

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS EM *Psidium cattleianum* SABINE E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIQUIMIOTÁXICA

BETINA MONTANARI BELTRAME

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS EM *Psidium cattleyanum* SABINE E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIQUIMIOTÁXICA

Dissertação apresentada por **Betina Montanari
Beltrame** para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dr^a. Amélia T. Henriques

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Melissa Schwanz

Porto Alegre, 2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 27 de março de 2020, pela banca examinadora constituída por:

Prof(a). Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof(a). Dra. Edna Sayuri Suyenaga

Feevale

Prof(a). Dra. Renata Biegelmeyer da Silva

Universidade Federal da Bahia

CIP - Catalogação na Publicação

Beltrame, Betina Montanari
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS EM
Psidium cattleyanum SABINE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIQUIMIOTÁXICA / Betina Montanari Beltrame. --
2020.
97 f.
Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Coorientadora: Melissa Schwanz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2020.

1. Psidium cattleyanum. 2. Controle de Qualidade.
3. Atividade anti-inflamatória. I. Henriques, Amélia
Teresinha, orient. II. Schwanz, Melissa, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Farmacognosia (505H) do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento da CAPES e do CNPQ. O autor recebeu bolsa de estudos CAPES.

À minha mãe, pelo incentivo e amor incondicional, e ao meu pai, que onde estiver levo sempre comigo.

Agradecimentos

À Deus, por me dar forças e me capacitar diariamente.

À Prof^a Dr^a Amélia T. Henriques, pela oportunidade, orientação e confiança depositadas.

À Prof^a Dr^a Melissa Schwanz, pela coorientação e incentivo ao ingresso neste programa de pós-graduação, e especialmente pelos ensinamentos, inspiração e amizade desde a graduação.

Aos colegas e amigos do laboratório de Farmacognosia: Bruno, Dejani, Elen, Juliana, Kriptsan, Letícia, Luciana, Maíra, Maria Helena, Maria Júlia, Miriam e em especial às amigas Marí e Mariana, por toda ajuda, ensinamentos e disponibilidade. Um agradecimento mais que especial às amigas: Angélica, Krissie, Marí, Natally, Thamires e Vanessa, pelo acolhimento, amizade e por tantos momentos divertidos, sou muito grata por ter conhecido vocês.

Aos meus melhores amigos, das épocas de escola e faculdade: Andressa, Carla, Carolina, Caroline, Clarissa, Gabriela, Gleice, Guilherme, Kerlloey, Larissa, Letícia, Luana, Márcio e Vinícius, obrigada pelo incentivo e por todos os momentos de descontração.

Aos amigos do grupo de Emaús, Kairós: Ana, Anderson, Cléber, Elen, Franciele, Ivanor, Maurício, Monica, Yuri, e em especial às amigas Monique e Natália, pelas orações e parceria.

E à minha família, em especial ao meu padrasto Juares, pela ajuda na coleta das amostras, e à minha mãe Marilva, pela credibilidade, incansável apoio e amor depositados. É tudo por ti e para ti.

“Sempre chega a hora em que descobrimos que sabíamos muito mais do que antes julgávamos.”

José Saramago

RESUMO

Psidium cattleyanum Sabine (Mytaceae) é uma espécie nativa brasileira, amplamente conhecida pelo consumo de seu fruto, o araçá, rico em compostos fenólicos. Alguns estudos apontam os flavonoides como os principais constituintes químicos das folhas, e ensaios pré-clínicos demonstram o potencial antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório que a espécie detém. Com o objetivo de contribuir com parâmetros de qualidade, a otimização da extração de compostos fenólicos e a validação de uma metodologia analítica para quantificação destes foram desenvolvidas. Ainda, foram identificados os compostos majoritários na espécie e testada a atividade anti-quimiotóxica dos extratos e isolados. O método de extração por ultrassom foi definido e a metodologia analítica por CLAE para quantificação de quercitrina foi desenvolvida e validada. Foram identificados cinco flavonoides principais na espécie: hiperosídeo, miquelianina, quercetina arabinosídeo, quercetina xilopiranosose e quercitrina. Os resultados obtidos permitiram caracterizar dois quimiotipos, sendo que a quercitrina foi o componente majoritário em ambos os tipos. Os teores de quercitrina obtidos nas diferentes amostras variaram de 0.10-1.5% (m/m). A avaliação da atividade anti-quimiotóxica demonstrou um potencial anti-inflamatório da espécie, e todas as amostras testadas inibiram significativamente a migração leucocitária nas concentrações de 0.1, 1 e 10 µg/mL, em comparação com o controle negativo.

Palavras-chave: *Psidium cattleyanum*; CLAE; flavonoides; validação; quimiotaxia

ABSTRACT

Psidium cattleyanum Sabine (Mytaceae) is a native species from Brazil, widely known for the consumption of its fruit, 'araçá', rich in phenolic compounds. Some studies point to flavonoids as the main chemical constituents of the leaves, and pre-clinical trials demonstrated the antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory potential that the species detains. In order to contribute to quality parameters, the extraction optimization of phenolic compounds and the validation of an analytical methodology for their quantification were developed. Also, the major compounds in the species were identified and the antichemotactic activity of the extracts and isolates was tested. The ultrasound extraction method was defined and the analytical methodology by HPLC for quantification of quercitrin was developed and validated. Five main flavonoids were identified in the species: hyperoside, miquelianin, quercetin arabinoside, quercetin xylopyranoside and quercitrin. The results obtained allowed to characterize two chemotypes, with quercitrin being the major component in both types. The levels of quercitrin obtained in the different samples varied from 0.10-1.5% (w/w). The evaluation of antichemotactic activity demonstrated an anti-inflammatory potential of the species, and all the tested samples significantly inhibited the leukocyte migration in the concentrations of 0.1, 1 and 10 µg/mL, in comparison with the negative control.

Keywords: *Psidium cattleyanum*; HPLC; flavonoids; validation; chemotaxis

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

BHT: butilhidroxitolueno

DCC: delineamento composto central

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

COX: ciclo-oxigenase

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

PAL: fenilalanina amônia-liase

PF: planejamento fatorial

USP: Farmacopeia Americana

UV: ultravioleta

XO: xantina oxidase

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1 e 2. Representação da árvore e folhas do araçazeiro.....	35
Figura 3. Frutos do araçá de coloração amarela e vermelha.....	36
Figura 4. Classificação dos compostos fenólicos.....	40
Figura 5. Biossíntese dos compostos fenólicos.....	41
Figura 6. Núcleo fundamental dos flavonoides.....	42
Figura 7. Resultado final da DCC para a otimização.....	84
Figura 8. Variação do teor de quercitrina nas diferentes coletas.....	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. REFERENCIAL TEÓRICO	31
3.1 Família Myrtaceae	33
3.2 Gênero <i>Psidium</i>	33
3.3 <i>Psidium cattleyanum</i> Sabine	34
3.3.1 Aspectos botânicos	34
3.3.2 Aspectos químicos	36
3.3.3 Aspectos farmacológicos e usos populares	37
3.3.3.1 Etnofarmacologia.....	37
3.3.3.2 Atividade antioxidante.....	37
3.3.3.3 Atividade anti-inflamatória.....	38
3.3.3.4 Atividade antimicrobiana.....	38
3.3.3.5 Atividade hipoglicemiante.....	39
3.4 Compostos fenólicos	39
3.5 Controle de qualidade vegetal e validação de métodos analíticos	42
3.6 Otimização da extração.....	44
3.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória	44
4. MANUSCRITO	47
5. DISCUSSÃO GERAL	81
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

