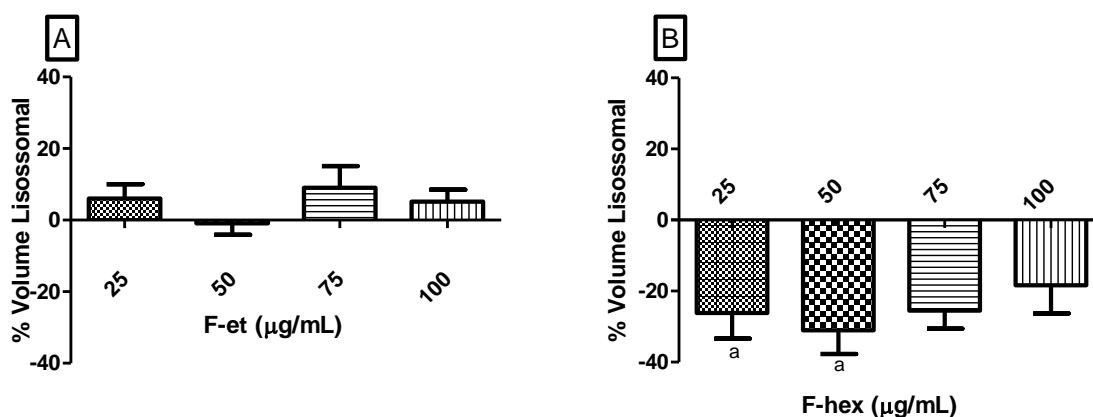
A imunidade inatadesempenha um importante papelno controle de infecções, através de mecanismos de ação como fagocitose e atividade lisossomal, os quais possibilitam ativação de antígenos e eliminação de patógenos (HARRISON *et al.*, 2003). Após endocitose de patógenos, o fagossoma recém-formado sofre fusão, seguido de fusão com lisossomas para produzir um fagolisossomo (NIEDERGANG, CHAVRIER, 2004). O fagolisossomo é um compartimento preenchido com hidrolases ácidas e espécies reativas de oxigênio nas quais ocorre a maior parte da degradação do conteúdo englobado. Ospatógenos fagocitados são mortos dentro do fagolisossomo (LEE, HARRISON, GRINSTEIN, 2003; LOPES *et al.*, 2006). O óleo essencial das folhas da *E. uniflora* promoveu aumento significativo na atividade fagocitária dos macrófagos nas concentrações de 100, 50 e 12,5 µg/mL de 62, 57 e 36%, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2012). A fração acetato de etila de *Eugenia*

uniflora foi utilizada na concentração de 1000 µg/mL para avaliar a ação sobre a fagocitose de *C. albicans*, onde o extrato reduziu significativamente a capacidade de fagocitose de *C. albicans* frente ao controle (média total de 120.36 ± 36.71 e 44.68 ± 19.84) (SILVA, 2017). A capacidade fagocitária dos macrófagos RAW 264.7 foi aumentada em 1,2 vezes quando administrado o tratamento com extrato aquoso das folhas da *Orostachys japonicus* (Crassulaceae) (PARK *et al.*, 2015).

O extrato etanólico de *R. Tomentosa*, pertencente à família Myrtaceae, aumentou a atividade fagocitária em neutrófilos estimulados com extrato nas concentrações de 50 e 250 µg/mL (HMOTTEH, MUSTHAFA, VORAVUTHIKUNCHAI, 2018). Os macrófagos peritoniais de hamster tratados com extratos metanólicos de *Ourateacuspidata* (Ochnaceae) apresentaram redução (92% - 98%) da capacidade fagocitária, enquanto os extratos acetato de etila e hexânico não apresentaram alterações (RIBEIRO, 2007). Resultados opostos ao encontrado no presente estudo onde o extrato hexânico da polpa, foi o único a aumentar a capacidade fagocitária dos macrófagos.

6.3.3 Ensaio de Volume Lisossomal

O aumento de volume lisossomal de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi avaliado pela retenção do corante vermelho neutro (Figura 20). Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o grupo P-hexo que apresentou aumento na retenção do vermelho neutro na concentração 75 µg/mL (8% em relação ao controle) (Figura 20-D). Os demais extratos não apresentaram efeito em relação a este parâmetro com base na análise estatística.



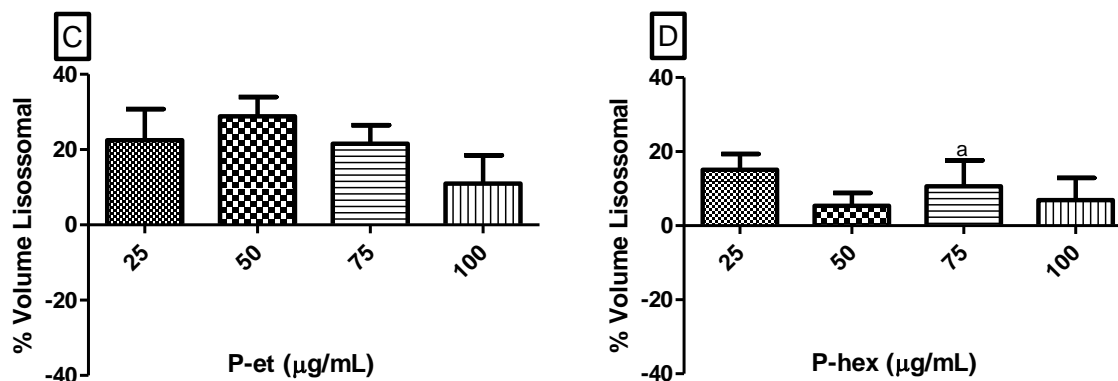


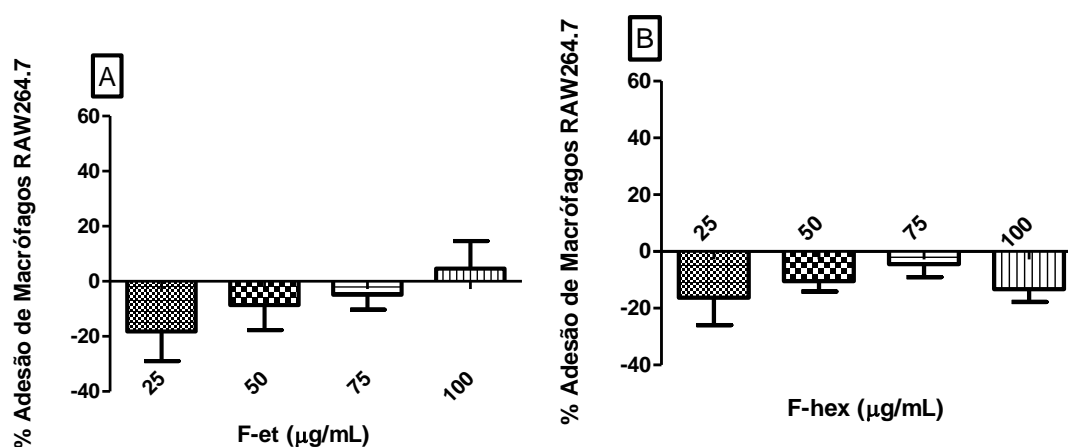
Figura 20. Captação do Vermelho Neutro (Retenção Lisossomal) da linhagem de macrófagos (RAW264.7) frente a ação dos extratos da *C. xanthocarpa* Berg, através das diferentes concentrações, expressa em percentual. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex). Variação em % em relação ao grupo Controle ($105 \pm 4,3$). Concentrações 25, 50, 75, 100 µg/mL. Onde ^ap<0,05 comparado ao controle do extrato P-hex.

