



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
GERAL/BIOPROSPECÇÃO



KAMILLA FELIPE DO NASCIMENTO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ÓLEO ESSENCIAL E
COMPOSTO ISOLADO DAS FOLHAS DE *Psidium guineense* Swartz
(MYRTACEAE).**

v. 1

Dourados

2017

KAMILLA FELIPE DO NASCIMENTO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ÓLEO ESSENCIAL E
COMPOSTO ISOLADO DAS FOLHAS DE *Psidium guineense* Swartz
(MYRTACEAE).

Dissertação apresentada à Universidade
Federal da Grande Dourados para obtenção
do título de Mestre em Biologia
Geral/Bioprospecção.

Área de concentração: Bioprospecção

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anelise Samara
Nazari Formagio

Dourados

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N244c	<p>Nascimento, Kamilla Felipe do. Composição química e avaliação biológica de óleo essencial e composto isolado das folhas de <i>Psidium guineense</i> Swartz (MYRTACEAE). / Kamilla Felipe do Nascimento. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 87f.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Óleo essencial. 2. Araçá. 3. <i>Psidium guineense</i>. 4. Atividades biológicas. I. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

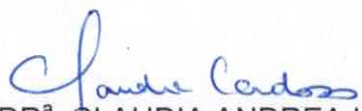
"COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ÓLEO ESSENCIAL E ESPATULENOL ISOLADO DAS FOLHAS DE *Psidium guineense* SWARTZ".

POR

KAMILLA FELIPE DO NASCIMENTO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".


PROF^a. DR^a. ANELISE SAMARA NAZARI FORMAGIO
ORIENTADORA – UFGD


PROF^a. DR^a. CLAUDIA ANDREA LIMA CARDOSO
MEMBRO TITULAR – UEMS


PROF^a. DR^a. VIRGÍNIA DEMARCHI KAPPEL TRICHES
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovada em 31 de março de 2017.

DEDICATÓRIA

*Aos amados meus pais, José Maria do Nascimento Jr. e Veneir Felipe de Souza,
A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade.
Vocês são meu grande exemplo, minha base, minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pelo dom da vida, pela guia e proteção diária, e por todas as bênçãos que das suas mãos eu tenho alcançado.

Aos meus pais, José Maria e Veneir, pelo amor incondicional com que criaram a mim e ao meu irmão. Por serem os meus melhores amigos e minha maior fortaleza. Pelos ensinamentos, incentivo, orações, amor e dedicação... Minha eterna gratidão.

Ao meu irmão Kayo, pelo carinho, companheirismo e apoio.

Aos meus familiares, por todo o carinho recebido desde sempre. Agradeço em especial a minha prima Adriana, por me ajudar e acolher em um momento difícil, estendendo-me sua mão e seu doce coração.

Aos meus amigos, por entenderem e aceitarem minhas ausências e torcerem pela minha conquista. Em especial a Camila e Hallana, pela amizade tão valiosa de toda uma vida, por todo carinho e dedicação recebido durante todos esses anos.

À minha orientadora Profa. Dra. Anelise Formagio por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e também em sua vida, pelos preciosos ensinamentos e pela forma com que os transmite não só a mim como aos meus colegas, nos representando um modelo de conduta profissional a ser espelhado. Por toda paciência a mim dedicada, por colaborar com o meu crescimento pessoal e profissional, e principalmente por acreditar e incentivar o amadurecimento da minha personalidade. Minha eterna gratidão, carinho e admiração.

Aos meus colegas do laboratório de Plantas Medicinais Carla, Camila, Isabela, Hariana e Diego, por auxiliarem na realização dos testes químicos e biológicos. Também aos demais presentes no nosso grupo de pesquisa, pelo companheirismo de cada dia.

Ao Centro de Estudos em Recursos Naturais (CERNA/UEMS) e Profa. Dra. Claudia Cardoso pela parceria nas análises químicas.

Ao Laboratório de dor e inflamação (FCS/UFGD), Profa. Dra. Candida Kassuya e Joyce Alencar por cederem seus aparatos para a realização dos ensaios anti-inflamatórios e também por cada conhecimento que ali adquiri.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (UNICAMP), Profa. Dra. Mary Ann Folgio e Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho pela parceria na realização dos ensaios antiproliferativos.

Ao Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS/UFGD), Prof. Dr. Julio Croda pela oportunidade de realizar os ensaios antimicobacterianos e também por me proporcionar uma amizade muito especial, a qual desejo para toda a vida, Flora.

As Professoras, Dra. Candida Kassuya, Dra. Claudia Cardoso e Dra. Virgínia Demarchi por participarem das bancas de qualificação e defesa e pelas valiosas contribuições.

Aos professores do PPG Biologia Geral/Bioprospecção por cada conhecimento adquirido.

À Fundect pela bolsa concedida e auxílio financeiro para desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À todas as pessoas que encontrei no caminho percorrido durante esses dois anos.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{13}C	Carbono
^1H	Hidrogênio
786-0	Linhagem celular tumoral renal
BHT	Butylated hydroxytoluene/Butil Hidroxitolueno
AAS	Ácido acetilsalicílico
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
CC	Coluna cromatográfica
CDCl_3	Deuterated chloroform
Cg	Carragenina
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CL_{50}	Atividade citocida mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO_2	Dióxido de carbono
COX	Ciclo-oxigenase
CPT	Camptotecina
DEXA	Dexametasona/dexamethasone
DHCB	Dehidrocoribulbina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	2,2 difenil-1-picrilhidrazil
EOPG	Essential oil of <i>Psidium guineense</i>
EOPG-F4	Fração 4 do óleo essencial de <i>P. guineense</i>
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Recuperação da fluorescência após fotodegradação
GC-MS	Gas <i>Chromatography</i> -Mass Spectrometry
GI_{50}	Atividade citostática
GO	Goiás

HaCaT	Queratinócitos
HT-29	Células tumorais de cólon
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50%
IFN	Interferon
IL	Interleucina
K-562	Linhagem celular tumoral de Leucemia
ME-FS	Micro-extração em fase sólida
MCF-7	Células tumorais de mama
MDA	Malondialdeído
MDR-TB	Tuberculose multidroga resistente
MG	Minas Gerais
MHz	Megahertz
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NCI	National Câncer Institute
NCI-ADR/RES	Linhagem celular tumoral de ovário resistente a múltiplas drogas
NCI-H460	Linhagem celular tumoral de pulmão
nm.	Nanômetros
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OADC	Oleic acid, bovine serum albumin, dextrose and catalase
OEPG	Óleo essencial das folhas de <i>Psidium guineense</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORAC	Capacidade de absorção de radiação de oxigênio
OVCAR-3	Linhagem celular tumoral de ovário
PBS	Tampão fosfato salina
PCO-3	Linhagem celular tumoral de próstata
PG-1	Espatuleno/Spathuleno isolado do óleo essencial das folhas de <i>P. guineense</i>
REMA	Resazurin Microtiter Assay
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
RR	Roraima
TGI	Atividade citotóxica

TLC	Thin Layer Cromatography
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Topo I	Topoisomerase I
U251	Linhagem celular tumoral de glioma

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Proposta de estudo com <i>Psidium guineense</i> em Dourados-MS	15
-------------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1.	Espécie <i>Psidium guineense</i> encontrada em Dourados-MS	5
Figura 2.	Biossíntese de terpenos	8

ARTIGO

Figura 1.	Rota biossintética do sesquiterpeno espatulenol	39
Figura 2.	Efeito de OEPG em modelo de edema de pata induzido por carragenina	42
Figura 3.	Efeito de OEPG e PG-1 em modelo de pleurisia induzida por carragenina e extravasamento de proteínas	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química de OEPG	38
Tabela 2.	Atividade antioxidante de OEPG e PG-1	42
Tabela 3.	Atividade antiproliferativa de OEPG e PG-1	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Família Myrtaceae	4
2.1.2	<i>Psidium guineense</i> Swartz	4
2.2	Óleos essenciais	7
2.3	Atividades biológicas	9
2.3.1	Estresse oxidativo	9
2.3.2	Inflamação	10
2.3.3	Câncer	12
2.3.4	Tuberculose	13
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivo Específico	15
4	REFERÊNCIAS	16
5	MANUSCRITO	26
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7	ANEXOS	54
7.1	Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD)	54

RESUMO

NASCIMENTO, K.F. **Composição química e avaliação biológica do óleo essencial e composto isolado das folhas de *Psidium guineense* Swartz (Myrtaceae)**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2017.

As folhas de *Psidium guineense* Swartz são usadas na medicina popular para o tratamento de processos inflamatórios. Entretanto, não há evidência científica que demonstre essa atividade. Este estudo consistiu em avaliar as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativa e antimicrobiana do óleo essencial de *P. guineense* e composto majoritário. O óleo essencial (OEPG) foi extraído das folhas de *P. guineense* por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). O composto majoritário (PG-1) foi isolado em coluna cromatográfica e identificado por ressonância magnética nuclear (RMN). A atividade antioxidante de OEPG e PG-1 foi avaliada *in vitro* pelos métodos DPPH, ABTS e MDA. O potencial anti-inflamatório foi avaliado utilizando dois modelos, incluindo pleurisia e edema de pata induzido por carragenina em camundongos. A ação de OEPG e PG-1 sobre a proliferação celular foi determinado através de quantificação espectrofotométrica do teor de proteína celular utilizando um ensaio de sulforodamina B e a atividade de antimicobacteriana frente ao *Mycobacterium tuberculosis* foi determinada utilizando o método REMA. Foram identificados 38 compostos em OEPG, sendo o principal constituinte o álcool sesquiterpênico espatulenol (PG-1) (80,7%). OEPG e PG-1 exibiram as atividades antioxidantes mais relevantes pelos métodos de DPPH e MDA em comparação com padrão de referência, com valores de IC₅₀ variando entre 26,13-85,60 µg/mL. A administração oral de EOPG e PG-1 mostrou inibição significativa no edema da pata de camundongos induzido por carragenina e também no modelo de pleurisia. OEPG (GI₅₀ = 0,89 µg/mL) e PG-1 (GI₅₀ = 49,30 µg/mL) foram ativas contra a linhagem celular de ovário. Ambos apresentaram atividade antimicobacteriana moderada. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativa e antimicobacteriana do óleo essencial de *P. guineense* (folhas coletadas em Dourados-MS) e espatulenol, colaborando com o uso etnofarmacológico desta espécie, devido ao seu efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Óleo essencial, araçá, *Psidium guineense*, atividades biológicas.

ABSTRACT

NASCIMENTO, K.F. **Chemical composition and biological avaluation of essential oil and compound isolated from leaves of *Psidium guineense* Swartz (Myrtaceae).** 2017. Master (MSc) – Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, 2017.

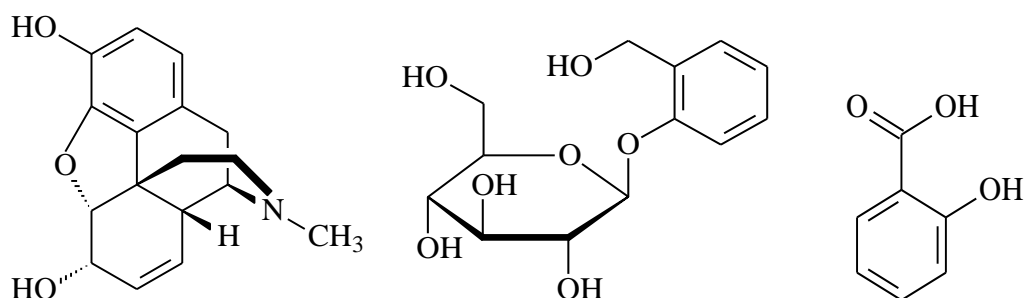
The leaves of *Psidium guineense* Swartz are used in folk medicine for the treatment of inflammatory processes. However, there is no scientific evidence to demonstrate this activity. This study consisted in evaluating the antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimicrobial activities of the essential oil of *P. guineense* and majoritarian compound. The essential oil (EOPG) was extracted from the leaves of *P. guineense* by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS). The major compound (PG-1) was isolated by column chromatography and identified by nuclear magnetic resonance (NMR). The antioxidant activity of EOPG and PG-1 was evaluated in vitro by the DPPH, ABTS and MDA methods. The anti-inflammatory potential was assessed using two models, including pleurisy and carrageenan-induced paw edema in mice. The impact of EOPG and PG-1 on cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification of the cellular protein content using a sulforhodamine B assay and the antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* was determined using the REMA method. 38 compounds were identified in EOPG, the main constituent being sesquiterpene spathulenol (PG-1) (80.7%). EOPG and PG-1 exhibited the most relevant antioxidant activities by DPPH and MDA methods compared to reference standard, with IC₅₀ values ranging from 26.13-85.60 µg/mL. Oral administration of EOPG and PG-1 showed significant inhibition in carrageenin-induced foot paw edema and also in the pleurisy model. EOPG (GI₅₀ = 0.89 µg/ml) and PG-1 (GI₅₀ = 49.30 µg/ml) were particularly effective against the ovarian cancer cell line. Both had moderate antimycobacterial activity. This study demonstrated for the first time the antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial properties of the essential oil of *P. guineense* (leaves collected in Dourados-MS) and of spathulenol, collaborating with the ethnopharmacological use of this species due to its effect anti-inflammatory.

Keywords: Essential oil, araçá, *Psidium guineense*, biological activites.

1.0 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como fontes terapêuticas é uma das mais antigas práticas alternativas utilizadas para tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, algumas das espécies utilizadas ainda não foram avaliadas quanto sua composição química e atividades farmacológicas, ocasionando desconhecimento de sua toxicidade (Kuntze *et al.*, 2012). As espécies vegetais, além de aplicação na medicina popular, também representam uma rica fonte de moléculas bioativas que podem contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, representando uma estratégia para a inovação farmacêutica (Alves *et al.*, 2014).