O interesse por produtos medicinais oriundos de fontes naturais cresce a cada ano, uma vez que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis para comercialização e utilização na terapêutica são advindos destas fontes, especialmente de plantas medicinais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Entre os países mais promissores para esta área de investigação está o Brasil, país com a maior biodiversidade do planeta. Estima-se que no país encontrem-se cerca de 45.000 espécies de plantas, representando 20 a 22% do total de espécies do mundo (JOLY et al., 2019). Essa vasta biodiversidade proporcionou a descoberta de inúmeras moléculas bioativas, e muitos princípios ativos já foram isolados a partir de plantas brasileiras, estimulando ainda mais o interesse na pesquisa de espécies nativas deste país (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Sabendo que plantas e extratos vegetais assumem grande importância como fonte de matérias-primas para a produção de medicamentos fitoterápicos (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018), cria-se uma necessidade crescente de desenvolvimento de métodos capazes de assegurar o controle de qualidade dos insumos utilizados. É necessária a avaliação da qualidade durante todo o processo de fabricação de um fitoterápico. Sendo assim, determinar a identidade e qualidade do material vegetal é considerada a primeira etapa para garantir a qualidade do produto final (COSTA; GUIMARÃES; VIEIRA, 2015).

Para isso, faz-se necessário o conhecimento dos constituintes químicos presentes em determinada espécie, para que se possa garantir a padronização da qualidade do material vegetal, bem como a repetibilidade dos efeitos farmacológicos desse produto quando utilizado na farmacoterapia. Sendo assim, o emprego de técnicas analíticas que permitam a identificação e quantificação de substâncias de uma espécie vegetal é necessário tanto para o conhecimento da composição química, como também para a determinação de uma substância que sirva como marcadora daquela espécie, para o controle de qualidade da mesma, possibilitando a padronização do material vegetal (GAVALI; PRADHAN; WAGHMARE, 2016).

Além disso, considerando-se a vasta biodiversidade brasileira, estudos com plantas nativas têm por objetivo instigar a pesquisa com espécies oriundas da nossa flora, a fim de se identificarem produtos com potenciais terapêuticos e subutilizados.

Popularmente, os frutos do araçá são conhecidos por serem ricos em vitaminas, sendo utilizados no tratamento de gripes e infecções. Porém, pouco se tem descrito sobre a utilização das folhas do araçazeiro, sendo necessária uma maior investigação. Ainda, sabe-se que o gênero *Psidium* contempla espécies com ampla utilização popular e terapêutica, como *Psidium guajava*, popularmente conhecido como goiabeira, que possui suas características químicas bem definidas, bem como inúmeras atividades biológicas comprovadas, aumentando o interesse no estudo de plantas deste gênero (MCCOOK-RUSSELL et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para avaliação química de *Psidium cattleianum* Sabine, otimizar o método extrativo, identificar os compostos majoritários e avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar amostras de folhas de *Psidium cattleianum* de diferentes regiões do estado e país.
- Desenvolver um método de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para quantificação de compostos fenólicos na espécie;
- Realizar a otimização da extração de compostos fenólicos através de um Planejamento Fatorial Fracionado e Delineamento de Composto Central;
- Isolar os compostos majoritários da espécie e identificá-los por Espectrometria de Massas (CLUE/QTOF/MS);
- Avaliar a similaridade química através da Análise de Componentes Principais (PCA) das diferentes amostras coletadas;
- Validar o método cromatográfico por CLAE proposto;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos e dos isolados, através do modelo de quimiotaxia.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é constituída por cerca de 140 gêneros e 3.500 espécies, distribuídas principalmente nas regiões da Ásia, Austrália e América (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014). No Brasil, encontram-se 23 gêneros e cerca de 997 espécies, sendo considerada uma das principais famílias de Angiospermas no país. Espécies desta família são encontradas em todas as regiões do país, sendo os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica os mais citados (SOBRAL et al., 2015).

Esta família detém grandes potenciais, tanto no âmbito da pesquisa quanto no âmbito econômico, devido a suas inúmeras espécies e aplicações. Algumas delas são fontes alimentícias, como a pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e a goiaba (*Psidium guajava* L.) (REISSIG, 2015). Outras, por sua vez, são utilizadas com fins farmacológicos, como o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e o eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), utilizados para o tratamento de gripes e infecções respiratórias, e a murta (*Myrtus communis* L.), utilizada com finalidade hipoglicemiante (BOUASLA; BOUASLA, 2017).

3.2 Gênero *Psidium*

O gênero *Psidium*, pertencente à família Myrtaceae, possui cerca de 150 espécies, sendo 61 representantes no Brasil, e encontra-se distribuído por todas as regiões do país. Atividades antioxidante (FERNANDES et al., 2014), antibacteriana (ARAÚJO et al., 2014), anti-inflamatória (NASCIMENTO et al., 2018), antiparasitária (SOUZA et al., 2017) e antifúngica (MORAIS-BRAGA et al., 2016) são algumas das relatadas para suas diferentes espécies.

Espécies nativas deste gênero são bastante estudadas principalmente devido aos potenciais apresentados pelos seus frutos, uma vez que estes são ricos em vitaminas e polifenóis (MELO; SELEGUINI; VELOSO, 2013). Na medicina popular, as espécies de *Psidium* são utilizadas principalmente no tratamento de problemas

digestivos, no controle da pressão arterial e para o tratamento de diarreias (OLIVEIRA et al., 2017).

3.3 *Psidium cattleianum* Sabine

Psidium cattleianum Sabine, tem como sinonímia, de acordo com Sobral et al. (2015): *Eugenia ferruginea*, Sieber ex C.Presl; *Guajava cattleiana* (Afzel. ex Sabine) Kuntze; *Guajava obovata* (Mart. ex DC.) Kuntze; *Psidium cattleianum* Sabine; *Psidium ferrugineum* C.Presl; *Psidium indicum* Bojer; *Psidium littorale* Raddi; *Psidium obovatum* Mart. ex DC. e *Psidium variabile* O.Berg. A espécie foi descrita pela primeira vez como *Psidium cattleianum* por Sabine (SABINE, 1821), que dedicou o epíteto a William Cattley por ter sido o primeiro a obter sucesso no cultivo da espécie (TULER et al., 2018).

Popularmente conhecida como araçá, é uma planta nativa brasileira, com ampla distribuição pelo país, sendo cultivada em pomares desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, além de outros países da América do Sul (REISSIG, 2015). Pertencente à família Myrtaceae, esta espécie floresce de outubro a novembro, e seus frutos amadurecem de setembro a março (PEREIRA et al., 2018).