O ensaio de volume lisossomal mede a viabilidade celular pela capacidade de células vivas em acumular o corante nos lisossomos por difusão passiva (REPETTO, DEL PESO, ZURITA, 2008). Os ensaios mais empregados para a avaliação de citotoxicidade são o teste de redução do MTT e o teste da captação do vermelho neutro (YANG *et al.*, 2008). Dependendo da concentração da amostra que promove viabilidade celular abaixo de 50% e do tipo celular em estudo, essa amostra pode ter o seu potencial biológico estudado. Um extrato vegetal promissor para futuras purificações deve apresentar índice citotóxico (IC50) menor que 30 µg/mL (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Por outro lado, quando o extrato não apresentar efeito citotóxico, além de indicar a segurança do uso, é possível investigar, por meio de ensaios bioquímicos *in vitro*, se há efeitos benéficos deste na prevenção de doenças, através de mecanismos antioxidantes.

O óleo essencial das folhas da *E. uniflora* promoveu um significativo aumento na retenção do vermelho neutro de macrófagos nas concentrações de 100, 50 e 12,5 µg/mL de 56, 53 e 23%, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2012). Estes resultados diferem do presente estudo, tendo em vista que nenhum dos extratos das folhas foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade celular. Extratos hidroalcoólicos da aroeira (Anacardiaceae) causaram redução da viabilidade celular em osteoblastos humanos somente em altas concentrações (MATOS, 2013).

6.3.4 Ensaio de Adesão de Macrófagos

O ensaio de adesão de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi empregado para avaliar os efeitos das diferentes concentrações dos extratos da *C. xanthocarpa*, os quais podem ser visualizados na Figura 21, valores descritos em porcentagem. O grupo P-et (Figura 21-C) apresentou aumento significativo da adesão dos macrófagos expostos às concentrações 25 $\mu\text{g/mL}$ aumento 30% em relação ao controle e 70% ao ser comparado com a concentração 75 $\mu\text{g/mL}$, a concentração 50 $\mu\text{g/mL}$ possibilitou aumento da adesão de 28% em relação ao controle e 68% frente à concentração 75 $\mu\text{g/mL}$. Já as células expostas à concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ foi as que apresentaram maior adesão, 50% mais que o controle, 17 e 97% mais em relação às concentrações 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O grupo P-hex (Figura 21-D), demonstrou redução da adesão dos macrófagos expostos ao extrato nas concentrações 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, 33 e 40% em relação ao controle, 36 e 43 % em relação a concentração 25 $\mu\text{g/mL}$, 34 e 40% em relação a concentração 50 $\mu\text{g/mL}$. Demais grupos não apresentaram alterações significativas na adesão de macrófagos frente às diferentes concentrações.



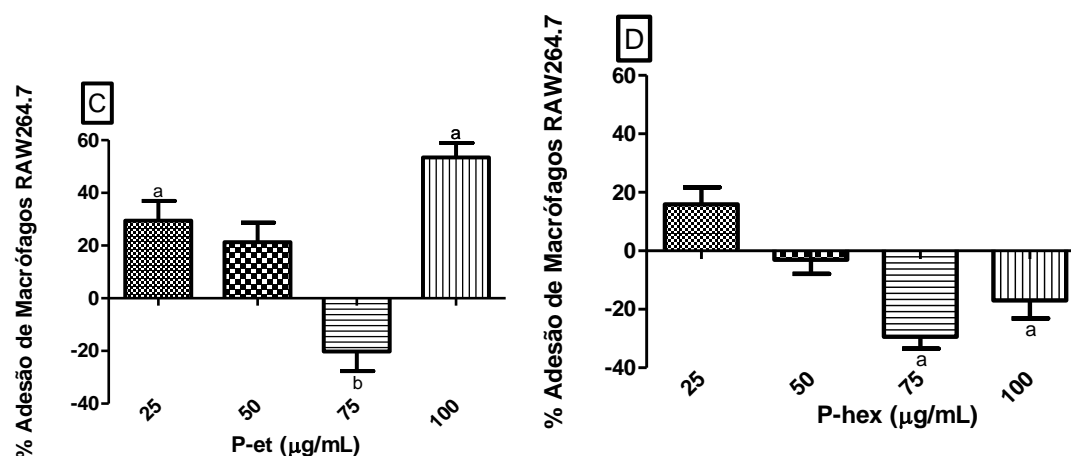


Figura 21. Adesão de macrófagos da linhagem de macrófagos (RAW 264.7) frente a ação dos extratos da *C. xanthocarpa* Berg, através das diferentes concentrações, expressa em percentual. Folha extraída com Etanol70% (F-et), Folha com n-hexano (F-hex), Polpa com etanol 70% (P-et) e Polpa com n-hexano (P-hex). Variação em % em relação ao grupo Controle ($99,5 \pm 4,7$). Concentrações 25, 50, 75, 100 µg/mL.

Onde ^a $p < 0,05$ quando comparado ao controle e a concentração 75 µg/mL; ^b $p < 0,05$ quando comparado a concentração 100µg/mL, no extrato P-et (C).

Onde ^a $p < 0,05$ quando comparado ao controle e as concentrações 25 e 50µg/mL, no extrato P-hex (D).

Um importante parâmetro a ser avaliado em cultura celular, é a adesão celular tendo em vista que as células podem estar viáveis, mas não estarem aderidas ao substrato, considerando que uma vez aderidas às células iniciam sua proliferação. A migração de neutrófilos, primeiro a ir para o foco inflamatório, envolve vários mecanismos, como o rolamento e a adesão de neutrófilos ao endotélio, seguido por quimiotaxia induzida por grupo de mediadores inflamatórios conhecidos como agentes quimiotáticos (GOMES *et al.*, 2017).

Ensaio *in vivo* com animais pré-tratados via oral com extrato hidroetanólico (etanol 80% liofilizado) das sementes da *Eugenia leittoni* (300 mg/kg), os quais apresentaram redução da adesão de neutrófilos da cavidade peritoneal dos camundongos (LAZARINI *et al.*, 2016). Resultado mostra que o extrato reduz a expressão de mediadores inflamatórios e diminui a liberação de TNF- α , resultando na inibição da rolagem, adesão e transmigração dos leucócitos em direção ao foco inflamatório (XIANG *et al.*, 2015). Os extratos do açaí (*Euterpeoleraceae*) também demonstraram efeito reduzindo a capacidade de gerar transcrições de IL-6 e IL-8 e capacidade de bloquear os efeitos indutores do LPS na sinalização e na expressão de moléculas de adesão, vascular (VCAM-1) e intercelular (ICAM-

1). Estes resultados demonstraram correlação negativa com a adesão leucocitária (NORATTO *et al.*, 2011).

O processo inflamatório envolve a expressão de diversas proteínas inflamatórias como citocinas, quimiocinas, enzimas que catalisam mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios e moléculas de adesão. Variações na expressão desses genes são reguladas por fatores de transcrição, e o seu excesso de ativação pode estar relacionado com a prolongação da liberação de citocinas inflamatórias (BARNES, 1994). Estudo realizado com extrato de *Prunellavulgaris* (Lamiaceae) demonstrou que houve redução da ativação de fatores de indução de inflamação (*NF-kb*) não houve produção de TNF- α , inibindo a adesão de monócitos/macrófagos (PARK *et al.*, 2013).

Compostos fenólicos presentes no cambuci (*C. phae*) melhoraram a tolerância à glicose, reduziram a glicemia de jejum e a insulinemia, protegeram contra dislipidemia e atenuaram o recrutamento de macrófagos no tecido adiposo e a expressão de marcadores inflamatórios (TNF- α e IL-6), em testes realizados em camundongos durante oito semanas, as dietas foram diferenciadas, onde alguns grupos recebiam extratos do fruto do cambuci contendo os polifenóis (DONADO-PESTANA *et al.*, 2015). Resultado semelhante foi encontrado no grupo celular expostos ao extrato P-hex, onde o mesmo reduziu a adesão de macrófagos nas concentrações 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, o grupo P-etaumentou a adesão dos macrófagos na maioria das concentrações.