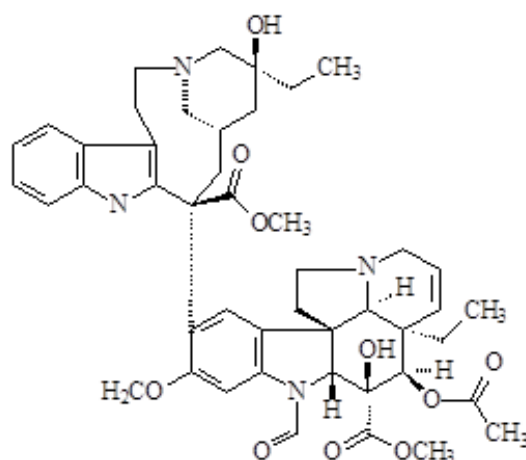
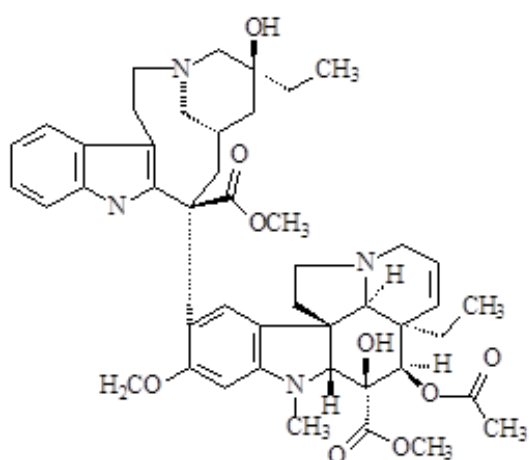
Como exemplos de fármacos originados a partir de plantas encontra-se a morfina **(1)** um dos primeiros compostos isolados relatados na literatura. Trata-se de um potente analgésico obtido da *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae). A salicilina **(2)** isolada das cascas da *Salix alba* (Salicaceae), após modificações originou o ácido acetilsalicílico (AAS) **(3)** fármaco analgésico e anti-inflamatório, que atua no controle da febre, artrite reumatoide e inibição da agregação plaquetária (Croteau *et al.*, 2000). Os alcaloides vincristina **(4)** e vimblastina **(5)** isolados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) são empregados no tratamento de leucemia e linfoma de Hodgkin (Booth, 1998; Croteau *et al.*, 2000). Em 1966, Wall e Wani isolaram a partir das cascas de *Camptotheca acuminata* o alcaloide quinolina conhecido como camptotecina (CPT) **(6)**, um anticancerígeno eficaz contra um amplo espectro de linhagens tumorais como cólon, pulmão, ovário, entre outras, pois atua inibindo a enzima topoisomerase I (Topo I) (Wall e Wani, 1996; Chabne e Roberts, 2005; Pommier *et al.*, 2009). A descoberta de moléculas ativas de origem vegetal se estende até os dias atuais. Em 2014 foi relatado o isolamento de um novo alcaloide isoquinolina, denominado dehidrocoribulbina (DHCB) **(7)** a partir de raízes de *Corydalis yanhusuo* (Papaveraceae), que demonstrou potente atividade antinociceptiva em modelos de dor inflamatória e neuropática, podendo contribuir para o desenvolvimento de um novo medicamento analgésico (Zhang *et al.*, 2014).



(1)

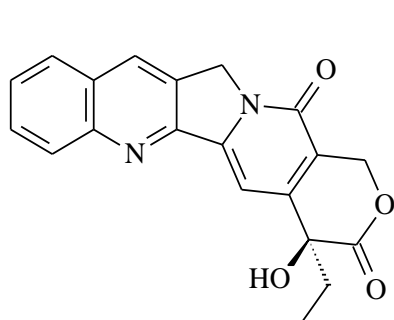
(2)

(3)

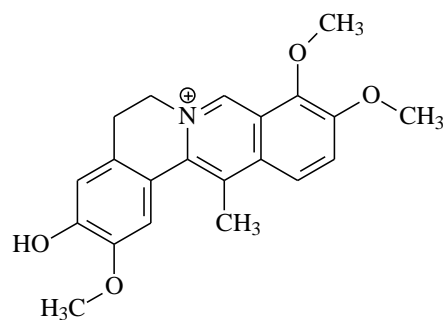


(4)

(5)



(6)



(7)

Na busca por novas biomoléculas ativas, o gênero *Psidium* (Myrtaceae) compreende cerca de 100 espécies, encontradas em todo o território brasileiro e utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreias, úlceras, doenças pulmonares, inflamações de garganta, dores e febre (Almeida *et al.*, 1995; Landrum e Kawasaki, 1997; Holetz *et al.*, 2002; Lapčík *et al.*, 2005; Franzon *et al.*, 2009). Estudos químicos e biológicos descrevem a presença de óleos essenciais nas folhas de suas espécies e relatam algumas atividades, bem como antioxidante, anti-inflamatória (El-Ahmady *et al.*, 2013), antimicrobiana (Soliman *et al.*, 2016) e antiproliferativa (Manosroi *et al.*, 2006) para *P. guajava* e antimicrobiana para *P. cattleianum* (Soliman *et al.*, 2016).

Psidium guineense Swartz, conhecida como “araçá-verdadeiro”, araçá-do-campo, araçá-comum, araçá-azedo ou araçá-mirim, possui ampla ocorrência no território nacional, principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Tocantins (Bezerra *et al.*, 2006). As folhas são utilizadas no tratamento de resfriados e inflamações, como bronquites (Akerele, 1991; Franzon *et al.*, 2009). Estudos fitoquímicos e biológicos realizados com suas folhas descrevem a presença de taninos, flavonóides e terpenos (Neira González *et al.*, 2005; Rivero-Maldonado *et al.*, 2013); e atividade antibacteriana (Fernandes *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2014).

Evidências científicas relacionam a ocorrência de eventos degenerativos e patológicos, como diabetes, alzheimer, doenças inflamatórias e câncer com o estresse oxidativo, condição em que ocorre acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e nitrogênio (ERN's), ocasionando danos ao DNA, proteínas e outras macromoléculas celulares (Reuter *et al.*, 2010; Morry *et al.*, 2017). Sabe-se que compostos antioxidantes, naturais ou sintéticos, tem a capacidade de eliminar os radicais livres e proteger o organismo dos danos ocasionados pelos mesmos, representando assim um importante papel na prevenção dessas patologias (Chand *et al.*, 2017).

Considerando o uso popular das folhas de “araçá-do-campo” e a ocorrência dessa espécie na região de Dourados-MS, o presente estudo foi elaborado com o objetivo de extrair, analisar a composição química, isolar o composto majoritário e realizar a avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicobacteriana do óleo essencial e composto isolado das folhas de *P. guineense*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Myrtaceae

Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América

(Angiosperm Phylogeny Group III, 2009). Dentre os principais gêneros destacam-se *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Melaleuca*, *Psidium*, *Pseuocaryophyllus* e *Syzygium* (Siddique *et al.*, 2017). Caracterizados pela presença de compostos polifenólicos e óleos essenciais que apresentam diferentes composições químicas, tais como α -terpineol, espatulenol, viridiflorol, β -pineno, 1,8-cineol, terpinen-4-ol e cariofileno como principais constituintes (Farag *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007; Magina *et al.*, 2009; Rini *et al.*, 2012; Cunha *et al.*, 2016), destacando atividades biológicas, antioxidante (Pino *et al.*, 2010; Victoria *et al.*, 2012), anti-inflamatória (Caldefie-Chezet *et al.*, 2006), antifúngica (Bagg *et al.*, 2006), antinociceptiva (Amorim *et al.*, 2009), antibacteriana (Magina, *et al.* 2009), dentre outras.

Pertencente à família Myrtaceae, o gênero *Psidium* compreende aproximadamente 92 espécies, incluindo *P. guajava* L. (goiaba ou goiabeira), *P. cattleianum* S. (araçá-morango), *P. friedrichsthalianum* Ndz. (goiaba costarriquenha) e *P. guineense* Sw. (araçá-do-campo) (Joseph e Mini Priya, 2011). No Brasil, encontram-se desde a região amazônica até o Estado do Rio Grande do Sul (Landrum, 2003). Na medicina popular, de modo geral está direcionada ao tratamento de diarreias, úlceras, doenças pulmonares, inflamações de garganta, dores e febre (Almeida *et al.*, 1995; Landrum e Kawasaki, 1997; Holetz *et al.*, 2002; Lapčik *et al.*, 2005; Jaradat *et al.*, 2016).

Dentre as espécies, a mais conhecida e estudada é a *P. guajava*, na qual as folhas relatam presença de compostos fenólicos (Takao *et al.*, 2015; Ashraf *et al.*, 2016; Morais-Braga *et al.*, 2017) e flavonoides (Ouyang *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2015). Além de óleos essenciais constituídos por compostos terpênicos (Lin *et al.*, 2013; Khadhri *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2015), os quais demonstraram algumas propriedades biológicas, bem como atividade antioxidante e anti-inflamatória (El-Ahmady *et al.*, 2013); antimicrobiana (Soliman *et al.*, 2016), antiproliferativa (Manosroi *et al.*, 2006), antifúngica (Morais-Braga *et al.*, 2017) e larvicida (Dias *et al.*, 2015).

2.1.2 *Psidium guineense* Swartz

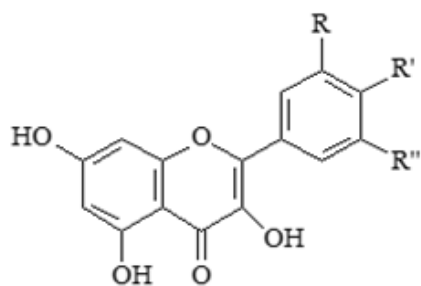
Psidium guineense Sw. (**Figura 1**), conhecida popularmente como “araçá-do-campo, araçá-comum, araçá-verdadeiro, araçá-azedo ou araçá-mirim” é encontrada na América Tropical, desde o Sul do México ao Norte da Argentina e Brasil. No território brasileiro, está presente nos estados de Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, principalmente nos biomas cerrados, campos, savanas e cerradões (Neira González *et al.*, 2005; Franzon *et al.*, 2009). Trata-se um arbusto ou árvoreta de aproximadamente

2,5 metros de altura, com caule de casca lisa, folhas simples com nervações salientes e margens levemente onduladas, flores brancas e axilares (Lorenzi *et al.*, 2008, Ferreira *et al.*, 2011). Popularmente, suas folhas são utilizadas no tratamento de resfriados e inflamações, como bronquites (Akerlele, 1991; Franzon *et al.*, 2009). O decocto das raízes é empregado para o tratamento de doenças urinárias, diarreias e disenterias (Neira González *et al.*, 2005).

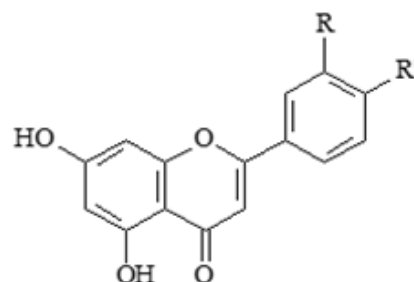


Figura 1: *Psidium guineense* (Março/2015) (Fonte: Nascimento, K.F.)

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato metanólico acidificado das folhas de *P. guineense* coletadas em diferentes regiões da Venezuela, com a finalidade de isolar compostos polifenólicos empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) relataram a presença dos flavonoides miricetina (8), luteolina (9), quercetina (10), apigenina (11) e canferol (12) (Rivero-Maldonado *et al.*, 2013).



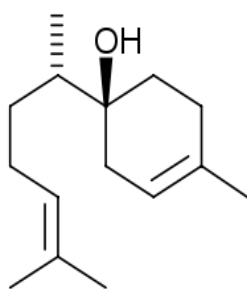
- (8) R = R' = R'' = OH Miricetina
 (9) R = R' = OH Quercetina
 (10) R = R'' = H R' = OH Canferol



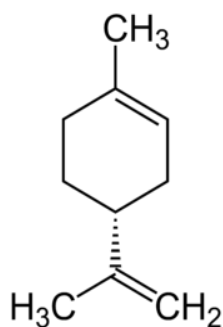
- (11) R = R' = OH Apigenina
 (12) R = H R' = OH Luteolina

O extrato hidroalcoólico das folhas dessa espécie apresentou efeito antimicrobiano e antiaderente frente às cepas de *Streptococcus mutans* (CIM= 550 µg/mL); *S. oralis* (CIM= 275 µg/mL); *S. parasanguis* (CIM= 275 µg/mL); *S. salivarius* (CIM= 275 µg/mL); *Streptococcus sp* (CIM= 500 µg/mL) e *Lactobacillus casei* (CIM= 1100 µg/mL) (Vieira *et al.*, 2012). Os taninos isolados mostraram-se ativos contra cepas de *Staphylococcus aureus* (CIM= 256 µg/ml) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 512 µg/ml) (Rodrigues *et al.*, 2014).

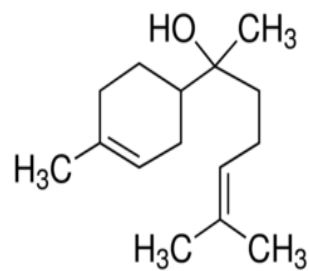
A composição de óleo essencial de frutos de *P. guineense* coletados na Colombia, analisado por micro-extração em fase sólida (ME-FS) seguido de destilação por solvente relatou a presença de 181 compostos, com destaque para as classes de ésteres e terpenos (Peralta-Bohórquez *et al.*, 2010). O óleo essencial obtido das folhas coletadas no município de Boa Vista (RR), extraído por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) descreveu presença de três compostos terpênicos majoritários, sendo o β-bisabolol (17,4%) (13), limoneno (6,8%) (14) e epi-α-bisabolol (6,7%) (15) (Da Silva *et al.*, 2013).



(13)



(14)



(15)

2.2 Óleos essenciais

Também conhecidos como voláteis ou etéreos, os óleos essenciais são substâncias voláteis, aromáticas e lipossolúveis que podem ser obtidos de diferentes partes da planta, como em flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, através de diferentes métodos de extração, no entanto sua composição química pode ser influenciada de acordo com a espécie, parte utilizada, localização geográfica, período de colheita, estágio de desenvolvimento, idade da planta e método de extração (Costa *et al.*, 2015).

São amplamente empregados em indústrias agrícolas, cosméticas, alimentícias e farmacêuticas, por serem naturais e biodegradáveis e possuírem baixa toxicidade, atuando em diversas moléculas ao mesmo tempo, quando comparados a fármacos de origem sintética (Burt, 2004; Figueiredo *et al.*, 2008; Simões e Spitzer, 2010; Zhang *et al.*, 2015).

A formação dos compostos presentes nos óleos essenciais dá a partir da formação de terpenóides originados a partir do ácido mevalônico, ou de fenilpropanóides, oriundos do ácido chiquímico (**Figura 2**). Os compostos terpênicos encontrados com maior frequência são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Já os diterpenos são encontrados apenas em óleos extraídos com solventes orgânicos devido à alta temperatura de volatilização desses compostos (Simões e Spitzer, 2010).

