

COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS FRUTOS DE  
PIMENTA ROSA (*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI -  
ANACARDIACEAE) ASSOCIADOS À ATIVIDADE  
CARDIOVASCULAR, ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE.

**LORENA DE LIMA GLÓRIA DAS VIRGENS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2018

COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS FRUTOS DE  
PIMENTA ROSA (*SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI –  
ANACARDIACEAE) ASSOCIADOS À ATIVIDADE  
CARDIOVASCULAR, ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE

**LORENA DE LIMA GLÓRIA DAS VIRGENS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutorado em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof. Dr. Daniela Barros de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

014/2018

V816 Virgens, Lorena de Lima Glória das.

Compostos fenólicos presentes nos frutos de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae) associados à atividade cardiovascular, antimicrobiana e antioxidante / Lorena de Lima Glória das Virgens. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

132 f. : il.

Bibliografia: f. 90 – 96.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientadora: Daniela Barros de Oliveira.

1. Naringenina. 2. Ácido Gálico. 3. Amenoflavona. 4. Pressão Arterial. 5. *Candida* ssp. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD 635.643

Compostos fenólicos presentes nos frutos de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae) associados à atividade cardiovascular, antimicrobiana e antioxidante

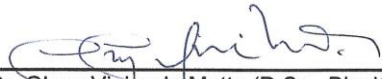
**LORENA DE LIMA GLÓRIA DAS VIRGENS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutorado em Produção Vegetal


Aprovada em 23 de fevereiro de 2018

Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Lanamar de Almeida Carlos (D.Sc., Produção Vegetal)  
UFSJ-MG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Olney-Vieira da Motta (D.Sc., Biotecnologia e Biotecnologia)  
UENF-RJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Luana Pereira de Moraes (D.Sc., Engenharia de Alimentos)  
UENF-RJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira (D.Sc., Química de Produtos Naturais)  
UENF-RJ (Orientadora)

*Aos meus pais, Tadeu e  
Penha e meu marido, Tiago.*

*Sem sonhos, a vida não tem brilho.*

*Sem metas, os sonhos não têm alicerces.*

*Sem prioridades os sonhos não se tornam reais.*

*“Tudo posso Naquele que me fortalece” (Filipenses 4.13)*

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, que é meu escudo e fortaleza. Agradeço por ter sempre iluminado e guiado meus caminhos, sendo meu abrigo nas tempestades e criando saídas onde parecia não haver escapatórias. Agradeço também à minha mãezinha, Nossa Senhora da Natividade, que nunca me abandona e sempre intercede por mim junto ao Teu Filho Jesus Cristo.

Agradeço aos meus pais, Tadeu e Penha, que sempre me incentivaram a realizar esse sonho e me fortaleceram nos momentos de aflição. Vocês me fizeram acreditar que sou capaz e se hoje estou me tornando Doutora é por vocês!

Ao meu marido, Tiago, que é minha fortaleza nos momentos mais difíceis e meu maior incentivador. Agradeço principalmente por sua paciência e amor que me davam forças para não desistir de lutar. Ter você ao meu lado tornou as coisas mais leves e fáceis para mim. Parte desse trabalho é seu também, amo você!

Aos meus irmãos, Pablo e Lara, que mesmo distantes, nunca se fizeram ausentes. Muito obrigada pelo amor de vocês dois, por me proporcionarem prazerosos momentos de descontração e por acreditarem em mim.

Aos meus cunhados, Letícia e Júnior, que além de todo incentivo, me deram duas princesas lindas que eu amo de paixão, e que me ajudavam a aliviar a tensão com apenas um sorriso. Lis e Isabella, a titia ama demais vocês.

Agradeço também aos meus sogros, Ademir e Maria Luiza, que sempre me apoiaram em tudo.

Agradeço à minha orientadora, Professora Daniela Barros de Oliveira, que ao longo desses anos passou a ser muito mais que uma mentora, tornando-se amiga, incentivadora e confidente. Agradeço por toda sua confiança, dedicação, companheirismo, ensinamento, paciência e amizade. Muito obrigada por tudo!

Um agradecimento todo especial à Silvitcha, que fez a distância do “colinho de mãe” ser diminuída com todo seu carinho, conselhos, amizade, companheirismo, orações, incentivo, preocupação e dedicação. Você é uma pessoa iluminada. Como irei sentir sua falta!

Agradeço à Professora Lanamar de Almeida Carlos, Olney Vieira da Motta e Luana Pereira de Almeida, por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho. Tenho certeza de que suas considerações serão muito valiosas.

Agradeço à professora, Fernanda Antunes e ao professor Olney Vieira da Motta, que abriram as portas de seus laboratórios, possibilitando a realização de toda parte biológica desse trabalho. Muito obrigada pela confiança, ideias, disponibilidade e competência. Todos os ensinamentos foram fundamentais para o desfecho dessa tese.

Agradeço, também, à Professora Solange Silva Samarão que, mais uma vez, a vida possibilitou que nos encontrássemos. Obrigada por todo seu ensinamento, experiência, paciência, pelas conversas e conselhos. Levo você sempre no coração.

A todas as amigas queridas do laboratório 106: Natalia, Larissa, Clara, Nathânia, Mariana, Larissa, Jamilla, Amanda e Yasmin, que são mais que parceiras de trabalho, tornando-se confidentes e cúmplices, quase irmãs. Vocês tornaram essa caminhada bem mais branda. Obrigada por toda ajuda, paciência, risadas e amizade. Vocês são mais que especiais para mim!

Agradeço também aos amigos Érica, Lázaro, Lara, Andreza, Juliana, Dani, Almir, Camilla, Noemi, Graziella, Karoline, Guilherme, Camila, Simone, João e Raphael, pela ajuda nos experimentos, companheirismo e momentos de distração. Nossos almoços no RU ficarão para sempre na memória. Agradeço também à minha amiga da Upa-Campos Sintilla, com ela compartilhei boa parte dos tormentos e alegrias desse trabalho.

Aos técnicos da UENF Aninha, Valdinéia, Paulo e Ritinha, sempre tão dispostos a ajudar. Agradeço ainda às meninas da limpeza.

A todos que moraram comigo em Campos: Marlon, Kamilla, Monique, Rafaela, Lidiane e Joyce, que foram como irmãos para mim, obrigada por cada momento que dividimos.

À UENF que me permitiu desenvolver aqui esse trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram, cada um do seu modo, de maneira direta ou indireta, a conquistar esta vitória. Meu muito obrigada!



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES .....	viii
APRESENTAÇÃO .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 – Objetivo geral .....	4
2.2 – Objetivos específicos .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	6
3.1 – Espécies medicinais .....	6
3.2 – Moléculas fenólicas .....	8
3.2.1 - Métodos de extração de substâncias fenólicas .....	9
3.3 – Flavonoides .....	10
3.3.1 – Propriedades químicas e classificação .....	11
3.3.2 – Biossíntese .....	14
3.3.3 – Atividades biológicas .....	15
3.4 – Radicais livres e antioxidantes .....	16
3.5 – Atividade cardiovascular .....	17
3.6 – Atividade antimicrobiana .....	18
3.6.1 – Fungos do gênero <i>Candida</i> spp. ....	19
3.7 – Material vegetal .....	20
3.7.1 – Descrição botânica .....	21
3.7.2 – Propriedades químicas .....	22
3.7.3 – Propriedades biológicas .....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
5. TRABALHOS .....	34
5.1 – Phenolic Compounds Present <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi Influence the Lowering of Blood Pressure in Rats .....	34

5.2 – Identification of the chemical substance responsible to the antifungal action of <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi .....	60
6. RESUMO E CONCLUSÕES .....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
APÊNDICE A .....	97
APÊNDICE B .....	103
APÊNDICE C .....	109

## LISTA DE ABREVIações

AA	Atividade Antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butil Hidroxi Anisol
BHT	Butil Hidroxi Tolueno
CCD	Cromatografia em camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetil Sufóxido Deuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
EM	Espectrometria de Massas
McF	McFarland
MH	Muller Highton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
RL	Radicais Livres
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-18	Cromatografia em fase inversa com dezoito átomos de carbono
RP-2	Cromatografia em fase inversa com dois átomos de carbono

Tr	Tempo de Retenção
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

## APRESENTAÇÃO

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como pimenta rosa ou aroeira, é uma espécie nativa da flora brasileira e faz parte da diversidade da região de Campos dos Goytacazes (Carvalho et al., 2006). Essa fonte vegetal vem sendo trabalhada por nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA-CCTA-UENF) desde 2007 e, a partir daí, alguns avanços vem contribuindo para o seu conhecimento químico e biológico.

Foram quatro projetos aprovados por Órgãos de Fomento Brasileiro; quatro artigos publicados em revistas indexadas pela CAPES (Glória et al., 2014; Bernardes et al., 2014; Bernardes et al., 2012a; Bernardes et al., 2012b); duas premiações em eventos estudantis (Primeiro lugar (doutorado) na categoria oral, no II Congresso Fluminense de Pós-Graduação da UENF em 2017 e Menção Honrosa na XXIV Reunião Anual da FESBE (Federação de Sociedades de Biologia Experimental) em 2009; além de mais de 15 participações em eventos nacionais e internacionais.

A presente tese foi dividida em resumo, introdução, revisão bibliográfica, materiais e métodos, trabalhos e conclusão. Todos esses tópicos se basearam em dois artigos que são apresentados no item 5.1) *Phenolic compounds present Schinus terebinthifolius Raddi influence the lowering of blood pressure in rats* (artigo já publicado na revista *Molecules*), e no item 5.2) *Identification of the chemical substance responsible to the antifungal action of Schinus*

*terebinthifolius Raddi* (artigo a ser submetido na revista *Journal of Ethnopharmacology*).

No primeiro trabalho (1), foram identificadas duas substâncias majoritárias presentes na fração G5 dos frutos de *S. terebinthifolius*: ácido gálico e naringenina (primeiro relato dessa flavanona na espécie). Um alto teor de fenólicos totais (659,21 mg de ácido gálico equivalente/g de amostra – método de Folin Ciocalteau), de flavonoides totais (140,69 mg de rutina equivalente/g de amostra – método do cloreto de alumínio) e alta atividade antioxidante (77,47% - método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil – DPPH) foi observada na fração G5 de pimenta rosa. A atividade anti-hipertensiva relacionada às suas substâncias fenólicas também foi investigada, e as mesmas reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) as pressões arteriais sistólica, mediana e diastólica dos indivíduos. O teste do Rotarod foi realizado para determinar um possível mecanismo de ação do efeito vasorelaxante da amostra, confirmando que a atividade cardiovascular exercida pelos frutos de *S. terebinthifolius* está relacionada às substâncias fenólicas presentes na espécie, que são potentes antioxidantes e inibem o estresse oxidativo, principalmente no Sistema Nervoso Central.

No segundo trabalho (2), a substância isolada foi identificada como o biflavona amentoflavona. Foi realizada a atividade antimicrobiana dessa substância pelo método de microdiluição em meio líquido frente a oito cepas de bactérias e seis cepas de fungos. A amentoflavona foi eficaz na inibição do crescimento dos fungos *Candida kefyr* (81,4 UFC) e *Candida parapsilosis* (152,6 UFC), e essa substância apresentou efeito de sinergismo quando associada à sete antifúngicos comerciais, provocando aumento no halo de inibição em todas as situações. A amentoflavona possui também efeito antioxidante (57,61 % - método do DPPH), inibindo assim o estresse oxidativo, e auxiliando a inibição do crescimento dos fungos, o que torna essa substância uma boa alternativa para tratamento de infecções, diante do crescente aumento de resistência antifúngica.

## RESUMO

GLÓRIA-DAS-VIRGENS, L. L. D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2018. Compostos fenólicos presentes nos frutos de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae) associados à atividade cardiovascular, antimicrobiana e antioxidante. Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) em colaboração com o Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal (LCCA) e o Laboratório de Sanidade Animal (LSA), todos pertencentes ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), e com o Laboratório de Ciências Químicas (LCQ) localizado no Centro de Ciência e Tecnologia (CCT), na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ. Os objetivos do mesmo foram: avaliar o perfil químico e identificar os principais compostos fenólicos presentes nos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e relacioná-los às atividades biológicas: avaliar a atividade antioxidante; avaliar a capacidade de abaixamento da pressão arterial *in vivo* e sugerir um possível mecanismo de ação para a atividade anti-hipertensiva e avaliar o perfil de susceptibilidade antibiótica e antifúngica, além de investigar o efeito de sinergismo quando associado a antifúngicos sintéticos. O fracionamento do extrato metanólico dos frutos *S. terebinthifolius* ocorreu por partição líquido-líquido, seguido do isolamento dos compostos ativos por

Cromatografia em Coluna Aberta. Os perfis químicos dos compostos foram verificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e as estruturas químicas elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia de Massas (EM). A atividade cardiovascular foi determinada por infusão intravenosa dos compostos ativos em ratos Wistar e o mecanismo de ação sugerido pelo teste do Rotarod. A atividade antimicrobiana foi determinada pela inibição do crescimento dos microrganismos em meio líquido, seguido do teste de antifungigrama. Essa tese foi dividida em dois trabalhos. No primeiro trabalho (a), foram identificados dois compostos majoritários presentes na fração G5 dos frutos de *S. terebinthifolius*: ácido gálico e naringinina (primeiro relato dessa flavanona na espécie). As moléculas fenólicas reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) as pressões arteriais sistólica, mediana e diastólica dos indivíduos testados, devido à sua capacidade em reduzir o estresse oxidativo através do seu alto teor de atividade antioxidante (77,47 %) e o possível mecanismo de ação do efeito vasorelaxante se deu principalmente no Sistema Nervoso Central. No segundo trabalho (b) a molécula isolada foi identificada como a biflavona amentoflavona, e essa foi eficaz na inibição do crescimento dos fungos *Candida kefyr* (81,4 UFC) e *Candida parapsilosis* (152,6 UFC), além de apresentar efeito sinérgico quando associada a todos os antifúngicos avaliados, devido também ao seu efeito antioxidante (57,61 %) capaz de auxiliar o estresse oxidativo no metabolismo dos microrganismos, assim inibindo seu crescimento. A inibição do estresse oxidativo pode provocar inibição da peroxidação lipídica e atividades enzimáticas, inibição da agregação plaquetária e oxidação do colesterol LDL, o que promove vasodilatação, além de resultar em prejuízos no metabolismo de microrganismos como injúria tecidual. Desta forma, este trabalho permitiu concluir que o poder antioxidante encontrado nos compostos fenólicos identificados favoreceu à atividade cardiovascular e antifúngica dos frutos de *S. terebinthifolius*, comprovando que essa espécie é uma promissora fonte natural para ação e prevenção frente a diversas doenças.



## ABSTRACT

GLÓRIA-DAS-VIRGENS, L. L. D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, february 2018. Phenolic compounds in Pink pepper fruits (*Schinus terebinthifolius* Raddi - Anacardiaceae) associated with cardiovascular, antimicrobial and antioxidant activities. Advisor: Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira.

This research was conducted at the Food Technology Laboratory (LTA) in collaboration with the Animal Clinic and Surgery Laboratory (LCCA) and the Animal Health Laboratory (LSA), belonging to the Center for Agricultural Sciences and Technologies (CCTA), and the Laboratory of Chemical Sciences (LTA) located in the Center of Science and Technology (CCT), at the State University of Northern Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ. The aims were: to evaluate the chemical profile and to identify the main phenolic compounds in *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits and to relate them to the biological activities: to evaluate the antioxidant activity; to evaluate the blood pressure lowering effect in vivo and to suggest a possible mechanism of action for the antihypertensive activity and to evaluate the profile of antibiotic and antifungal susceptibility, besides investigating the effect of synergism when associated with synthetic antifungals. The fractionation of the *S. terebinthifolius* fruits methanolic extract occurred by liquid-liquid partition, followed by the isolation of the active compounds by Open Column Chromatography. Chemical

profiles of the compounds were verified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and chemical structures elucidated by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectroscopy (MS). Cardiovascular activity was determined by intravenous infusion of the active compounds into Wistar rats. The Rotarod test was performed to suggest the mechanism of action. The antimicrobial activity was determined by inhibiting the growth of the microorganisms in liquid medium, followed by the antifungigram test. This thesis has been divided into two papers. In the first paper (a), two major compounds in the G5 fraction of the *S. terebinthifolius* fruits: gallic acid and naringinin (this is the first report of this flavanone in the species) were identified. Phenolic molecules significantly reduced systolic, median and diastolic blood pressures ( $p < 0.05$ ) in the animals tested, due to their ability to reduce oxidative stress through their high antioxidant activity (77.47%). The possible mechanism of action of the vasorelaxant effect occurred mainly in the Central Nervous System. In the second study (b) the isolated molecule was identified as biflavone amentoflavone. It was effective against *Candida kefyr* (81.4 CFU) and *Candida parapsilosis* (152.6 CFU). It also presented a synergistic effect when associated to all antifungal agents evaluated, due to its antioxidant effect (57.61%), capable of assisting oxidative stress in the metabolism of microorganisms, thus inhibiting their growth. Inhibition of oxidative stress can lead to inhibition of lipid peroxidation and enzymatic activities, inhibition of platelet aggregation and oxidation of LDL cholesterol, which promotes vasodilation, in addition to resulting in damage to the metabolism of microorganisms as tissue injury. Thus, this study has allowed concluding that the antioxidant capacity observed in the identified phenolic compounds favored the cardiovascular and antifungal activity of the *S. terebinthifolius* fruits, proving that this species is a promising natural source for action and prevention against various diseases.