Seus frutos, que são de coloração amarela ou vermelha, são considerados os melhores entre as espécies de araçazeiro conhecidas. Alguns autores classificam a espécie em duas subespécies, conforme a coloração de seus frutos, sendo *P. cattleianum* var. *cattleianum*, de frutos vermelhos, e *P. cattleianum* var. *lucidum*, de frutos amarelos (FRANZON; SOUZA-SILVA, 2017). Por outro lado, trabalhos de seleção de genótipos resultaram na divulgação de dois cultivares até o momento, para a espécie *P. cattleianum*: “Ya-cy” e “Irapuã”. A cultivar “Ya-cy”, produtor de frutos amarelos, possui esse nome que significa “a mãe de todos os frutos”, apresenta características de frutos doces com baixa acidez. Já a cultivar “Irapuã” produz frutos de película avermelhada, apresenta maior acidez e leve adstringência nos frutos (FRANZON et al., 2009; SILVA et al., 2018).

3.3.1 Aspectos botânicos

É uma árvore de casca fina e tronco tortuoso, de coloração castanha-avermelhada e altura de aproximadamente 6 metros, conforme ilustração da figura 1. Suas folhas, representadas na figura 2, são simples, opostas, coriáceas, de forma ovalada, brilhantes e de cor verde. Plantas que produzem os frutos vermelhos apresentam folhas verdes de tonalidade mais escura e de menor tamanho do que aquelas produtoras de frutos amarelos (FRANZON; SOUZA-SILVA, 2017).

Suas flores solitárias e axilares, também são diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas, pendunculadas, com duas brácteas, cíclicas e com simetria radial, de coloração branca e cálice fechado no botão (CORRÊA; PENNA, 1984). Além disso, apresenta alto número de estames, entre 250 e 480, os quais tem filete branco. O ovário apresenta número de óvulos variando de 94 a 165. O número de grãos de pólen por antera varia de 754 a 1558. O cálice é gamossépalo com cinco sépalas e com cinco pétalas (FRANZON; SOUZA-SILVA, 2017).

Figuras 1 e 2. Representação da árvore e folhas do araçazeiro



Fonte: Lorenzi (2002).

Os frutos são bagas globosas, piriformes, ovoides ou achatadas, com coloração que pode ser amarela ou vermelha. Além disso, têm tamanho pequeno, que variam entre 2,5 a 5 cm de diâmetro, contendo numerosas sementes: um único fruto pode possuir até 100 sementes (RASEIRA; RASEIRA, 1996). A polpa da fruta é translúcida,

aromática e succulenta, apresentando sabor que remete a morango, com toque picante (BIELGELMEYER et al., 2011), além de apresentar epicarpo amarelo ou vermelho quando maduro, dependendo do cultivar a que pertence, como mostra a figura 3.

Figura 3. Frutos do araçá (*P. cattleyanum*) de coloração amarela e vermelha



Fonte: Franzon et al. (2009).

3.3.2 Aspectos químicos

Estudos de prospecção fitoquímica relatam a presença de compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos, esteroides e catequinas para extratos das folhas da planta (FALEIRO et al., 2016).

Quanto à caracterização do óleo essencial, este apresenta monoterpenos e sesquiterpenos, sendo β -cariofileno (BIEGELMEYER et al., 2011) e isocariofileno (CASTRO et al., 2015) os sesquiterpenos mais abundantes.

Em relação aos frutos, sua composição fitoquímica engloba vitamina C, compostos voláteis, carotenoides, e compostos fenólicos (PEREIRA et al., 2018). Além disso, no que tange aos aspectos nutricionais, sabe-se que em 100 g de fruto fresco encontram-se cerca de 83 g de água, 0,7-1 g de proteína, 0,6-1,5 g de minerais, 4-10 g de carboidrato, 0,5 g de lipídeos, 3-6 g de fibras e aproximadamente 27 Kcal (MORTON, 1987).

3.3.3 Aspectos farmacológicos e usos populares

3.3.3.1 *Etnofarmacologia*

A medicina popular utiliza esta espécie para o tratamento de diarreias (NIEHUES et al., 2011; DENARDIN et al., 2015), distúrbios digestivos e dores abdominais (SILVA; QUADROS; NETO, 2015), como diurético e para controlar a pressão arterial (FALEIRO et al., 2016), além de quadros de hemorragias (DENARDIN et al., 2015).

3.3.3.2 *Atividade antioxidante*

Diversos estudos já foram realizados a fim de verificar o potencial antioxidante da espécie, na sua maioria testando extratos a partir dos frutos do araçazeiro. McCook- Russell et al. (2012) obtiveram extratos a partir dos frutos de araçá e pitanga, e avaliaram a atividade antioxidante através do método de ABTS, tendo os resultados expressos em equivalentes de trolox ($\mu\text{mol/g}$). Os resultados obtidos mostraram uma atividade superior do araçá quando comparado a pitanga.

Ribeiro et al. (2014) avaliaram o potencial de extratos etanólicos dos frutos de araçá em capturar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e obtiveram resultados satisfatórios de captura, que são correlacionados com o teor de polifenóis totais das amostras e sua atividade antioxidante. Resultado semelhante foi encontrado por Vinholes et al. (2017) que, comparando extratos dos frutos araçá, pitanga e butiá, obtiveram resultados de captura de radicais livres, além da capacidade de redução do radical DPPH, para o teste de atividade antioxidante, com todos os extratos testados.

Em um estudo realizado por Scur et al. (2016) com extratos etanólicos e aquosos das folhas do araçazeiro, além do óleo essencial, avaliou-se a atividade antioxidante através do método de redução do radical DPPH, utilizando butilhidrotolueno (BHT) como controle positivo. Os resultados obtidos para o teste foram muito semelhantes ao padrão, resultando em um percentual de inibição do radical de 94,6% para o extrato etanólico (200 mg/mL) e de 95,8% para o BHT. Para

o óleo essencial foram obtidos percentuais de inibição menores, de até 16% (sendo a concentração do óleo de 100 mg/mL).

3.3.3.3 Atividade anti-inflamatória

Em relação à atividade anti-inflamatória da espécie, o mesmo estudo de McCook- Russell et al. (2012) avaliou a capacidade de extratos obtidos a partir dos frutos, em inibirem a enzima ciclo-oxigenase (COX). As atividades inibidoras de COX-2 foram avaliadas através do monitoramento da taxa inicial de captação de O₂ usando um eletrodo de oxigênio conectado a um monitor biológico de oxigênio à 37° C.

Perceberam que, para extratos com concentração de 250 µg/mL utilizando hexano e acetato de etila como solventes, a inibição obtida para COX-2 foi de 18,3% e 26,5%, respectivamente, indicando o potencial anti-inflamatório *in vitro* para *Psidium cattleianum*.