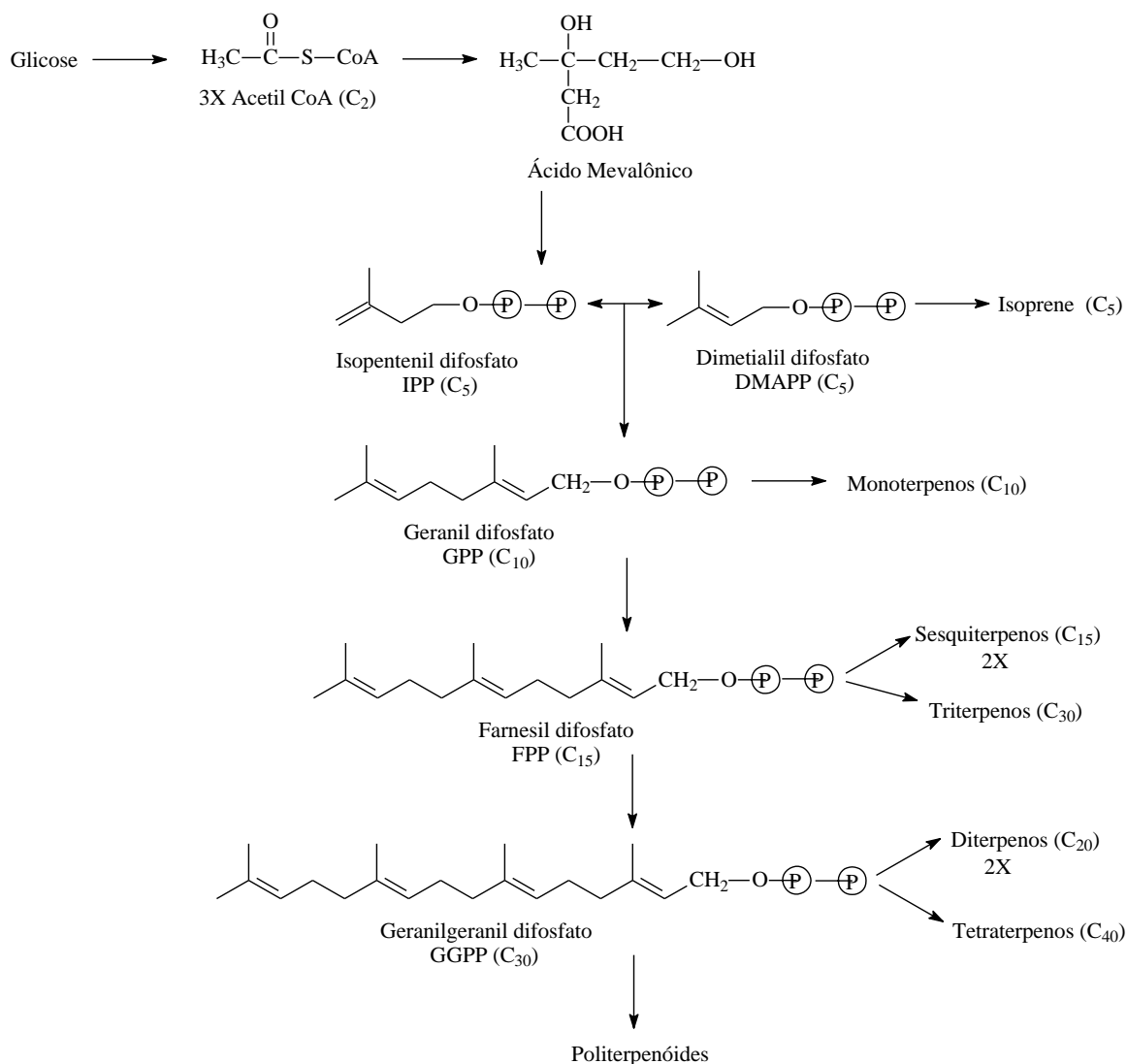
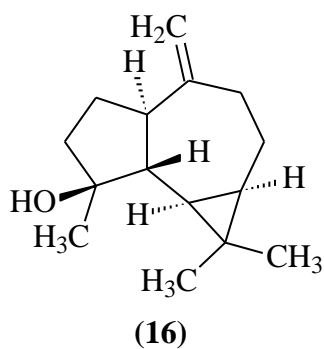


Figura 2. Biossíntese de terpenos (Taiz e Zeiger, 2004).

O espatulenol (**16**) é um sesquiterpeno oxigenado, isolado pela primeira vez a partir da espécie *Eucalyptus spathulata* (Myrtaceae) e pertence à classe dos cicloaromadendreno (Orsini *et al.*, 1993).



Alguns relatos descrevem a presença majoritária de espatulenol em diversas espécies vegetais, com destaque para a família Annonaceae (Araújo *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017; Meira *et al.*, 2017). Também está presente nas folhas de algumas espécies de Myrtaceae de diferentes localidades, como *Eugenia calycina* coletadas na cidade de Uberlândia (MG) (21,3%) (Sousa *et al.*, 2015); *E. uniflora* encontradas em Anápolis (GO) (10,0%) (Costa *et al.*, 2009) e *Eucalyptus oleosa* do município de Gabes (Tunísia) (16,1%) (Marzoug *et al.*, 2011). Em folhas de *Psidium*, também é relatada sua presença, porém, em menores concentrações. Espécie *P. guajava* presente em Henchir Chinchou (Tunísia) apresentou uma concentração de 1,96% (Khadhri *et al.*, 2014), já a amostra de *P. cattleianum* da Mata Atlântica brasileira demonstrou um total de 0,6% de espatulenol em sua composição total (Marques *et al.*, 2008).

Dentre as atribuições biológicas relatadas para esse composto encontra-se em destaque a atividade repelente contra os vetores *Triatoma infestans* (doença de Chagas), *Aedes aegypti* (dengue) e *Anopheles stephensi* (malária) (Cantrell *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2014; Meira *et al.*, 2017). Outros estudos realizados com amostras contendo presença majoritária de espatulenol em sua composição, relataram atividades antioxidante (Araújo *et al.*, 2015; Dib *et al.*, 2017; Meira *et al.*, 2017), anti-inflamatória (Apel *et al.*, 2010), antimicobacteriana, antifúngica (Tan *et al.*, 2016), antimicobacteriana (Wang *et al.*, 2006; De Lima *et al.*, 2016), imunomoduladora (Ziaei *et al.*, 2011) e antiproliferativa (Bonfim *et al.*, 2016; Petrelli *et al.*, 2016). Quando testado isoladamente, o composto obtido das folhas de *Annona vepretorum* apresentou promissora atividade antiproliferativa frente a células de leucemia (K562) (Bonfim *et al.*, 2016).

2.3 Atividades biológicas

2.3.1 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) são geradas por processos metabólicos normais e observadas em diversas condições fisiológicas de organismos aeróbicos. Entretanto, quando há um desequilíbrio entre a produção dessas espécies e a capacidade da célula de exercer uma resposta antioxidante eficaz, podem ocorrer danos em lipídios, proteínas, carboidratos e no DNA celular, ocasionando o estresse oxidativo. Apesar de sua fisiopatologia não estar bem estabelecida, essa condição está relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças, como câncer, doenças

inflamatórias, renais, cardiovasculares, diabetes e doença de Alzheimer (Dasuri *et al.*, 2013; Brown e Griending, 2015).

Os antioxidantes representam possíveis intervenções terapêuticas, uma vez que apresentam capacidade de combater danos ocasionados pelo estresse oxidativo, e assim prevenir o desenvolvimento de patologias. A principal função dos antioxidantes é eliminar ou neutralizar a formação de radicais livres e inibir os efeitos deletérios ocasionados pelas espécies reativas (Morry *et al.*, 2017). Compostos antioxidantes de origem natural são amplamente utilizados e tem ação comprovada, dentre os quais encontra-se o ácido ascórbico (Vit. C) (Xu *et al.*, 2017), curcumina (El-Wakf *et al.*, 2011), quercetina (Vázquez-Flores *et al.*, 2017), carotenoides como o β caroteno (Nath *et al.*, 2015) e licopeno (Hu *et al.*, 2017).

Uma gama de métodos são empregados para determinar a capacidade antioxidante de substâncias biologicamente ativas, entre os quais se encontram os ensaios que avaliam a capacidade de sequestro/eliminação de radicais livres (DPPH e ABTS), a peroxidação lipídica induzida por um radical artificial (ORAC e MDA), capacidade de redução de ferro (III) em ferro (II) (FRAP) (Bast e Haenen, 2013).

Algumas evidências científicas descrevem atividade antioxidante em espécies do gênero *Psidium*. Os extratos aquoso e etanólico obtidos de folhas de *P. guajava* e compostos isolados apresentaram potente atividade sequestradora de radicais livres pelos métodos DPPH, ABTS, e FRAP; sendo que alguns dos compostos isolados apresentaram atividade superior ao controle positivo (ácido ascórbico) (Fernandes *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Os frutos das espécies *P. friedrichsthalianum* e *P. acutangulum* também apresentaram atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS (Flores *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2015). Extratos aquoso e etanólico das folhas de *P. cattleianum* apresentaram atividade sequestradora de radical livre pelo método DPPH (Castro *et al.*, 2015). Os dados relatados, indicam que espécies do gênero *Psidium* representam promissores compostos com potencial antioxidante, entretanto, ainda não existem relatos evidenciando tal atividade avaliando a espécie *P. guineense*.

2.3.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica adaptativa desencadeada por estímulos nocivos, como patógenos, danos celulares ou irritantes (físicos ou químicos) que resultam ativação de mecanismos que provocam alterações nos componentes humorais e celulares após lesão tecidual. O contato com o agente lesivo gera uma migração de células

circulantes, que são direcionadas pela presença de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. A resposta na área lesionada é caracterizada por um processo inflamatório, que apresenta sinais clínicos denominados sinais cardinais da inflamação, sendo estes: rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (Cruvinel *et al.*, 2010). A resposta inflamatória consiste num mecanismo de defesa desenvolvido pelo organismo, o qual tem por finalidade remover o agente causador da lesão, além de seus fragmentos resultantes e iniciar a restauração tecidual. Essa resposta atua neutralizando, diluindo ou destruindo os agentes nocivos. A conclusão da resposta inflamatória e a transição do organismo para o estado homeostático é um processo ativo e altamente regulado, conhecido como resolução da inflamação (Medzhitov, 2010; Ashlei *et al.*, 2012).

O processo inflamatório é mediado por citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL) IL-1 e IL-6. Estas citocinas são proteínas pleiotrópicas que regulam a morte celular de tecidos inflamatórios, modificam a permeabilidade endotelial vascular, recrutam células sanguíneas para tecidos inflamados e induzem a produção de proteínas de fase aguda (Takeuchi e Akira, 2010).

A inflamação pode ser diferenciada em aguda ou crônica. O processo agudo tem curta duração, inicia logo após estímulo lesivo e resulta na cura. Caracteriza-se pela adesão de componentes sanguíneos (plasma e leucócitos) no local inflamado eliminando o agente causador, resultado na restauração do tecido. Quando a resposta inflamatória é insuficiente e não há completa eliminação do patógeno, inicia-se a fase crônica, que persiste por tempo indeterminado e está relacionada a algumas doenças como artrite e aterosclerose (Maskrey *et al.*, 2011; Tabas e Glass, 2013).

Dentre as classes de medicamentos utilizados para o tratamento da inflamação encontram-se os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), também conhecidos como glicorticóides, utilizados para tratamento de desordens inflamatórias, como alergias, dermatites, artrite reumatóide, esclerose múltipla, entre outras. Atuam interferindo na ativação de fatores de transcrição, inibindo mediadores inflamatórios (NF- κ B), outros genes de interleucinas e citocinas (IL-1, interferon- γ (IFN- γ), TNF) e ativando genes anti-inflamatórios (IL-10 e lipocortina). O uso prolongado dessa classe de medicamentos está associado ao aparecimento de efeitos adversos, dos quais os mais típicos são: diabetes, osteoporose, hipertensão e retardo do crescimento (De Bosscher *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2012)

Outra classe utilizada no tratamento de inflamações e dores são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que atuam inibindo a liberação da enzima

ciclooxigenase (COX): ciclooxigenase-1 constitutiva (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), que agem bloqueando a biossíntese prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. Os AINEs não seletivos bloqueiam as duas isoformas da COX, levando em consideração que COX-1 executa funções fisiológicas no organismo, o uso de tais medicamentos ocasiona efeitos indesejáveis como ulcerações e nefrotoxicidade (Harrak *et al.*, 2007; Tarp *et al.*, 2012). Já os inibidores seletivos de COX-2, os coxibes, atuam inibindo essa enzima, porém, mantêm a produção de prostaglandinas via COX-1, que está envolvida na manutenção da integridade mucosa gastrointestinal, afim de evitar os efeitos adversos gastrointestinais (Sostres *et al.*, 2013).

Considerando as limitações e os efeitos indesejáveis ocasionados pelo uso dos medicamentos anti-inflamatórios disponíveis no mercado, há um crescente interesse na descoberta de compostos naturais ativos e menos tóxicos, que possam ser eficazes no tratamento de processos inflamatórios (Feng *et al.*, 2016).

Dentre os modelos experimentais utilizados para avaliar atividades anti-inflamatórias de compostos biologicamente ativos estão a avaliação da migração de leucócitos, teste de edema na pata do animal induzido por substâncias químicas inflamatórias, modelos de inflamação por mecanismos autoimunes, modelos que utilizam agentes infecciosos, teste da permeabilidade capilar induzida pelos marcadores da inflamação, pleurisia ou peritonite e edema inflamatório de orelha induzido por agentes irritantes (Lapa *et al.*, 2007).

2.3.3 Câncer

O câncer, também denominado como neoplasia ou tumor maligno, compreende um grupo de doenças complexas e heterogêneas, caracterizado pela proliferação descontrolada de células alteradas, com capacidade de invadir tecidos adjacentes e se disseminar para outros órgãos (Popat *et al.*, 2013). Trata-se de uma das principais causas de morbidade no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), só no ano de 2015 um total de 8,8 milhões de mortes foram ocasionadas por câncer (Who, 2017).

Vários mecanismos bioquímicos então envolvidos na gênese e desenvolvimento do câncer, incluindo o estresse oxidativo, induzido por radicais livres, que atua causando danos no DNA celular (Reuter *et al.*, 2010). Fatores ambientais como o estilo de vida sedentário, tabagismo, ingestão de bebidas alcoólicas, e outras fatores de ordem genética, hormonal e fisiológica também estão envolvidos na etiologia da doença (Kanavos, 2006).

Alguns dos fármacos utilizados para o tratamento do câncer são oriundos de plantas medicinais. A química de produtos naturais constitui uma das principais linhas de pesquisa na busca de novos agentes anticancerígenos (Silva *et al.*, 2003). No período de 1940 até o final de 2014, 49% dos fármacos descritos para tratamento do câncer eram de origem vegetal ou moléculas sintetizadas a partir de produtos naturais (Newman e Cragg, 2016).