Os polifenóis, presentes nas plantas, representam uma categoria de compostos fitoquímicos muito importante, pela sua capacidade antioxidante, tendo em vista que muitos efeitos relacionados ao estresse oxidativo estão envolvidos no processo inflamatório, entre eles a produção de radicais livres por células imunológicas tais como os macrófagos. Porém o efeito protetor dos polifenóis vai além de seu potencial antioxidante, e vem mostrando atividade citotóxica, efeitos anti-envelhecimento e atividades antimicrobianas (LI *et al.*, 2014). A utilização terapêutica de produtos naturais requer conhecimento prévio de seus compostos farmacologicamente ativos e a determinação de seu potencial. Além disso, a avaliação da toxicidade é muito importante, tendo em vista a possível presença de constituintes nocivos, que podem causar riscos à saúde, por seus efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (KARAM *et al.*, 2013).

7. CONCLUSÕES

Os compostos bioativos observados no presente estudo apresentaram maior concentração no extrato da folha da *C. xanthocarpa* extraída pelo solvente etanol70%. Este grupo demonstrou relação positiva nos ensaios de capacidade antioxidante (DPPH e ABTS), porém o mesmo não foi observado nas análises *in vitro* (células da linhagem adenocarcinoma humano H295R e linhagem de macrófagos de ratos RAW 264.7). O grupo F-hex apresentou efeito na viabilidade celular nas células H295R, enquanto o grupo P-hex apresentou efeito biológico na atividade de macrófagos nas células RAW 264.7, demonstrando aumento da ação fagocitária e no volume lisossomal, por outro lado desencadeou diminuição da adesão de macrófagos. Deve-se considerar a existência de outros compostos bioativos nos extratos que não foram identificados ou detectados devido a baixas concentrações e metodologia, sendo, portanto, necessárias análises fitoquímicas mais detalhadas em futuros estudos, além de testar outras concentrações dos extratos nas linhagens celulares.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 5° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 576 p. 2008.
- ABE, S. Y.; SILVA, S. M.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Phytochemical screening, total flavonoids content and antioxidant capacity of *Campomanesia xanthocarpa* mart. Ex o. Berg (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. XI, n.2, p. 01–14, 2014.
- ABRAFRUTAS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FRUTAS. **Estatística de exportações brasileiras de frutas frescas 2016**. Acesso em 17/02/2017, as 17:00 horas. Disponível em: http://abrafrutas.org/index.php?option=com_content&view=article&id=235:estatistica-de-exportacoes-brasileiras-de-frutas-frescas-2016&catid=95&Itemid=259&lang=pt-br.
- ADOUM, O. A. Absolute configuration of components isolated from the root of *Ximenia americana* Linn. **International Journal of Chemistry**, v.19, n.2,p.67-72, 2009.
- ALI, R. MIRZA, Z. ASHRAF, G. M. KAMAL, M. A. ANSARI, S. A. DAMANHOURI, G. A. ABUZENADAH, A. M. CHAUDHARY, A. G. SHEIKH, I. A. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. **Anticancer Research**, p. 2999-3005, 2013.
- ALMEIDA, J. M. L.; SANTANA, R.; ROCHA, L. M.; SANTOS, E. V. M.; SHARAPIN, N. Processo de fabricação e determinação do prazo de validade do Xarope de Guaco. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, UNIFESP. **Anais**. Águas de Lindóia, São Paulo, 08.019, 197, 1998.
- ALMEIDA, R. C.; COSTA, D. M. V.; OLIVEIRA, G. L. S.; MENDES, S. M. V. Abordagem fitoquímica do extrato foliar da guabiraba, *Campomanesia lineatifolia*. In.: V Congresso Norte-Noredeste de Pesquisa e Inovação - CONNEPI 2010. **Anais**. Instituto Federal de Alagoas. 2010.
- ALONSO-CASTRO, A.J., VILLARREAL, M.L., SALAZAR- OLIVO L.A., GOMEZ-SANCHEZ M., DOMINGUEZ F., GARCIA-CARRANCA A., Review: Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 945-972, 2011.
- ALVES, A. M.; ALVES, M. S. O.; FERNANDES, T. DE O.; NAVES, R. V., NAVES, M. M. V. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabiroba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 3, p. 837-844, Setembro 2013.
- ALVES, R. E., BRITO, E. A., RUFINO, M. S. M., & SAMPAIO, C. G. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with acerola. **Acta Horticulturae**, v.773, p.299–305. 2008.
- AMARAL, E. V. E. J., REIS, E. F., RESSEL, K., PINTO, J. F. N.. Morphological description of two species of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.7, n.1, p.42-52, 2016.

AMARAL, M.P.H.; VIEIRA, F.P.; LEITE, M.N.; AMARAL, L.H.; PINHEIRO, L.C.; FONSECA, B.G.; PEREIRA, M.C.S.; VAREJÃO, E.V. Coumarin content of guaco syrup stored at different temperatures. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.2b, n.19, p.607-611, abr./jun. 2009.

AMARANTE, C. V. T.; SOUZA, A. G.; BENINCÁ, T. D. T.; STEFFENS, C. A. Phenolic content and antioxidant activity of fruit of Brazilian genotypes of feijoa. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.52, n.12, p.1223-1230, dez. 2017.

AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, mar./abr. 2006.

ANDRES, V., VILLANUEVA, M. J., & TENORIO, M. D. Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies. **LWT - Food Science and Technology**, p.70–78, 2016.

ANNADURAI, G.; ROSE, B.; MASILLA, P.; JOTHIRAMSHEKAR, S.; PALANISAMI, E.; PUTHIYAPURAYIL, S.; PARIDA, A. K. Antimicrobial , antioxidant , anticancer activities of *Syzygium caryophyllatum* (L .) Alston Full Text Introduction. **International Journal of Green Pharmacy Impact Factor**, v. 4, p. 4–5, 2012.

ARAÚJO, L. C. A.; RIOS, N. L.; BOLETI, A. P. A.; SANTOS, E. L. *Campomanesia velutina* leaves extracts exert hypouricemic effects through inhibition of xanthine oxidase and ameliorate inflammatory response triggered by MSU crystals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2016.

ARRUDA, M. F. C.; MIGUEL, O. G.; STUELP-CAMPELO, P. M.; DUARTE, M.R. Leaf and Stem Morpho-Anatomy of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.32, n.9, p. 1342. 2013.

BACANLI, M., BASARAN, A. A., BASARAN, N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin, **Food and Chemical Technology**, v.81, p.160-170, 2015.

BALLVE ALICE, C.; SARAIVA DE SIQUEIRA, N. C.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. B.; JOSÉ, K. F. D. **Plantas medicinais de uso popular** (Atlas farmacognóstico). Editora da ULBRA, Canoas, p. 205, 1995.

BAMPOULI, A. *et al.* Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.1, n.3, p.81-91, 2014.

BANDGAR BP, GAWANDE SS, BODADE RG, TOTRE JV, KHOBRADE CN. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorgan Med Chem**. v.18, p 1364.2010.

BARBIERI, R. L.; GOMES, J. C. C.; ALERCIA, A.; PADULOSI, S. Agricultural Biodiversity in Southern Brazil: Integrating Efforts for Conservation and Use of Neglected and Underutilized Species. **Sustainability**, v.6, p.741-757, 2014.

BARBOSA J. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.: estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante. 2009. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2009.

BARNES, P.J. Cytokines and mediators of chronic asthma. **Am J Crit Care Med**, v. 150, p. 42-9, 1994.

BARROSO, G.F. **BMLP**- Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura. Programa de Monitoramento Ambiental. Protocolo para Análise de clorofila *a* e feopigmentos pelo método fluorímetro TD- 700. Vitória, Espírito Santo, 1998. p.1-21.

BATAGLION, G. A.; DA SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. F. Simultaneous quantification of phenolic compounds in buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.) by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 66, p. 396-400, 2014.

BATISTA, A. G.; DA SILVA, J. K.; A CAZARIN, C. B. B.; BIASOTO, A. C. T.; SAWAYA, A. C. H. F.; PRADO, M. A.; MAROSTICA JÚNIOR, M. R. Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves. **LWT - Food Science and Technology**. v.76, p.284-291. 2017.

BERZOFSKY, J.A. TERABE, M.; KON OH, S.; BELYKOV, I . M.; AHLERS, J. D.; JANIK, J. E.; MORRI, J. C. Progression new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. **The Journal of clinical investigation**, 2004.