## 1. INTRODUÇÃO

O contexto sócio-cultural de cada população influencia e determina as práticas de cuidado à saúde adotada ao longo da história. Em todos os momentos, ainda que de diferentes formas, o homem buscou na natureza, recursos para melhorar suas condições de vida e aumentar suas chances de sobrevivência (Aidi Wannes & Marzouk, 2016). As fontes vegetais podem ser consideradas uma das formas mais antigas de cuidados de saúde (Farzaneh & Carvalho, 2015; Holtmann & Talley, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que cerca de três quartos da população mundial faz uso de plantas medicinais para cuidados primários da saúde (WHO, 2017). A maioria dos usuários da medicina tradicional e holística são pessoas de países em desenvolvimento, motivadas pela manutenção de suas tradições culturais ou religiosas, e pela disponibilidade de uma rica diversidade botânica, devido ao baixo custo e também pela falta de acesso à medicina moderna (Moura-Costa et al., 2012).

O Brasil tem uma vasta biodiversidade de recursos à base de plantas ao longo de todo seu território, tendo aproximadamente 350-550 mil espécies, das quais 55 mil são catalogadas (Torres et al., 2016). É uma prática comum o conhecimento terapêutico que decorre do uso popular de fontes medicinais, e que é transmitido de geração em geração, para a prevenção e tratamento de vários transtornos de saúde (Barbieri et al., 2014).

Em 2008, o Ministério da Saúde do Brasil criou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos objetivando inserir, com segurança, eficácia e qualidade, plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS (Sistema Único de Saúde). O programa tem por finalidade promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros, bem como subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva relacionada à regulamentação como: cultivo, manejo, produção, comercialização e dispensação de fontes medicinais e fitoterápicos; além de orientar e subsidiar estudos e pesquisas na área da etnofarmacobotânica (Ministério da Saúde, 2017). Nesse contexto, em 2009 surgiu a RENISUS que é a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, onde já foram listadas 71 espécies vegetais, dentre elas *Schinus terebinthifolius* Raddi (Ministério da Saúde, 2017; DiCiaula et al., 2014).

A importância do estudo com *S. terebinthifolius* promoveu sua inclusão desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira publicada em 1926, devido às suas aplicações biológicas baseadas principalmente no seu uso na medicina tradicional (Silva et al., 2017). *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, é uma planta nativa da América do Sul popularmente conhecida como Aroeira ou Pimenta Rosa (Silva et al., 2017; Corrêa, 1984). É uma espécie encontrada em diferentes partes do mundo como a América do Sul e Central, Europa Mediterrânea, África e Estados Unidos, sendo também largamente distribuída por todo território brasileiro (Fedel-Miyasato et al., 2014; Corrêa, 1984).

Além da aplicabilidade na culinária, onde seus frutos são frequentemente utilizados como condimentos, a aroeira é ainda utilizada para fins terapêuticos, apresentando diversas propriedades como: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, antialérgica, antisséptica, balsâmica, hemostática, propriedades adstringentes, antidiarreica, febrífuga, propriedade diurética, além de ser usada para problemas respiratórios, úlceras, feridas, reumatismo, gota, doenças da pele e artrite (Torres et al., 2016; Bernardes et al., 2014; Fedel-Miyasato et al., 2014; Sartorelli et al., 2012; El-Massry et al., 2009; Degáspari et al., 2005).

Acredita-se que pelo menos metade das plantas medicinais existentes contenham substâncias químicas ativas responsáveis pelo seu efeito terapêutico (Torres et al., 2016). A capacidade de espécies vegetais em reduzir o risco de

certas doenças tem sido associada, pelo menos em parte, com a ocorrência de metabólitos secundários, que têm demonstrado exercer uma gama de atividades biológicas (Taiz & Zeiger, 2013; Vo & Kim, 2013). Assim, os benefícios dos compostos fenólicos naturais na saúde vêm sendo relacionados com o seu potencial antioxidante no combate de radicais livres no organismo (Liu et al., 2015).

Os compostos fenólicos naturais são responsáveis pelo efeito protetor das células frente aos danos oxidativos causados por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Farzaneh & Carvalho, 2015). O excesso de EROs no organismo pode causar uma série de complicações, como injúrias teciduais, inibição da peroxidação lipídica e atividades enzimáticas, inibição da agregação plaquetária e oxidação do colesterol LDL (Farzaneh & Carvalho, 2015; Haytowitz et al., 2013). Os antioxidantes, que são os agentes responsáveis por neutralizar os efeitos das EROs e a eliminação de radicais livres, podem assim favorecer diversos parâmetros biológicos dentre eles auxiliar nas atividades cardiovasculares e antimicrobianas em seres humanos (Torres et al., 2016; Penso et al., 2014).

Considerando a importância das moléculas fenólicas e visando identificar novas fontes naturais com alto potencial biológico, este trabalho teve como objetivo identificar os principais compostos fenólicos presentes nos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi e relacioná-los às atividades biológicas: avaliar a capacidade de abaixamento da pressão arterial *in vivo* e sugerir um possível mecanismo de ação para a atividade anti-hipertensiva; avaliar o perfil de susceptibilidade antibiótica e antifúngica da substância fenólica e verificar se a sua associação com diferentes classes de antifúngicos sintéticos apresenta efeito sinérgico; bem como averiguar se as atividades cardiovascular e antifúngica estariam relacionadas com processos oxidativos através da atividade antioxidante.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é ampliar o conhecimento químico e biológico acerca dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, para a utilização do mesmo como agente anti-hipertensivo, antimicrobiano e antioxidante.

### 2.2 Objetivos específicos

- ❖ Preparar o extrato bruto, realizar seu fracionamento através de técnicas cromatográficas e isolar moléculas fenólicas presentes nos frutos de pimenta rosa;
- ❖ Avaliar o perfil químico das substâncias fenólicas presentes nos frutos da pimenta rosa através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ❖ Isolar e identificar as estruturas químicas fenólicas e associá-las às atividades biológicas;
- ❖ Quantificar o teor de fenólicos totais das substâncias identificadas;
- ❖ Quantificar o teor de flavonoides totais das substâncias identificadas;
- ❖ Avaliar a atividade cardiovascular em ratos Wistar das substâncias identificadas;
- ❖ Avaliar o mecanismo de ação da atividade cardiovascular pelo teste do RotaRod em camundongos;
- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana da substância isolada;

- ❖ Fazer o teste de antifungigrama frente às diferentes classes de fungicidas comerciais;
- ❖ Avaliar a atividade antioxidante e relacioná-la às demais atividades biológicas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Espécies medicinais

O contexto sociocultural de cada população influencia e determina as práticas de cuidado à saúde adotada ao longo da história. Em todos os momentos, ainda que de diferentes formas, o homem buscou na natureza recursos para melhorar suas condições de vida e aumentar suas chances de sobrevivência (Aidi Wannes & Marzouk, 2016).

O emprego da etnofarmacobotânica no cuidado à saúde é um hábito comum em toda população mundial. Essa prática engloba a prevenção de doenças, a manutenção e recuperação da saúde e a melhoria da qualidade de vida, considerando ainda o uso sustentável dos recursos naturais (Alcantara et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), alguns países como China, Dinamarca, Gana, Japão, Noruega e Arábia Saudita já contam com políticas nacionais que regulam a prática da medicina tradicional (WHO, 2017). Na União Europeia metodologias estão sendo desenvolvidas para regulação da qualidade dos medicamentos tradicionais e mecanismos para registrar produtos dessa abordagem (Tupec et al., 2017).

No Brasil, o Ministério da Saúde criou, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), onde essa ação é executada em



vários municípios ao longo de todo território nacional (Figura 1), e tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Ministério da Saúde, 2017).



Figura 1 – Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços a partir de plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federadas (Fonte: Ministério da Saúde, 2017).

Dentro da PNPMF, para fins didáticos, a fitoterapia pode ser identificada em três principais vertentes: a fitoterapia popular – proveniente da tradição de uso doméstico e comunitário de plantas medicinais, transmitida oralmente de geração em geração; a fitoterapia tradicional – que, por contar com registro escrito de sua prática e, a depender se sua origem já existir por décadas, está mais relacionada à medicina tradicional; e à fitoterapia científica ocidental – fruto de estudos clínicos, baseado em estudos científicos (Ministério da Saúde, 2017).

Assim, a comunidade científica tem se empenhado constantemente em pesquisas relacionadas à compostos bioativos presentes em fontes naturais que estejam relacionados à atividades biológicas contribuindo para manutenção da

saúde e bem-estar dos usuários (Silva et al., 2017). Acredita-se que pelo menos metade das plantas medicinais existentes contenham substâncias químicas presentes em sua composição que sejam responsáveis pelo seu efeito terapêutico (Torres et al., 2016).

A capacidade dessas substâncias em auxiliar ou prevenir o surgimento de doenças ou enfermidades tem sido associada, pelo menos em parte, com a ocorrência de metabólitos secundários (Vo & Kim, 2013). Dentro da classe dos metabólitos secundários, existem as moléculas fenólicas, que possuem benefícios para saúde, relacionados principalmente com o seu potencial antioxidante durante o sequestro de radicais livres no organismo (Santos et al., 2014).

### **3.2 Moléculas fenólicas**

Uma característica típica de plantas é a sua capacidade de biossintetizar uma vasta e diversificada gama dos chamados metabólitos secundários (Taiz & Zeiger, 2013). Esses metabólitos são moléculas presentes em células especializadas e que não estão diretamente associados aos fenômenos fotossintéticos ou respiratórios, mas acredita-se que sejam necessários para a sobrevivência da planta no ambiente, associados ao seu crescimento e desenvolvimento (Cheynier et al., 2013).

As moléculas fenólicas, também conhecidas como polifenóis, constituem o maior grupo de metabólitos secundários oriundos de fontes vegetais (Martins et al., 2016). Essa classe possui cerca de 8000 compostos identificados e largamente distribuídos em diversas plantas (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Segundo Taiz & Zeiger (2013), os polifenóis constituem um grupo bem heterogêneo: alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água, e há ainda aqueles que são grandes polímeros insolúveis.

Suas estruturas variam de uma simples molécula a um complexo polímero de elevado peso molecular (Taiz & Zeiger, 2013). O potencial antioxidante desses compostos depende do número e da disposição dos grupamentos hidroxilas nas substâncias de interesse (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Quimicamente, os polifenóis são caracterizados por apresentarem em sua estrutura, anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus demais grupos funcionais (Taiz & Zeiger, 2013). Possuem estrutura variável e, com isso, são multifuncionais (Liu et al., 2015).

Devido à sua ampla diversidade estrutural, os polifenóis são agrupados em diferentes classes de acordo com sua estrutura química básica, dentre eles, destacam-se as cumarinas, os taninos, as ligninas e, principalmente, os flavonoides (Liu et al., 2015; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

### **3.2.1 Métodos de extração de substâncias fenólicas**

A extração de substâncias com propriedades farmacológicas para sua quantificação e caracterização é uma das etapas mais críticas nas pesquisas com produtos naturais (Xynos et al., 2012). A eficiência da extração depende de vários parâmetros como: tipo e proporção do solvente extrator (Xynis et al., 2012), natureza química dos analitos a serem extraídos (Zhao et al., 2011), tipo e tamanho das partículas da amostra (Mustafa e Turner, 2011), metodologia e temperatura de extração (Galanakis, et al., 2010), entre outros.

Para amostras sólidas, uma das primeiras etapas a serem realizadas é a transferência dos analitos em estudo para a fase líquida, composta pelo solvente extrator adequado (Castro e Capote, 2010). Esse processo também é chamado de extração sólido-líquido ou maceração, e é uma das técnicas mais antigas empregadas no preparo de amostras (Milic et al., 2013).

A maceração é uma das técnicas mais comum para obtenção de moléculas fenólicas a partir de espécies vegetais (Milic et al., 2013). É uma técnica tradicional que consiste na imersão da fonte vegetal em solvente adequado durante certo período, podendo empregar ou não calor e agitação (Castro e Capote, 2010). A separação realiza-se quimicamente, sendo o solvente posteriormente removido por técnicas de evaporação.

Uma das vantagens dessa técnica de extração é a sua simplicidade e baixo custo, enquanto sua principal desvantagem é tratar-se de um processo longo, variando de horas a dias para ser efetuado (Haminiuk et al., 2012).

Diversos solventes são utilizados para alcançar uma extração adequada. A escolha do solvente mais apropriado depende da sua seletividade,

miscibilidade, densidade, recuperação, pressão de vapor, viscosidade, preço e estabilidades química e térmica (Haminiuk et al., 2012). Os solventes mais comumente empregados nos processos de extração de substâncias fenólicas são: metanol, etanol, acetato de etila, acetona, éter etílico, propanol, dimetil formaldeído e combinações entre eles (Haminiuk et al., 2012).

A extração de substâncias fenólicas também pode ser influenciada pela razão solvente:amostra empregado no sistema. De acordo com Wong e colaboradores (2013), quanto maior a proporção solvente:amostra utilizada, maior a quantidade de fenólicos totais obtida. Isso porque, quando a quantidade de solvente aumenta, aumenta-se a chance de componentes bioativos entrarem em contato com o solvente de extração, resultando em maiores rendimentos de fenólicos, até que se alcance um equilíbrio no gradiente de concentração entre o sólido (amostra) e o solvente extrator.

A temperatura é outra variável que deve ser controlada durante os processos de extração, uma vez que o aumento desta promove um acréscimo na taxa de extração, em decorrência do aumento da solubilidade do analito e maior taxa de transferência de massa, bem como, da diminuição da viscosidade e da tensão superficial do solvente extrator, facilitando sua penetração na matriz em análise (Dai e Mumper, 2010). No entanto, deve-se ter em mente que muitas das substâncias fenólicas são facilmente oxidadas. Dessa forma, tempos longos de extração sob alta temperatura podem levar à degradação das mesmas (Galanakis, et al., 2010).

O tamanho de partícula do material vegetal também é um parâmetro que exerce grande influência sobre a extração. Com menores tamanhos de partícula, aumenta-se a extração de compostos fenólicos, haja vista que ocorre um processo de ruptura da parede celular da fonte vegetal (Mustafa e Turner, 2011).

### **3.3 Flavonoides**

Dados da literatura indicam que já foram identificados mais de 10.000 tipos de flavonoides (Agati et al., 2012). A concentração de um flavonoide específico pode variar consideravelmente, dependendo de inúmeros fatores, tais como doenças, ataque de insetos e/ou pragas, estresse climático, radiação ultravioleta, entre outros (Haytowitz et al., 2013). Outras fontes da variabilidade

podem incluir o cultivar, o local de crescimento, as práticas agrícolas, a colheita, os métodos de armazenamento e as condições de processamento e preparação (Haytowitz et al., 2013).

O descobrimento de atividades biológicas atribuídas a moléculas fenólicas e flavonoides, tem sido altamente considerado no meio científico, já que as suas fontes naturais são de baixo custo, comumente utilizadas por populações de países em desenvolvimento, além de serem largamente encontradas em todo território mundial (Wang et al., 2017; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

### 3.3.1 Propriedades químicas e classificação

Os flavonoides são substâncias fitoquímicas que existem como agliconas livres ou conjugados glicosídicos. Quimicamente, são polifenóis compostos por dois anéis benzênicos (A e B), que são conectados por um anel pireno contendo o oxigênio (C) (Figura 2) (Wang et al., 2017).

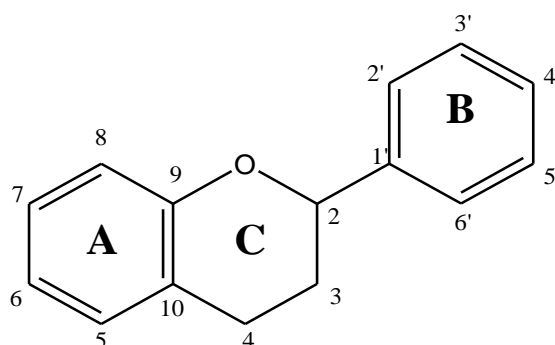


Figura 2 – Núcleo fundamental dos flavonoides.

A classificação dos flavonoides se baseia nas diversas combinações de vários grupos de hidroxila e metoxila, além das reações de redução e oxidação no esqueleto básico dessas moléculas (Agati et al., 2012). Assim, são conhecidas diferentes seis subclasses (Figura 3): 1) flavonóis contendo uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do anel C (p.ex., quercetina, kaempferol, miricetina); 2) flavanonas contendo apenas a carbonila no C-4, também sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3 (p.ex., naringenina); 3) flavanóis contendo apenas a hidroxila no C-3, porém sem a dupla ligação entre os C-2 e C-3 (p.ex. catequina e epicatequina); 4) flavonas contendo apenas carbonila na

posição 4 (p.ex., luteolina, apigenina); 5) antocianinas apenas contendo a hidroxila no C-3 (p.ex., cianidina, pelargonidina) e 6) isoflavonas em que o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (p.ex., genisteína, daidzeína) (Otaki et al., 2009; Harborne, 1994).