3.3.3.4 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada especialmente com o óleo essencial da espécie, assim como descrito por Soliman et al. (2016). Estes autores obtiveram o óleo essencial através do método de hidrodestilação em aparelho de cleverger. Em seguida, além da caracterização química do óleo obtido, realizaram a avaliação da atividade antimicrobiana através do teste de susceptibilidade, com técnica de difusão em discos, utilizando bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, além do teste de concentração inibitória mínima (CIM). Com os resultados obtidos, pôde-se concluir que o óleo desta espécie de *Psidium* é um potencial agente antibacteriano, uma vez que foi possível obter halos de inibição para as bactérias testadas, e foi possível determinar a CIM para as mesmas.

Medina et al. (2011), por sua vez, avaliaram a atividade antimicrobiana dos frutos de araçá, através das mesmas técnicas de difusão em discos e determinação da CIM. Todos os extratos testados demonstraram atividade antimicrobiana, e a CIM obtida para os mesmos foi de 5% (m/v).

3.3.3.5 Atividade hipoglicemiante

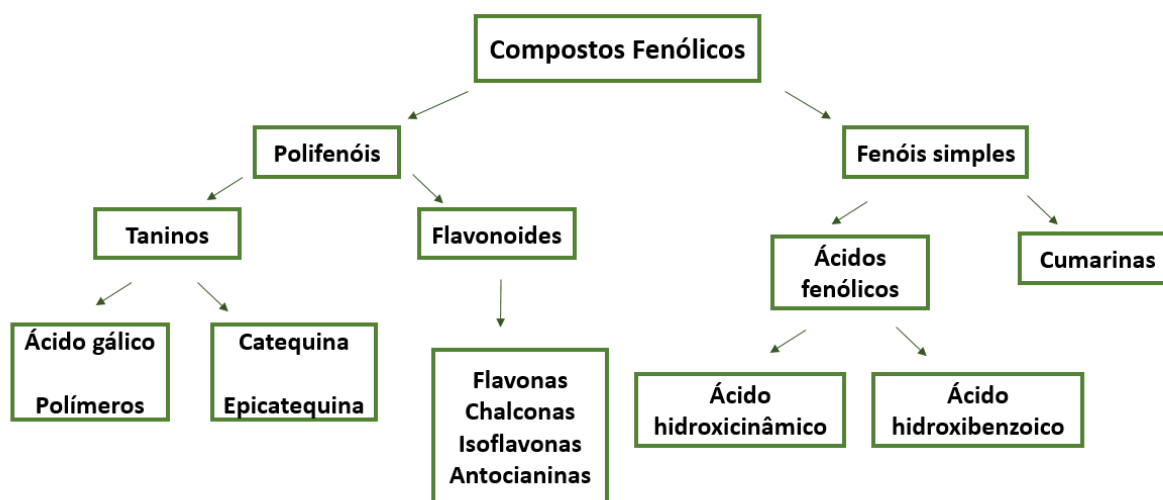
Estudos *in vitro* avaliaram o potencial do fruto do araçazeiro em inibir as enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase e, assim, contribuir para a modulação da hiperglicemia. Obtiveram-se resultados satisfatórios de inibição das enzimas, indicando um potencial antidiabético de extratos desta espécie (PACHECO, 2015; VINHOLES et al., 2017).

Um estudo *in vivo* foi realizado por Cardoso et al. (2017), avaliou o potencial preventivo de hiperglicemia após indução de resistência à insulina e, embora o mecanismo de ação não tenha sido descrito pelos autores, a administração dos extratos foi eficaz na prevenção da diabetes, o que indica novamente esse potencial hipoglicemiante da espécie.

3.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um importante grupo de metabólitos secundários. Estruturalmente, são substâncias que possuem ao menos um anel aromático, com no mínimo um de seus hidrogênios substituídos por grupamentos hidroxila (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016). Originários do metabolismo secundário das plantas, são críticos para o seu crescimento e reprodução. Na natureza são encontrados em abundância: mais de 8.000 compostos fenólicos já foram identificados em plantas. A finalidade destes compostos está associada com a inibição ou ativação de uma vasta diversidade de sistemas enzimáticos, como quelantes de metais ou sequestradores de radicais livres (TANASE; COSARCA; MUNTEAN, 2019).

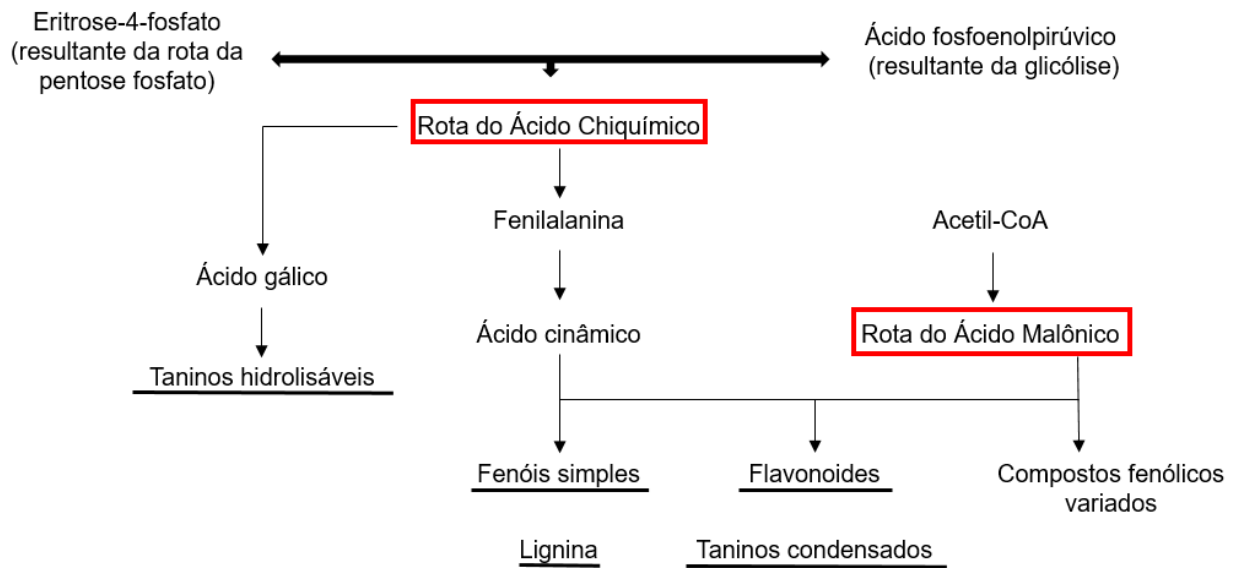
O termo “fenólicos” engloba um grupo abundante de compostos químicos, que são subdivididos de acordo com o número de subunidades de fenol presentes na molécula, classificados entre polifenóis e fenóis simples. As principais classes e subclasses de compostos fenólicos podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4. Classificação dos compostos fenólicos

Fonte: Adaptado de Luthria (2006).

Esta classe de substâncias pode ser sintetizada por diferentes rotas metabólicas, sendo duas as rotas que possuem maior envolvimento: a do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico, como ilustra a Figura 5. A rota do ácido chiquímico desempenha o papel de converter precursores de carboidratos originados através da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos (WANG et al., 2019).