BETA, T.; DUODU, K. G. Bioactive: antioxidants. **Reference Module in Food Science**, v. 86, p. 76-86 P 2016.

BETEMPS, D. LEITZKE; MIOTTO, R.; VIGOLO, J.; SCHAINHUK, L.; PASSOS, C. T. DOS; PEREIRA, M.. **13698 - Estudo exploratório da presença de frutas nativas nas pequenas propriedades da Região do Cantuquiriguaçu/PR**. Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – v.8, n.2, 2013.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PREDO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethno pharmacology**, v 93, p. 385-389, 2004.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies. In L. Packer (Ed.), **Methods in Enzymology**. v. 335. San Diego, CA: Academic Press, p.343-355. 1990.

BOWDISH, D.M.E.; LOFFREDO, M.S.; MUKHOPADHYAY, S.; MANTOVANI, A; GORDON, S. Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. **Microbes and Infection**, v.9, p.1680-1687, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 30, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição (2005). Food guide for the Brazilian people: Promoting healthy eating [**Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável**]. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde 236 pp.

BUCIĆ-KOJIĆ A., PLANINIĆ M., TOMAS S., BILIĆ M., VELIĆ D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, p.236–242, 2007.

CÁCERES-CASTILLO, D., MENA-REJÓN, G. J., CEDILLO-RIVERA, R., QUIJANO, L. 21 β -Hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. **Phytochemistry**, v.69, n.4, p.1057-1064. 2008.

CAMPOS, J. F.; ESPINDOLA, P. P. de T.; TORQUATO, H. V.; VITAL, W. D.; JUSTO, G. Z.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; SOUZA, K. de P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; SANTOS, E. L. dos. Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. **Frontiers in Pharmacology**.v. 8, n.466.August 2017.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behaviour of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology and Medicine**. v.22, p.749-760. 1997.

CARDOSO, C.A.L.; SALMAZZO, G.R.; HONDA, N.K.; PRATES, C.B.; VIEIRA, M.C.; COELHO, R.G. Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia species* (Myrtaceae). **J Med Food**. v.13, n.5, p.1273-6. 2010,

CARDOSO, C.A.L.; SILVA, J.R.M.; KATAOKA, V.M.F.; BRUM, C.S.; POPPI, N.R. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-MS do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubens*. **Revista de Ciências Farmacéuticas**. Básica Apl. v.29, n. 3, p.297-301. 2008.

CARDOSO, C. A. L.; SALVADOR, M.J.; CARVALHO, J.E.; COELHO, R,.. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.72, n.4, p.309-15, 2013.

CARNEIRO, R.G.S.; CASTRO, Q.C.; ISAIAS, R.M.S. Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall. **South African Journal of Botany**.v.92, p.97–104, 2014.

CARVALHO, F. M. V.; MARCO JÚNIOR, P.; FERREIRA, L. G. The Cerrado into pieces: habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, Essex, v. 142, n. 7, p. 1392-1403, 2009.

CASSOLA, F.; LOPES, E. F. M.; GARCIA, V. L.; LUSA, M. G.; MAYER, J. L. S. Detecção histoquímica de cumarinas em espécies vegetais através do uso da microscopia de fluorescência. In.:68° Congresso Nacional de Botânica e XXXVI Jornada Fluminense de Botânica. **Anais**. Rio de Janeiro, 20 a 25 de agosto de 2017 p138.

CASTRO, M.D. L.; CAPOTE, F.P. Soxhlet extractions: past and present pancea. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CHEN, L., YIN, H., LAN, Z., MA, S., ZHANG, C., YANG, Z., LI, P., LIN, B. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. **Journal. Ethnopharmacol.** v.135, p.399–405, 2011.

CHI, D. S.; QUI, M. G. U.; KRISHNASWAMYA. LI, C.; STONE, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide** v.8, n. 2, p.127–132, 2003.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutos e Hortaliças: glossário.** Lavras: Editora UFLA, 2006.

CHO, M. HUNT, T. K. HUSSAIN, M. Z. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.** v.280, p. 2357-2363, 2001.

CHUA, L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.** v.150, p.805–817, 2013.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G.; Trends. **Food Sci. Technol.** v.9, p.168, 1998.

COSTA-LOFUTO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p. 47-58, 2010.

COTRAN RS, KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and câncer. **Nature.** v.420, p.860–867, 2002.

COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; SILVA, J. R.; VILEGAS, M. W.; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, São Paulo, v.33, n4, p.53-60, 2008.

COUTINHO, I.D.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; COELHO, R. G.; VIEIRA, M. C.; CARDOSO, C. A. L. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v.20, n.3, p.322-327, Jun./Jul. 2010.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual Química**, v.1, p.241-256, 2009.

CRUVINEL, W. M., MESQUITA JR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S., SILVA, N. P., ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia.** v.50, n.4, p.434-461, 2010.

DA COSTA, J. P. CARVALHAIS, V. AMADO, F. SILVA, A. NOGUEIRA-FERREIRA, R. FERREIRA, R. HELGUERO, L. VITORINO, R. Anti-tumoral activity of human salivary peptides. **Peptides Science**, v.71 p. 170-178, 2015.

DE PASCUAL, T. J., BELLIDO, I. S., GONZÁLEZ, M. S., & VICENTE, S. Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from *Santolina oblongifolia*. **Phytochemistry**, v.25, n.1, p.185-190. 1985.

DECS – Descritores em Ciências da Saúde. Biblioteca virtual em saúde. 2018.

DELVING, L. K. de O. B. **Avaliação dos potenciais citotóxico e antiinflamatório dos extratos etanólico e hexânico da *Calyptanthes grandifolia* O.berg em cultura celular.** 2015. 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Lajeado: UNIVATES, 2015.

DIEAMANT, G.C.; VELAZQUEZ, M.D.C.; EBERLIN, S.; NOGUEIRA, C.; WERKA, R.M.; SANTOS, I.M.N.S.R; PERÓN, C.R.G.S.; QUEIROZ, M.L.S. Relievene® SK: neuroimmunomodulation for dermocosmetic treatment of sensitive skin. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 65, p. 34-45, 2008.

DONADO-PESTANA *et al.* Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v.69, p.170–178, 2015.

ELBE, J. H. von. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. (Ed.). *Química de losalimentos*. 2. ed. Zaragoza: Wisconsin, p. 782-799, 2000.

ELTZSCHIG HK, ECKLE T, 2011. Ischemia and reperfusion from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v.17, p.1391–1401, 2011.

ESPINDOLA, P. P. T., ROCHA, P. S., CAROLLO, C. A., SCHMITZ, W. O., PEREIRA, Z. V., VIEIRA, M. C., SANTOS, E. L., SOUZA, K. P. (2016) Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 8 , 8 p, 2016.

FERNANDES, T. O.; ÁVILA, R. I.; MOURA, S. S.; RIBEIRO ,G. A.; NAVESSA, M. M. V.; VALDARES, M. C. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports** v.2, p.184–193, 2015.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. **Journal Immunology Methods**. v.131, n.2, p.165-172, 1990..

FERREIRA, L. C.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; SOUZA FILHO, J. D.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 145, n. 1, p. 100-108, 2013.

FERREIRA, L.C., GRABE-GUIMARÃES, A., PAULA, C.A., MICHEL, M.C.P., GUIMARÃES, R.G., REZENDE, S.A., SOUZA FILHO, J.D., SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.

Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal Ethnopharmacol.** v.145, p.100–108, 2013a.

FIGUEIRÔA, E. D. O.; CLÁUDIO, L.; MOUTINHO, C.; MELO, L. D., KELLE, J.; LEMOINE, D. A.; TEREZA, M. Evaluation of Antioxidant, Immunomodulatory and Cytotoxic Action of Fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content. **The Scientific World Journal**, 2013.

FILHO, G. B.; PEREIRA, F.E.; GUIMARÃES, R.C. **Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares**. In.: Bogliolo Patologia Geral. 4^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 8, p. 226- 281, 2009.