Drogas como a vincristina e vimblastina são produzidas a partir de alcalóides isolados *Catharantus roseus*. Atuam inibindo o fuso mitótico, interrompendo a divisão celular na metástase e são utilizadas no tratamento de leucemia, câncer de mama, rins, tumor de ovário e linfoma de Hodgkin (Carvalhaes *et al.*, 2002). O medicamento Paclitaxel®, é produzido a partir do taxol, um alcaloide derivado de *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata*, apresenta ação antiproliferativa semelhante à dos alcaloides da vinca (Correa, 1995). Espécies de *Croton* constituem uma vasta fonte de substâncias ativas contra o câncer, como os triterpenóides (clerodano, furoclerodano e diterpenos acíclicos) e alcalóides como a taspina (Salatino *et al.*, 2007).

Dentre os diferentes tipos de câncer que acomete os seres humanos, encontra-se o de ovário, que atinge exclusivamente o sexo feminino (Smith *et al.*, 2000), que é caracterizado por um difícil prognóstico, dessa forma, a maioria dos casos são diagnosticados já em fase avançada, o que dificulta o seu tratamento (Jemal *et al.*, 2009). Os tratamentos convencionais consistem em procedimentos cirúrgicos, radiação, quimioterapias, medicação e outras terapias. Entretanto, a resistência aos fármacos e a toxicidade representam uma grande dificuldade, fazendo assim necessário o desenvolvimento de novos fármacos, mais eficientes e menos tóxicos, para o tratamento desse tipo de tumor (Guan *et al.*, 2012).

2.3.4 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), também denominado de Bacilo de Koch (Fiuza De Melo *et al.*, 2005). A doença apresenta características como longo período de latência entre a infecção inicial e a apresentação clínica da doença. A TB acomete os pulmões, mas também pode ocorrer em outros órgãos do corpo como ossos, rins, meninges e linfonodos (Iseman, 2005). No ano de 1993, a OMS a declarou como uma emergência de saúde pública mundial, ressaltando a necessidade de medidas efetivas para seu controle. A doença é considerada um grave problema de saúde pública, sendo a principal causa

mundial de morte por um único agente infeccioso. Em 2016, a OMS relatou um total de 10,4 milhões de novos casos, sendo que estes, ocasionaram 1,8 milhões de mortes no mundo (Hornes *et al.*, 2010; Who, 2014; 2016)

A terapêutica recomendada pelo Ministério da Saúde para o tratamento da tuberculose consiste em seis meses de utilização de quatro drogas de primeira linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Já em casos de tuberculose multidroga resistente MDR-TB (multidrug resistant tuberculosis), o tratamento consiste em 3 meses de estreptomicina, etionamida, etambutol e pirazinamida e 9 meses de etionamida e etambutol (Castelo Filho *et al.*, 2004). O tratamento irregular eleva as taxas de resistência. Sejam essas primária, em pacientes nunca tratados, contaminados por bacilos previamente resistentes, quanto adquirida, em pacientes com TB inicialmente sensível, que se tornam resistentes após a exposição aos medicamentos (De Rossi, 2006).

Devido ao aparecimento de cepas resistentes e dada a alta toxicidade de fármacos para o tratamento da TB, há uma necessidade de desenvolvimento de novos fármacos, mais eficazes e menos tóxicos que as drogas correntes, visando assim, a redução do tempo e a complexidade do tratamento (Koul *et al.*, 2011).

A busca por novas substâncias ativas contra o MTB representa um grande desafio para a ciência atual. Objetiva-se encontrar novas moléculas capazes de reduzir a duração total do tratamento, que apresentem compatibilidade com os fármacos já existentes e ação sinérgica, evitando a interação com outros medicamentos (Orme *et al.*, 2001; Zhang; Amzel, 2002).

Pesquisas na área de produtos naturais tem se intensificado, especialmente na busca por compostos e espécies de plantas ativos contra o MTB, com o desenvolvimento de técnicas de rastreio mais fácil, rápido e mais seguro. Vários autores consideram necessária uma concentração inibitória mínima (CIM <200 µg/mL) para que uma amostra vegetal seja considerada ativa contra o MTB e colabore com o desenvolvimento e evolução de pesquisas, como identificação de compostos ativos, testes *in vivo* com modelos animais, ensaios clínicos, entre outros (Chimponda e Mukanganyama 2010; Negi *et al.*, 2010).

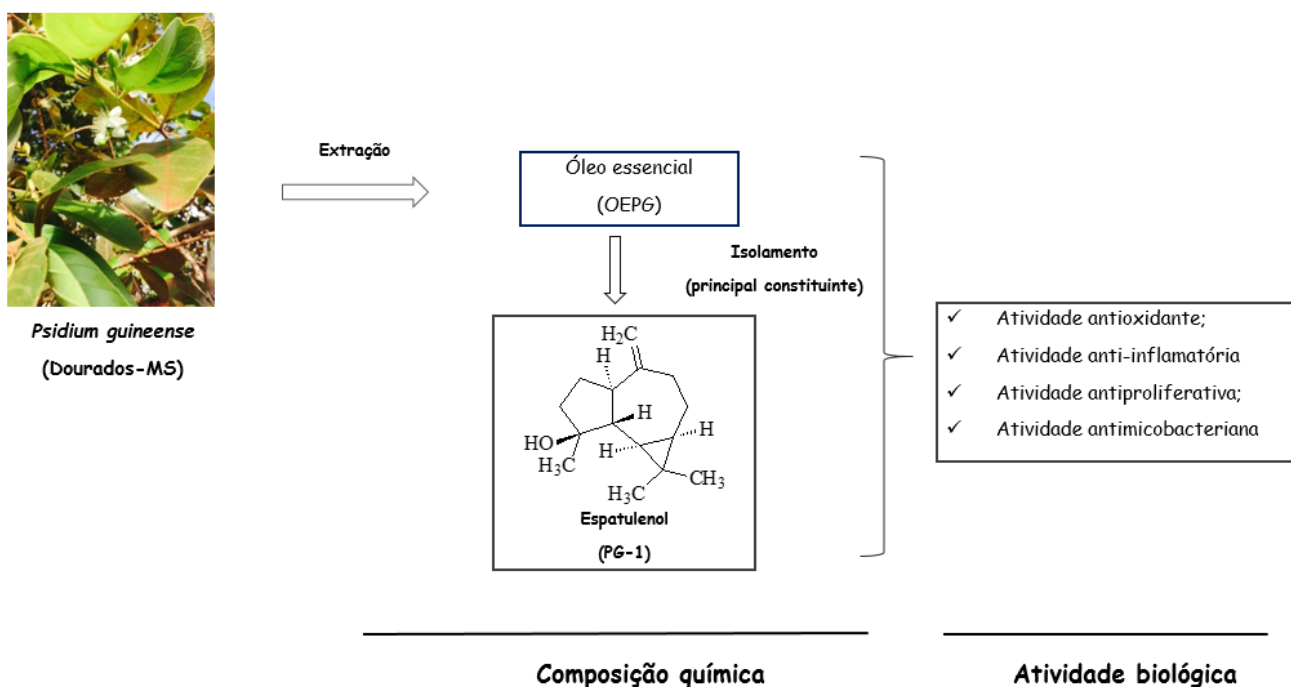
3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Composição química e avaliação da atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicrobacteriana do óleo essencial e composto majoritário isolado das folhas de *Psidium guineense* Swartz (**Esquema 1**).

3.2 Objetivos específicos

- Extração, análise da composição química e isolamento do composto majoritário (espatulenol/PG-1) presente no óleo essencial das folhas de *P. guineense* (OEPG);
- Avaliação das atividades biológicas de OEPG e PG-1:
Atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e MDA;
Atividade anti-inflamatória pelos métodos de pleurisia e edema de pata;
Atividade antiproliferativa pelo método de Sulforrodamina B;
Atividade antimicrobacteriana frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.



Esquema 1. Proposta de estudo para folhas de *P. guineense* coletadas em Dourados-MS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERELE, O. Traditional Medicine Programme. Traditional herbal medicines around the globe: modern perspectives. **Swiss Pharma**, v.13, p. 57-72, 1991.

ALMEIDA, C. E. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 428-433, 1995.

ALVES, A. C. S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 593-606, 2014.

AMORIM, A. C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.

APEL, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 433-438, 2010.

ARAÚJO, C. S. et al. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from leaves of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 43, p. 615-618, 2015.

ASHLEI, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

ASHRAF, A. et al. Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of *Psidium guajava* leaf extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 10, p. 1971-1981, 2016.

BAGG, J. et al. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. **Oral Oncology**, v. 42, n. 5, p. 487-492, 2006.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. Ten misconceptions about antioxidants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 8, p. 430-436, 2013.

BEZERRA, J. E. F. L. et al. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

BONFIM, L. M. et al. Antitumour Activity of the Microencapsulation of *Annona vepretorum* Essential Oil. **Basic Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 118, n. 3, p. 208-213, 2016.

BOOTH, M. **“Opium - a History”**. New York: St Martin's Griffin, 1998.

BROWN, D. I.; GRIENGLING, K. K. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 116, n. 3, p. 531-549, 2015.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALDEFIE-CHEZET, F. et al. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 364-70, 2006.

CANTRELL, C. L. et al. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5948-5953, 2005.

CARVALHAES, S. F. et al. Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian “vinca rósea” using long exchange chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 83-84, 2002.

CASTRO, M. R. et al. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 242-250, 2015.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65-72, 2005.

CHAND, K. et al. A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic derivatives. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 281-295, 2017.

CHEN, Y.Y. et al. Studies on chemical constituents and anti-hepatoma effects of essential oil from *Annona squamosa* L. pericarps. **Natural Products Research**, v. 31, n. 11, p. 1305-1308, 2017.

CHIMPONDA, T.; MUKANGANYAMA, S. Antimycobacterial activities of selected medicinal plants from Zimbabwe against *Mycobacterium aurum* and *Corynebacterium glutamicum*. **Tropical Biomedicine**, v. 27, n. 3, p. 595-610, 2010.

CORREA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**. In: (Ed.), v.18, p.460-467, 1995.

COSTA, D. C. et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 336-354, 2015.

COSTA, D. P. et al. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1287-1293, 2009.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). **American Society of Plant Physiologists**, v.2, p. 1250-1318. 2000.

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. . **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-461, 2010.

CUNHA, F. A. B. et al. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

DA SILVA, J. D. et al. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and fragrance Journal**, v. 18, p. 240-243, 2013.

DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J. N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 170-185, 2013.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 497-504, 2010.

DE LIMA, B. R.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Onychopetalum amazonicum* R.E.Fr. **Natural Products Research**, v. 30, n. 20, p. 2356-9, 2016.

DE ROSSI, E.; AINSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of *mycobacterial* efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiology Letters**., v. 30, p. 36-52, 2006.

DIAS, C. N. et al. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (*Diptera: Culicidae*). **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2015, p. 490765, 2015.

DIB, I. et al. Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 82, p. 1-15, 2017.

EL-AHMADY, S. H.; ASHOUR, M. L.; WINK, M. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Psidium guajava* fruits and leaves. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 6, p. 475-481, 2013.

EL-WAKF, A. M. et al. Use of tumeric and curcumin to alleviate adverse reproductive outcomes of water nitrate pollution in male rats. **Nature and Science**, v. 9, n. 7, p. 229-239, 2011.

FARAG, R. S. et al. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 1, p. 30-35, 2004.

FENG, J. et al. Phenolics from Durian Exert Pronounced NO Inhibitory and Antioxidant Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 21, p. 4273-4279, 2016.

FENG, X.H. et al. Cytotoxic and antioxidant constituents from the leaves of *Psidium guajava*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 10, p. 2193-2198, 2015.

FERNANDES, M. R. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39-44, 2014.

FERNANDES, T. G. et al. In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 158-237, 2012.

FERREIRA, P.R.B. et al. Morphoanatomy, Histochemistry and Phytochemistry of *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae) Leaves. **Journal of Pharmacy Research**, v.4, p. 942-944, 2011.

FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L.G.; JOHANNES, J.C.S. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FIUZA DE MELO, F. A. et al. Tuberculose. In: Focaccia R. 3. Rio de Janeiro: **Atheneu**, p. 1139-2005.

FLORES, G. et al. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 889-895, 2013.

FRANZON, R. C. C. et al. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Brasília: **Embrapa Cerrados**, v.1, p. 48, 2009.

GUAN, Y.-Q. et al. Cell cycle arrest and apoptosis of OVCAR-3 and MCF-7 cells induced by co-immobilized TNF- α plus IFN- γ on polystyrene and the role of p53 activation. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6162-6171, 2012.

HARRAK, Y. et al. Synthesis and biological activity of new anti-inflammatory compounds containing the 1,4-benzodioxine and/or pyrrole system. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 14, p. 4876-4890, 2007.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HORNES, D. J. et al. Factors associated with mortality in patients with tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 258-265, 2010.

HU, W. et al. Neuroprotective effects of lycopene in spinal cord injury in rats via antioxidative and anti-apoptotic pathway. **Neuroscience Letters**, v. 642, p. 107-112, n.6, 2017.

ISEMAN, M. D. **Tuberculose. In: Goldman L & Ausiello D. Cecil: Tratado de Medicina Interna.** 22. Rio de Janeiro: Campus-Elsevier: 2005.

JARADAT, N. A.; AYESH, O. I.; ANDERSON, C. Ethnopharmacological survey about medicinal plants utilized by herbalists and traditional practitioner healers for treatments of diarrhea in the West Bank/Palestine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 182, p. 57-66, 2016.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, p. 225–249, 2009.

JOSEPH, B.; MINI PRIYA, R. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Guava (*Psidium guajava* Linn.). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p. 53-69, 2011.

KANAVOS, P. The rising burden of cancer in the developing world. **Annals of Oncology**, v. 17, p. 15-26, 2006.

KHADHRI, A. et al. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 29-31, 2014.

KIM, S.Y. et al. Protective effects of polysaccharides from *Psidium guajava* leaves against oxidative stresses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 804-811, 2016.

KOUL, et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, p. 483-490, 2011.

KUNTZE, L. B. et al. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* C.A. Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 34-42, 2012.

LANDRUM, L. R. **A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae).** v. 20, n.4, 1449-1469, 2003.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LAPA, A. J. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais.** São Paulo: Setor de Produtos Naturais: Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2007.

LAPČÍK, O. et al. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 10, p. 983-992, 2005.

LIN, J. N. et al. [Effects of triterpenoid from *Psidium guajava* leaves ursolic acid on proliferation, differentiation of 3T3-L1 preadipocyte and insulin resistance]. **Zhong Yao Cai**, v. 36, n. 8, p. 1293-1297, 2013.

LOPEZ, S. et al. Chemical composition, antibacterial and repellent activities of *Azorella trifurcata*, *Senecio pogonias*, and *Senecio oreophyton* essential oils. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, Brasil. p. 384-388, 2008.

MAGINA, M. D. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia species*. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 3, p. 345-350, 2009.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, v. 235, n. 1, p. 114-120, 2006.