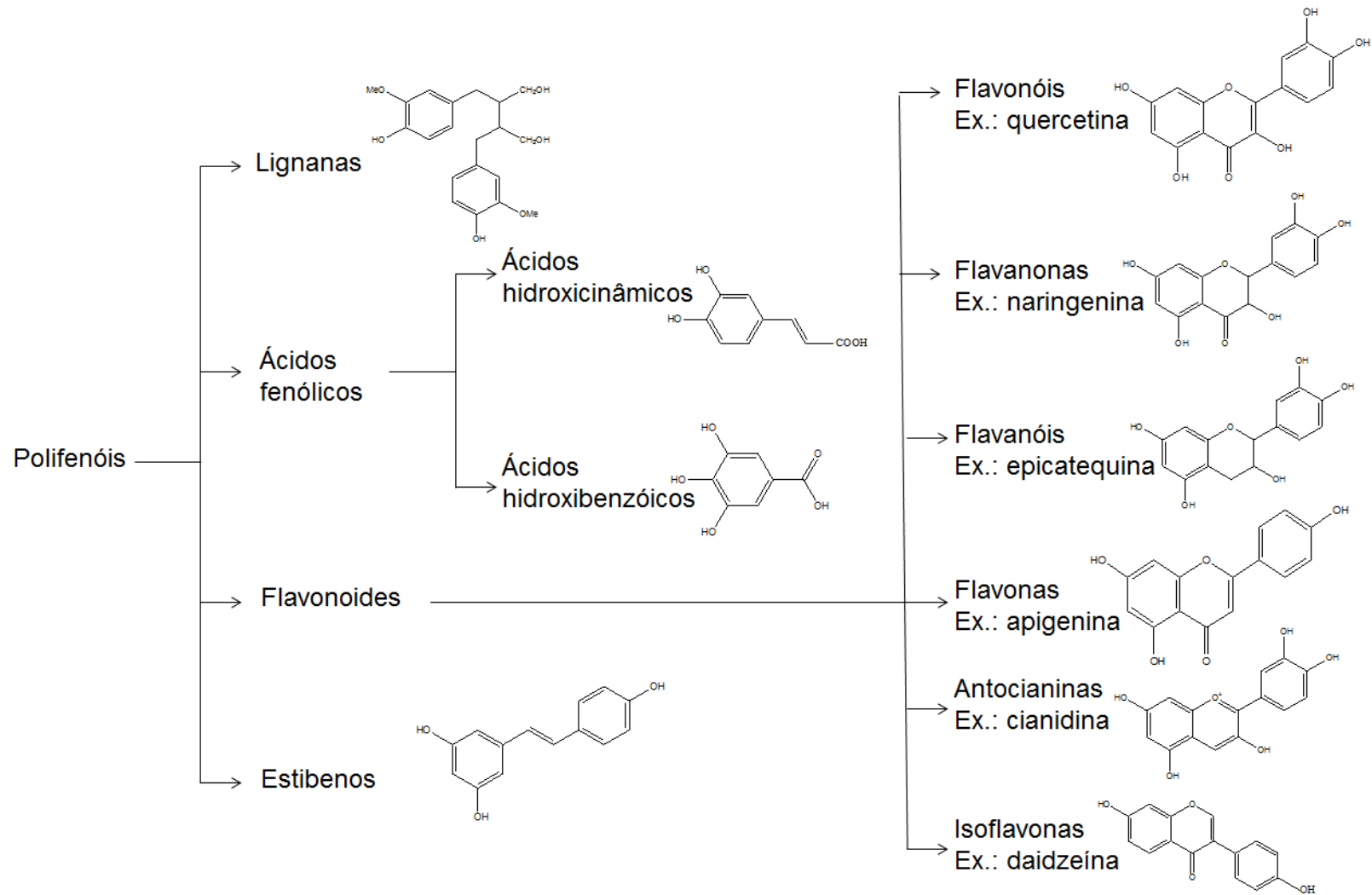


Figura 3 – Classificação geral dos polifenóis, com ênfase em flavonoides (adaptado de Dovichi e Lajolo, 2011).

### 3.3.2 Biossíntese

Como regra geral, proposto por Quideau e colaboradores (2011), o termo "fenólicos vegetais" deve ser estritamente utilizado para se referir a metabólitos secundários naturais decorrentes biogeneticamente das vias do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. Estas vias produzem uma enorme gama de estruturas monoméricas e poliméricas que desempenham uma gama muito ampla de papéis fisiológicos nas plantas (Cheynier et al., 2013).

O esqueleto carbônico dos flavonoides resulta de rotas biossintéticas mistas (Figura 4): a via do ácido chiquímico e a via do acetato através da via do ácido mevalônico (Harborne, 1994). A chalcona sintase é a enzima que catalisa a formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonoides são formados, pela condensação de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula de 4-coumaroil-CoA, (C6-C3). O substrato éster da CoA do ácido cinâmico vem da fenilalanina. A fenilalanina amônio liase canalisa o esqueleto C6-C3 da fenilalanina via o ácido *trans*-cinâmico pelo metabolismo de fenilpropanoides. A introdução da função hidróxi na posição 4 do ácido *trans*-cinâmico é catalisada pela cinamato 4-hidroxilase, fornecendo o 4-coumarato. O ácido hidróxi-cinâmico é ativado para futuras reações, pela formação de um éster da CoA (4-coumaroil-CoA), substrato preferido pela chalcona sintase. O segundo substrato da chalcona sintase, o malonil-CoA, é sintetizado a partir da acetil-CoA e CO<sub>2</sub>. Através de subseqüentes hidroxilações e reduções, os vegetais sintetizam as diferentes classes dos flavonoides (Forkmann & Martens, 2001; Harborne, 1994).



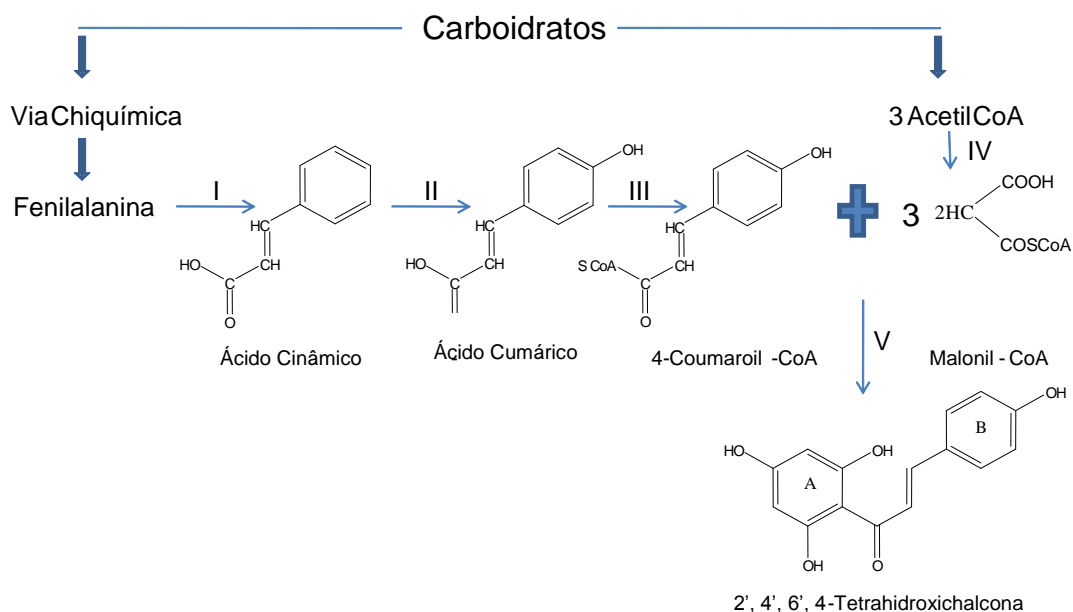


Figura 4 – Biossíntese geral dos flavonoides, ilustrando as etapas da formação da chalcona intermediária básica C15, da qual todos os flavonoides são formados. As enzimas são: I-Fenil amônia liase; II-Cinamato 4-hidroxilase; III-4-coumarato:CoA ligase; IV- Acetil-CoA carboxilase; V-Chalcona sintase (adaptado de Harborne, 1994).

### 3.3.3 Atividades biológicas

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, dentre as quais podemos citar a proteção dos vegetais contra a incidência de raios Ultravioleta Visível (UV), e a proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, controle da ação de hormônios vegetais, e inibidores de enzimas (Taiz & Zeiger, 2013; Povh et al., 2012).

De acordo com Cao e colaboradores (2015), os flavonoides exercem uma ampla gama de benefícios também para a saúde humana. Algumas pesquisas têm explorado diversas atividades biológicas e farmacológicas de flavonoides nos humanos, só nos últimos cinco anos são citadas: atividade antioxidante (Glória et al., 2017), atividade antibacteriana e antifúngica (Pianalto & Alspaugh, 2016; Uliana et al., 2016), atividade antidiabética (Xiao et al., 2015), atividade anti-inflamatória (Bernardes et al., 2014), atividade leishmanicida (Ogungbe et al., 2014), atividade antiobesidade (Kim et al., 2014), atividade anticancerígena (Santos et al., 2013), atividade anti-HIV (Andrae-Marobela et al., 2013), atividade

anticoagulante (Liao et al., 2013), atividade imunomoduladora (Katayama et al., 2013), atividade antialérgica (Kim et al., 2013), entre outras.

### **3.4 Radicais livres e antioxidantes**

Os radicais livres podem ser caracterizados como moléculas orgânicas e inorgânicas que possuem átomos contendo um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons isolados ocupando um orbital atômico ou molecular (Filipović et al., 2015; Halliwell, 2011). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (Halliwell, 2011).

O efeito cumulativo desses radicais provocam vários danos no organismo, sendo que, os danos oxidativos são responsáveis por alterações tão alarmantes, que as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) podem provocar até a morte celular (Sen et al., 2013; Bernardes et al., 2010).

As EROs são geradas naturalmente durante os processos fisiológicos e bioquímicos do organismo, e são reguladas por diferentes mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Labat-Robert & Robert, 2014). ERO é um termo amplo e abrange, além dos radicais de oxigênio como radical hidroxil, óxido nítrico e radical superóxido, também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, ozônio e oxigênio singlete (Santos et al., 2014; Barreiros & David, 2006).

As origens das EROs podem ser endógenas e exógenas. As fontes exógenas incluem a luz ultravioleta, irradiações ionizantes e os agentes químicos (Santos et al., 2014). No organismo (fontes endógenas), as EROs estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, mediação da transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, seu excesso causa peroxidação lipídica nas membranas celulares, agressão às proteínas (tecidos e membranas), às enzimas, carboidratos e danos ao DNA (Santos et al., 2014; Sen et al., 2013). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua remoção por substâncias antioxidantes resulta em efeitos danosos à célula, o que pode desencadear processos patológicos (Labat-Robert & Robert, 2014).

Os antioxidantes são moléculas com cargas positivas que se combinam com os radicais livres, de carga negativa, tornando-os inofensivos. As substâncias antioxidantes são formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais (antioxidantes não enzimáticos) e, ainda, por enzimas (antioxidantes enzimáticos) que combatem o efeito nocivo dos radicais livres (Santos et al., 2014; Barreiros & David, 2006).

Entre os antioxidantes naturais podemos citar a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), os carotenoides e os flavonoides (Glória et al., 2017; Bernardes et al., 2014; Santos et al., 2014). Estes são distribuídos largamente em fontes vegetais, reduzindo os efeitos prejudiciais dos radicais livres (Filipović et al., 2015).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e por vezes como quelantes de metais, agindo na iniciação e na propagação do processo oxidativo (Cesari et al., 2013; Li et al., 2012). Devido ao elevado poder antioxidante, essas substâncias exercem atividades biológicas e funções sobre a saúde, como, auxiliar no tratamento de infecções causadas por microrganismos (Torres et al., 2016; Uliana et al., 2016; Gomes et al., 2013) além de prevenir o surgimento de algumas doenças crônicas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, aterosclerose e o diabetes (Glória et al., 2017; Santos et al., 2014).

### **3.5 Atividade cardiovascular**

A hipertensão é um grande problema de saúde pública mundial e é uma das doenças cardiovasculares mais comuns existentes (Rawat et al., 2016). As moléculas fenólicas são uma classe de substâncias químicas bem conhecida por sua capacidade antioxidante e, conseqüentemente, favoráveis à eliminação de radicais livres no organismo (Santos et al., 2014). Por esse motivo é que a atividade pode favorecer parâmetros cardiovasculares em indivíduos (Wang et al., 2017; Penso et al., 2014).

Estudos indicam que os possíveis mecanismos de ação pelos quais essas estruturas estão relacionadas à atividade cardiovascular, é devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres, provocando um efeito protetor sobre todas as células por estar evitando os danos oxidativos causados por Espécies

Reativas de Oxigênio (EROs) (Rawat et al., 2016; Lobo De Andrade et al., 2015; Penso et al., 2014).

A diminuição do estresse oxidativo desempenha uma série de eventos no organismo humano como: inibição da peroxidação lipídica, inibição de atividades enzimáticas, inibição da agregação plaquetária e a oxidação do colesterol LDL (Santos et al., 2014). Todos esses eventos são capazes de promover um efeito de vasodilatação, garantindo assim a integridade dos vasos sanguíneos, contribuindo para o bom funcionamento da atividade cardiovascular (Wang et al., 2017; Lobo De Andrade et al., 2015).

Portanto, a descoberta de novas fontes naturais ricas em compostos fenólicos que apresentem potencial poder antioxidante, pode provar a eficácia de plantas utilizadas na medicina popular, cujas atividades biológicas são cientificamente comprovadas. Tudo isso enfatiza a relevância do desenvolvimento de novos fármacos anti-hipertensivos específicos naturais com potencial para uso clínico.

### **3.6 Atividade antimicrobiana**

Estudos demonstraram uma crescente dificuldade dos agentes antimicrobianos sintéticos usados para inibir ou eliminar o desenvolvimento de microrganismos, pois seus efeitos têm se mostrado limitados ou ineficazes (Pianalto & Alspaugh, 2016; Farzaneh & Carvalho, 2015). Isso faz reforçar a tendência do emprego de agentes antimicrobianos de origem natural que podem fornecer uma barreira de proteção adicional (Cruz-Galvez et al., 2013).

O mecanismo de ação de substâncias naturais sobre os microrganismos ocorre principalmente nas estruturas de membranas celulares desses seres (Farzaneh & Carvalho, 2015). Injúrias nas membranas podem expor certas organelas intracelulares para fora da célula, causar transtornos no sistema de transferência de elétrons, diminuição ou inativação de atividades enzimáticas ou, ainda, diminuição da capacidade de adsorção de nutrientes da célula (Farzaneh & Carvalho, 2015).

O dano oxidativo induzido em células e tecidos está relacionado à etiologia de várias doenças, incluindo doenças microbianas. Os produtos naturais são fortes candidatos a esses testes porque a inserção de fitofármacos

com capacidade de sequestro de radicais livres pode ser uma alternativa importante para o tratamento de infecções causadas por bactérias ou fungos (Silva et al., 2017). Amensour e colaboradores (2010) demonstraram que a permeabilidade da membrana celular é afetada principalmente por compostos bioativos disponíveis nos extratos naturais.

Os produtos do metabolismo secundário das fontes vegetais podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antimicrobiana”, favorecendo a atividade de antibióticos e antifúngicos sintéticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos microrganismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção (González-Lamothe et al., 2009).

Estruturas fenólicas presentes em plantas, além de apresentarem capacidade antioxidante, também podem possuir propriedades antimicrobianas inibindo o crescimento, tanto de bactérias, quanto de fungos patogênicos (Torres et al., 2016; Paz et al., 2015).

### **3.6.1 Fungos do gênero *Candida* spp.**

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos saprófitos que, dependendo de fatores de pré-eliminação que alterem sua integridade orgânica, podem modificar sua conformação para forma fusiforme, tornando-se patogênicas (Campoy & Adrio, 2017). Assim, as *Candidas* estariam relacionadas a fortes fatores de virulência, entre os quais, são responsáveis pela formação de biofilmes, e essa habilidade é estreitamente relacionada com a sua aptidão em causar infecções (Ramage et al., 2005).

A candidíase é uma infecção causada por fungos oportunistas de diferentes espécies de *Candidas*. Essa infecção é um importante problema de saúde, já que estatísticas revelaram que as espécies de *Candida* apresentaram diminuição da susceptibilidade à fármacos comumente utilizados no tratamento dessa doença, como por exemplo fluconazol e anfotericina B, causando inúmeros transtornos, principalmente nos indivíduos infectados (Campoy & Adrio, 2017; Torres et al., 2016).

Esta emergente resistência antifúngica pode levar a consequências como a administração de antifúngicos alternativos mais caros, hospitalização

prolongada e aumento da morbidade e mortalidade entre indivíduos de alto risco (Hoh & Dhanashree, 2017).

Diante da variedade e das manifestações clínicas que as infecções por *Candida* spp. podem apresentar, a utilização de diferentes métodos de diagnósticos e esquemas terapêuticos torna-se fundamental. Os fármacos antifúngicos sintéticos disponíveis atualmente estão sendo relacionados a diversas falhas como: toxicidade relevante, aumento da resistência, diminuição do efeito de ação, reações indesejáveis, entre outros (Campoy & Adrio, 2017; Pianalto & Alspaugh, 2016).

Por essa razão, é incessante a procura por novos agentes antifúngicos mais potentes e, sobretudo, mais seguros que os já existentes na tentativa de minimizar esses problemas (Campoy & Adrio, 2017; Hoh & Dhanashree, 2017; Pianalto & Alspaugh, 2016). A exploração do potencial antifúngico de produtos naturais pode contribuir para um tratamento alternativo, mais econômico e com ações terapêuticas mais efetivas para infecções Candidais.

### **3.7 Material vegetal**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) informou que cerca de três quartos da população mundial utiliza plantas medicinais para a melhoria da saúde (WHO, 2017). A fitoterapia pode ser considerada uma das formas mais antigas de cuidados de saúde, e os tratamentos à base de fontes vegetais têm sido utilizados por todas as culturas ao longo da história (Holtmann & Talley, 2015). Os tratamentos à base de plantas medicinais têm mostrado efeitos colaterais mínimos e menor intolerância por parte de seus usuários (Farzaneh & Carvalho, 2015).

Algumas pessoas acreditam que os medicamentos sintéticos em geral são demasiadamente dispendiosos, causam muitos efeitos adversos, e estes motivos fazem com que se busque cada vez mais a cura para suas enfermidades através de métodos ou meios naturais (Seeff et al., 2015). A maioria acredita que, porque os produtos à base de espécies medicinais têm sido utilizados durante séculos, eles devem ser eficazes e seguros (Seeff et al., 2015). Infelizmente apesar da ampla utilização dessas fontes pela população, existe o consenso sobre a falta de evidências científicas para a segurança e

eficácia no uso desses produtos (Bae et al., 2015). Portanto, torna-se necessário estimular a realização de estudos, tendo em vista a importância dos seus resultados tanto individuais como sociais.

O Brasil possui vasta biodiversidade de recursos à base de plantas ao longo de todo seu território, tendo aproximadamente 350-550 mil espécies, das quais 55 mil são catalogadas (Torres et al., 2016). É uma prática comum o conhecimento terapêutico que decorre do uso popular de plantas medicinais, e que é transmitido de geração em geração para a prevenção e tratamento de vários transtornos de saúde (Barbieri et al., 2014).