FOTI, M.; PIATTELLI, M.; BARATTA, M. T.; RUBERTO, G. Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.44, p.497-501, 1996.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 43, p. 228-265, 2004.

FREITAS, A. C. T. Carcinoma da glândula supra-renal – Revisão. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.20, n.3, p.195-200, 2007.

FREITAS, P.C.D. 1999. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: *Pothomorphe umbellata* (L) Miq e *Piper regnellii* (Miq) CDC**. São Paulo. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 1999

FRESHNEY, R. I. **Basic Principles of Cell Culture, in Culture of Cells for Tissue Engineering** (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. p 03-22, 2006.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society**, v. 58, n. 9, p. 537–52, 2009.

GAUTAM, N. MANTHA, A. K. MITALL, S. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. **BioMed Research International**, p. 23, 2014.

GAZDAR, A.F., OIE, H.K., SHACKLETON, C.H., CHEN, T.R., TRICHE, T.J., MYERS, C.E., CHROUSOS, G.P., BRENNAN, M.F., STEIN, C.A., LA ROCCA, R.V. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. **Cancer Research**. v.50, p.5488–5496. 1990.

GAZZONI, D. L. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p.109- 122, 2003.

GIL-CHÁVEZ, J. G.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: na overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.1,p.12, 2013.

GOBBO-NETO L, LOPES NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova.** v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOMES, B. S.; NETO, B. P. S.; LOPEZ, E. M.; CUNHA, F. V. M.; ARAÚJO, A. R. WANDERLEY, C. W. S.; WONG, D. V. T.; Cé. R. P. L.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, D. P.; VENES, J.; MEDEIRO, R.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, F. A. Anti-inflammatory effect of the monoterpene myrtenol is dependent on the direct modulation of neutrophil migration and oxidative stress, **Chemico-Biological Interactions**,2017.

GOUVÊA MR. Estudo Botânico e Fitoquímico de *Campomanesia xanthocarpa* Berg (Myrtaceae), 2001, 67f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná -UFPR, Curitiba, 2001.

GRABACKA, M. M.; GAWIN, M.; PIERZCHALSKA, M. Phytochemical modulators of mitochondria: the search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 9, p. 913–42, 2014.

GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids.** New York: V. N. Reinhold, 351 p. 1991.

HA DO, T., TUAN, D. T., THU, N. B., NHIEM, N. X., NGOC, T. M., YIM, N., & BAE, K. Palbinone and triterpenes from Moutan Cortex (*Paeonia suffruticosa*, Paeoniaceae) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells. **Bioorganic Medicine Chemistry Lett**, v.19, n.19,p5556-5559. 2009.

HAAS, LÍRIO INÁCIO RECKZIEGEL. Caracterização físico-química, fitoquímica, atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e efeitos antiproliferativos de extratos dos frutos do araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e da guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.). 2011. 107f. (Tese Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell.** v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HARRISON, R. E., BUCCI, C., VIEIRA, O. V., SCHROER, T. A., GRINSTEIN, S. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. **Molecular and Cellular Biology** v.23, p.6494–6506, 2003.

HARVEY, P.W., EVERETT, D.J. The adrenal cortex and steroidogenesis as cellular and molecular targets for toxicity: critical omissions from regulatory endocrine disrupter screening strategies for human health? **J. Appl Toxicology.**v.23, p.81–87, 2003.

HMOTEH, J.; MUSTHAF, K. S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Effects of *Rhodymyrtus tomentosa* extract on virulence factors of *Candida albicans* and human neutrophil function. **Archives of OralBiology**v.87,p.35–42, 2018.

IBRAF - Sistema Agroalimentar de Frutas e Derivados. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2015.** Editora: Gazeta 2015.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: **incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015. Acessado em 03 de março de 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>

INCA, **Instituto Nacional do Câncer**, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 17-05-2018.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT T. M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia**. O sistema imunológico na saúde e na doença. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 767 p., 2002.

KADRI, A., ZARAI, Z., CHOBBA I.B. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil cultivated from South-Western Tunisia. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 25, p. 5999–6004, 2011.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immune histochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-401, 2002.

KARABEGOVIĆ, I.T. *et al.* The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v.54, p.142- 148, 2014.

KARAKAYA. SIBEL. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 66, 2004.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.15, n.2, p.280–286, 2013.

KAULMANN, A., JONVILLE, M. C., SCHNEIDER, Y. J., HOFFMANN, L., BOHN, T. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v.155, p.240-250, 2014.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; OLIVEIRA, M. F.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. F.; DOS SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J.; VIECILI, P. R. N. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p. 299–305, 2010.

KOOLEN, H. H. F.; DA SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; DE SOUZA, A. Q. L.; DE SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa L. f.*) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467-473, 2013.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

KUSTER, V.C.; VALE, F. H. A. Leaf histochemistry analysis of four medicinal species from Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**v.26, p.673–678, 2016.

KWIATKOWSKI, A.; FRANÇA, G.; OLIVEIRA, D. M.; ROSA, C. I. L. F.; CLEMENTE, E. Avaliações químicas da polpa e resíduo da polpa de amora-preta orgânica, cv. Tupy. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.1, n.1, p.43-45 Campo Mourão- PR, 2010.

LAZARINI, J. G., FRANCHIN, M., INFANTE, J., PASCHOAL, J. A. R., FREIRES, I. A., de ALENCAR, S. M., ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory activity and polyphenolic profile of the hydroalcoholic seed extract of *Eugenia leitonii*, an unexplored Brazilian native fruit. **Journal of Functional Foods**v.26, p.249–257, 2016.

LEE, J. E.; BERGER, D. H.; EL-NAGGAR A'; HICKEY, R.C.; VASSILOPOULOU-SELLIN, R.; GAGEL, R. F.; BURGESS, M. A.; EVANS, D. B. Surgical management, DNA content, and patient survival in adrenal cortical carcinoma. **Surgery Journal**,1995.

LEE, S., MIN, B., & KHO, Y. Brine shrimp lethality of the compounds from *Phryma leptostachya* L. **Arch Pharm Res**, v.25, n.5, p.652-654, 2002.

LEE, W. L., HARRISON, R. E., GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v.5, p.1299–1306, 2003.

LERARI, A. M.; MENDONÇA, B. B.; LIN, C. J. Avanços Recentes no Conhecimento dos Mecanismos Moleculares Envolvidos na Tumorigênese Adrenocortical. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 49, n. 5, 2005.

LEVY, A. S.; CARLEY, S. Cytotoxic Activity of Hexane Extracts of *Psidium Guajava* L (Myrtaceae) and *Cassia Alata* L (Caesalpineaceae) in Kasumi-1 and OV2008 Cancer Cell Lines. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 201–207, 2012.

LI, A.-N.; LI, S.; ZHANG, Y.-J.; XU, X.-R.; CHEN, Y.-M.; LI, H.-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020–6047, 2014.

LI, H.; HAO, Z.; WANG, X.; HUANG, L.; LI, J. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. **Bioresource Technology**.v.100 n.2 p.970-974, 2009.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.

LIMBERGER, J.; SANT'ANNA, L. S.; EHLE, C.; MERLUGO, L.; BLANCO, M.; MENDEZ, A. S. L.; MOREIRA, C. M. Composição química e efeito hipotensor do extrato de *Campomanesia xanthocarpa*. **Anais**In. VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal do Pampa, 2016.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal Nutrition**, v.134, n.12, p.3479-3485, 2004.

LONDON CANCER NEU DRUGS GROUP - APC/DTC Briefing: **Mitotane for the adjuvant treatment of adrenocortical carcinoma**, 2011.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C.B.C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.2, p.1519-5228, 2002.

LOPES, L., GODOY, L. M. F., de OLIVEIRA, C. C., GABARDO, J., SCHADECK, R. J. G., de FREITAS BUCHI, D. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular-aspects of macrophage activation by *Canova medication*. **Micron** v.37, p.277–287, 2006.

LÓPEZ-POSADAS R, BALLESTER I, ABADÍA-MOLINA AC, SUÁREZ MD, ZARZUELO A, MARTÍNEZ-AUGUSTIN O, SÁNCHEZ DE MEDINA F. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v.15, p.495-506, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1, 368 p., 2002.