MARQUES, A. F.; WENDLER, E. P.; SALES MAIA, B. H. Volatile Oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 519-521, 2008.

MARZOUG, H. N. B. et al. *Eucalyptus oleosa* Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1695-1709, 2011.

MASKREY, B. H. et al. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. **Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 1001-1006, 2011.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MEIRA, C. S. et al. Chemical composition and antiparasitic activity of essential oils from leaves of *Guatteria friesiana* and *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 2, p. 156-162, 2017.

MORAIS-BRAGA, M. F. et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal of Biological Science**, v. 24, n. 2, p. 302-313, 2017.

MORRY, J. et al. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. **Redox Biology**, v. 11, p. 240-253, 2017.

NATH, A. et al. Chapter 4 - Ascorbic Acid, β -Carotene and Antioxidant Activity of Broccoli During Short-Term Refrigerated Storage A2 - Preedy, Victor. In: (Ed.). **Processing and Impact on Active Components in Food**. San Diego: Academic Press, p.27-34, 2015.

NEGI, A. S. et al. Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. **Medicinal Research Review**, v. 30, n. 4, p. 603-645, 2010.

NEIRA GONZÁLEZ, A. M.; RAMÍREZ GONZÁLEZ, M. B.; SÁNCHEZ PINTO, N. L. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, p. 0-0, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016.

ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents Chemotherpary**. v.45, p. 1943-1946, 2001.

ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L. Application of molecular modelling to natural products: a biogenetic study of (+)-spathulenol and (+)-allospathulenol. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 284, n. 1, p. 67-74, 1993.

OUYANG, W. et al. [Chemical Constituents from Ethyl Acetate Extract of *Psidium guajava* Leaves (II)]. **Zhong Yao Cai**, v. 38, n. 8, p. 1649-1652, 2015.

PETRELLI, R.; et al. Biological Activities of the Essential Oil from *Erigeron floribundus*. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1-14, 2016.

PERALTA-BOHÓRQUEZ, A. F. et al. Analysis of Volatile Compounds of Sour Guava (*Psidium guineense* Swartz) Fruit. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 6, p. 493-498, 2010.

PINO, J. A. et al. Phytochemical analysis and in vitro free-radical-scavenging activities of the essential oils from leaf and fruit of *Melaleuca leucadendra* L. **Chemical Biodiversity**, v. 7, n. 9, p. 2281-2288, 2010.

POMMIER, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 2894-2902, 2009.

POPAT, K.; MCQUEEN, K.; FEELEY, T. W. The global burden of cancer. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 27, n. 4, p. 399-408, 2013.

RAMOS, A. S. et al. Chemical characterization and antioxidant capacity of the araçá-pera (*Psidium acutangulum*): An exotic Amazon fruit. **Food Research International**, v. 75, p. 315-327, 2015.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Chemical compositions, antioxidant and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils from Indonesia. **Wood Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 23-29, 2012.

RIVERO-MALDONADO, G. et al. Flavonoids extracted from *Psidium* species (MYRTACEAE) in Venezuela. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 30, p. 217-241, 2013.

RODRIGUES, C. G. et al. Antibacterial activity of taninins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, p. 1-5, 2014.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 11-33, 2007.

SEN, S. S. et al. Flavonoid fraction of guava leaf extract attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF-kappaB signalling pathway in Labeo rohita macrophages. **Fish Shellfish Immunology**, v. 47, n. 1, p. 85-92, 2015.

SIDDIQUE, S. et al. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Leaves of Three *Melaleuca* Species of Pakistani Flora. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

SILVA, C. J. et al. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 6, p. 474-478, 2007.

SILVA, J. S. et al. Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 221-232, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G., Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC. p. 467-495. 2010.

SMITH, H. O. et al. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States- a 24-year population-based study. **Gynecology Oncology**, v. 78, n. 2, p. 97-105, 2000.

SOLIMAN, F. M. et al. 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, n. 2, p. 219-225, 2016.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; LANAS, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. **Arthritis Research Therapy**, v. 15 Suppl 3, p. S3, 2013.

SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71-78, 2015.

TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 166-172, 2013.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of *Myrtaceae* species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TAN, N. et al. Antimycobacterial and Antifungal Activities of Selected Four *Salvia* Species. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 5, p. 593-603, 2016.

TARP, S. et al. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the C-reactive protein level in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 11, p. 3511-3521, 2012.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; DE FARIAS CARVALHO, V. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. **Corpus et Scientia**, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012.

VÁZQUEZ-FLORES, L. F. et al. Chapter 47 - Antioxidant, Antiinflammatory, and Antifibrotic Properties of Quercetin in the Liver. In: (Ed.). **Liver Pathophysiology**. Boston: Academic Press, p.653-674. 2017.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

VIEIRA, T. I. et al. Atividade antibacteriana e antiaderente in vitro dos extratos das folhas de *Psidium guineense* Sw. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre microrganismos orais. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia** v. 60, p. 359-365, 2012.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin. Discovery to clinic. **Annals of New York Academy of Science**, v. 803, p. 1-12, 1996.

WANG, P.; KONG, C. H.; ZHANG, C. X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L. **Molecules**, v. 11, n. 7, p.549-455, 2006.

WHO. **Global Tuberculosis Report**. ORGANIZATION, W. H. Geneva: p. 1-155, 2014.

WHO. **Global Tuberculosis Report**. ORGANIZATION, W. H. Geneva, p. 194-214, 2016.

WHO. **Guide to câncer early diagnosis** Geneva: p. 10-48, 2017.

XU, X. et al. Ascorbic acid as an effective antioxidant additive to enhance the efficiency and stability of Pb/Sn-based binary perovskite solar cells. **Nano Energy**, v. 34, p. 392-398, 2017.

ZHANG, D.Y. et al. Variation of essential oil content and antioxidant activity of *Lonicera* species in different sites of China. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 772-779, 2015.

ZHANG, Y.; AMZEL, L.M. Tuberculosis drug targets. **Current drugs targets**, v.3, p. 131-154, 2002.

ZHANG, Y. et al. A novel analgesic isolated from a traditional Chinese medicine. **Current Biology**, v. 24, n. 2, p. 117-123, 2014.

ZIAEI, A. et al. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 4, p. 557-162, 2011.

5.0 MANUSCRITO

A elaboração desse trabalho originou o artigo “**Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Swartz and spathulenol**”, que foi submetido ao periódico “*Journal of Ethnopharmacology*” (Qualis: A1/Biodiversidade) (fator de impacto 3.055).

Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Swartz and spathulenol

Kamilla Felipe do Nascimento^a, Flora Martinez Figueira Moreira^b, Joyce Alencar Santos^b, Candida Aparecida Leite Kassuya^b, Julio Henrique Rosa Croda^{b,c}, Claudia Andrea Lima Cardoso^d, Maria do Carmo Vieira^e, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz^f, Mary Ann Foglio^f, João Ernesto de Carvalho^f and Anelise Samara Nazari Formagio^{a,b*}

^a *Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados UFGD, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

^b *Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados UFGD, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

^c *Oswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

^d *Chemistry, State University of Mato Grossodo Sul UEMS, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

^e *Faculty of Agricultural Sciences, Federal University of Grande Dourados UFGD, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

^f *Multidisciplinary Center for Chemical, Biological, and Agricultural Research, State University of Campinas Unicamp, São Paulo State, Brazil.*

*Corresponding author at: *Faculty of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Health Sciences, UFGD, MS, Brazil*

E-mail address: aneliseformagio@ufgd.edu.br; aneliseformagio@yahoo.com.br

(A.S.N.Formagio)

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Leaves from *Psidium guineense* Swartz are used in popular medicine for the treatment of inflammatory disease. However, there is no scientific evidence demonstrating this activity. **Aim of the study:** To evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *P. guineense* and spathulenol (a major constituent). The study was conducted in part to provide evidence supporting the ethnobotanical use of the leaves of this species. **Material and methods:** The essential oil (EOPG) was extracted from the leaves of *P. guineense* by hydrodistillation and was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The major compound, spathulenol (PG-1), was isolated in a chromatographic column and characterized by nuclear magnetic resonance (NMR). EOPG and PG-1 were evaluated *in vitro* for antioxidant activity by DPPH, ABTS and MDA methods; anti-inflammatory potential was assessed using two models, including pleurisy and oedema, in mice. The impact of EOPG and PG-1 on cell proliferation was determined via spectrophotometric quantification of the cellular protein content using a sulforhodamine B assay, and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity was determined using the REMA method. **Results:** A total of 38 components were identified from the EOPG, with the sesquiterpenic alcohol spathulenol (PG-1) (80.7%) being the major constituent. EOPG and PG-1 exhibited the highest antioxidant activities in the DPPH and MDA system compared with reference standards, with IC₅₀ values ranging from 26.13-85.60 µg/mL. Oral administration of EOPG and PG-1 showed significant inhibition in the carrageenan-induced mice paw oedema and pleurisy model. The EOPG (GI₅₀ = 0.89 µg/mL) and PG-1 (GI₅₀ = 49.30 µg/mL) were particularly effective against the ovarian cancer cell line. Both showed moderate antimycobacterial activity. **Conclusion:** For the first time, this study demonstrated the antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial properties of the essential oil of *P. guineense* (leaves were collected in Dourados-MS) and spathulenol, collaborating the ethnopharmacological use of this plant due to its an anti-inflammatory effect.

Keywords: Araçá, antioxidant, oedema, pleurisy, anti-*Mycobacterium tuberculosis*, antiproliferative.

1. Introduction

Psidium guineense Swartz. (Myrtaceae) is a native shrub or small tree in tropical America that is 1–9 m in height and can be found from Southern Mexico to Northern Argentina and Brazil (Neira González et al., 2005). In Brazil, it is known as ‘goiabinha-araçá’, ‘araçá-do-campo’, ‘araçá verdadeiro’ or ‘goiabinha selvagem’. The fruits are used in preparations that can be eaten raw or in the form of desserts, drinks, ice cream and liqueurs (Manica, 2000). In folk medicine, the leaves of *P. guineense* Swartz. Are used in the treatment of inflammation (Franzon et al., 2009), and the roots and bark are used to treat gastrointestinal disorders or as a diuretic (Rodrigues and Carvalho, 2001).

Studies of the biological activity of this plant have demonstrated antimicrobial properties of leaf extracts (Fernandes et al., 2012; Neira González et al., 2005; Vieira et al., 2012) and the antioxidant potential of the fruits (Damiani et al., 2012; de Araújo et al., 2016; Gordon et al., 2011). Chemical screening of extract from the leaves of this species identified bioactive compounds such as phenolics, lycopene, vitamin C and flavonoids (Rivero-Maldonado et al., 2013). In previous studies, some researchers have analysed the chemical composition of the essential oil of this plant (da Silva et al., 2013; Peralta-Bohórquez et al., 2010; Tucker et al., 1995). Studies of the essential oil extracted from *P. guineense* leaves collected in Boa Vista (Brazil) identified a predominance of monoterpenes (including limonene) and sesquiterpenes (β -bisabolol and epi- α -bisabolol) (da Silva et al., 2003). Although the chemical composition of the essential oil generated from the leaves of this plant has been studied, research regarding its biological activities is still limited.

To the best of our knowledge, no studies have evaluated the biological activities of the essential oil from leaves for this species. Thus, the aim of this study was to further investigate the chemical composition of the essential oil from *P. guineense* leaves and evaluate its antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial

properties as well as the major identified compound in this oil. In addition, we wished to explain the ethnobotanical uses of leaves from this plant to treat inflammation in traditional Brazilian medicine.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and drugs

For *in vitro* assays, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), dimethyl sulfoxide (DMSO), doxorubicin, isoniazid, resazurin, rifampicin, RPMI-1640 medium, sulforhodamine B, tetramethylsilane and trichloroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); additional materials used included analytical-grade chloroform and methanol from Vetec, (RJ, Brazil), Broth Middlebrook 7H9 and 7h11 from Difco/Becton Dickinson (Sparks, USA), n-hexane from Dinâmica Química Contemporânea (SP, Brazil), oleic acid, bovine serum albumin, dextrose, and catalase (OADC enrichment) from BBL/Becton Dickinson (Sparks, USA), and thin-layer chromatography (TLC) plates from Macherey-Nagel GmbH & Co. (Düren, Germany). For *in vivo* assays, λ -carrageenan (Cg) and dexamethasone (DEXA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); phosphate buffered saline (PBS) and Turk's solution were obtained from Vetec (RJ, Brazil).

2.2 Plant material

Leaves of *P. guineense* were collected in the Dourados-MS in March of 2015. Dr. Zefa Valdevina Pereira (A Botanist and faculty member of the department of Biological and Environmental Sciences) authenticated the plant and a specimen voucher was deposited in the herbarium of the Federal University of Grande Dourados-UFGD (DDMS

5502). The authorization for accessing and studying samples from the Brazilian genetic heritage was obtained from the Brazilian government through National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (CNPq authorization no. 010220/2015-1-CNPq/CGEN/MMA)

2.2.1. Extraction of essential oil

Fresh *P. guineense* leaves (300 g) were subjected to hydrodistillation in a Cevenger-type apparatus for approximately 4 h to obtain the essential oil according to the procedure described in the Brazilian Pharmacopoeia. The obtained essential oil (EOPG) presented as a colourless liquid and had a distinct aroma. This sample was dried over anhydrous sodium sulfate and after filtration was stored at -4 °C until use.

2.2.2. Essential oil analyses and identification of components– GC/MS

The EOPG analyses were performed using a gas chromatograph equipped with a mass spectrometer detector (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japan). A DB-5 column (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25- μ m film thickness) was used, with helium (99.999% purity) used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ and an injection volume of 1 μ L (in split mode, 1:10). The initial oven temperature was 50 °C and it was heated to 280 °C at 3 °C min⁻¹. The injector temperature was 220 °C, and the temperature of the transfer line and the quadrupole detector was 280 °C. The MS scan parameters included an electron impact ionization voltage of 70 V, a mass range from 50 to 550 Daltons and a scan interval of 0.3 s.

The retention index was calculated using a mixture of linear alkanes (C8-C30) as an external reference (Adams, 2007). Compound identification was achieved by

comparing the mass spectra of the samples with the spectra available in the NIST21 and WILEY229 libraries as well as with data reported in the literature (Adams, 2007).

2.2.3. Isolation and identification of the major EOPG constituent

A portion of the EOPG obtained by hydrodistillation was purified by column chromatography (CC) in silica gel, using as eluent mixture of n-hexane/chloroform with increasing polarity. A total of 54, 10 mL fractions were collected and each was assessed by thin-layer chromatography (TLC) to make comparisons, then the sub-fractions EOPG-1 to EOPG-7 were pooled. The sub-fraction eluted with 40% of the n-hexane/chloroform mixture (EAF-4) yielded compound PG-1. The NMR measurements were carried out on a Varian Mercury Plus BB spectrometer operating at 300 MHz for ^1H and 75.5 MHz for ^{13}C , using CDCl_3 as the solvent and tetramethylsilane (TMS) as the internal standard.