A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), também conhecida como pimenta rosa, ou aroeira, é uma espécie nativa da flora brasileira sendo largamente distribuída por todo seu território (Silva et al., 2017), além de ser encontrada em diferentes partes do mundo, como a América do Sul e Central, Europa Mediterrânea, África e Estados Unidos (Fedel-Miyasato et al., 2014). A pimenta rosa também faz parte da diversidade da região de Campos dos Goytacazes - RJ (Glória et al., 2017).

A importância do estudo a partir dessa espécie vegetal promoveu sua inclusão desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira publicada em 1926 devido às suas aplicações biológicas baseadas principalmente no seu uso na medicina tradicional (Silva et al., 2017), bem como ser uma das 71 plantas de interesse do SUS, estando listada na RENISUS (Ministério da Saúde, 2017).

### **3.7.1 Descrição botânica**

A família Anacardiaceae é composta por cerca de 75 gêneros e mais de 700 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Madikizela et al., 2013; Degáspari et al., 2005). No Brasil ocorrem cerca de 15 gêneros e 70 espécies (Fedel-Miyasato et al., 2014). Esta família é composta por árvores ou arbustos e algumas vinhas utilizadas como plantas ornamentais. Os membros da família Anacardiaceae não são apenas conhecidos por seu apelo hortícola, mas são também usados para fins medicinais (Madikizela et al., 2013). Vários compostos químicos com atividades farmacêuticas já foram amplamente associados a membros dessa família, tais como fenóis e taninos (Degáspari et al., 2005).

*S. terebinthifolius* Raddi, é popularmente conhecida como "aroeira-vermelha", "pimenta rosa", "aroeira-pimenteira", "aroeira-mansa", "pimenta brasileira" ou "Christmas-berry" (Fedel-Miyasato et al., 2014). É uma árvore perene, nativa do Brasil, sendo largamente distribuída por todo território brasileiro, indo desde o Alagoas até o Rio Grande do Sul (Corrêa, 1984). A aroeira também é introduzida em diferentes partes do mundo, como a América do Sul e Central, Europa Mediterrânea, África e Estados Unidos (Fedel-Miyasato et al., 2014; El-Massry et al., 2009).

A aroeira é uma árvore de médio porte, atingindo a altura de 5 a 10 metros. Suas folhas são verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas e com nervura proeminente na parte de cima do limbo. Os frutos (Figura 5) são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos. A casca é vermelha, seca e envolve a única semente, de coloração marrom-escura, com cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (Degáspari et al., 2005).



Figura 5 – Frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

### 3.7.2 Propriedades químicas

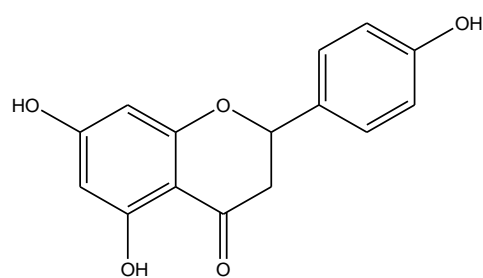
*S. terebinthifolius* tem sido alvo frequente de pesquisas sob o ponto de vista químico, principalmente após essa planta ter sido listada na RENISUS (Ministério da Saúde, 2017; Lima et al., 2009). Vários compostos químicos já foram identificados tais como: fenóis (Uliana et al., 2016; Bernardes et al., 2014), flavonoides (Glória et al., 2017; Feuereisen et al., 2017; Degaspari et al., 2005), terpenos (Jain et al., 1995) e Pentagaloilglicose - precursor de muitas estruturas complexas de taninos (Hayashi & Nagayama, 1989). Além disso, a análise



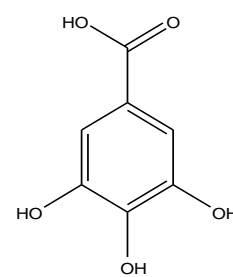
química da casca de *S. terebinthifolius* comprovou a existência de antraquinonas, xantonas e esteroides livres (Lima et al., 2009).

Glória e colaboradores (2017) identificaram no fracionamento do extrato metanólico dos frutos de *S. terebinthifolius* Raddi o composto fenólico ácido gálico e o flavonoide naringenina, demonstrado pela primeira vez nessa espécie (Figura 6).

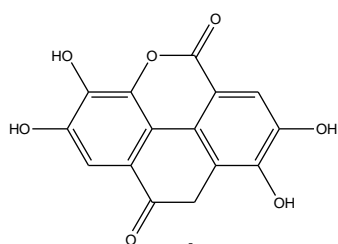
Feuereisen e colaboradores (2017) caracterizaram a composição fenólica do extrato do exocarpo de *S. terebinthifolius* utilizando UHPLC-DAD-MS/ MS e identificaram quatro antocianinas, dois tipos de taninos hidrolisáveis, o ácido gálico, o ácido elágico e quatro biflavonoides (Figura 6 e 7). A partir do extrato metanólico dos frutos de aroeira, foram isolados os flavonoides apigenina, galangina 7-O-Ramnopiranosídeo e a galangina pura, além do fenólico ácido gálico (Bernardes et al., 2014) (Figura 6).



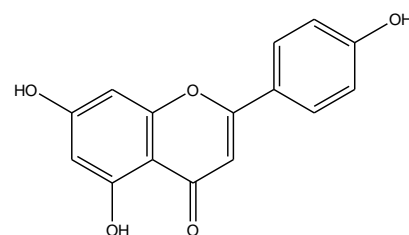
Naringenina



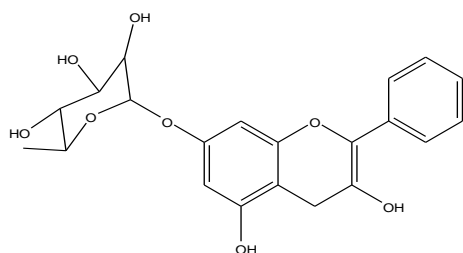
Ácido Gálico



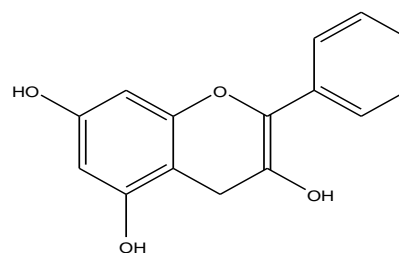
Ácido elágico



Apigenina



Galangina 7-O-Ramnopiranosídeo



Galangina

Figura 6 – Estrutura química dos principais compostos fenólicos e flavonoides caracterizados em *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Dentre os biflavonoides identificados e isolados em frutos e extrato do exocarpo de pimenta rosa aparecem a tetrahidrorobustaflavona, a amentoflavona, a agatisflavona e a robustaflavona (Feuereisen et al., 2017; Kassem et al., 2004) (Figura 7).

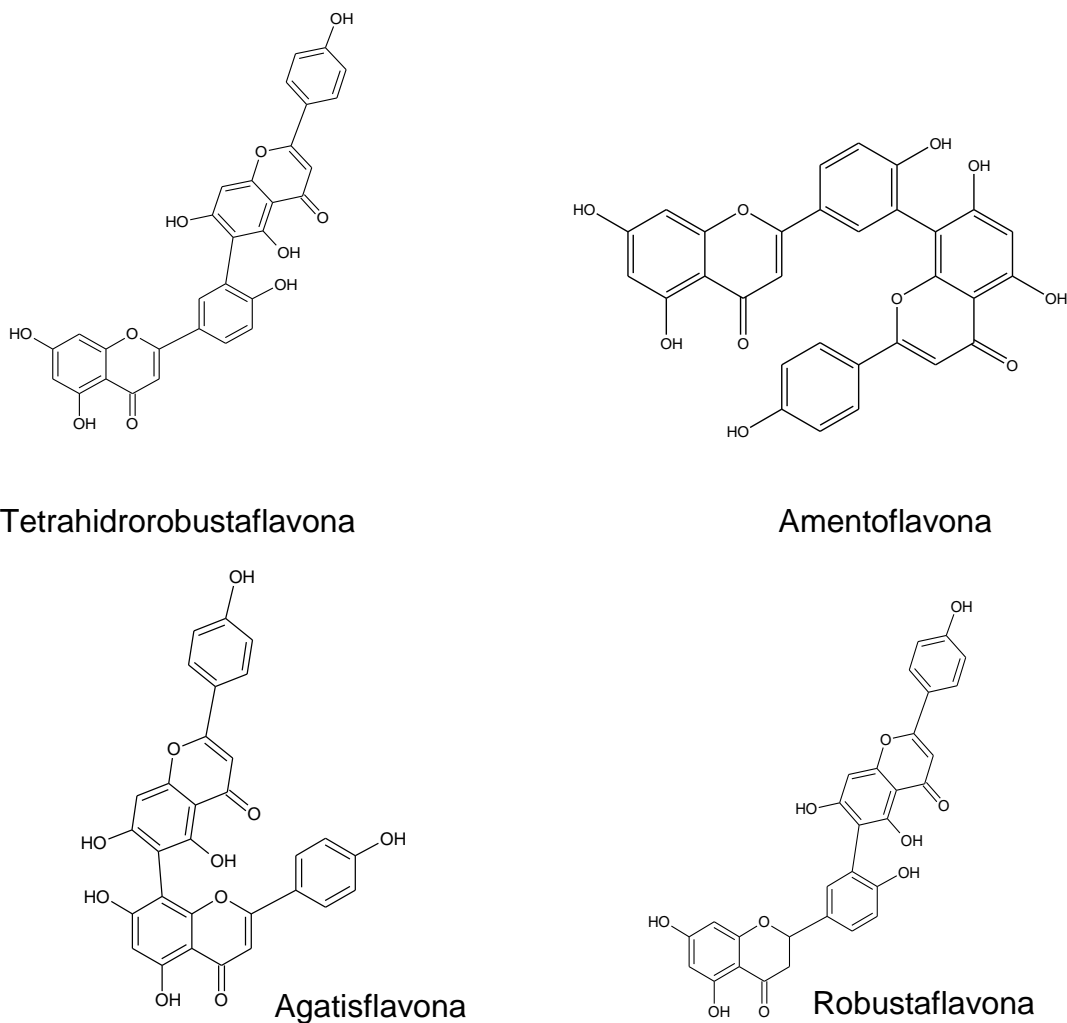


Figura 7 – Estrutura química de biflavonoides caracterizados a partir de extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Na classe dos terpenoides, dois triterpenos isolados a partir do extrato de acetato de etila dos frutos de *S. terebinthifolius* foram caracterizados como inibidores específicos da fosfolipase A<sub>2</sub> (Jain et al., 1995), em que 1 representa o ácido masticadienoico, e 2 representa o álcool schinol, sua estrutura molecular está esquematizada na Figura 8.

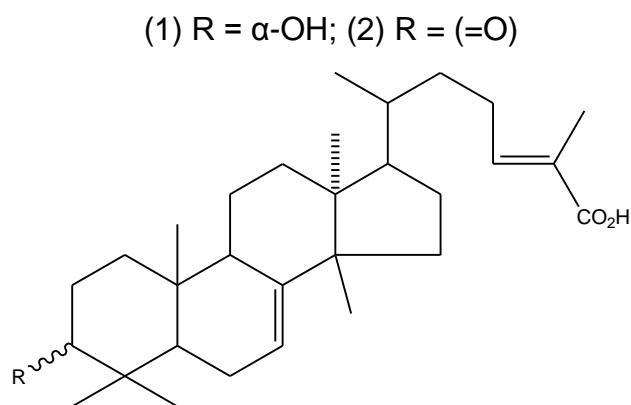


Figura 8 – Estrutura molecular do álcool schinol (1) e do ácido masticadienoico (2) identificados nos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Ceruks e colaboradores (2007) isolaram a partir da fração em acetato de etila das folhas *S. terebinthifolius*, oriunda do extrato em etanol, o galato de etila (1), miricetrina (2), quercitrina (3), galato de metila (4) e miricetina (5), como mostra a Figura 9.

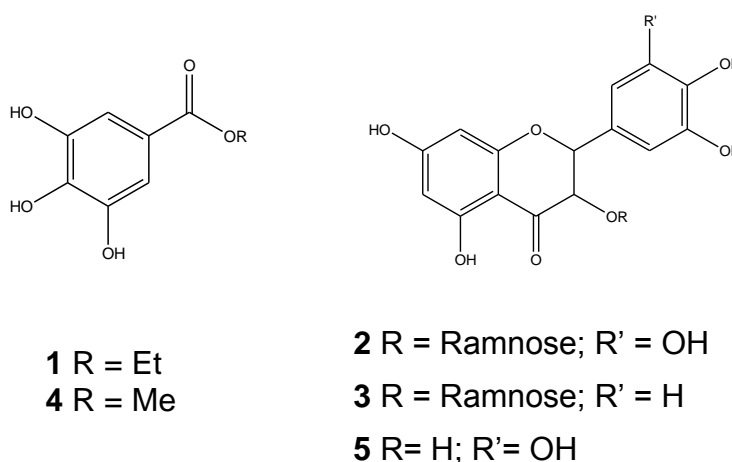


Figura 9 – Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Enquanto que Barbosa e colaboradores (2007) relataram a detecção dos flavonoides amentoflavona e tetrahydroamentoflavona, do álcool de cadeia longa cardanol, dos esteroides schinol, simiarinol e  $\beta$ -sitosterol, além do ácido masticadienoico presentes no óleo essencial das folhas de aroeira (Figura 10).

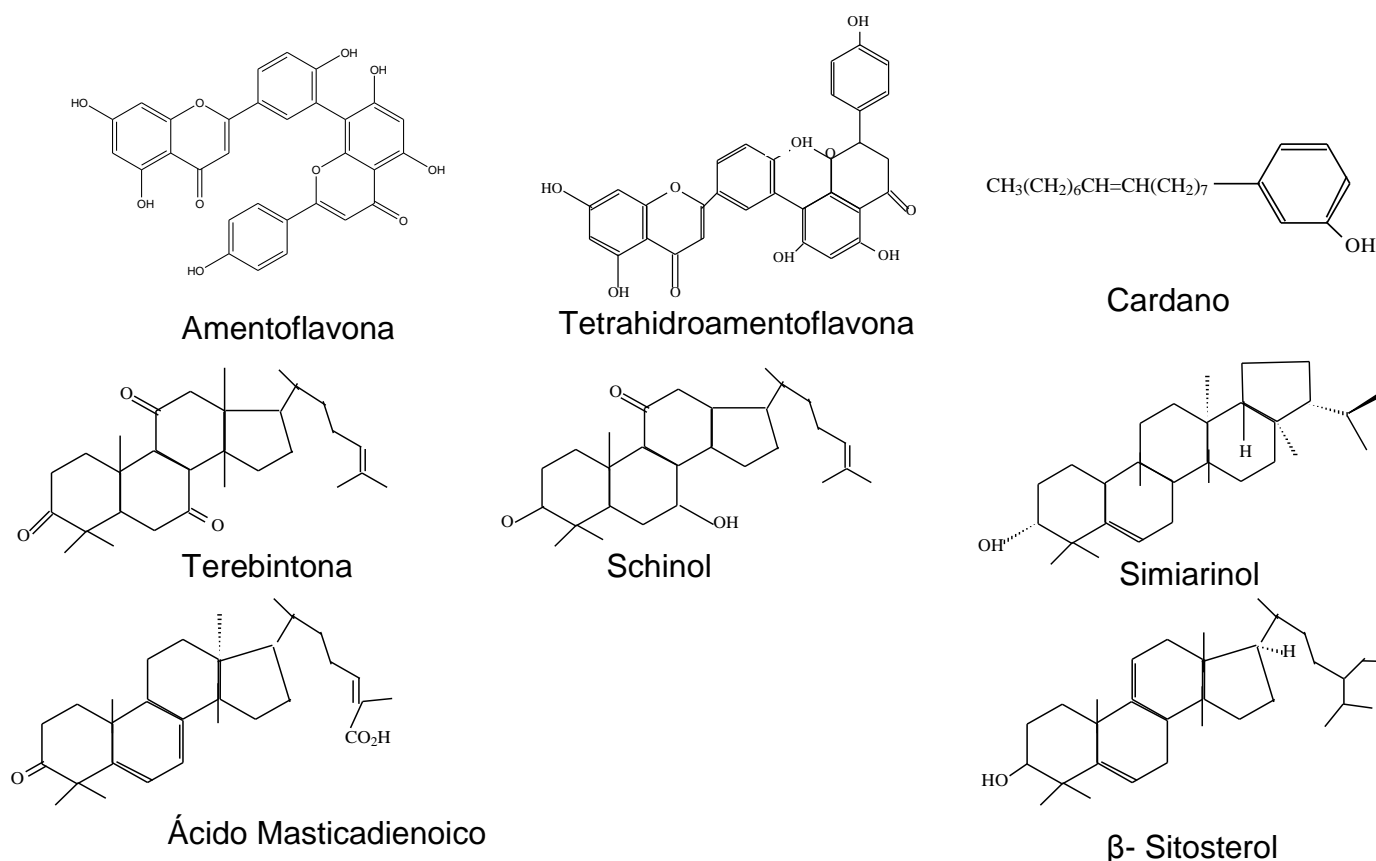


Figura 10 – Estrutura química das substâncias isoladas das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

### 3.7.3 Propriedades biológicas

Além da aplicabilidade na culinária de *S. terebinthifolius*, sob a forma desidratada dos frutos, várias partes da aroeira como folhas, cascas, sementes, caules e frutos inteiros são utilizadas para fins terapêuticos (Fedel-Miyasato et al., 2014). Observações na medicina tradicional de *S. terebinthifolius* levaram autores a estudarem a comprovação *in vitro* da utilização dessa espécie para inibir o crescimento de microrganismos, entre eles os fungos (Torres et al., 2016).