LU, J.J.; BAO, J.L.; WU, G.S.; XU, W.S.; HUANG, M.Q.; CHEN, X.P.; WANG, Y.T. Quinones Derived from Plant Secondary Metabolites as Anti-cancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 456–463, 2013.

MACMICKING J. XIE Q. W. NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p. 323-350, 1997.

MADALOSSO et al. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, p. 772– 779, 2012.

MALTA, L. G.; TESSARO, E. P.; EBERLIN, M.; PASTORE, G. M.; LIU, R. H. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Journal Food Research International**, v 53, n 1, p. 417-425, 2013.

MANDHANE, S. N.; SHAH, J. H.; THENNATI, R. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects. **International Immunopharmacology**, v.11, p.1646–1662, 2011.

MARKMAN B. E. O. **Caracterização farmacognóstica de *Campomanesia xanthocarpa*** Myrtaceae. 2002, 169f. Dissertação (Ciencias Farmaceuticas). São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP; 2002.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology** v.94, p.55–57, 2004.

MARTINS, E. R., CASTRO,D.M., CASTELLANI,D.C., DIAS,J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: EDUFV. 1998

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MATOS, A. A. **Efeito do extrato de aroeira no processo de proliferação e mineralização de osteoblastos *in vitro***. – Bauru, 2013. 131f. Dissertação (Mestrado)– Faculdade Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.2013

MEDZHITOV R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v.140, p.771-776. 2010.

MELO, L. V.; SAWAYA, A. C. H. F. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.25, p.105–110, 2015.

MEOTTI, F.C., SENTHILMOHAN, R., HARWOOD, D.T., MISSAU, F.C., PIZZOLATTI, M.G., KETTLE,A.J. Myricitrin as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: implications for the pharmacological effects of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.** v.44,p.109–120, 2011.

MICHEL et al. Extracts from the leaves of *Campomanesia velutina* inhibits production of LPS/INFinduced inflammatory mediators in J774A.1 cells and exerts anti-inflammatory and antinociceptive effects *in vivo*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v.23, p.927-936, 2013.

MISSAU, F. C.; JUNIOR, E. P.; PIZZOLATTI, M. G. Síntese de novas cumarinas através de um composto natural, a febalosina. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.**Anais**.2009.

MIZGIER, P., KUCHARSKA, A. Z., SOKOL-LETOWSKA, A., KOLNIAK-OSTEK, J., KIDON, M., FECKA, I. Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. **Functional Foods**,v.21, p.133–146, 2016.

MOLDOVAN, B., FILIP, A., CLICHICI, S., SUHAROSCHI, R., BOLFA, P.,LUMINITA DAVID, L. Antioxidant activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits extract and the *in vivo* evaluation of its anti-inflammatory effects. **Journal of Functional Foods**, v.26, p. 77–87, 2016.

MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. INFLAMAÇÕES: CONCEITOS GERAIS E INFLAMAÇÃO AGUDA. IN: MOTENEGRO, MARIO R.; Franco, Marcello. **Patologia: Processos gerais**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, p.109-128, 1999.

MOREIRA, F. D. P. M., COUTINHO, V., MONTANHER, A. B. P., CARO, M. S. B., BRIGHENTE, I. M. C., PIZZOLATTI, M. G., & MONACHE, F. D. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*: bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**,v.26,p.309-311, 2003.

MORESCO, H. H., PIZZOLATTI, M. G., & BRIGHENTE, I. M. C. Constituents of *Psidium cattleianum*. **Chemistry of Natural Compounds**,v.47, n.6, p.1028-1029, 2012.

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

MOURA-COSTA, G. F. *et al.* Antimicrobial activity of plantas used as medicinal son na indigenous reserve in Rio das cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, p.631 – 638, 2012.

MÜLLER, L., FROHLICH, K., & BOHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferricreducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v.129, p.139-148, 2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NANTITANON, W.; YOTSAWIMONWAT, S.; OKONOGLI, S. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. **LWT. Food Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 1095–1103, 2010.

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. **Journal of Food Research International**, v. 50, p. 70-76, Oct. 2013.

NIEDERGAN, F., CHAVRIER, P., 2004. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome. **Current Opinion in Cell Biology** v.16, p.422–428, 2004.

NOBREGA, A. B.; FERNANDES, T.; SLANA, G. A.; JOFFILY, A.; PAIVA, S. R. Contribuições ao estudo farmacognóstico de *Eugenia florida* DC. (*Myrtaceae*). **Anais do 68º Congresso Nacional de Botânica e XXXVI Jornada Fluminense de Botânica**. p.135. Rio de Janeiro, 20 a 25 de agosto de 2017.

NORATTO, G. D., ANGEL-MORALES, G., TALCOTT, S. T., MERTENS-TALCOTT, S. U. Polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular Endothelial cells (HUVEC) from glucose- and lipopolysaccharide (LPS) -induced inflammation and target microRNA-126. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.7999–8012, 2011.

NOWICKA, P., WOJDYLO, A., SAMOTICHA, J. Evaluation of phytochemicals, antioxidant capacity, and antidiabetic activity of novel smoothies from selected Prunus fruits. **Functional Foods**, v.25, p. 397-407, 2016.

OKOH, O. O., SADIMENKO, A. P., AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p.308–312, 2010.

OLIVEIRA FERNANDES et al. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports**, v.2, p.184–193, 2015.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v.48, p. 170–179, 2012.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Medicina**, Campinas, v.18, n.1, p.230-239, 2016.

OLIVEIRA-CAMPOS, M. *et al.* Impacto dos fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis na qualidade de vida. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2013.

OMS, Organização Mundial da Saúde – OMS. **World cancer report 2014**. International Agency for Research on Cancer (Iarc). Cancer Incidence in Five Continents (CI5) Volumes I to X. IARC CancerBase No. 12. Edited by Parkin DM.

OMS, Organização Mundial da Saúde. International Agency form Reserach on Cancer. **GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Acessado em 03 de março de 2017. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> .

OSÓRIO, A. de C.; MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Rev. Bras. Cienc. Farm. Braz. J. Pharm. Sci.** v.40, n.4, out./dez., 2004.

PALOZZA, P.; CATALANO, A.; SIMONE, R. E.; MELE, M. C.; CITTADINI, A.. Effect of lycopene and tomato products on cholesterol metabolism. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.61, n.2, p.126–134, 2012.

PARK, H. J.; YANG, H. J.; KIM, K. H.; KIM, S. H. Aqueous extract of *Orostachys japonicus* A. Berg exerts immunostimulatory activity in RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology** v.170, p.210–217, 2015.

PARK, S.H., KOO, H.J., SUNG, Y.Y., KIM, H.K. The protective effect of *Prunella vulgaris* ethanol extract against vascular inflammation in TNF- α -stimulated human aortic smooth muscle cells. **BMB Reports** v. 46, n. 7, p. 352-7, 2013.

PARKAR, S.G., TROWER, T.M., STEVENSON, D.E. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. **Anaerobe** v.23, p.12–19, 2013.

PASCOAL, A. C. R. F. *Campomanesia adamantium e Campomanesia guaviroba*: fitoquímica e estudo in vitro e in vivo visando a desterminação da atividade biológica e toxicidade [tese doutorado] Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas-SP. 2015

PASCOAL, A. C. R. F.; EHRENFRIED, C. A.; EBERLIN, M. N.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.. Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. **Natural Product Communications**, v 6, n 7, p.969–972, 2011.

PATEL, P. R.; RAO, T. V. R. Growth and Ripening in Black Plum [*Syzygium cumini* (L.) Skeels], **International Journal of Fruit Science**, v.14, n.2, p.147-156, 2014.

PEDROSO, A. P. D, Isolation of syringaldehyde from Mikania laevigata medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira Farmacologia** v.1, p.63-69. 2008.

PEREIRA, M. C.; HILL, L. E.; ZAMBIAZI, R.C.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOOT, SL; GOMES, C. L. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. **LWT - Food Science and Technology** v.63, p.100-107, 2015.