2.3. Animals

Experiments were conducted using female and male *Swiss* mice (50 days old, 20-30 g, n=6) and female *Wistar* rats (50 days old, 200-300 g, n=6) provided by the Federal University of Grande Dourados (UFGD). All animals were kept under 12:12 h light–dark cycle conditions with the temperature maintained at 22 ± 3 °C and with free access to food and water. The animals were acclimated to the experimentation room for at least 2 h before testing and were used only once throughout the experiments. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UFGD (27/2015).

2.4. Antioxidant assays

2.4.1 ABTS and DPPH radical scavenging

Free radical scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and azino-bis (ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) were determined by a spectrophotometric method (Blois, 1958; Burits and Bucar, 2000 and Re et al. 1999), with modifications. For the DPPH test, different concentrations of EOPG or PG-1 in methanol (10–100 µg/ml) were added to 2 mL of a 0.1 mM solution of DPPH that was previously prepared and incubated in the dark for 30 min. The absorbance was recorded at 517 nm using a UV spectrophotometer (Biospectro sp 220). In the ABTS assay, 1980 mL of diluted ABTS+ solution was added to 20 µL of EOPG or PG-1, and the absorbance at 734 nm was measured 6 min after the initial mixing. BHT was used as a positive control. Assays were carried out in triplicate. The percentage inhibition was calculated as $(I\%) = (A_0 - A/A_0) \times 100$, where A_0 is the absorbance of the control, and A is the absorbance of the samples. The IC_{50} value was calculated as the concentration of sample required to scavenge 50% of free radicals by graphing the $I\%$ *versus* extract concentration.

2.4.2. MDA

The antioxidant activity of EOPG and PG-1 in rat brain homogenates was evaluated according to a method described by Stocks et al., 1974, with modifications. Malondialdehyde (MDA) was used to evaluate lipid peroxidation. Aliquots (50 µL) of samples at different concentrations (EOPG or PG-1; 25-100 µg/ml) or phosphate buffer (control) were added to 3 mL of homogenate and 1.2 mL of trichloroacetic acid, then the samples were centrifuged to collect the precipitated proteins. The supernatant (1 mL) was heated with 1 mL of an aqueous solution of 0.67% thiobarbituric acid for 15 min at 100 °C. The absorbance at 535 nm was measured using a spectrophotometer (Biospectro sp 220). Butylated hydroxytoluene (BHT) was utilized as a positive control. The calculation

of the antioxidant antioxidant (AA%) was based on the following equation: $AA \% = 1 - (A_{\text{sample}} - A_{0\text{sample}} / A'_{\text{control}} - A'_{0\text{control}}) \times 100$

2.5. Anti-inflammatory assay

2.5.1 Carrageenan-induced paw oedema

Swiss male mice were orally treated with EOPG (30, 100 or 300 mg/kg), or the vehicle (saline solution). A second group of mice was treated subcutaneously with the positive control (dexamethasone; 0.5 mg/kg). After 1 h, the animals received a 50 μL s.c. injection into the right hind paw of carrageenan (300 $\mu\text{g}/\text{paw}$) that was suspended in sterile 0.9% saline. The contralateral paw received only saline solution and was used as a control. The thickness of the paw oedema was measured using a plethysmometer (PANLAB Harvard) 1 h before any treatment and at different time points (0.5, 1, 2 and 4 h) after the injection of carrageenan. The results were expressed in milliliter and the differences between control *versus* samples quantified as oedema (Henriques et al., 1990).

2.5.2 Pleural cell migration and protein exudation

Different groups of female mice were treated with EOPG (30 or 100 mg/kg, v.o.), PG-1 (100 mg/kg, v.o), vehicle (saline solution) or dexamethasone (0.5 mg/kg, subcutaneously, positive control). The naive (negative control) group was treated with sterile saline solution (0.9%) by intrapleural injection. Pleurisy was induced by the intrathoracic injection of 100 μL of a 1% carrageenan solution as previously described by Vinegar et al., 1973. Naive mice received an equal volume (100 μL) of sterile, pyrogen-free saline. After 4 h, the animals were killed with isoflurane (1.5%) and the thoracic cavity was washed with 1 mL of phosphate buffered saline (PBS), and the pleural exudate was collected. The exudate volume was measured, and an aliquot of 20 μL was diluted in

Türk's solution (1:20) and used to determine the total number of leukocytes present in a Neubauer chamber. To verify protein extravasation, a portion of the exudates were centrifuged and the protein concentrations were determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

2.6. Antiproliferative activity

The antiproliferative activities of EOPG and PG-1 were analysed according to the sulforhodamine B method (Monks et al., 1991). The human cell lines U251 (glioma), breast (MCF-7), resistant ovary (NCI/ADR-RES), renal (786-0), lung (NCI-H460), prostate (PCO-3), ovarian 2 (OVCAR-3), colon (HT-29), leukaemia (K-562) and keratinocytes (HaCaT) were obtained from the National Cancer Institute (Frederick, MD, USA) and were grown in 5 mL of RPMI 1640 medium (Gibco-BRL, Life Technologies, USA) supplemented with 5% foetal bovine serum. The cells were placed in 96-well plates (100 μ l of cells/well) and then exposed to different concentrations of EOPG and PG-1 in DMSO (0.25 to 250 μ g/ml) at 37 °C and 5% CO₂ for 48 h. Doxorubicin (0.025 to 25 μ g/mL) was used a positive control.

2.7. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity

The antimycobacterial activity of EOPG and PG-1 was determined using the REMA method (Palomino et al., 2002). *M. tuberculosis* (MTB) H37Rv (ATCC 27294) was grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco/Becton Dickinson) supplemented with OADC enrichment (BBL/Becton Dickinson), and the turbidity was adjusted to a McFarland no. 1 standard. Stock solutions of the samples were diluted in DMSO to obtain final concentrations in a range of 0.98 to 250 μ g/mL. Rifampicin and isoniazid were solubilized according to the manufacturer's recommendations and used as positive

control drugs in the range of 0.004 to 1 µg/mL. The bacterial suspension (5×10^5 CFU/mL) was then added to each in 96-well plate. Plates were incubated for 7 days at 37 °C, after which resazurin was added to test viability. The plates were analysed for colour change and fluorescence with a SPECTRAfluor Plus microfluorimeter (TECAN). Assays were performed in duplicate on separate days. The MIC was defined as the lowest concentration resulting in 90% growth inhibition of *M. tuberculosis*.

2.8 Statistical analyses

The data are expressed as the means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were performed using a one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test, and the differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. The number of animals per group is indicated in the legends. All statistical calculations and graphs were prepared using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results and Discussion

The analysis of EOPG by GC–MS identified 38 compounds, with the sesquiterpene spathulenol being the dominant constituent (80.71%) (Table 1). The remaining constituents were present at concentrations of less than 4.0% (Table 1). Our results showed a different chemical composition than previously reported (Silva et al., 2003) which analysed the essential oil of the *P. guineense* leaves collected from Boa Vista (Roraima State, Brazil) and reported the β -bisabolol (17.40%), limonene (6.82%) and epi- α -bisabolol (6.73%) were the main compounds. Previous research has reported that *P. guineense* essential oil from leaves obtained in the state of Arizona also contained β -bisabolene (13.18%) and α -pinene (12.85%) (Tucker et al., 1995). These variations in the

levels of the compounds may be related to the local environments and conditions to which the assayed plant was exposed. Seasonality, circadian rhythm, temperature and brightness, as well as the stage of development and nutritional factors, are all likely to influence the chemical composition of essential oils (Gobbo-Neto and Lopes, 2007). The specimen analysed in the present study was collected in the Cerrado near Dourados city (state of Mato Grosso do Sul, midwest Brazil), an area characterized by the presence of latosol, with low-activity clay that is poor in nutrients, acids and has high levels of exchangeable aluminium.

Table 1. Identification of constituents of the essential oil obtained from EOPG.

N°	Identify	Retention index (determined)	Retention time	Content (%)
1	α -pinene	932	7.56	0.14
2	Limonene	1024	11.09	0.24
3	1,8-cineole	1026	11.19	1.45
4	β -Ocimene	1032	11.46	0.10
5	E-Tagetone	1039	15.49	0.53
6	γ -Terpineol	1162	16.93	1.91
7	α -Terpineol	1186	18.18	0.12
8	Longicyclene	1366	26.10	0.16
9	α -Ylangene	1373	26.34	0.27
10	Geranyl acetate	1379	26.65	0.15
11	E-Caryophyllene	1417	28.19	0.31
12	Khusimene	1453	29.58	0.19
13	β -Santalene	1457	29.77	0.25
14	Ishwarane	1465	30.09	0.11
15	γ -Gurjugene	1475	30.48	0.23
16	Germacrene D	1484	30.93	0.09

17	α -Zingiberene	1493	31.24	0.67
18	Bicyclogermacrene	1500	31.36	0.08
19	β -Bisabolene	1505	31.78	0.29
20	δ -Cadinene	1522	32.42	0.34
21	Spathulenol	1569	34.25	80.71
22	Pygmacin	1581	34.48	0.22
23	Globulol	1590	34.93	0.33
24	Cedrol	1600	35.27	0.46
25	Hillone	1607	35.63	0.09
26	β -Acorenol	1632	36.50	0.32
27	epi- α -Muurolol	1640	37.00	0.58
28	α -Muurolol	1644	37.16	0.30
29	Selin-11-em-4- α -ol	1658	37.48	0.47
30	epi- β -Bisabolol	1670	38.00	0.37
32	epi- α -Bisabolol	1683	38.50	0.76
33	α -Bisabolol	1685	38.59	1.05
34	2Z,6Z-Farnesol	1698	39.02	1.06
35	2E,6Z-Farnesal	1713	39.61	0.13
36	2Z,6E-Farnesol	1722	39.86	3.65
37	2E,6E Farnesal	1740	40.57	0.21
38	β -Bisabolenol	1789	42.58	0.13

Total identified	98.47
-------------------------	--------------

Monoterpenes	(10)
--------------	------

Oxygenated Monoterpene	(1)
------------------------	-----

Sesquiterpene	(12)
---------------	------

Oxygenated Sesquiterpene	(15)
--------------------------	------

The analysis was performed in triplicate and showed a coefficient of variation of < 2% of the retention times.

The formation of sesquiterpenes begins with the condensation of two pyrophosphate isoprenoids, geranyl pyrophosphate and isopentenyl pyrophosphate (IPP), generating farnesyl pyrophosphate. The predominance of the sesquiterpenic alcohol in the essential oil of *P. guineense* is derived from the cyclization of *trans*-pyrophosphate farnesyl and allo-aromadendrene type skeleton (Fig. 1). Among the proposed intermediaries (Fig. 1), bicyclogermacrene was also found in the *P. guineense* essential oil at concentrations of 0.08%, with a 31.36 min. retention time (Table 1).

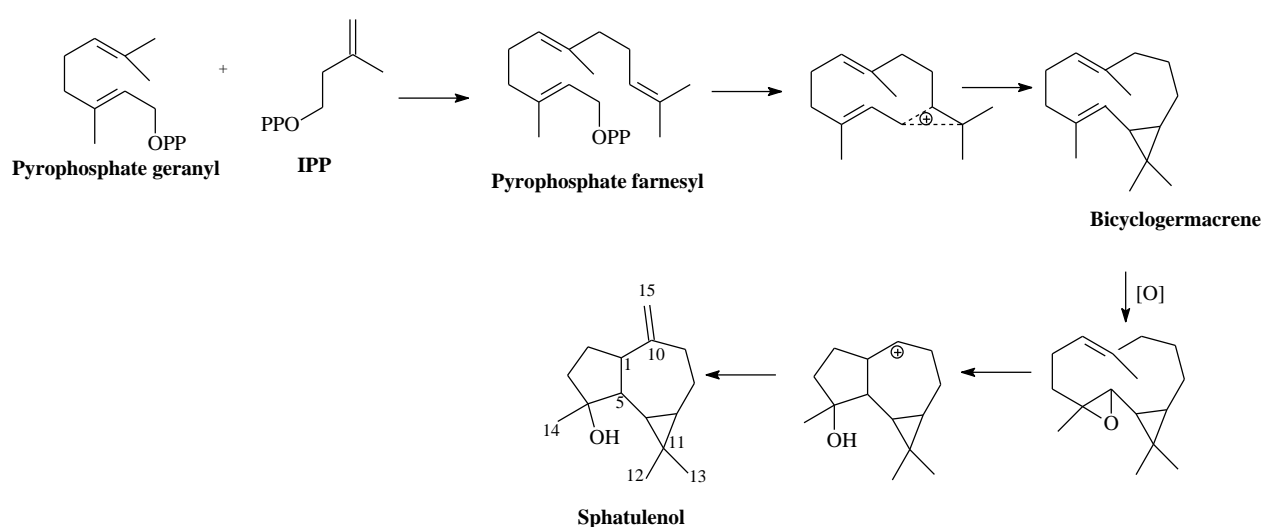


Fig. 1. Proposed biosynthetic route for the sesquiterpenic alcohol spathulenol.

Fractionation of part of the *P. guineense* EOPG resulted in the isolation of a sesquiterpenic alcohol derived from allo-aromadendrene, spathulenol (PG-1). The ^1H and ^{13}C NMR data showed signals for three methyl groups at δ_{H} 1.06 (s, H-12)/ δ_{C} 28.7 (C-12), δ_{H} 1.04 (s, H-13)/ δ_{C} 16.4 (C-13), and δ_{H} 1.29 (s, H-14)/ δ_{C} 26.1 (C-14), with integrations for three protons each, and signals for the exocyclic double bonds were observed at δ_{H} 4.67 (s, H-15a) and δ_{H} 4.69 (s, H-15b) and δ_{C} 106.3 (C-15). A change in the displacement of a methyl group occurs in the presence of the hydroxyl group at C-4. The ^{13}C NMR data were characteristic the skeleton of sesquiterpenic, by the presence of

signals of eleven other carbon atoms, with four signals of the methynic carbon at δ_C 53.4 (C-1), δ_C 54.4 (C-5), δ_C 30.1 (C-6) and δ_C 27.6 (C-7), four methylene at δ_C 26.8 (C-2), δ_C 41.8 (C-3), δ_C 24.9 (C-8) and δ_C 38.9 (C-9), two quaternary at δ_C 81.5 (C-4) and δ_C 20.8 (C-11) and one carbinolic carbon at δ_C 153.5 (C-10). These data were consistent with those described in the literature for spathulenol (Krebs et al., 1990).