Ainda sobre o uso popular, a casca do caule e folhas de *S. terebinthifolius* são utilizadas na cicatrização de feridas, para o tratamento de úlceras e possuem ação anti-inflamatória (Sartorelli et al., 2012). Sob a forma de infusão ou decocção, são eficazes para o tratamento de infecções bacterianas (El-Massry et al., 2009). Os frutos dessa espécie também já foram relacionados com

atividade antioxidante e antitumorais (Bernardes et al., 2014; El-Massry et al., 2009).

Em relatos na literatura já foram citadas as seguintes propriedades: propriedade antioxidante e cardiovascular (Glória et al., 2017), propriedade antimicrobiana (Torres et al., 2016; Gomes et al., 2013), propriedade anti-inflamatória e antimicobacteriana (Bernardes et al., 2014), antiaderente para formação de biofilme oral (Barbieri et al., 2014), propriedades imunomoduladoras e quimiopreventivas (Fedel-Miyasato et al., 2014), antitumoral (Matsuo et al., 2011), propriedade antisséptica, balsâmica e hemostática (Lima et al., 2009), antialérgica (Cavalher-Machado et al., 2008), propriedades adstringente, antidiarreica e febrífuga (Ceruks et al., 2007).

Não há relatos de trabalhos sobre atividade cardiovascular para qualquer espécie de *Schinus* spp, sendo o primeiro relato feito no trabalho 5.1 dessa tese de doutorado com o artigo publicado (Glória et al., 2017).

Para outras espécies da família Anacardiaceae, descreve-se o seguinte: extrato aquoso de tronco de casca de *Anacardium occidentale* foi administrado por via intravenosa em coelhos e reduziu significativamente a pressão arterial e a atividade contrátil do coração de ratos (Tchikaya et al., 2011). Extrato aquoso do caule de *Harpephyllum caffrum* reduziu significativamente as pressões arteriais sistêmicas e as frequências cardíacas em ratos hipertensos, após administração intravenosa do extrato (Ojewole, 2006). Extratos das folhas de *Sclerocarya birrea* mostraram efeito antagonista significativo na liberação de cálcio devido ao efeito vasorelaxante observado em vasos arteriais de ratos, uma vez que os íons cálcio são responsáveis pela contração do músculo liso (Belemtougri et al., 2001).

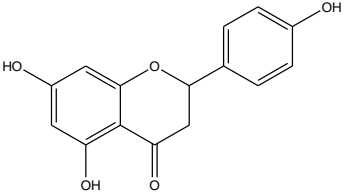
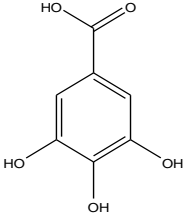
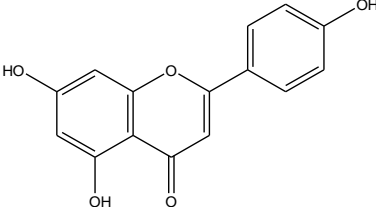
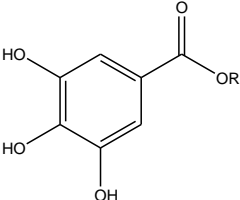
As atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, que são relatadas para os extratos de *S. terebinthifolius*, englobam ação antibacteriana com significativa ação contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Leishmania amazonensis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Uliana et al., 2016; Gomes et al., 2013; El-Massry et al., 2009); e também ação antifúngica principalmente na inibição do crescimento de fungos do gênero *Candida* spp (Torres et al., 2016; Moura-Costa et al., 2012).

Em 1999 foi lançada, no Brasil, uma preparação farmacêutica em gel contendo extrato de aroeira. Este fármaco é utilizado no tratamento da vaginose

bacteriana e apresentou taxa de cura de 84% para o grupo dos tratados com o gel, contra 47,8% para o grupo do placebo. O gel foi lançado no mercado farmacêutico do Brasil com o nome de Kronel® (Hebron Laboratório, Brasil) (Leite et al., 2011; Amorim & Santos, 2003).

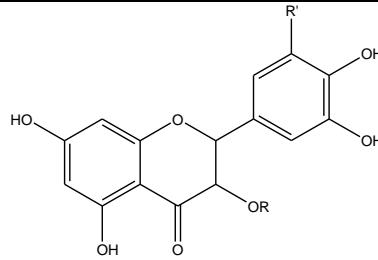
O conhecimento da substância química responsável pelo efeito biológico da fonte vegetal é de grande importância, principalmente para o desenvolvimento de novos produtos medicinais (Alves et al., 2013). São mostrados na Tabela 1 as principais substâncias fenólicas identificadas em *Schinus terebinthifolius* Raddi e as atividades biológicas relacionadas a essas substâncias.

Tabela 1 – Substâncias fenólicas identificadas em *Schinus terebinthifolius* Raddi associadas às atividades biológicas.

Substância Identificada	Estrutura Química	Atividade Biológica	Referência
1) Naringenina (flavanona)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade cardiovascular</li> <li>• Atividade antioxidante</li> </ul>	Glória et al., 2017
2) Ácido gálico (ácido fenólico)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade cardiovascular</li> <li>• Atividade antioxidante</li> </ul>	Glória et al., 2017
3) Apigenina (flavona)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade anti-inflamatória</li> <li>• Atividade antioxidante</li> <li>• Atividade antimicrobacteriana</li> </ul>	Bernardes et al., 2014
4) 1 - Galato de etila (R = Et) 2 - Miricetrina (R = Me) (ácidos fenólicos)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade antioxidante</li> </ul>	Ceruks et al., 2007



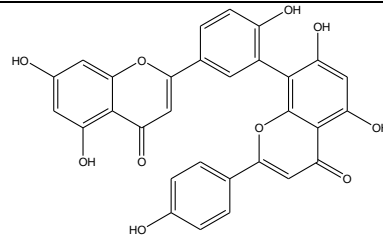
- 5) 1 - Quercitrina (R = Ramnose; R' = OH)  
2 - Galato de metila (R = Ramnose; R' = H)  
3 - Miricetina (R = H; R' = OH)  
(flavanonas)



- Atividade antioxidante

Ceruks et al., 2007

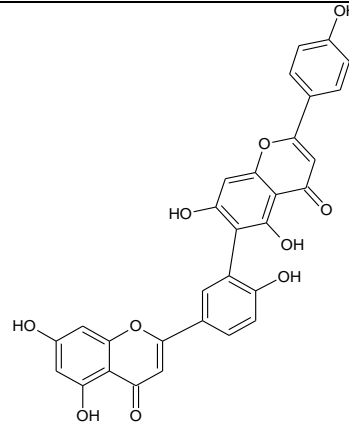
- 6) Amentoflavona  
(biflavona)



- Atividade alelopática

Barbosa et al., 2007

- 7) Tetrahydroamentoflavona  
(biflavona)



- Atividade alelopática

Barbosa et al., 2007

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O fracionamento do extrato metanólico bruto dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi para os dois trabalhos dessa tese é demonstrado de forma resumida na Figura 11. As descrições detalhadas de cada experimento executado são relatadas nas seções de Materiais e Métodos nos itens 5.1 (Trabalho 1) e 5.2 (Trabalho 2) da presente tese.

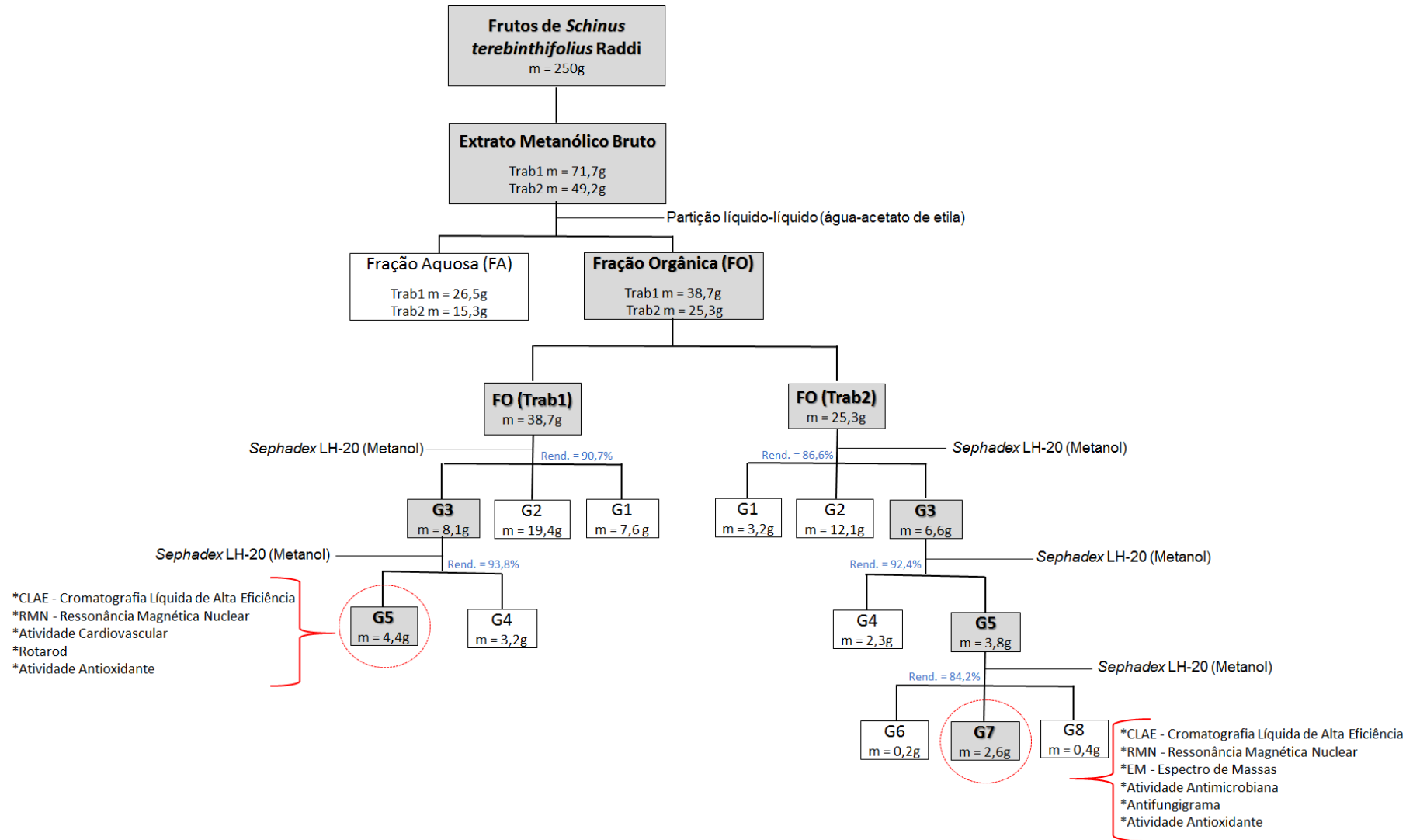


Figura 11 – Esquema do fracionamento do extrato bruto metanólico oriundo dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

## 5. TRABALHOS

### 5.1 Phenolic Compounds Present *Schinus terebinthifolius* Raddi Influence the Lowering of Blood Pressure in Rats \*

Lorena de Lima Glória<sup>1</sup>, Mariana Barreto de Souza Arantes<sup>1</sup>, Silvia Menezes de Faria Pereira<sup>1</sup>, Guilherme de Souza Vieira<sup>2</sup>, Camilla Xavier Martins<sup>2</sup>, Almir Ribeiro de Carvalho Junior<sup>3</sup>, Fernanda Antunes<sup>2</sup>, Raimundo Braz-Filho<sup>3</sup>, Ivo José Curcino Vieira<sup>3</sup>, Larissa Leandro da Cruz<sup>1</sup>, Douglas Siqueira de Almeida Chaves<sup>4</sup>, Silvério de Paiva Freitas<sup>5</sup> and Daniela Barros de Oliveira<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratório de Tecnologia de Alimentos, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes 28013-602, Brazil; lorena\_limagloria@hotmail.com (L.d.L.G.); mariana.arant@yahoo.com.br (M.B.d.S.A.); silvia@uenf.br (S.M.d.F.P.); larissa.leandrocruz@gmail.com (L.L.d.C); dbarrosoliveira@uenf.br (D.B.d.O)
- <sup>2</sup> Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal, CCTA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes 28013-602, Brazil; guilhermesv.medvet@gmail.com (G.d.S.V.); camilla.xm@gmail.com (C.X.M.); prfernandaantunes@yahoo.com.br (F.A.)
- <sup>3</sup> Laboratório de Ciências Químicas, CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes 28013-602, Brazil; almir@uenf.br (A.R.d.C.J.); braz@uenf.br (R.B.-F.); curcino@uenf.br (I.J.C.V.)

- <sup>4</sup> Laboratório de Química de Bioativos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23897-000, Brazil; chavesdsa@yahoo.com.br (D.S.d.A.C.)
- <sup>5</sup> Laboratório de Fitotecnia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes 28013-602, Brazil; silverio@uenf.br (S.d.P.F.)

\* Correspondence: dbarrosoliveira@uenf.br; Tel.: +55-22-2748-6517

Received: 28 September 2017; Accepted: 18 October 2017; Published: 23 October 2017

\* **Parte da tese de doutorado publicada na revista *Molecules* 2017, 22, 1792; doi:10.3390/molecules22101792.**

## ABSTRACT

This study identified two phenolic compounds in *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits: naringenin (first report in this species) and gallic acid. Their structures were elucidated by nuclear magnetic resonance (NMR) data (<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR) and a high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. A high content of phenolics (659.21 mg of gallic acid equivalents/g of sample - Folin-Ciocalteu method) and total flavonoids (140.69 mg of rutin equivalents/g of sample - aluminum chloride method) were quantified in *S. terebinthifolius*, as well as high antioxidant activity (77.47% - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH method). The antihypertensive activity related to its phenolic content was investigated. After intravenous infusion in Wistar rats, these phenolics significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the systolic, median, and diastolic arterial pressures of individuals. The rotarod test was performed to determine the mechanism of action of the sample vasorelaxant effect. It was found that its action exceeded that of the positive control used (diazepam). This confirmed the vasodilatory activity exerted by *S. terebinthifolius* fruits is related to the phenolic compounds present in the plant, which are potent antioxidants and inhibit oxidative stress, mainly in the central nervous system.

Keywords: *Schinus terebinthifolius* Raddi; Anacardiaceae; naringenin; gallic acid; blood pressure; rotarod.

## 1. Introduction

The World Health Organization (WHO) reported that about three-quarters of the world's population make use of medicinal plants to improve health [1]. Medicinal plants can be considered one of the oldest forms of health care [2,3].

*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, is a plant native to South America popularly known as Aroeira or Pink Pepper [4]. This species is one of 71 medicinal plants reported in the National Relation of Medicinal Plants (RENISUS), which are of interest to the Brazilian Unified Health System (SUS) [5]. This list was created to promote and acknowledge the popular use of medicinal plants with potential effect on primary health care [5].

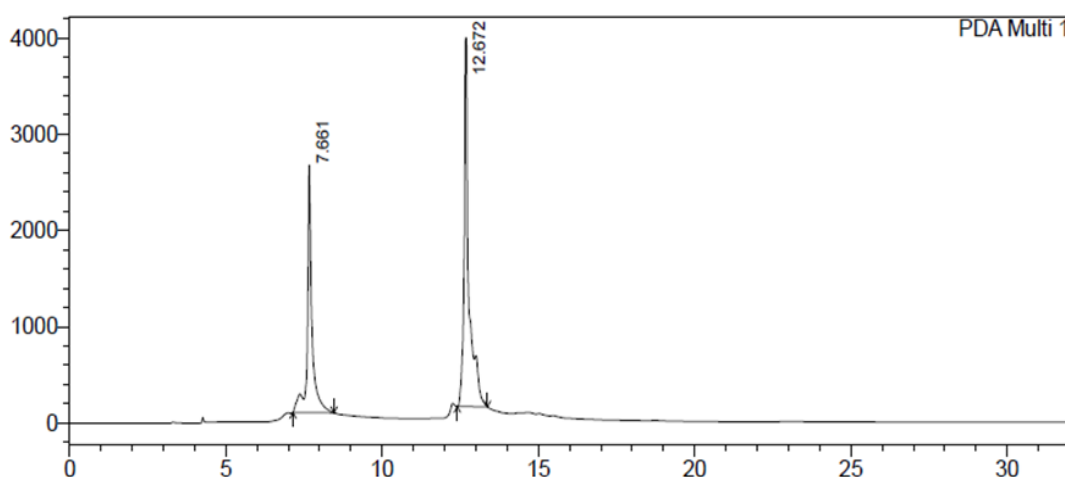
The discovery of biological activities attributed to phenolic compounds has been widely reported in several studies and has led the scientific community to carry out epidemiological studies on the likely associations between phenolic compounds and reduced risk for various diseases [6,7]. Natural compounds are responsible for the protective effect of cells against oxidative damage caused by Reactive Oxygen Species (ROS) [8]. Excess ROS in the body can cause a number of complications [7,8]. Antioxidants, which are responsible for neutralizing the effects of ROS and the scavenging of free radicals, may favor cardiovascular parameters in individuals [9,10].

Considering the importance of phenolic compounds and aiming to identify new natural sources with high biological potential, the total phenolics and flavonoids were quantified and the antioxidant activity and cardiovascular activity of the phenolic compounds in *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits was determined. The present work is the first report on flavonoid naringenin and the activities attributed to it in this species.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Identification and Structure Elucidation of the Major Compounds

The methanolic extract of *Schinus terebinthifolius* was partitioned into aqueous and organic fractions. The organic fraction was subjected twice to Sephadex LH-20 column chromatography to produce the G5 fraction, whose chemical profile was analyzed by High Performance Liquid Chromatography with a Diode-Array Detector (HPLC-DAD) (Figure 1).