PEREIRA, R. M.; MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B. C.; PIANOVSKI, M.; FRANÇA, S. N.; BOGUSZEWSKI, M. C. S.; COSTA, O.; CAT, I.; LACERDA FILHO, L. L.; SANDRINI, R. Tumores do Córtex Adrenal na Infância. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo** v.48, n.5, Outubro 2004.

PINTO, E.M. et al. TP53-associated pediatric malignancies. **Genes & Cancer**, v.2, n. 4, p.485-490, 2011.

PIPE, R. K.; COLES, J.A.; FARLEY, S.R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*, *Tech. Fish Immunol*, v.4, p.93–100, 1995.

PRADO, L. C. S.; SILVA, D. B.; OLIVEIRA-SILVA, G. L.; RENATA, K. N. H.; CANABRAVA, H. A. N.; BISPO-DA-SILVA, L. B. The Gastroprotective Effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) Leaf Extract : The Possible Role of Condensed Tannins. **Biology Pharmacology Bull.**, v.37, n.5, p.722–730, 2014.

RAINEY, W.E.; SANER, K.; SCHIMMER, B. P. Adrenocortical cell lines. **Molecule Cell Endocrinology**, v.288, n. 1-2, p.23-38, 2004.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, London, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REPETTO, A.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, **Nature Protocol**. v.3, p.1125-1131, 2008.

RIBAS, P. S.; CUNHA, E. B.; AITA, C. A. M. Análise *in vitro* do extrato de *Campomanesia xanthocarpa* na ativação celular em linhagens monocíticas. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - SEMIC, 23., 2015, Curitiba. **Anais**. Curitiba: PUCPR, 2015.

RIBEIRO, Renata da Silva. Immunomodulation and action anti-Leishmania (Vianna) braziliensis promastigotes by *Ouratea cuspidata* (Ochnaceae). 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; ANDREW NILES, A. L.; SARAH DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; LISA MINOR, L. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual [Internet]**. Created: May v.1, 2013; Updated: July 1, 2016.

RIZZETO, L.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; SELMI, C. Connecting the immune system, systemic chronic inflammation and the gut microbiome: The role of sex. **Journal of Autoimmunity**, 2018.

ROCHA, B.S., *et al.*, Tuning constitutive and pathological inflammation in the gut via the interaction of dietary nitrate and polyphenols with host microbiome. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, 2016.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado/ Total phenolics and condensed tannins in native fruits from Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROCKENBACH, I.I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 238-244, 2008 .

RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; CANEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A. Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos pelo óleo essencial das folhas da *Eugenia uniflora* L. In.: 64ª Reunião Anual de SBPC. **Anais**, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: CHARALAMBOUS, F. (Ed.). **Shelf life of foods and beverages chemical, biological, physical and nutritional aspects**. Amsterdam: Elsevier Science, p. 547-589, 1993.

ROMAN, S. Adrenocortical carcinoma. **Current Opinion in Oncology**, v.18, p.36-42, 2006.

ROOT, R. K. & J. A. Metcalf. **Journal Clinical Investigation** v.60, p.1266, 1977.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v.166, p. 1685-1701, 1987.

RUBEL, R. SANTA, H. D. S. FERNANDES, L. C. BONATTO, S. J. R. BELLO, S. FIGUEIREDO, B. C. LIMA FILHO, J. H. SANTOS, C. A. M. SOCCOL, C. R. Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss:Fr) Karst used as a dietary supplement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v.27, p.1083-1089, 2011.

RUBEL, R. SANTA, H. S. D. BONATTO, S. J. R. BELLO, S. FERNANDES, L. C. BERNARDI, R. D. GERN, J. SANTOS, C. A. SOCCOL, C. R. Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Leyss: Fr) Karst. Triggers Immunomodulatory Effects and Reduces Nitric Oxide Synthesis in Mice. **Journal of Medicinal Food.**, v.13, p.142-148, 2010.

RUEDA, A. Q. RODRIGUEZ, I. G. ARANTES, E. C. SETÚBAL, S. S. CALDERON, L. A. ZULIANI, J. P. STÁBELI, R. G. SOARES, A. M. Biochemical Characterization, Action on Macrophages, and Superoxide Anion Production of Four Basic Phospholipases A2 from Panamanian *Bothrops asper* Snake Venom. **Biomedical Research International** 9p, 2013.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**,v.121, p.996–1002, 2010.

RUIZ-NÚÑEZ, B.; et al. Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, p.1183–1201, 2013.

SAEDI, T. A.; NOOR, S.; ISMAIL, P.; OTHMAN, F. The Effects of Herbs and Fruits on Leukaemia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**,v.7, p.1–8, 2014.

SAKLANI, A., & KUTTY, S. K. Plant derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**,v.13, p.161–171, 2008.

SANDHAR, H.K., KUMAR, B., PRASHER, S., TIWARI, P., SALHAN, M., SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p. 25–41, 2011.

SANT'ANNA, L. S.; MERLUGO, L.; EHLE, C. S.; LIMBERGER, J.; FERNANDES, M. B.; SANTOS, M. C.; ANDREAS SEBASTIAN LOUREIRO MENDEZ, A. S. L.; PAULA, F. R.; MOREIRA, C. M. Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa*. Hindawi Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**. 11p., 2017

SANTOS, L. F. dos. **Produção e Aplicação da levana de *Bacillus subtilis* natto em filmes isolados para liberação em cólon – específica de fármacos.**2010. 255 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Área agroindustrial, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

SANTOS, M. S.; LIMA, J.J; PETKOWICZ, C. L. O.; CANDIDO, L. M. B. Chemical characterization and evaluation of the antioxidant potential of gabiropa jam (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). **Acta Scientiarum**. Agronomy Maringá, v. 35, n. 1, p. 73-82, Jan.-Mar., 2013.

SANTOS, MARLI DA SILVA. **Impacto do processamento sobre as características físico-químicas, reológicas e funcionais da gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg)** 2011. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2011.

SEBRAE – **Boletim de Inteligência**. Outubro, 2015. Acesso em 17/02/2017, as 16:50 horas. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)

SEKIROV, I., RUSSELL, S.L., ANTUNES, L.C., FINLAY, B.B. Gut microbiota in health and disease. **Physiology Revist** v.90, n.3, p.859–904, 2010.

SHIMOSAKI, S., TSURUNAGA, Y., ITAMURA, H., NAKAMURA, M. Anti-allergic effect of the flavonoid myricitrin from *Myrica rubra* leaf extracts in vitro and in vivo. **Nature Prodoer Resion** V.25, p.374–380, 2011.

SIEGLER, D. S.; SEILHEIMER, S.; KEESY, J.; HUANG, H. F. Tannins from Four Common Acacia Species of Texas and Northeastern Mexico. **economic Botany**, v. 40, n. 2, p. 220-232, 1986.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, E. P.; VILAS BOAS, E. V. B.; RODRIGUES, L. J.; SIQUEIRA, H. H. Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.29, n.4, p.803-809, 2009.

SILVA, L. S. **Hormônios da glândula adrenal**. 2005. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SILVA, R. DE O.; CARDOSO, C. A. L. Extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*. **Anais do ENIC**. n.2. 2010.

SILVA, S. M. C.; MURA, J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, p.1256, 2010.

SILVA, WALICYRANISON PLINIO da. **Efeito da fração acetato de etila do extrato de *Eugenia uniflora* na expressão global de proteínas durante a morfogênese *Candida albicans***. 2017. 139f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.(Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SKALICKA-WOZNIAK, K.; GLOWNIAK, K. Pressurized liquid extraction of coumarins from fruits of *Heracleum leskowi* with application of solvents with different polarity under increasing temperature. **Molecules**, v.17, p. 4133–4141, 2012.

SLADOWSKI, D.; STEER, S.J.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. An improve MTT assay. **Journal Immunology Methods**, v.157, p. 203-207, 1993.