A maioria dos compostos fenólicos de plantas é derivada da desaminação da fenilalanina formando ácido cinâmico. Esta reação é catalisada pela PAL (fenilalanina amônia-liase), uma das enzimas mais estudadas do metabolismo secundário de plantas. A PAL está situada na ramificação entre os metabolismos primário e secundário. Sendo assim, a reação por ela catalisada é uma etapa reguladora e essencial para a formação dos compostos fenólicos (MA et al., 2015).

Figura 5. Biossíntese dos compostos fenólicos

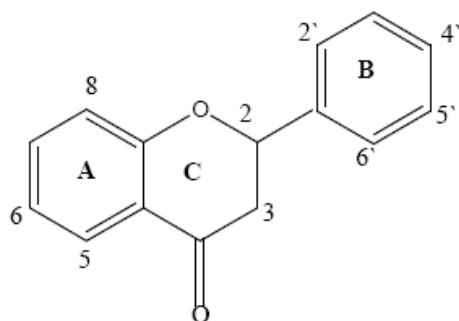
Fonte: Adaptado de Taiz & Zeiger (2004).

Entre os grupos fenólicos, os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e estudados. Podem ser encontrados sob diferentes formas estruturais. No entanto, a maior parte dos representantes dessa classe possui um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, além de dois radicais fenil ligados por uma cadeia de três carbonos entre elas, conforme a Figura 6. Os flavonoides de origem natural apresentam-se oxigenados e na sua maioria conjugados com açúcares. A classificação dos flavonoides é baseada no grau de insaturação do anel central e no estado de oxidação, sendo assim classificados em flavonas, chalconas, flavanonas, antocianos, entre outros (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017).

A atividade biológica dos flavonoides e de seus metabólitos depende de sua estrutura química, que pode sofrer substituições incluindo hidrogenações, hidroxilações, metilações e glicosilações. Flavonoides e isoflavonoides ocorrem comumente como ésteres, éteres ou derivados glicosídicos. As substituições glicídicas incluem D-glicose, L-ramnose, galactose e arabinose. Quando não apresentam glicídios em sua estrutura, são denominados de aglicona (MACHADO et al., 2008).

Os flavonoides estão associados a diversos efeitos benéficos à saúde e são componentes indispensáveis em uma variedade de produtos nutracêuticos, medicinais e cosméticos. Isto é devido ao seu potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico e anticarcinogênico. Eles também são conhecidos por serem inibidores potentes para várias enzimas, como xantina oxidase (XO), COX e lipoxigenase (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Figura 6. Núcleo fundamental dos flavonoides



Fonte: Zuanazzi, Montanha & Zucolotto (2017).

3.5 Controle de qualidade vegetal e validação de métodos analíticos

Produtos naturais são matrizes complexas, que podem conter diferentes constituintes químicos. Além disso, alguns parâmetros essenciais para a garantia da qualidade deste material vegetal podem sofrer variações quanto à pureza e até mesmo à composição química, dependendo da influência de fatores externos, como diferentes localizações geográficas, solos e estações do ano. Por isso, o controle de qualidade da matéria-prima vegetal é um passo essencial na produção de fitoterápicos, a fim de se garantir que esta possua os requisitos de qualidade mínimo estabelecidos para o uso a que se destina (YAU; GOH; KOH, 2015).

Em se tratando da pureza da matéria-prima, recomenda-se que as especificações farmacopeicas para o material vegetal incluam perda por dessecação, determinação de cinzas totais e de materiais estranhos (BRASIL, 2019).

Para garantir um produto uniforme é necessário que todos os insumos, desde a droga vegetal até o produto acabado, sejam caracterizados através de seus constituintes químicos. Para isso, são definidos marcadores químicos para cada espécie, compostos normalmente presentes em grande quantidade ou que possuem influência na atividade farmacológica, e que servem para avaliar a identidade do material vegetal ou a qualidade do produto fitoterápico (LI et al., 2019).

Para isso, o emprego de técnicas cromatográficas que permitam a separação dos constituintes de um material vegetal se faz necessário, tanto para a identificação da presença de um marcador químico específico, quanto para o conhecimento da composição química total. Por isso, metodologias que utilizam cromatografia, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são bastante utilizadas e eficazes para estas finalidades (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Após o desenvolvimento do método, se faz necessária a etapa de validação da metodologia analítica, tendo como objetivo comprovar por meio de análises que o método atende aos objetivos que se propõe e às exigências das aplicações analíticas e órgãos reguladores, garantindo a confiabilidade dos resultados e, juntamente com os testes de segurança, sendo indispensáveis para o registro de novos produtos farmacêuticos (SANTOS; BARROS; OLIVERIA, 2016).

Diferentes guias contendo diretrizes sobre validação de métodos analíticos estão disponíveis, como a Farmacopeia Brasileira e os guias do Conselho Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos em Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH) e Farmacopeia Americana (USP). Apesar de apresentarem diferenças em suas normas, estes produzem recomendações para execução do procedimento de validação, requisito básico para demonstrar a competência da técnica (SANTOS; BARROS; OLIVERIA, 2016).

3.6 Otimização da extração

Planejamentos experimentais e análise de dados através da estatística são técnicas utilizadas para a otimização de diversos sistemas, como os utilizados na engenharia, computação e, neste caso, na química de produtos naturais. A utilização

de planejamento fatorial (PF) em projetos que compreendem muitas variáveis, como é o caso da otimização da extração de substâncias químicas em produtos vegetais é de extrema relevância, já que torna possível uma melhor adequabilidade do sistema, com a realização de menos experimentos, levando a uma economia de tempo e recursos (PELOI et al., 2016).

Diversas etapas da análise de um material vegetal podem ser planejadas através de um desenho fatorial. Entretanto, considera-se que a etapa da extração é a mais importante, uma vez que envolve uma série de fatores, como por exemplo: método de extração, temperatura, polaridade do solvente, granulometria do material vegetal e tempo de contato entre o líquido extrator e o produto (MIGLIATO et al., 2011).

Todos estes fatores influenciam diretamente no rendimento da extração de metabólitos de matérias-primas vegetais e precisam ser considerados. É desejável que a granulometria, por exemplo, seja homogênea para que a penetração de solventes no material seja facilitada. Enquanto isso, a polaridade do solvente deve ser o mais seletiva possível, considerando a polaridade do grupo de substâncias que se deseja, para que se consiga extrair as substâncias de interesse em quantidades satisfatórias (MIGLIATO et al., 2011; KIDGELL et al., 2019). Em vista disso, torna-se relevante a investigação do melhor método extrativo para cada espécie.

3.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A inflamação é a resposta do sistema imunológico inato a estímulos prejudiciais, incluindo patógenos. Quando ativada de forma excessiva ou prolongada, a inflamação pode causar o comprometimento de órgãos e sistemas, levando ao aparecimento de doenças, uma vez que já foi reconhecida como fator em comum em vários distúrbios cardiovasculares e metabólicos, como insuficiência cardíaca, hipercolesterolemia e síndrome metabólica (OIKONOMOU; TOUSOULIS, 2018).