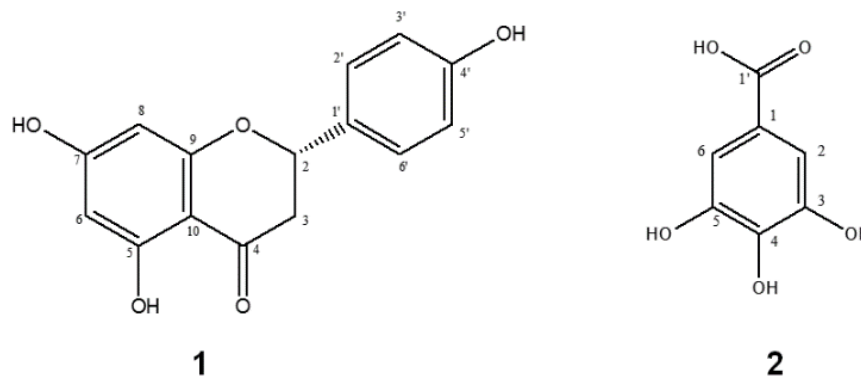
**Figure 1.** Chromatogram of the High Performance Liquid Chromatography with a Diode-Array Detector (HPLC-DAD) analysis of the investigated G5 fraction from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract (4.0 mg/mL) at wavelength of 254 nm. Analytical conditions: stationary phase: RP-18 reverse-phase column (5  $\mu$ m, 250 mm, 4.5 mm, Macherey-Nagel); temperature: 32  $^{\circ}$ C; mobile phase: A = purified water adjusted to pH 3.2 with phosphoric acid, B = acetonitrile; flow rate: 1.0 mL/min; detection: 254 nm; injection volume: 20  $\mu$ L; solvent composition during analysis: 0': 100% A; 5': 70% A; 10': 50% A; 15': 30% A; 20': 20% A; 25': 10% A; 30': 0% A; 32': stop.

The chromatogram shows two major peaks at retention times 7.7 and 12.7 min. Kanaze et al. (2004) validated a methodology for HPLC assay and identified naringenin at retention time 13.1 min, while Song et al. (2012) developed a methodology to determine phenols in HPLC and found gallic acid at the retention time 7.71 min [11,12].

Although Kanaze et al. (2004) and Song et al. (2012) have identified compounds with retention time close to those demonstrated in the present study, the authors did not use the same method of analysis developed by us, so without NMR analysis, we cannot be sure about identity of the analytes [11,12].

The prevailing compounds present in the G5 fraction of *S. terebinthifolius* were identified, namely, a flavonoid and a phenolic acid: naringenin (**1**) and gallic acid (**2**) (Figure 2). The phenolic compounds were identified by NMR analysis

(figures shown in Supplementary Material) and comparing their  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data with values in the literature [13,14]. Naringenin was reported for the first time in the fruits of this plant.



**Figure 2.** Chemical structures of compounds **1** and **2**.

Compound **1** was obtained as yellow powder.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  7.22 (2H, d, H-2' and H-6'), 6.70 (2H, d, H-3' and H-5'), 5.89 (1H, s, H-6), 6.05 (1H, s, H-8), 5.56 (1H, dd  $J = 6.1$  and  $2.1$  Hz, H-2), 3.16 (1H, m, H-3a), 2.80 (1H, br d  $J = 16.0$  Hz, H-3b).  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  196.9 (C-4), 167.1 (C-7), 164.0 (C-9), 163.6 (C-5), 157.9 (C-40), 129.0 (C-10), 128.2 (C-20 and C-60), 115.4 (C-30 and C-50), 102.2 (C-10), 96.2 (C-6), 95.4 (C-8), 79.1 (C-2), 42.8 (C-3). The data are in accordance with those published by Du et al. (2004) [13].

Compound **2** was obtained as yellow powder.  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6.92 (2H, s, H-2 and H-6).  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta_{\text{C}}$  165.9 (C-10), 145.9 (C-3 and C-5), 139.2 (C-4), 119.3 (C-1), 109.2 (C-2 and C-6). The data are in accordance with those published by Santana et al. (2012) [14].

Other researchers have identified gallic acid in leaves and stem bark of *S. terebinthifolius* [14,15], but there are no reports on the presence of naringenin flavanone in this species. The presence of 13',118-binaringenin in *S. terebinthifolius* was confirmed and allocated to the internal part of the fruit [16]. Some studies have identified only tetrahydrorobustaflavone [8] and tetrahydroamentoflavone [17] compounds in *S. terebinthifolius*, which are binaringenin linked at positions 6 and 5', respectively, and 130,118-binaringenin [18] and 13,113-binaringenin [19] in fruits of *Schinus molle* have been reported.



The present work is the first report on flavonoid naringenin and the activities attributed to it in this species.

## 2.2. Total Phenolic Compounds, Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity

Natural compounds are responsible for the protective effect of cells against oxidative damage caused by Reactive Oxygen Species (ROS) [20]. Excess ROS in the body can cause a number of complications such as lipid peroxidation in cell membranes, aggression to proteins and enzymes and DNA damage, which can trigger pathological processes, including cell aging, the onset of cancer, cardiovascular diseases and other chronic diseases [6,7,20]. Antioxidants, which are responsible for neutralizing the effects of ROS, can be mainly found in compounds derived from secondary metabolites from plant sources, such as phenolic compounds [10,21]. Hence the need to determine the antioxidant activity and content of total flavonoids and phenolics in plants, since this is an important step for the identification of possible sources of bioactive molecules.

Table 1 shows the content of total phenolic compounds, flavonoids and the antioxidant activity of the G5 fraction of *S. terebinthifolius* fruits using the Folin-Ciocalteu, aluminum chloride colorimetric assay and DPPH free radical methods, respectively. The results showed a significant phenolic content (over 650 mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g), a large amount of flavonoids (140.69 mg Rutin Equivalent (RE)/g), and high antioxidant activity (above 70%) for *Schinus terebinthifolius* fruits.

**Table 1.** Total phenolic compounds, total flavonoid content, and antioxidant activity of G5 fraction from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract.

	Total Phenolic Compounds (mg GAE*/g)	Total Flavonoid Content (mg RE**/g)	Antioxidant Activity (%)		
			1 mg/mL	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL
Fraction G5	659.21 ± 6.05	140.69 ± 9.44	77.5 ± 2.57	75.0 ± 6.78	69.2 ± 6.47
Quercetin	1214.71 ± 9.51	1009.27 ± 7.85	77.2 ± 0,73	74.1 ± 3.82	71.0 ± 3.63
BHT***			76.4 ± 1.98	75.0 ± 4.94	66.3 ± 4.20

Values are means of three determinations standard deviation. \*GAE = Gallic Acid Equivalent, \*\* Rutin Equivalent, \*\*\* BHT = Butylated hydroxytoluene.

The content of total phenolics found in the Aroeira fruits used in the present study was significantly higher than that reported in the literature for the same species for fruit extract: 110 mg GAE/g [21], leaf extract: 384.64 mg GAE/g [22], extract from the stem: 309.03 mg GAE/g [21], and extract from the bark: 207 mg GAE/g [21]. A study proved that the maceration method was almost 20 times more effective than the soxhlet method, and the solvent used (methanol) was also the most effective to determine the content of total phenolics in Aroeira fruits [21].

Tabaldi et al. (2016) found a value lower than that of our work for total flavonoids in the methanolic extract from Aroeira leaves: 111.81 mg of quercetin equivalent (QE)/g extract [23]. Fedel-Miyasato et al. (2014) studied the same type of extract and reported a much higher value: 460.20 mg QE/g [24]. This value is higher than that found by Uliana et al. (2016) for ethanolic extract from leaves of *S. terebinthifolius*: 69.67 mg QE/g of macerated extract and 243.09 mg QE/g of extract obtained with the use of assisted ultrasound technique [20].

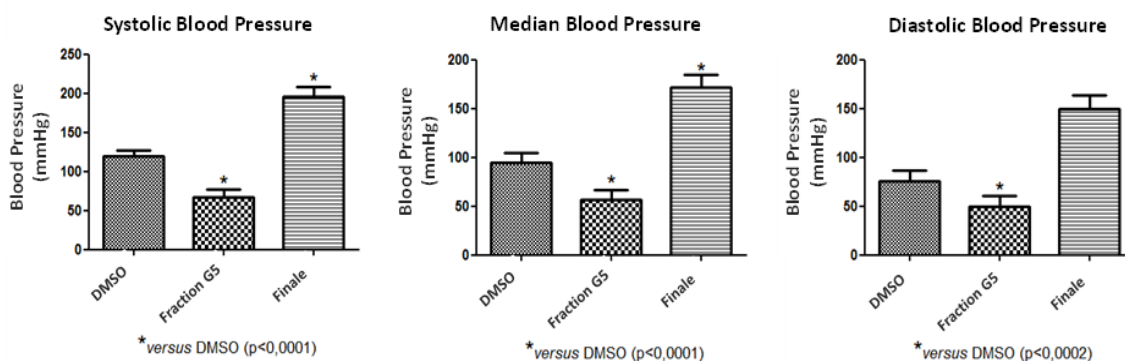
Generally, several assays have been frequently used to estimate antioxidant capacity in fruits and their products [25]. However, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method measures the ability to scavenge free radicals. The test is simple, relatively rapid, reproducible, and does not require specialized equipment, and thus can be used for assessing antioxidant activity in foods and plant extracts [26].

Ethanollic extract from different parts of Aroeira obtained by maceration showed the following approximate antioxidant activities: fruits—60%, stem—90%, peels—70%, and leaves—30% [21]. The methanolic extract from Aroeira fruits showed antioxidant activity of 95.6% by the DPPH method in the work of Bernardes et al. (2014) [27]. El-Massry et al. (2009) evaluated the antioxidant activity of ethanolic extract, dichloromethane extract and essential oil from Aroeira leaves and observed that the ethanolic extract presented the highest antioxidant activity, with free radical sequestration above 80% [25].

Differences in the obtained values may be due to many factors. For example, climate conditions and fruit variety as well as processing methods (extraction, filtration, isolation), and storage conditions (air, temperature) can cause changes in the composition of phenols [8,28]. Furthermore, the antioxidant capacity of biomolecules is significantly influenced by the structure. The activity may be attributed to the enhanced stabilization of the radical state during electron transfer [10,20]. The present work is the first report on flavonoid naringenin and the activities attributed to it in this species.

### *2.3. In Vivo Blood Pressure Assessment*

Phenolic compounds are the main compounds related to antioxidant activity, and the scavenging of free radicals caused by this activity may favor cardiovascular parameters in individuals. An intravenous infusion of the G5 fraction was administered in rats to investigate if this sample may cause changes in blood pressure. After the administration of the infusion of G5, all parameters analyzed were significantly reduced compared to the final pressure and the control (DMSO) in Wistar rats at 5% probability (Figure 3). Comparison between pressure after G5 infusion and final pressure showed that the systolic pressure decreased by 128.3 mmHg, the median pressure decreased by 115.4 mmHg and the diastolic pressure decreased by 100.3 mmHg ( $p < 0.05$ ). Comparison between G5 pressure and the DMSO control showed that the systolic pressure was reduced by 51.72 mmHg, the median pressure decreased by 37.83 mmHg and the diastolic pressure decreased by 26.35 mmHg ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** Effects of the G5 fraction (30 mg/kg) from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract on the blood pressure of Wistar rats. Systolic blood pressure (SBP), median blood pressure (MBP), diastolic blood pressure (DBP). The values are expressed as mean  $\pm$  SEM from eight experiments. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test (\*  $p < 0.05$  compared to control).

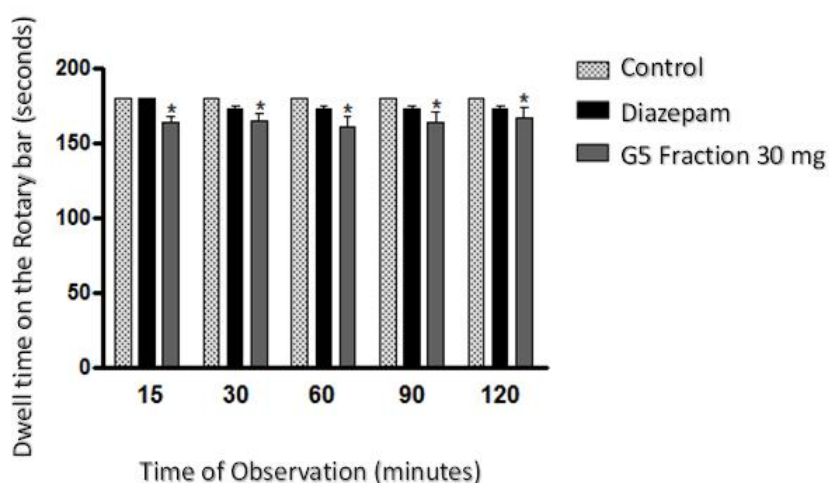
In this paper, it has been shown that G5 is a compound that induces blood pressure decrease in rats evaluated *in vivo* by intravenous administration. Hypertension is an important public health problem and is one of the most common cardiovascular diseases [29]. Phenolic compounds, which perform antioxidant activity, have already been associated with coronary vasodilator activity [9,29]. This stresses the relevance of developing new specific antihypertensive drugs with potential for clinical use.

The possible mechanisms by which phenolic compounds perform cardiovascular activity have led to studies on free radical sequestration, inhibition of lipid peroxidation, and enzymatic activities [9,30]. Phenols also inhibit platelet aggregation and the oxidation of LDL cholesterol and promote vasodilation, thus ensuring the integrity of blood vessels [9,31].

There are no reports in the literature on cardiovascular activity for any species of *Schinus* spp. However, for other species of the Anacardiaceae family, the following is described: aqueous extract of bark stem of *Anacardium occidentale* was administered intravenously in rabbits and significantly reduced arterial pressure and the contractile activity of the isolated heart of rat, thus presenting *in vivo* hypotensive activities and *in vitro* cardio-inhibitory activity [32]. Aqueous extract from the *Harpephyllum caffrum* stem significantly reduced systemic arterial pressures and heart rates in hypertensive rats after intravenous administration of the extract. The hypotensive effects are believed to be related to the presence of polyphenolic compounds and flavonoids in the plant [33].

Extracts from leaves of *Sclerocaryabirrea* showed a significant antagonistic effect on calcium release due to the vasorelaxing effect observed in arterial vessels of rats, since calcium ions are responsible for the contraction of the smooth muscle [34].

In the present study, it was also observed that the administration of the G5 fraction significantly affected ( $p < 0.0001$ ) the motor incoordination of the mice (performance in rotarod) (Figure 4). As the time of permanence of G5 in the rotating bar was shorter than that of animals using diazepam, which is the positive control with activity on the central muscle relaxation, it is concluded that this sample has a more direct action on the central nervous system, with an effect on the peripheral musculature. If the time of permanence in the bar had been equal to that obtained with diazepam, the action would have been only on the peripheral plate.



\*versus Control and Diazepam ( $p < 0.0001$ )

**Figure 4.** Effects of the G5 fraction (30 mg/kg) *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract on Swiss mice (*Mus musculus*) in the Rotarod test. The values are expressed as means  $\pm$  SEM of ten experiments. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test (\*  $P < 0.05$  compared to the control).

Treatment with G5 produced hypolocomotion, increased immobility and muscular incoordination, with activity mainly observed on the central nervous system of the mice. These findings contradict previous studies reporting that the extract from the *S. terebinthifolius* stem bark alleviated the effects of rat motor incoordination caused by the administration of rotenone in the rotarod test [15],

and that mangiferin isolated from the bark of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) did not produce any significant effect on motor coordination in rotarod in rats indicating that the observed antinociception was not related to sedation or motor anomaly, but to the peripheral antinociceptive activity [35].

According to Seaman (2000), the locomotor impairment produced by G5 may be related to reduced energy levels and consequent changes in neural processing [36]. The brain is highly susceptible to free radical damage due to its high rate of oxygen utilization and the relatively low presence of antioxidant enzymes and free radical scavengers. There is a growing interest in the establishment of therapeutic and dietary strategies to combat oxidative stress induced by damage mainly to the central nervous system [15]. Oxidative stress is a result of an imbalance between free radicals, and may be ameliorated by the endogenous action of antioxidant defense systems [21]. Thus, the discovery of new natural sources rich in phenolic compounds and presenting antioxidant potential can prove the efficacy of the plants used in popular medicine, whose biological activities are scientifically proven. The present work is the first report on flavonoid naringenin and the activities attributed to it in this species.

### **3. Materials and Methods**

#### *3.1. General Experimental Procedures*

$^1\text{H}$  (500 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) NMR data were obtained on a Bruker Advance II 9.4 T instrument (Centro de Ciências e Tecnologia, UENF) using  $\text{DMSO-}d_6$  as solvent. Chromatographic purifications were carried out by using Sephadex LH-20 (25–100  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich). High Performance Liquid Chromatography analyses were performed using a Shimadzu Prominence HPLC system with two LC10AT pumps, a scanning ultraviolet SPD-M10A photodiode array detector and a Rheodyne 7725i injector. The reverse-phase column used was an RP-18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm, 4.5 mm i.d., Macherey-Nagel). Temperature: 32°C. Mobile phase: A = purified water adjusted to pH 3.2 with phosphoric acid, B = acetonitrile was used as eluent. Flow elution rate was 1.0 mL/min; 20  $\mu\text{L}$  of the samples (4 mg/mL) were injected, detection: 254 nm. Solvent composition during analysis: 0': 100% A; 5': 70% A; 10': 50% A; 15': 30% A; 20': 20% A; 25':

10 % A; 30': 0% A; 32': stop. The UV/VIS (ultraviolet–visible) spectrophotometer (Epoch - Biotek - versão: Gen 5 1:10) was used. The hemodynamic parameters were measured using the Bioamp equipment from Adinstruments, and Graph Labsoftware (version 7.0; ADInstruments). The automated Rota Rod instrument (EFF 411, Insight®) was used.