Spathulenol, a sesquiterpene reported to be major volatile component of the essential oils of several aromatic Myrtaceae species, including *Eugenia calycina*, *E. uniflora*, *Psidium guajava* and *P. cattleianum* (Costa et al., 2009; Khadhri et al., 2014; Marques et al., 2008; Sousa et al., 2015). Studies of essential oils containing spathulenol as a major compound have reported some biological activities, such as antiproliferative (Bendaoud et al., 2010; Wang et al., 2006), anti-inflammatory (Apel et al., 2010; Dib et al., 2017), and antimicrobial activities (Tan et al., 2016), as well as repellent activity against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Cantrell et al., 2005).

The antioxidant activity of EOPG and PG-1 was determined using a radical scavenging assay and lipoperoxidation, shown in Table 2. The results show that EOPG and PG-1 exhibited significant DPPH free radical activity, with IC_{50} values of 63.08 and 85.60 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which was comparable to an ABTS assay that presented IC_{50} values $\geq 780.13 \mu\text{g/mL}$ (Table 2). In a spontaneous lipoperoxidation rat brain homogenate model, when incubated in controlled temperature and oxygenation conditions, EOPG and PG-1 exhibited the highest activity, with IC_{50} values of 37.91 and 26.13 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were comparable to a commercial antioxidant BHT (38.41 $\mu\text{g/mL}$). Thus, EOPG and PG-1 contributed to a decrease in the generation of MDA, which is a toxic product resulting from the degradation of the cell membrane by lipid peroxidation, causing cell ruptures and mutations (Wang et al., 2014).

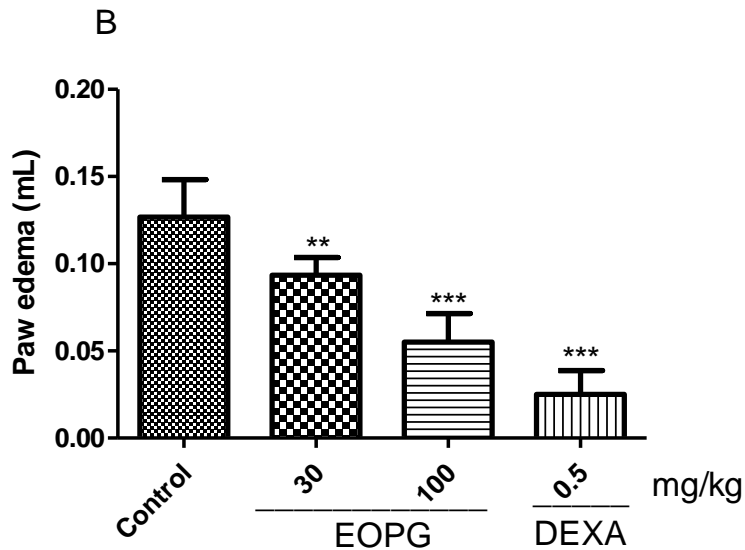
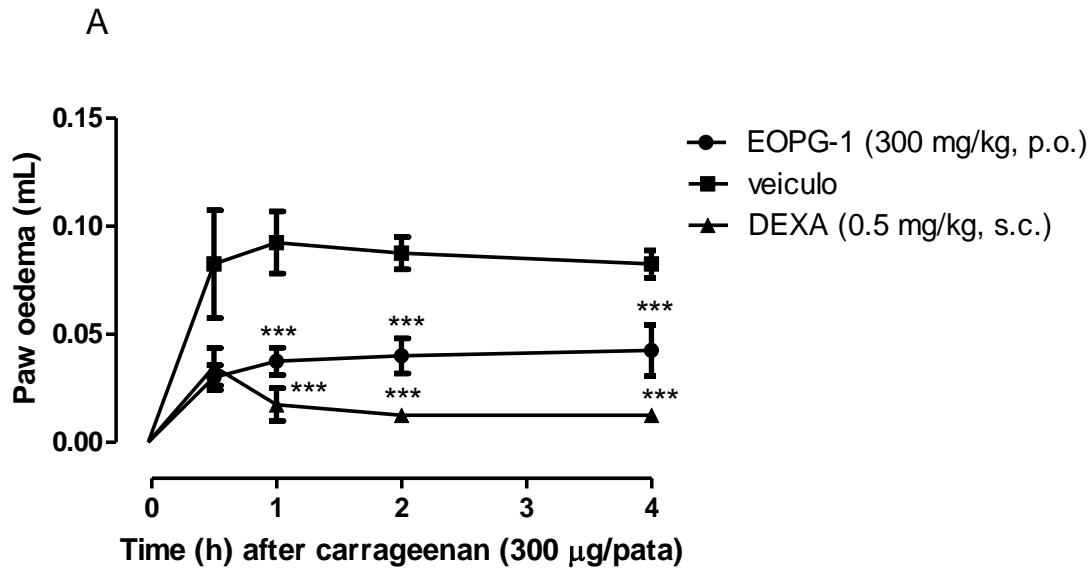
The antioxidant effects observed for EOPG in DPPH and MDA are considered significant when compared to the positive control BHT, a standard antioxidant that effectively inhibits the formation of free radicals and lipid peroxidation (Bajpai et al., 2017), and may be partly the result of the presence of the primary component, spathulenol.

Table 2: The antioxidant effects of EOPG and PG-1 in DPPH, ABTS and MDA assays.

Samples	Radical scavenging		Lipoperoxidation
	DPPH	ABTS	MDA
IC ₅₀ µg/mL (95% confidence limit)			
EOPG	63.08 (65.92 - 60.74)	780.13 (767.45 - 792.77)	37.91 (36.23 - 40.50)
PG-1	85.60 (88.43 - 89.38)	639.25 (622.33 - 644.68)	26.13 (24.30 - 28.68)
BHT	16.7 (14.15 - 18.80)	97.60 (95.50 - 99.40)	38.41 (36.51 - 41.22)

Values are expressed as the mean ($n = 3$); IC₅₀ = concentration resulting in 50% inhibition, derived from the graph of I% (inhibition percentage) *versus* concentration in µg/mL

The anti-inflammatory effect of EOPG was evaluated through the carrageenan-induced mice paw oedema and pleurisy model. The injection of carrageenan in the paw induced oedema that started at 30 min and peaked at 1 h. In the first hour, the oral treatment with EOPG (300 mg/kg) significantly inhibited oedema formation compared to the control group, and this reduction continued after the second and fourth hour of observation (Fig. 2A), with inhibitions of the $59.46 \pm 3\%$, $51.03 \pm 5\%$ and $48.48 \pm 2\%$, respectively. The positive control (DEXA) showed a significant reduction at all time points, with same inhibition of $84.84 \pm 5\%$ after 2 h and 4 h. When EOPG was evaluated in low doses (30 and 100 mg/kg) to assess its performance, the inhibition was maintained only at a dose of 100 mg/kg, with a maximal inhibition of $56.50 \pm 6\%$ (Fig. 2B) 4 h after of carrageenan administration but did not occur in a dose dependent manner.



4 h after carrageenan injection (300 µg/paw)

Fig. 2. Effect of oral administration of EOPG on carrageenan-induced paw oedema in male *Swiss* mice (n=6). Animals received EOPG (30, 100 or 300 mg/kg, p.o.) or control (vehicle) or dexamethasone (DEXA, 0.5 mg/kg, s.c.) and after 1 h an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw). Panels (A) represent the evaluation of EOPG (300 mg/kg) and DEX (0.5 mg/kg) on paw oedema at 0.5, 1, 2, 3 and 4 h after carrageenan injection. In (B), bars show the effect of different doses of EOPG (30 and 100 mg/kg) and DEXA (0.5 mg/kg) on paw oedema (mL) 4 h after the carrageenan injection. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals/ group. ** P < 0.01, *** P < 0.001 when compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

To investigate whether EOPG induced anti-inflammatory effects in another model of experimental inflammation, EOPG and PG-1 (spathulenol) were tested in a pleurisy model that induces inhibition of inflammatory parameters such as leukocyte migration and protein extravasation. The results were expressed as leukocytes counts and plasma leakage in mg of protein/mL (Fig. 3). Administration of carrageenan to the pleural cavity of the animals induced an increase in total leukocyte numbers (Fig. 3A), and an increase in protein extravasation (Fig. 3B) 4 h after injection. EOPG (30 and 100 mg/kg) and PG-1 (100 mg/kg) given by the v.o. route, significantly reduced the increase in total leukocytes (inhibition of $45.33 \pm 3\%$, $77.70 \pm 5\%$ and $75.20 \pm 1\%$, respectively) (Fig. 3A) and reduced the rise in protein levels (inhibition of $49.72 \pm 7\%$, $78.40 \pm 4\%$ and $82.00 \pm 2\%$ respectively) induced by carrageenan in the pleural cavity. For the positive control, a reduced increase in total leukocytes and in protein levels was observed ($83.00 \pm 0.8\%$ and $93.20 \pm 1\%$, respectively).

Species of this genus have been reported to have pharmacological effects on inflammatory states, and extracts of *P. friedrichsthalianum* have been investigated for effects against chronic obstructive pulmonary disease, interleukin-8 (IL-8) and inhibition of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression before and after treatment with cigarette smoke (Flores et al., 2013), *P. acutangulum* inhibited the secretion of the pro-inflammatory cytokines, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and NO (Houël et al., 2015), and the essential oil from *P. guajava* leaves may be useful to treat inflammatory diseases by mechanisms that include the inhibition of eosinophil migration (Siani et al., 2013).

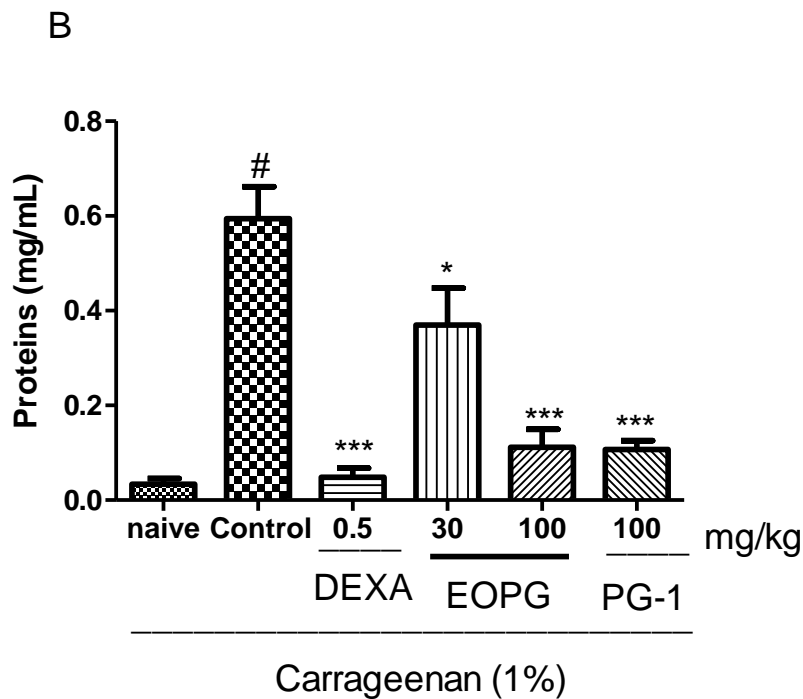
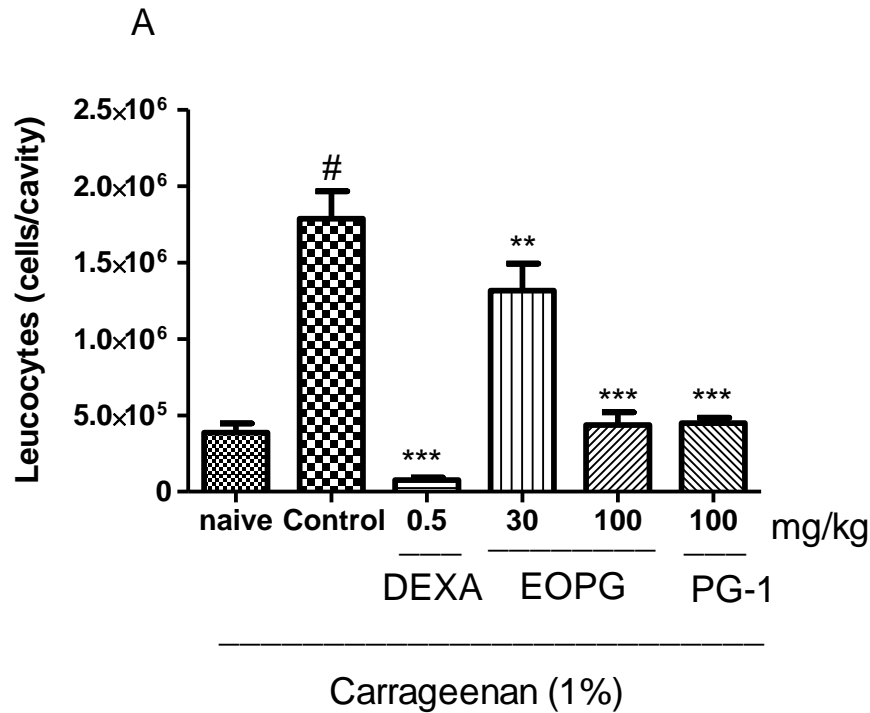


Fig. 3. Effects of EOPG and PG-1 on total leukocytes (A) and protein extravasations (B) induced by carrageenan in the pleural cavity of mice. Animals received an oral treatment EOPG (30 or 100 mg/kg), PG-1 (100 mg/kg) DEXA (0.5 mg/kg; s.c.), naive and control received only the vehicles. After 1 h, they received an intrapleural injection of Cg or saline solution (100 μ l of a 1% solution/cavity). The bars represent the mean \pm SEM of 6 animals. The # symbol indicates the significant differences between naive and control group ($P < 0.001$), while the * symbol compares the treated group in relation to the control

group: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keul.

EOPG showed an antiproliferative activity against most cell lines compared to PG-1 (spathulenol), the main constituent of the essential oil, with a GI_{50} less than 9.84 $\mu\text{g/mL}$ towards all cell lines, and it displayed significant activity against OVCAR-3 ($GI_{50} = 0.89 \mu\text{g/mL}$, TGI = 49.30 $\mu\text{g/mL}$). The moderate activity against the OVCAR-3 cell line was also observed for spathulenol ($GI_{50} = 49.30 \mu\text{g/mL}$), which did not demonstrate cytostatic activity. The activity of EOPG can be the result of synergistic effects associated with other compounds present, such as α -bisabolol, a sesquiterpene alcohol, which are reported in the literature to have a potential antiproliferative activity capable of inducing apoptosis in pancreatic cancer cells (Uno et al., 2016); 1,8-cineole has also been previously shown to have antiproliferative activity on liver cells (Rodenak et al., 2014). The essential oil of *P. guajava* was active against human mouth epidermal carcinoma (Manosroi et al., 2006). Fruit extracts of *P. cattleianum* reduced the proliferation of breast tumour and colon cells (Medina et al., 2011).