Uma das principais etapas da inflamação é a liberação de leucócitos da corrente sanguínea para o local da lesão. Esta migração é chamada de quimiotaxia, um mecanismo de defesa do organismo, momento em que começam os processos

de reparação, com a cicatrização e a regeneração do tecido afetado (DAWAR et al., 2017).

Trabalhos descritos na literatura apontam para a atividade anti-inflamatória dos frutos de araçá e das folhas de araçazeiro. Mc-Cook et al. (2012) foram os primeiros a descrever esta atividade para os frutos, através do teste de inibição enzimática COX. Anteriormente, em 2006, Apel et al. descreveram esta atividade para o óleo essencial das folhas da espécie, através do ensaio em câmara de Boyden.

O ensaio da câmara de Boyden, utilizado com a finalidade de determinar a anti-quimiotaxia, foi desenvolvido por Stephen Boyden em 1962 e adaptado por Suyenaga et al. (2011). Essa técnica possibilita avaliar a resposta anti-quimiotóxica de uma substância. Observa-se, experimentalmente, o impedimento do processo migratório após a aplicação da substância testada no compartimento superior da câmara (POISSONNIER; LEGEMBRE, 2017), assim avaliando o potencial anti-inflamatório *in vitro* das substâncias testadas.

O texto completo referente à Manuscrito, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 49 – 79, foi omitido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

5. DISCUSSÃO GERAL

As plantas medicinais possuem grande importância na área da saúde humana, tanto na cura como na prevenção de problemas, e o uso de plantas como agentes profiláticos de doenças é algo que acontece desde os primórdios da civilização.

No entanto, produtos naturais também são passíveis de efeitos adversos, e o uso indiscriminado deste tipo de produto emite um alerta, pois a população muitas vezes desconhece o risco de intoxicações e mesmo interações com outros medicamentos. Isso se deve ao fato de plantas serem matrizes complexas, que apresentam composição variada de substâncias químicas. Estas substâncias podem ser terapêuticas em determinadas doses, e possuem efeito tóxico em doses mais elevadas. Ou ainda, podem agir em sinergismo ou antagonismo entre elas.

Alguns fatores que afetam a segurança no uso de plantas medicinais estão relacionados à má qualidade ou falta de padronização na obtenção destes produtos, como a falta de cuidados na coleta e no tratamento da planta vegetal, resultando até mesmo em variações nas características farmacológicas. Em razão disso, tem se tornado cada vez mais clara a necessidade de se estabelecerem parâmetros de controle de qualidade destes materiais.

Psidium cattleianum Sabine é uma espécie nativa do Brasil, bastante estudada pelo seu fruto, o araçá. Porém, poucos estudos de caracterização química que auxiliem no controle de qualidade da espécie foram realizados com as folhas. Desta forma, a otimização da extração e os parâmetros de qualidade propostos neste trabalho são de grande relevância.

A otimização da extração por fatorial visa resultar em uma condição ótima do experimento, em que é obtido o maior rendimento da extração do metabólito ou substância em questão. Obtivemos ao final dos experimentos a seguinte condição ótima de extração, ilustrada na figura 7: extração por ultrassom à 60 °C, por 30 minutos. Tamanho de partícula utilizado de 180 µm em solvente metanol à 43%, na proporção de 1:40 (m/v). Embora os resultados encontrados ao final da DCC não tenham sido significativos estatisticamente, foi possível observar um aumento no teor de fenólicos expressos em quercitrina de 0,47% para 0,85%, quando comparado o extrato otimizado com um extrato preliminar.

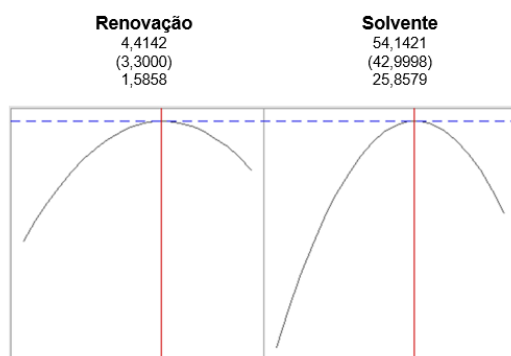


Figura 7. Resultado final da DCC para a otimização

A identificação dos compostos presentes nas folhas da espécie se deu por Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a massas (UHPLC-MS). Essa técnica permite que as substâncias sejam separadas em um cromatograma, e após serem ionizadas, sejam separadas de acordo com a relação existente entre sua massa/carga. Através desta técnica, juntamente com a comparação de perfil UV e tempo de retenção com padrões analíticos, foi possível comprovar a presença de hiperosídeo, miquelianina, quercetina xilopirranose, quercetina arabinosídeo e quercitrina nas amostras, vindo ao encontro dos resultados encontrados em estudo anterior (SABER et al., 2018).

A determinação química qualitativa destes compostos acima relatados, e quantitativa da quercitrina, componentes majoritários em *Psidium cattleyanum*, foi realizada por CLAE. Vários fatores podem ser modificados em uma análise por CLAE a fim de obter um método adequado, com boa separação, simetria e resolução dos picos. Neste trabalho, a separação ocorreu de forma satisfatória com uma coluna de fase reversa com partículas de tamanho 5 μm .

Após o desenvolvimento do método, foi realizada a validação da metodologia analítica para quantificação de quercitrina. A validação é essencial para atestar a confiabilidade dos resultados, sendo necessária para o registro de qualquer medicamento. Neste trabalho, ela foi realizada seguindo as recomendações da RDC 166 (2017) e o guia ICH (2005). Os resultados indicaram que o método se mostrou linear, preciso, exato e robusto.

Ao realizar a análise do teor de quercitrina nas diferentes amostras coletadas, foi possível observar uma grande variabilidade nos resultados, como ilustra a figura 8, com teores de quercitrina que variaram entre 0,10 – 1,5% (m/m). O teor de polifenóis,

assim como o teor dos demais metabólitos secundários, pode ser afetado por diferenças genéticas, mas também pode sofrer variações temporais, devido a diferenças na época de colheita, sazonalidade, locais de crescimento e técnicas de cultivo (Moreira et al., 2012).