### 3.2. Chemicals

Deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO- $d_6$  purity > 99%), Folin-Ciocalteu reagent, Butylated hydroxytoluene (BHT 99% purity), 2,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH purity  $\geq$  99%), gallic acid and rutin, quercetin (purity of standards  $\geq$  99%) were all purchased from Sigma-Aldrich. Merck acetonitrile (HPLC purity  $\geq$  99.9%) was obtained from Merck. The anhydrous sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) was obtained from Synth. Aluminum chloride hexahydrate ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) was purchased from VETEC. Isoflurane 100% and diazepam (5mg/mL) were obtained from Cristália, heparin 5000 IU/mL from Blaú - Cristal Pharma laboratory, sodium chloride (NaCl 0.9%) was purchased from Sanobiol. The other chemical reagents were purchased from VETEC.

### 3.3. Animals

The tests were performed on male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 250 and 300 g, and male Swiss mice (*Mus musculus*) weighing between 25 and 30 g, from the Animal Experimentation Unit of the Universidade Estadual do Norte Fluminense (UEA - UENF), kept in an environment with controlled temperature, 19 °C, humidity of 50 to 60% and light/dark cycle of 12 hours. Water and food were offered ad libitum. The present study was approved by the UENF Ethics Committee for Animal Use (CEUA), registered under protocol number 353. Each animal was used in only one experiment.

### 3.4. Plant Material

The fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi were collected in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil (Latitude 21°44'S and 41°18'W; Altitude 12m above sea level) in April, 2014. A voucher specimen was identified and deposited at the UENF herbarium under the code H5073.

### 3.5. Extraction and Isolation

The fruits of *S. terebinthifolius* (250g) were cleaned, washed and subjected to methanol extraction (10% w/v) by static maceration for 30 days. Every seven days, the solvent was filtered through a paper filter (QUANTY number 41), placed to evaporate in water bath at 35 °C and protected from light [37] so as to obtain the crude extract (71.7g). Then, the crude extract was partitioned with ethyl acetate resulting in two fractions: aqueous and organic. The organic fraction was rotary evaporated at 40 °C. The fractionation of the organic fraction (38.7g) occurred in open *Sephadex* LH-20 Chromatographic Column using methanol as the eluent, which resulted in three fractions: G1 (7.6g), G2 (19.4g) and G3 (8.1g). The G3 fraction was injected again into the *Sephadex* LH-20 column with methanol, and two more fractions were obtained: G4 (3.2g) and G5 (4.4g). The fraction G5 was the one used in the present work due to the profile shown in Thin Layer Chromatography similar to flavonoids and phenolic compounds.

### 3.6. Total Phenolic Compounds

The total phenolic compounds were determined by the Folin-Ciocalteu method previously described by Singleton et al. (1999) with modifications, using gallic acid calibration curve concentrations from 0 to 500 µg/mL [38]. An aliquot of 0.1 mL of sample diluted in methanol (1.0 mg/mL) was added in 1.0 mL of methanol and 0.1 mL of the Folin-Ciocalteu reagent. The mixture was homogenized and received the addition of 1.0 mL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) after 5 minutes. The reaction occurred for 90 minutes, in the dark, at room temperature. The absorbance was read at 760 nm and the results were expressed in milligrams of gallic acid equivalents (mg GAE/g) per gram of sample.

### 3.7. Total Flavonoid Content



Total flavonoids were established by a colorimetric assay described by Woisky and Salatino (1998) with modifications [39]. An aliquot of 7.5 mL of sample (0.1 mg/mL in methanol) was added to 0.5 mL of  $\text{AlCl}_3$  (5% w/v) and then to 25 mL of methanol. Absorbance reading was performed at 425 nm after 30 minutes at rest. The flavonoid content was calculated using rutin calibration curve concentrations from 0 to 100 mg/mL. The results were expressed in milligrams of rutin equivalents per gram of sample (RE/g).

### 3.8. Antioxidant Activity

The antioxidant activity was determined by the stable free radical DPPH method (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) [26]. The samples were prepared in methanol at 2, 0.2 and 0.02 mg/mL. Samples (0.5 mL) were added to 0.5 mL methanolic solution of DPPH (4%) to final concentrations of 1, 0.1 and 0.01 mg/mL. The reaction was incubated in darkness, for 60 minutes at 25 °C. The absorbance values were measured at 515 nm. The radical scavenging activity (% inhibition) was expressed as percentage of scavenged DPPH and calculated according to the following equation: % of Inhibition =  $[(\text{ADPPH} - \text{Asample}) / \text{ADPPH}] \times 100$ , where ADPPH is the absorbance of DPPH solution (negative control) and Asample is the absorbance of the sample in the presence of DPPH. BHT and quercetin were used as positive controls.

### 3.9. In vivo Blood Pressure Assessment

Wistar rats were anesthetized by inhalation with isoflurane and contained for catheter insertion in the left carotid artery, through which the parameters analyzed were measured: systolic, median and diastolic blood pressure. The cannula was heparinized with a sodium heparin solution and 0.9% sodium chloride in order to avoid blood clotting. Another catheter was inserted into the jugular vein for intravenous infusion of the G5 fraction at a dose of 30 mg/kg diluted in DMSO with a volume of 0.1 mL per animal. Prior to the tests, DMSO alone was infused at the same dose to serve as a control so as to eliminate the hypotensive effects of DMSO on the results.

### 3.10. Rotarod Test

The Swiss mice (*Mus musculus*) were previously tested on the rotating bar. Those that fell two or more times in three-minute period were discarded. After the selection of the animals, the G5 fraction and the diazepam positive control were administered intraperitoneally, 0.1 mL volume and 300 mg/mL concentration in DMSO.

Each individual was placed with all four legs on a rotating bar of 8 cm diameter, 20 cm from the bottom of the equipment, already in motion (20 rpm). The time they could balance before falling was measured. The mice were observed at the times of 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after sample administration, and remained on the rotating bar for three minutes. At the fall, the chronometer used to verify the time of equilibrium would stop automatically, the animals returned to their respective bars and the chronometer would be reactivated, so that the total falls would be counted after the three minutes, while a general timer measured the total time of the test (120 minutes).

### 3.11. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicates and the results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The results obtained were tabulated by the LabChart 7 program, and statistically analyzed through the GraphPadPrisma 5. The analysis of variance (ANOVA) was defined, followed by the Newman-Keuls and Bonferroni mean test, with reliability index of 95%.

## 4. Conclusions

This study provides evidence for the pharmacological antihypertensive and antioxidant potential of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract. Phytochemical investigations identified two major compounds of the G5 fraction from methanolic extract: naringenin (first report in this species) and gallic acid, which were analyzed for the first time by inducing blood pressure decrease evaluated *in vivo*. Phenolic compounds present in *S. terebinthifolius* were

identified as a promising natural source to combat cardiovascular and related diseases.

**Supplementary Materials:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - and  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ NMR spectra, COSY, HSQC and HMBC spectra correlations, and structures of compound **1** and **2** assembled with the aid of COSY correlations are available as Supplementary Materials available online.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) by grant and for project financial support; to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), and UENF for research fellow ships and the financial support.

**Author Contributions:** L.d.L.G. and D.B.d.O. conceived and designed the experiments; A.R.d.C.J., R.B.-F., and I.J.C.V. performed the experiments on NMR analysis; L.d.L.G. and S.M.d.F.P. performed the analysis on HPLC; L.d.L.G. and M.B.d.S.A. performed the phenolic compounds, flavonoid content and DPPH tests; L.d.L.G., F.A., G.d.S.V., and C.X.M. performed the antihypertensive analysis; L.d.L.G., L.L.d.C., D.B.d.O., D.S.d.A.C., and S.d.P.F. wrote the article.

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

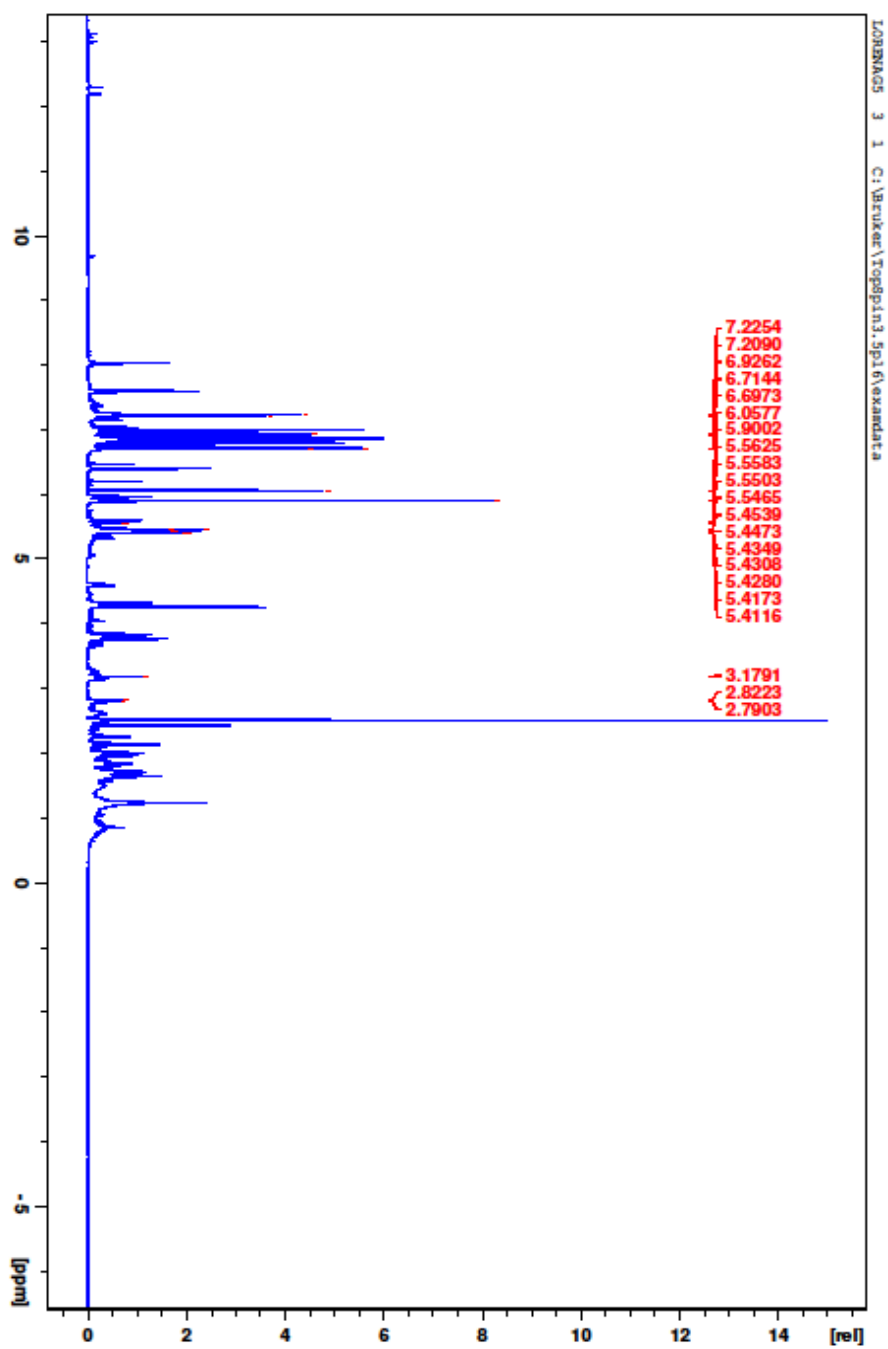
## References

1. Bae, J.W.; Kim, D.H.; Lee, W.W.; Kim, H.Y.; Son, C.G. Characterizing the human equivalent dose of herbal medicines in animal toxicity studies. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *162*, 1–6.
2. Holtmann, G.; Talley, N.J. Herbal medicines for the treatment of functional and inflammatory bowel disorders. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *13*, 422–432.
3. Farzaneh, V.; Carvalho, I.S. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *65*, 247–258.
4. Corrêa, M.P. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **1984**, v. 6, 170-171.
5. DiCiaula, M.C.; Lopes, G.C.; Scarminio, I.S.; De Mello, J.C.P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. *Quim. Nova* **2014**, *37*, 158–163.
6. Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Novel Functional Food Ingredients from Marine Sources ScienceDirect Novel functional food ingredients from marine sources. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *2*, 123–129.

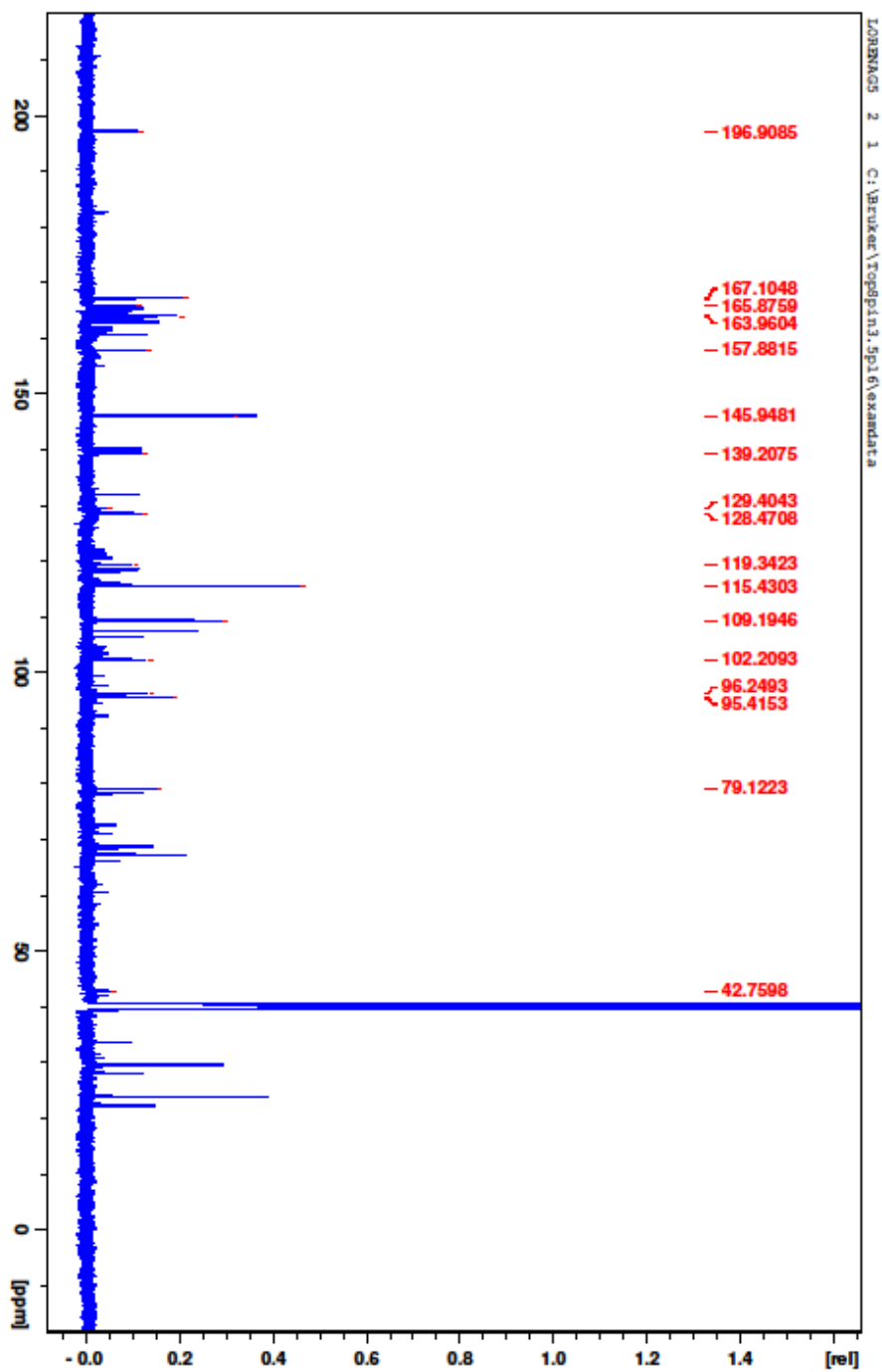
7. Haytowitz, D.B.; Bhagwat, S.; Holden, J.M. Sources of variability in the flavonoid content of foods. *Procedia Food Sci.* **2013**, *2*, 46–51.
8. Kassem, M.E.S.; El-Desoky, S.K.; Sharaf, M. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, *40*, 447–450.
9. Penso, J.; Cordeiro, K.C.F.A.; Da Cunha, C.R.M.; Da Silva Castro, P.F.; Martins, D.R.; Lião, L.M.; Rocha, M.L.; De Oliveira, V. Vasorelaxant activity of 7- $\beta$ -O-glycosides biosynthesized from flavonoids. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *733*, 75–80.
10. Ali, S.S.; Kasoju, N.; Luthra, A.; Singh, A.; Sharanabasava, H.; Sahu, A.; Bora, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 1–15.
11. Kanaze, F.I.; Kokkalou, E.; Georgarakis, M.; Niopas, I. A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 175–181.
12. Song, R.; Cheng, Y.; Tian, Y.; Zhang, Z.J. A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of gallic acid, catechin and epicatechin in rhubarb decoction. *Chin. J. Nat. Med.* **2012**, *10*, 275–278.
13. Du, Q.Z.; Jerz, G.; Winterhalter, P. Preparation of three flavonoids from the bark of *Salix alba* by high-speed countercurrent chromatographic separation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, *27*, 3257–3264.
14. Santana, J.S.; Sartorelli, P.; Lago, J.H.G.; Matsuo, A.L. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae). *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2245–2248.
15. Sereniki, A.; Linard-Medeiros, C.F.B.; Silva, S.N.; Silva, J.B.R.; Peixoto Sobrinho, T.J.S.; da Silva, J.R.; Alvesa, L.D.S.; Smailic, S.S.; Wanderley, A.G.; Lafayette, S.S.L. *Schinus terebinthifolius* administration prevented behavioral and biochemical alterations in a rotenone model of Parkinson's disease. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2016**, *26*, 240–245.
16. Feuereisen, M.M.; Gamero Barraza, M.; Zimmermann, B.F.; Schieber, A.; Schulze-Kaysers, N. Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. *Food Chem.* **2017**, *214*, 564–571.
17. Skopp, G.; Schwenker, G. Biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Zeitschrift für Naturforsch. B* **1986**, *41*, 1479–1482.
18. Ono, M.; Yamashita, M.; Mori, K.; Masuoka, C.; Eto, M.; Kinjo, J.; Ikeda, T.; Yoshimitsu, H.; Nohara, T. Sesquiterpenoids, triterpenoids, and flavonoids from the fruits of *Schinus molle*. *Food Sci. Technol. Res.* **2008**, *14*, 499–508.
19. Yueqin, Z.; Recio, M.C.; Máñez, S.; Giner, R.M.; Cerdá-Nicolás, M.; Ríos, J.L. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. *Planta Med.* **2003**, *69*, 893–898.
20. Uliana, M.P.; Fronza, M.; da Silva, A.G.; Vargas, T.S.; de Andrade, T.U.; Scherer, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *83*, 235–240.
21. Ribeiro, P.; Fernandez, L.; Loureiro, M.; Simões, R.; de Castro, R.; D'Sousa' Costa, C. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacogn. Mag.* **2015**, *11*, 607.
22. Bulla, M.K.; Hernandez, L.; Baesso, M.L.; Nogueira, A.C.; Bento, A.C.; Bortoluzzi, B.B.; Serra, L.Z.; Cortez, D.A.G. Evaluation of photoprotective potential and percutaneous penetration by photoacoustic spectroscopy of the *Schinus terebinthifolius* Raddi extract. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 558–566.
23. Tabaldi, L.A.; Vieira, M.C.; Zárata, N.A.H.; Formagio, A.S.N.; Pilecco, M.; Silva, L.R.; Santos, K.P.; Santos, L.A.C.; Cardoso, C.A.L. Biomass yield and flavonoid and phenol content of *Schinus terebinthifolius* cultivated in single or double row with poultry litter. *Ciência Florest.* **2016**, *26*, 787–796.
24. Fedel-Miyasato, L.E.S.; Kassuya, C.A.L.; Auharek, S.A.; Formagio, A.S.N.;