Ovarian cancer is common type of cancer in women and usually has a poor prognosis with regards to long-term treatment (Jemal et al., 2009). Thus, the discovery of alternative therapies against this type of tumour represents is a priority for science (Kwiecińska et al., 2012).

Table 3. GI₅₀ values (µg/mL); TGI and LC₅₀ (values in parentheses) in µg/mL for EOPG, spathulenol and doxorubicin (DOX) in ten tumour cell lines.

	Cancer Cell Lines									
	GI ₅₀ values (µg/mL)									
	U251	MCF-7	NCI/ADR-RES	786-0	NCI-H460	PCO-3	OVCAR-3	HT-29	K-562	HaCaT
EOPG	9.84	7.90	9.25	2.57	4.57	9.18	0.89	5.62	5.03	7.98
PG-1	>100.00	83.69	>100.00	-	>100.00	>100.00	49.30	>100.00	>100.00	61.27
DOX	0.02	0.01	0.20	0.04	0.01	0.18	0.02	0.09	0.03	0.01
	TGI and LC ₅₀ (values in parentheses) in µg/mL									
EOPG	45.22 (99.62)	44.50 (>100)	46.09 (>100)	28.70 (>100)	30.75 (94.03)	37.55 (>100.00)	16.29 (>100.00)	29.07 (>100.00)	31.37 (>100.00)	42.82 (>100.00)
PG-1	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	>100.00 (>100.00)
DOX	0.15 (-)	1.22 (1.40)	- (-)	0.28 (13.45)	0.38 (21.97)	0.70 (14.53)	0.78 (-)	2.56 (-)	- (-)	0.29 (1.20)

GI₅₀: (growth inhibitory activity) the drug concentration that reduces cellular growth by 50%; TGI: the drug concentration required for total growth inhibition; LC₅₀: the drug concentration required for killing 50% of cells; (-): not presented.

The antimycobacterial evaluation of EOPG and PG-1 against to *M. tuberculosis* (MTB) showed MIC values of 126.4 µg/mL and 231.9 µg/mL, respectively. This result suggests moderate activity, since several authors consider MIC values of plant samples less than 200 µg/mL as being active against MTB. Our results may thus contribute to the development and evolution of research, such as future *in vivo* tests with animal models and clinical trials (Chimponda and Mukanganyama 2010; Negi et al., 2010). The antimycobacterial activity evaluation using nanoparticles of *P. guajava* of an extract from leaves collected in the municipality of the Nanded district of Maharashtra India also showed activity against MTB (Kote et al., 2014).

4. Conclusions

The essential oil of the *P. guineense* leaves collected in Dourados-MS has potential antioxidant, antiproliferative and antimycobacterial activities. In addition, the observed anti-inflammatory and anti-oedematogenic activity in mice provides credence to the traditional use of this plant for the treatment of inflammatory processes and suggests that spathulenol is responsible in part for the therapeutic effects found in this study; however, other studies should be conducted to evaluate the mechanisms of action. The preliminary results of the antiproliferative potential against of ovarian (OVCAR-3) cell line showed by EOPG could be promising for the development of new cancer treatments, but future studies using *in vivo* experimental models are needed.

Author contributions

MCV participated in the collection of plant material; KFN and ASNF designed the study, performed the extraction of essential oil, isolation/structure elucidation of the compound and the antioxidant assays, CALC conducted identification composition

chemistry; CALK and JAS performed the anti-inflammatory assays. MAF, ALTGR and JEC assisted with the antiproliferative assay. FMFM and JHRC designer antimycobacterial activity. All authors participated in the design, interpretation, and analysis of the data and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

No competing financial interests exist.

Acknowledgements

The authors are grateful to FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, Brazil, 59/300.029/2015), Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), and UFGD (Universidade Federal da Grande Dourados) for financial support and fellowships.

References

- Adams, R.P., 2005. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spect.* 16, 1902-1903.
- Apel, M.A., Lima, M.E., Sobral, M., Young, M.C., Cordeiro, I., Schapoval, E.E., Henriques, A.T., Moreno, P.R., 2010. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. *Pharm. Biol.* 48, 433-438.
- Bajpai, V.K., Baek, K.H., Kang, S.C., 2017. Antioxidant and free radical scavenging activities of taxoquinone, a diterpenoid isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. *South African J. Botany* 111, 93-98.
- Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J.P., Cazaux, S., Bouajila, J., 2010. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *J. Food Sci.* 75, 466-472.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burits, M., Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Res.* 14, 323-328.
- Cantrell, C.L., Klun, J.A., Bryson, C.T., Kobaisy, M., Duke, S.O., 2005. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. *J. Agr. Food Chem.* 53, 5948-5953.
- Chimponda, T., Mukanganyama, S., 2010. Antimycobacterial activities of selected medicinal plants from Zimbabwe against *Mycobacterium aurum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Trop. Biomed.* 27, 595-610.
- Costa, D.P., Santos, S.C., Seraphin, J.C., Ferri, P.H., 2009. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *J. Brazil. Chem. Soc.* 20, 1287-1293.
- da Silva, J.D., Luz, A.I.R., da Silva, M.H., Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B., Maia, J.G.S., 2013. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. *Flavour Frag. J.* 18, 240-243.
- Damiani, C., Silva, F.A.D., Asquieri, E.R., Lage, M.E., Vilas Boas, E.V.d.B., 2012. Antioxidant potential of *Psidium guinnensis* Sw. jam during storage. *Pesqui. Agropecu. Trop.* 42, 90-98.
- de Araújo, L.C.A., Rios, N.L., Boleti, A.P.A., dos Santos, E.L., 2016. 196 - Profile of Antioxidant Activity of Fruits of the Savana Brazilian. *Free Radical Bio. Med.* 100, Supplement, S95.
- Dib, I., Fauconnier, M.L., Sindic, M., Belmekki, F., Assaidi, A., Berrabah, M., Mekhfi, H., Aziz, M., Legssyer, A., Bnouham, M., Ziyyat, A., 2017. Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. *BMC Comp. Alt. Med.* 17, 1-15.
- Fernandes, T.G., de Mesquita, A.R.C., Randau, K.P., Franchitti, A.A., Ximenes, E., Azevedo, I., 2012. In Vitro Synergistic Effect of *Psidium guineense* (Swartz) in Combination with Antimicrobial Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Sci. World J.* 2012, 7.
- Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.-B., Whalen, K., Dabo, A.J., Reynertson, K.A., Foronjy, R.F., D'Armiento, J.M., Kennelly, E.J., 2013. Phenolic-rich extract from

- the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chem.* 141, 889-895.
- Franzon, R.C.C., L.Z.O.; Proença, C.E.B.; Sousa-Silva, J.C., 2009. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Embrapa Cerrados, Brasília, pp. 1-48.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30, 374-381.
- Gordon, A., Jungfer, E., da Silva, B.A., Maia, J.G., Marx, F., 2011. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. *J. Ag. Food Chem.* 59, 7688-7699.
- Henriques, M.G., Weg, V.B., Martins, M.A., Silva, P.M., Fernandes, P.D., Cordeiro, R.S., Vargaftig, B.B., 1990. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *British J. Pharm.* 99, 164-168.
- Houël, E., Fleury, M., Odonne, G., Nardella, F., Bourdy, G., Vonthron-Sénécheau, C., Villa, P., Obrecht, A., Eparvier, V., Deharo, E., Stien, D., 2015. Antiplasmodial and anti-inflammatory effects of an antimalarial remedy from the Wayana Amerindians, French Guiana: Takamalaimë (*Psidium acutangulum* Mart. ex DC., Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 166, 279-285.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J., 2009. Cancer statistics. *CA: A Cancer J. Clin.* 59, 225-249.
- Khadhri, A., El Mokni, R., Almeida, C., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M., 2014. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Ind. Crop. Prod.* 52, 29-31.
- Kote, J.R., Ramjan, M.M., Ambadas, S.K., Bhimrao, M.S., 2014. Anti-mycobacterial activity of nanoparticles from *Psidium guajava* L. *J. Microbiol. Biotechn. Res.* 4, 14-17.
- Krebs, H.C., Rakotoarimanga, J.V., Habermehl, G.G., 1990. Isolation of spatulenol and (-)-caryophyllene oxide from *Vernonia mollissima* don and ¹H and ¹³C reassignment by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 28, 124-128.
- Kwiecińska, P., Taubøll, E., Gregoraszczyk, E.Ł., 2012. Effects of valproic acid and levetiracetam on viability and cell cycle regulatory genes expression in the OVCAR-3 cell line. *Pharm. Rep.* 64, 157-165.
- Manica, I., 2000. Frutas nativas, silvestres e exóticas 1: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biriba, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba. Cinco Continentes, Porto Alegre.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., Manosroi, A., 2006. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.* 235, 114-120.
- Marques, A.F., Wendler, E.P., Sales Maia, B.H., 2008. Volatile Oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Forest. *J. Essen. Oil Res.* 20, 519-521.
- Medina, A.L., Haas, L.I.R., Chaves, F.C., Salvador, M., Zambiasi, R.C., da Silva, W.P., Nora, L., Rombaldi, C.V., 2011. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chem.* 128, 916-922.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., et al., 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* 83, 757-766.

- Negi, A.S., Kumar, J.K., Luqman, S., Saikia, D., Khanuja, S.P., 2010. Antitubercular potential of plants: a brief account of some important molecules. *Med. Res. Rev.* 30, 603-645.
- Neira González, A.M., Neira González, M.B., Pinto, N.L.S., 2005. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. *Rev. Cub. Plan. Med.* 10, 0-0.
- Palomino, J.C., Martín, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F., 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Ch.* 46, 2720-2722.
- Peralta-Bohórquez, A.F., Parada, F., Quijano, C.E., Pino, J.A., 2010. Analysis of Volatile Compounds of Sour Guava (*Psidium guineense* Swartz) Fruit. *J. Ess. Oil Res.* 22, 493-498.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Bio. Med.* 26, 1231-1237.
- Rivero-Maldonado, G., Pacheco, D., Martín, L.M., Sánchez-Urdaneta, A., Quirós, M., Ortega, J., Colmenares, C., Bracho, B., 2013. Flavonoids extracted from *Psidium species* (MYRTACEAE) in Venezuela. *Rev. Fac. Agr.* 30, 217-241.
- Rodenak, K. B., Polo, M., Montero, V. S., Galle, M., Crespo, R., García, B.M., 2014. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines. *Chem.-Bio. Int.* 214, 57-68.
- Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.A., 2001. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Editora UFLA, 1-180.
- Siani, A.C., Souza, M.C., Henriques, M.G., Ramos, M.F., 2013. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. *Pharm. Bio.* 51, 881-887
- Sousa, R.M.F., de Moraes, S.A.L., Vieira, R.B.K., Napolitano, D.R., Guzman, V.B., Moraes, T.S., Cunha, L.C.S., Martins, C.H.G., Chang, R., de Aquino, F.J.T., do Nascimento, E.A., de Oliveira, A., 2015. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. *Ind. Crop. Prod.* 65, 71-78.
- Stocks, J., Gutteridge, J.M.C., Sharp, R.J., Dormandy, T.L., 1974. Assay Using Brain Homogenate for Measuring the Antioxidant Activity of Biological Fluids. *Clin. Sci.* 47, 215-222.
- Tan, N., Satana, D., Sen, B., Tan, E., Altan, H.B., Demirci, B., Uzun, M., 2016. Antimycobacterial and Antifungal Activities of Selected Four *Salvia* Species. *Rec. Nat. Prod.* 10, 593-603.
- Tucker, A.O., Maciarello, M.J., Landrum, L.R., 1995. Volatile Leaf Oils of American Myrtaceae. III. *Psidium cattleianum* Sabine, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu, *P. guajava* L., *P. guineense* Sw., and *P. sartorianum* (Berg) Niedenzu. *J. Ess. Oil Res.* 7, 187-190.
- Uno, M., Kokuryo, T., Yokoyama, Y., Senga, T., Nagino, M., 2016. alpha-Bisabolol Inhibits Invasiveness and Motility in Pancreatic Cancer Through KISS1R Activation. *Anticancer Res.* 36(2), 583-589.
- Vieira, T.I., Gondim, B.L.C., Santiago, B.M., Valença, A.M.G., 2012. Atividade antibacteriana e antiaderente in vitro dos extratos das folhas de *Psidium guineense* Sw. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre microrganismos orais. *RGO – Rev. Gaúcha Od.* 60, 359-365.

- Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., 1973. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Soc. Exp. Bio. Med. (New York, N.Y.)* 143, 711-714.
- Wang, P., Kong, C.H., Zhang, C.X., 2006. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L. *Molecules (Basel, Switzerland)* 11, 549-555.
- Wang, P., Xie, K., Wang, C., Bi, J., 2014. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Eur. Neurol.* 72, 249-254.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o óleo essencial obtido das folhas de *P. guineense* (OEPG) coletadas no município de Dourados-MS apresenta composição majoritária do sesquiterpeno oxigenado espatulenol (PG-1) (80,71%). OEPG e PG-1 apresentaram atividade antioxidante por ensaios de avaliação *in vitro* (DPPH, ABTS e MDA), quando comparados ao composto antioxidante comercial BHT. OEPG apresentou atividade antiproliferativa frente à células tumorais de ovário e atividade antimicobacteriana frente à cepas de *M. tuberculosis*, entretanto, tais atividades não foram observadas no composto PG-1, acredita-se que tais atividades relatadas podem ser atribuídas ao sinergismo entre os demais compostos presentes no OEPG. Na avaliação da atividade anti-inflamatória pelos ensaios de edema de pata e pleurisia induzida por carragenina em camundongos, quando comparadas com o fármaco anti-inflamatório dexametasona, OEPG e PG-1 apresentaram inibição do processo inflamatório.

Levando em consideração o uso popular de *P. guineense* para tratamento de inflamação, os resultados observados nesse trabalho podem contribuir para comprovação etnofarmacológica, uma vez que a composição do OEPG pode ser a base química para explicar seus usos etnobotânicos.

ANEXO I – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Uso animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
 PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 29 de março de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Estudo fitoquímico e farmacológico do óleo essencial, extrato e compostos isolados de Psidium guineense Swartz (Myrtaceae)”**, registrada sob o protocolo de nº 27/2015, sob a responsabilidade de Anelise Samara Nazari Formagio e Kamilla Felipe do Nascimento– que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 30/11/2015.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/04/2016 a 20/01/2017
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus/Wistar e Mus musculus/Swiss
Nº de animais	65 / 48

Peso/idade	200-300 g/ 2-3 meses
Sexo	Ratos 51 Machos e 14 Fêmeas/Swiss 48 Machos
Origem	Biotério da FCS/UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.

Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br