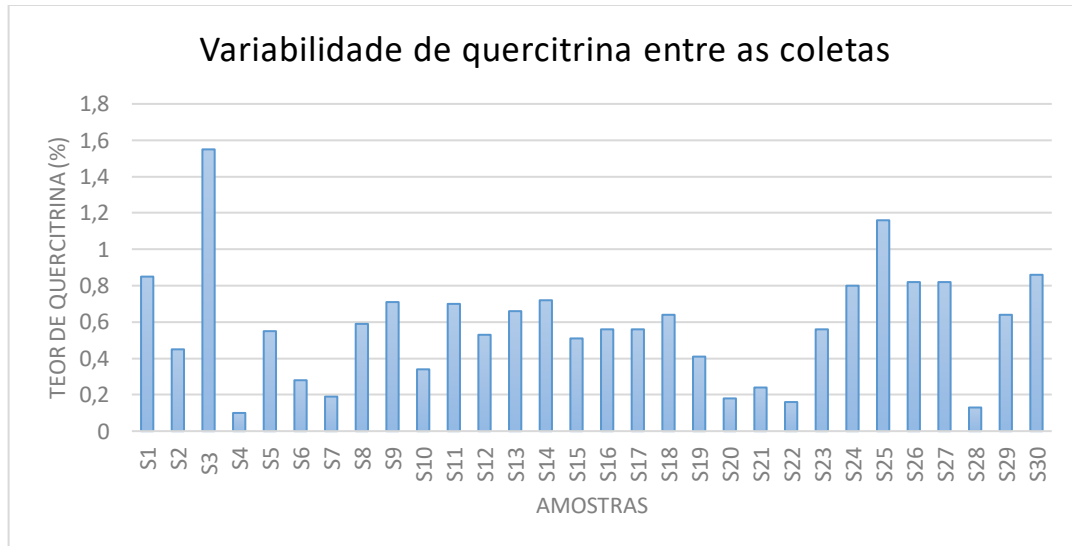


Figura 8. Variação do teor de quercitrina nas diferentes coletas

Para finalizar, foi realizada a avaliação da atividade anti-quimiotática dos extratos e dos compostos isolados. Foi possível observar que todos os extratos testados inibiram significativamente a migração leucocitária em pelo menos duas concentrações diferentes. Da mesma forma, os isolados também apresentaram percentuais de inibição da migração estatisticamente significativos se comparados ao controle negativo. Estes resultados indicam que a espécie possui uma potencial atividade anti-inflamatória através da inibição do processo de migração de neutrófilos no estágio inicial.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A otimização da extração por planejamento fatorial nos permitiu obter uma condição ótima de extração por ultrassom, com metanol 43% à 60°C, 3 renovações de solvente por um tempo total de extração de 30 minutos;
- ✓ O teor de perda por dessecação pelo método gravimétrico foi de 9,23%;
- ✓ O método analítico desenvolvido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência mostrou-se adequado, sendo linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para quantificação de quercetrina em extratos de *Psidium cattleianum*, e passível de utilização no controle de qualidade desta espécie;
- ✓ As amostras de *Psidium cattleianum* obtidas em diferentes localidades permitiram a observação de dois perfis químicos para a espécie, nos levando a subdividi-la em dois quimiotipos e obtendo teores médios de compostos fenólicos de 0,85% e 1,5% expressos em quercitrina para os quimiotipos 1 e 2, respectivamente, nas amostras utilizadas para a validação do método;
- ✓ Os resultados da atividade anti-quimiotóxica nos permitiram avaliar que a espécie possui um potencial anti-inflamatório, com inibição da migração leucocitária de 70-100% na concentração mais alta.

7. REFERÊNCIAS

AMBRIZ-PÉREZ, D.L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E.P.; HEREDIA, B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Food Science and Technology**, v. 2, p. 1-14, 2016

ARAÚJO, A.A.; SOARES, L.A.; ASSUNÇÃO, M.R.F.; NETO, M.A.S.; SILVA, G.R.; ARAÚJO, R.F. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, n. 1, p. 88-96, 2014

APEL, M.A.; LIMA, M.E.; SOUZA, A.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.; SOBRAL, M.E.G. et al. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 376-383, 2006

BIEGELMEYER, R.; ANDRADE, J.M.; ABOY, A.L.; APEL, M.A.; DRESCH, R.R.; MARIN, R. et al. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. 991-996, 2011

BOUASLA, A.; BOUASLA, I. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. **Phytomedicine**, v. 36, n. 1, p. 68-81, 2017

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira 6ª edição**, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2019. 874 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 de julho de 2017

CARDOSO, J.S.; OLIVEIRA, P.S.; BONA, N.P.; VASCONCELLOS, F.A.; BALDISSARELLI, J.; VIZZOTTO, M. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox Report**, v. 23, n. 1, p. 41-46, 2017

CASTRO, M.R.; VICTORIA, F.N.; OLIVEIRA, D.H.; JACOB, R.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 242-250, 2015

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984. 747p

COSTA, R.P.; GUIMARÃES, A.L.; VIEIRA, A.C. Avaliação da Qualidade de Amostras de Plantas Medicinais Comercializadas no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 35, p. 425-433, 2015

DAWAR, F.U.; WU, J.; ZHAO, L.; KHATTAK, M.N.K.; MEI, J.; LIN, L. Updates in understanding the role of cyclophilin A in leukocyte chemotaxis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, p. 823-826, 2017

DENARDIN, C.C.; HIRSCH, G.E.; ROCHA, R.F.; VIZOTTO, M.; HENRIQUES, A.T.; MOREIRA, J.C.F. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 387-398, 2015

FALEIRO, J.H.; GONÇALVES, R.C.; SANTOS, M.N.G.; SILVA, D.P.; NAVES, P.L.F.; MALAFAIA, G. The Chemical Featuring, Toxicity, and Antimicrobial Activity of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) Leaves. **New Journal of Science**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2016

FERNANDES, M.R.V.; DIAS, A.L.T.; CARVALHO, R.R.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, n. 1, p. 39-44, 2014

FRANZON, R.C.; CAMPOS, L.Z.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. **Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2009. 48p

FRANZON, R.C.; SOUZA-SILVA, J.C. **Araçá: *Psidium* spp.** Montevideo: Procisur, 2017. 26 p.

GAVALI, J.B.; PRADHAN, N.; WAGHMARE, N. Current trends in analytical methods of medicinal plant drugs. **International Ayurveda Publications**, v. 1, p. 101-107, 2016

ICH Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia - ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 7, p. 1-7, 2018

JOLY, C.A.; SCARANO, F.R.; BUSTAMANTE, M; GADDA, T.M.C; METZGER, J.P.W; SEIXAS, C.; SIMÃO, O. et al. Brazilian assessment on biodiversity and ecosystem services: summary for policy makers. **Biota Neotropica**, v. 19, 2019

KIDGELL, J.T.; MAGNUSSON, M.; NYS, R.; GLASSON, C.R.K. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. **Algal Research**, v. 39, 2019

LI, Y.; XIE, Y.; HE, Y.; HOU, W.; LIAO, M.; LIU, C. Quality Markers of Traditional Chinese Medicine: Concept, Progress, and Perspective. **Engineering**, v. 5, p. 888-894, 2019

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4ª edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002

LUTHRIA, D. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2266-2272, 2006

MA, X.H.; MA, Y.; TANG, J.F.; HE, Y.L.; LIU, Y.C.; MA, X.J. et al. The Biosynthetic Pathways of Tanshinones and Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza*. **Molecules**, v. 20, p. 16235–16254, 2015

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do centro de biologia da reprodução**, v. 27, p. 33-39, 2008

MCCOOK-RUSSEL, K.P.; NAIR, M.G.; FACEY, P.C.; BOWEN-FORBES, C.S. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1069-1073, 2012

MELO, A.P.C.; SELEGUINI, A.; VELOSO, V.R.S. Caracterização física e química de frutos de araçá (*Psidium guineense* Swartz). **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 91-95, 2013

MEDINA, A.L.; HAAS, L.I.R.; CHAVES, C.F.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R.C.; SILVA, W.P. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 916-922, 2011

MIGLIATO, K.F.; CÔRREA, M.A.; SALGADO, H.R.N.; TOGNOLLI, J.O.; SACRAMENTO, L.V.S.; MELLO, J.C.P. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011

MORAIS-BRAGA, M.F.B.; SALES, D.L.; CARNEIRO, J.N.P.; MACHADO, A.J.T.; SANTOS, A.T.L.; FREITAS, M.A. et al. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti e *Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, Crato, v. 95, p. 200-207, 2016

MORAIS, L.M.F.; CONCEIÇÃO, G.M.; NASCIMENTO, J.M. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 317-346, 2014

MORTON, J.F. **Cattley Guava**. In: MORTON, J.F. (Ed.). Fruits of warm climates. Miami: Creative Resource Systems Inc, 1987.