SOUZA, A. G.; FASSINA, A. C.; SARAIVA, F. R. S. Compostos bioativos e atividade antioxidante em frutas nativas do Brasil. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Agrotrópica**, v.30, n.1, p.73-78. 2018.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALVAGNINI, L. E.; SANTOS, E.; SILVA, V. Y.; MOREIRA, R. R.; SALGADO, H. R.; PIETRO, R. C. Antidiarrheal Activity of *Campomanesia xanthocarpa* Fruit. **Journal of Medicinal Food**, v 14, n 5, p. 528-531, 2011.

SOXHLET, F.: Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes, **Polytechnisches J.** (Dingler's) v.232, p.461, 1879.

STAELS, B., HUM, D.W., MILLER, W.L. Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. **Moleculare Endocrinology** v.7, p.423-433, 1993.

STEWART, P.; BOONSIRI, P.; PUTHONG, S.; ROJPIBULSTIT, P. Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 60, 2013.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; do CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.748-755, 2005.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. **Neoplasia**. In.: Robbins Patologia Básica. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 6, p. 187-243, 2008.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Londres: Academic Press, p. 71-133, 1990.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGLI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, p. 381-388, 2007.

TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 693 p.

TIWARI, P.; Kumar, B.; Kaur, M.; Kaur, G.; Kaur, H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

TOBIN, D.J. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 52-67, 2006.

TOYOHARA, M, DE O.; NICÁCIO, A. E.; BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O.; VISENTAINER, J. V.; MALDANER, L. Otimização de métodos de extração de antioxidantes em frutas. **Anais**. 24º Encontro Anual de Iniciação Científica. 2015.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E., HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.M.;KNIGHT, R.;GORDON, J.I. The human microbiome project. **Nature**v.449, n.7164, p.804-810, 2007.

UMAR, S., MISHRA, N.K., PAL, K., SAJAD, M., NEHA ANSARI, M.M., AHMAD, S., KATIYAR, C.K.,KHAN, H.A. Protective effect of rutin in attenuation of collagen-

induced arthritis in Wistar rat by inhibiting inflammation and oxidative stress. **Indian Journal Rheumatology**, v.7, p.191–198, 2012.

VALADARES M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALDES, L., CUERVO, A., SALAZAR, N., RUAS-MADIEDO, P., GUEIMONDE, M., GONZALEZ, S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. **Food Function**, v.6, n.8, p.2424–2439, 2015.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cmbessédes) O. Berg – Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v 18, n 1, p.15-22, 2006.

VAN-ASSCHE, T.; HUYGELEN, V.; CRABTREE, M. J.; ANTONIADES, C. Gene therapy targeting inflammation in atherosclerosis. **Current Pharmaceutical Design**, v.17, p.4210–4223, 2011.

VASCO, C., RUALES, J., & KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v.111, n.4, p.816–823, 2008.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, p.253–262, 2000.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; DE LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

VINAGRE, A. S.; RONNAU, A. D. R. O.; PEREIRA, S. F.; SILVEIRA, L. U.; WILLAND, E. D. F.; SUYENAGA, E. S. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.2, p.167–177, 2010.

VISCARDI *et al.* Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2016.

VITORINO, R.; FERNANDES, O.; LIMA, L.R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C.; PARENTE, D.M.; CAVALCANTE, A. A. M. C., CAVALCANTE, R. R. L.; MARTINS, M. C. C.; PARENTE, D. M.; CAVALCANTE, A. A. M. C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburanacearensis* (A. C. Smith) (Imburana-decheiro). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 415–422, 2013.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. Fitoquímicos em pitanga (*Eugenia uniflora* L.): seu potencial na prevenção e combate a doenças. **EMBRAPA**, 2009.

VONGSAK, B. *et al.* Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v.44, p.566–571, 2013.

WAITZBERG, DAN LINETZKY. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** 4ª edição. Cap.16, p.295-300. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

WANG, W.; TYAN, Y.; CHEN, Z.; LIN, C.; YANG, M.; YUAN, S.; TSAI, W. Evaluation of the Antioxidant Activity and Antiproliferative Effect of the Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seed Extracts in Oral Carcinoma Cells. **BioMed Research International**, v. 7, p. 1–7, 2014.

WHO, 2013. Disponível em: www.who.int/topics/cancer/en/index.html. Acesso em 17-05-2018.

WOO, C. W. MAN, R. Y. SIOW, Y. L. CHOY, P. C. WAN, E. W. LAU, C. S. Ganoderma lucidum inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.275, p. 165-171, 2005.

XIANG, P., CHEN, T., MOU, Y., WU, H., XIE, P., LU, G., GONG, X., HU, Q., ZHANG, Y., & JI, H. NZ suppresses TLR4/NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages. **Inflammation Research**, v.64, p.799–808, 2015.

XIE, U.; HUANG, L.; ZHANG, C.; ZHANG, Y. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea L.*) extracts and their structure–activity relationships. **Journal of Functional Foods**, v.16, p. 460–471, 2015.

XIMENES, C.; TORRES, J. Development of the Microbiota in Infants and its Role in Maturation of the Gut Mucosa and the Immune System. **Archives of Medical Research**, v 48, p. 663- 792, 2017.

YANG, X. et al. **Preliminary study on neutral red uptake assay as an alternative method for eye irritation test.** *Alternative to Animal Testing and Experimentation*, v. 14, p. 509–514, 2008.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effectes on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

ANEXO

Tabela 2. Médias de todos os ensaios *in vitro*.

Extratos	Concentrações $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ensaio <i>in vitro</i> % (\pm erro)			
		MTT	Fagocitose	C.V.Neutro	Adesão
F-et	Controle	142,6 \pm 6,97	109,7 \pm 7,10	171,8 \pm 14,79	158,8 \pm 23,71
	25	148,5 \pm 6,73	129,8 \pm 4,73	183,1 \pm 13,10	171,6 \pm 26,66
	50	150,8 \pm 10,77	128,5 \pm 5,37	171,0 \pm 12,26	173,0 \pm 20,62
	75	176,0 \pm 9,12	128,3 \pm 3,88	185,5 \pm 15,00	172,1 \pm 13,69
	100	139,4 \pm 8,43	125,1 \pm 4,34	178,2 \pm 5,86	164,7 \pm 21,54
F-hex	Controle	148,5 \pm 5,79	119,9 \pm 6,31	171,8 \pm 14,88	158,3 \pm 21,97
	25	139,1 \pm 5,66	114,2 \pm 4,26	130,6 \pm 13,36	160,8 \pm 15,74
	50	158,2 \pm 5,12	115,6 \pm 6,06	137,1 \pm 11,69	165,2 \pm 11,95
	75	122,8 \pm 5,38	112,1 \pm 5,08	142,7 \pm 10,47	178,4 \pm 10,88
	100	143,5 \pm 6,84	121,5 \pm 5,54	158,1 \pm 17,03	166,7 \pm 13,36
P-et	Controle	140,8 \pm 5,76	96,96 \pm 6,69	118,2 \pm 8,93	164,0 \pm 7,81
	25	119,8 \pm 7,22	105,0 \pm 5,35	143,6 \pm 14,52	213,5 \pm 12,36
	50	129,5 \pm 6,61	110,6 \pm 4,43	152,7 \pm 10,50	210,8 \pm 12,19
	75	122,1 \pm 4,89	106,4 \pm 4,23	145,5 \pm 11,11	125,2 \pm 12,24
	100	148,8 \pm 6,99	104,0 \pm 7,11	128,2 \pm 12,26	246,9 \pm 9,09
P-hex	Controle	140,8 \pm 5,76	96,96 \pm 7,14	132,7 \pm 9,58	164,0 \pm 7,81
	25	129,6 \pm 5,10	123,4 \pm 8,13	140,0 \pm 5,19	173,9 \pm 12,46
	50	139,5 \pm 5,76	144,5 \pm 6,18	130,0 \pm 4,25	166,7 \pm 8,05
	75	141,7 \pm 5,04	145,9 \pm 5,98	143,6 \pm 11,65	109,9 \pm 6,38
	100	122,0 \pm 5,17	138,3 \pm 7,10	121,8 \pm 8,99	99,55 \pm 9,97