NASCIMENTO, K.F.; MOREIRA, M.D.F.; SANTOS, J.A.; KASSUYA, C.A.L.; CRODA, J.H.R.; CARDOSO, C.A.L. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, n. 1, p. 351-358, 2018

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016

NIEHUES, J.; BONETTI, P.; SOUZA, M.R.; MAIA, A.L.; PIOVEZAN, A.P.; PETERS, R.R. Levantamento etnofarmacológico e identificação botânica de plantas medicinais em comunidades assistidas por um serviço de saúde. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 40, p. 34-39, 2011

OIKONOMOU, E.; TOUSOULIS, D. Inflammation: A pathogenetic mechanism or a mediator, linking risk factors and cardiovascular disease? **International Journal of Cardiology**, v. 264, p. 170-171, 2018

OLIVEIRA, E.F.; BEZERRA, D.G.; SANTOS, M.L.; REZENDE, M.H.; PAULA, J.A.M. Leaf morphology and venation of *Psidium* species from the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 407- 413, 2017

PACHECO, S. M. **Frutos da família Myrtaceae: Caracterização físico-química e potencial inibitório da atividade das enzimas digestivas**, 2015. 84 p. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, 2015.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016

PELOI, K.E.; BOVO, F.; MESSIAS-REASON, I.J.; PEREZ, E. Utilização de planejamento fatorial para a determinação da capacidade antioxidante e doseamento de flavonoides totais em *Verbena minutiflora* Briq. ex Moldenke (gervai). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.1-8, 2016

- PEREIRA, E.S.; VINHOLES, J.; FRANZON, R.C.; DALMAZO, G.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, n. 1, p. 95-103, 2018
- POISSONNIER, A., LEGEMBRE, P. Boyden Chamber Assay to Study of Cell Migration Induced by Metalloprotease Cleaved-CD95L. **Methods in Molecular Biology**, 117–123, 2017
- RASEIRA, M.C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro (*Psidium cattleianum*)**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996. 95 p.
- REISSIG, G. N. **Geleias convencionais e diet de araçá e de pitanga: estabilidade no processamento e armazenamento**. 2015. 81 p. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, 2015.
- RIBEIRO, A.B.; CHISTE, R.C.; FREITAS, M.; SILVA, A.F.; VISENTAINER, J.V.; FERNANDES, E. *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient *in vitro* scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, n. 2, p. 140-148, 2014
- SABER, F.R.; ABDELBAR, G.A.; SALAMA, M.M.; SALEH, D.O.; FATHY, M.M.; SOLIMAN, F.M. UPLC/QTOF/MS profiling of two *Psidium* species and the in-vivo hepatoprotective activity of their nano-formulated liposomes. **Food Research International**, 105, 1029-1038, 2018
- SABINE, J. *Psidium cattleianum*. **Transactions of the Horticultural Society of London**, v. 4, p. 315–317, 1821
- SANTOS, E.C.; BARROS, D.A.C.; OLIVERIA, S.R. Validação de métodos analíticos na indústria farmacêutica. **Saúde e Ciência em Ação**, v. 2, p. 93-113, 2016
- SCUR, M.C.; PINTO, F.G.S.; PANDINI, J.A.; COSTA, W.F.; LEITE, C.W.; TEMPONI, L.G. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2016
- SILVA, M.; OLIVEIRA, L.S.; RADAELLI, J.C.; PORTO, A.; JUNIOR, A.W. Estratificação e uso de giberelina em sementes de *Psidium cattleianum*. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 11, n. 3, p. 121-125, 2018
- SILVA, L.E.; QUADROS, D.A.; NETO, A.J.M. Estudo etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas na região de Matinhos – PR. **Ciência e Natura**, v. 37 n. 2, p. 266-276, 2015
- SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae**. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB171>>. Acesso em: 23/12/2019
- SOLIMAN, F.M.; FATHY, M.M.; SALAMA, M.M.; SABER, F.R. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 54, p. 219-225, 2016

SOUZA, C.E.S.; SILVA, A.R.P.; GOMEZ, M.C.V.; ROLÓM, M.; CORONEL, C.; COSTA, J.C.M. et al. Anti-Trypanosoma, anti-Leishmania and cytotoxic activities of natural products from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. and *Psidium guajava* var. Pomifera analysed by LC-MS. **Acta Tropica**, v. 176, n. 1, p. 380-384, 2017

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010

SUYENAGA, E.S.; KONRATH, E.L.; DRESCH, R.R.; APEL, M.A.; ZUANAZZI, J.A.; CHAVES, C.G. et al. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Medica**, v. 77, p. 698-704, 2011

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Armed Editora, 2004

TANASE, C.; COSARCA, S.; MUNTEAN, D.L. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. **Molecules**, v. 24, p. 1-18, 2019

TULER, A.C.; PROENÇA, C.E.B.; CARRIJO, T.T.; PEIXOTO, A.L. Typification and nomenclatural notes on *Psidium cattleyanum* (Myrtaceae). **Taxon**, v. 67, p. 1194-1198, 2018

VALLI, M; RUSSO, HM.; BOLZANI, VS. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 763-778, 2018

VINHOLES, J.; LEMOS, G.; BARBIERI, R.L.; FRANZON, R.C.; VIZZOTTO, M. *In vitro* assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food Bioscience**, v. 19, n. 1, p. 92-100, 2017

WANG, J.; XU, J.; GONG, X.; YANG, M.; ZHANG, C.; LI, M. Biosynthesis, Chemistry, and Pharmacology of Polyphenols from Chinese *Salvia* Species: A Review. **Molecules**, v. 24, p. 1-23, 2019

YAU, W.P.; GOH, C.H.; KOH, W.L. **Quality Control and Quality Assurance of Phytochemicals: Key Considerations, Methods, and Analytical Challenges**. In: RAMZAN, I. (Ed.). *Phytotherapies: Efficacy, Safety, and Regulation*. John Wiley & Sons Inc, 2015

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A.; ZUCOLOTTO, S.M. Flavonoides. In: Simões, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017