- Cardoso, C.A.L.; Mauro, M.O.; Cunha-Laura, A.L.; Monreal, A.C.D.; Vieira, M.C.; Oliveira, R.J. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2014**, *24*, 565–575.
25. El-Massry, K.F.; El-Ghorab, A.H.; Shaaban, H.A.; Shibamoto, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5265–5270.
26. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
27. Bernardes, N.R.; Heggdorne-Araújo, M.; Borges, I.F.J.C.; Almeida, F.M.; Amaral, E.P.; Lasunskaja, E.B.; Muzitano, M.F.; Oliveira, D.B. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2014**, *24*, 644–650.
28. Šamec, D.; Piljac-Žegarac, J. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures-Comparison with blackberries, white and red grapes. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2011**, *131*, 15–21.
29. Torres-Piedra, M.; Figueroa, M.; Hernández-Abreu, O.; Ibarra-Barajas, M.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S. Vasorelaxant effect of flavonoids through calmodulin inhibition: *Ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* approaches. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, *19*, 542–546.
30. Lobo De Andrade, D.M.; Reis, C.D.F.; Castro, P.F.D.S.; Borges, L.L.; Amaral, N.O.; Torres, I.M.S.; Rezende, S.G.; Gil, E.D.S.; Cardoso Da Conceicao, E.; Pedrino, G.R.; Lavorenti Rocha, M. Vasorelaxant and hypotensive effects of jaboticaba fruit (*Myrciaria cauliflora*) extract in rats. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**.
31. Wang, T.; Li, Q.; Bi, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* **2017**.
32. Tchikaya, F.O.; Bantsielé, G.B.; Kouakou-Siransy, G.; Datté, J.Y.; Yapo, P.A.; Zirihi, N.G.; Offoumou, M.A. *Anacardium occidentale* Linn. (Anacardiaceae) stem bark extract induces hypotensive and cardio-inhibitory effects in experimental animal models. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2011**, *8*, 452–461.
33. Ojewole, J.A. Hypoglycaemic and hypotensive effects of *Harpephyllum caffrum* Bernh ex CF Krauss (Anacardiaceae) stem - bark aqueous extract in rats. *Cardiovasc. J. South Africa* **2006**, *17*, 67–72.
34. Belemtougri, R.G.; Constantin, B.; Cognard, C.; Raymond, G.; Sawadogo, L. Effects of *Sclerocarya birrea* (A. rich) hochst (Anacardiaceae) leaf extracts on calcium signalling in cultured rat skeletal muscle cells. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 247–252.
35. Lopes, S.C.; Da Silva, A.V.L.; Arruda, B.R.; Morais, T.C.; Rios, J.B.; Trevisan, M.T.S.; Rao, V.S.; Santos, F.A. Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: Role of endogenous opioids, KATP-channels and adenosine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2013**, *110*, 19–26.
36. Seaman, R.L. Effects of acute systemic 3-nitropropionic acid administration on rat activity and acoustic startle. *Neurosci. Lett.* **2000**, *280*, 183–186.
37. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analysis Chemists. **1995**, 957p.
38. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Method Enzymol*; **1999**; 299, 152–178.
39. Woisky, R.G.; Salatino, A. Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* **1998**, *37*, 99–105.

***Supplementary Materials***

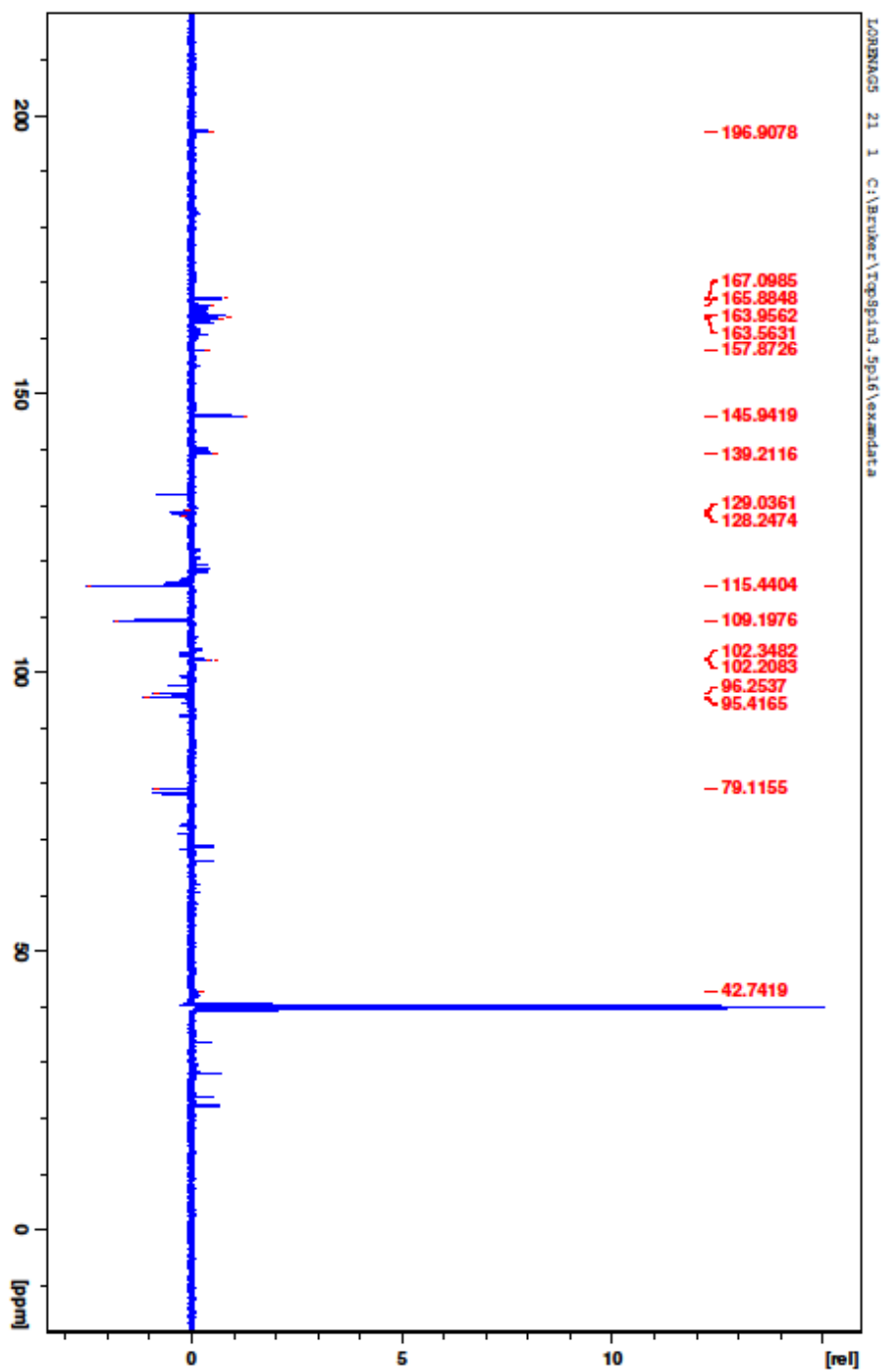


**Figure S1:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **1** and **2** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

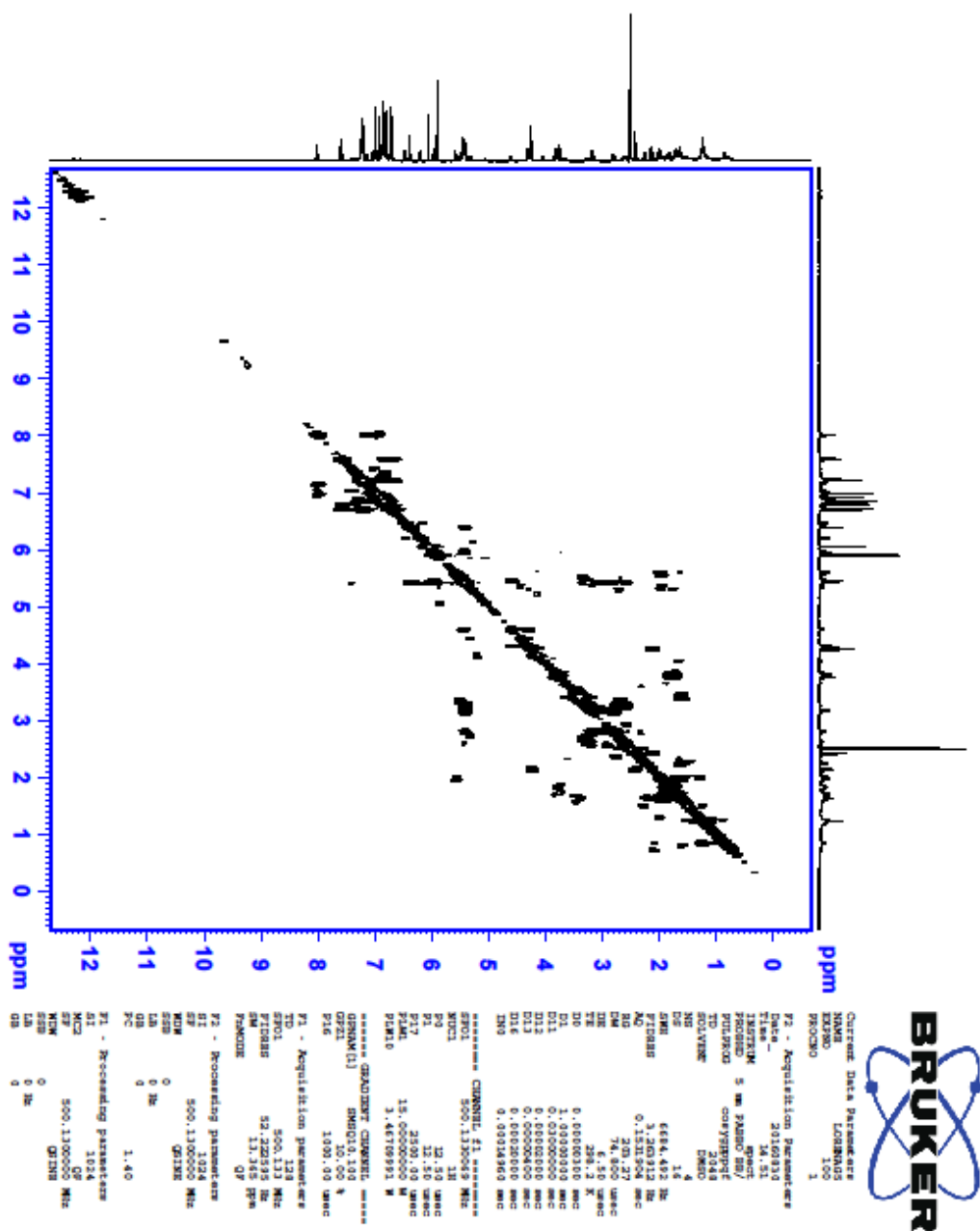


**Figure S2:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 1 and 2 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

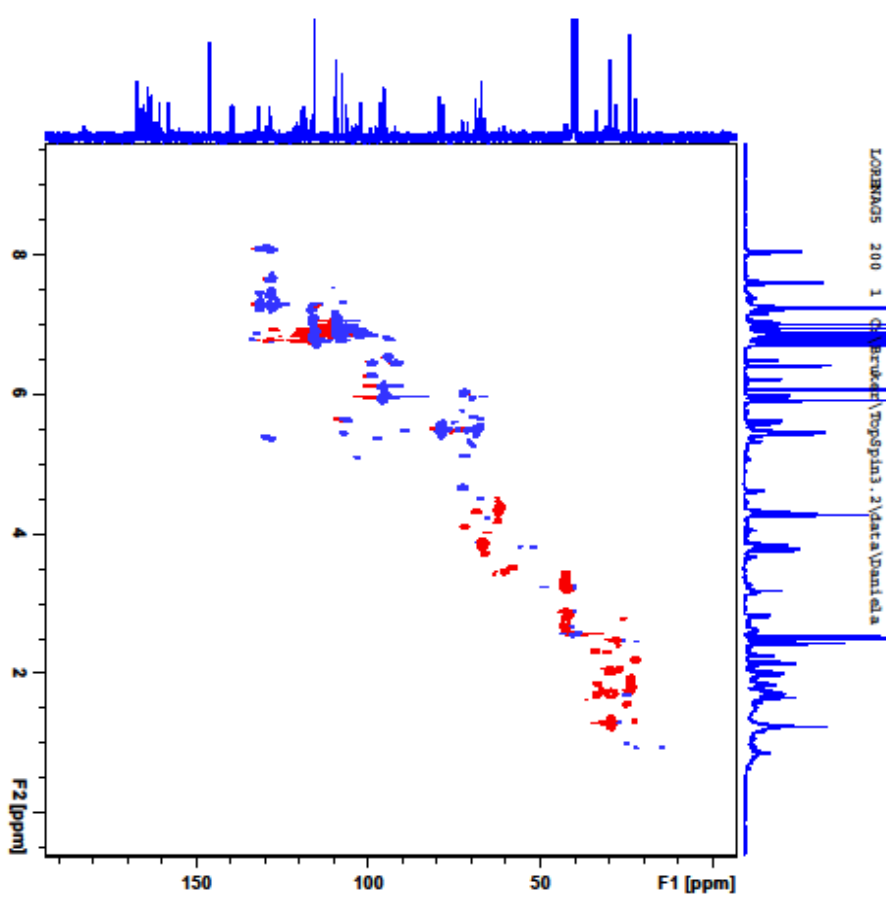




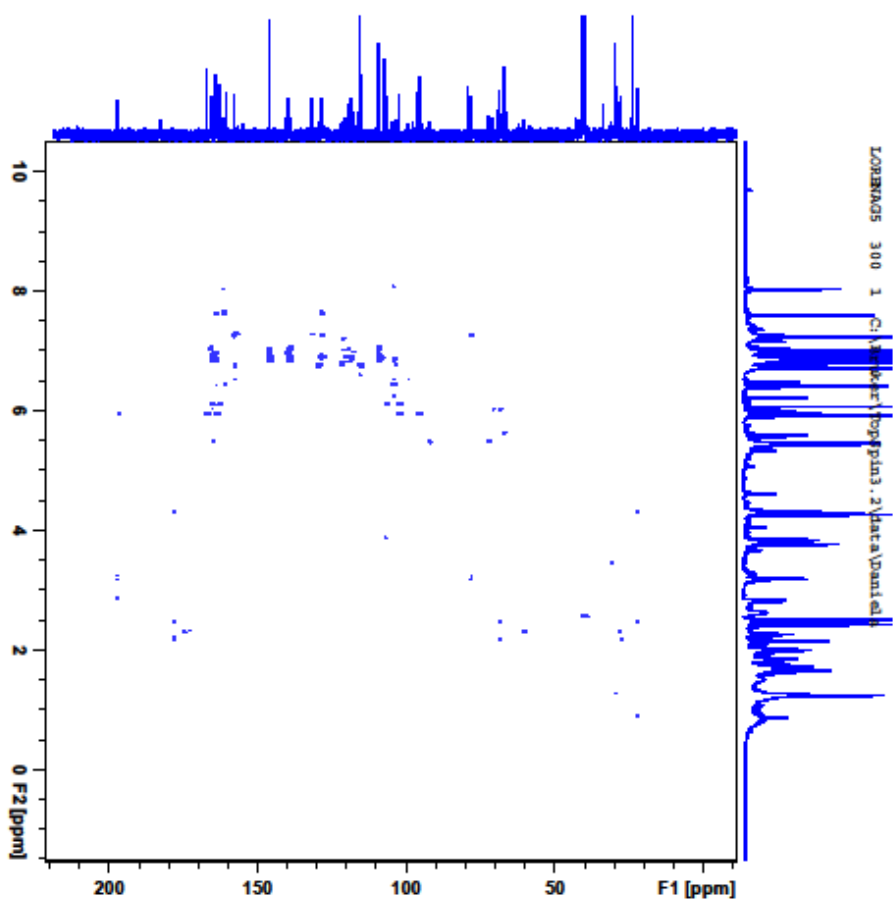
**Figure S3:**  $^{13}\text{CDEPTQ}$  NMR spectrum of compound **1** and **2** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz).



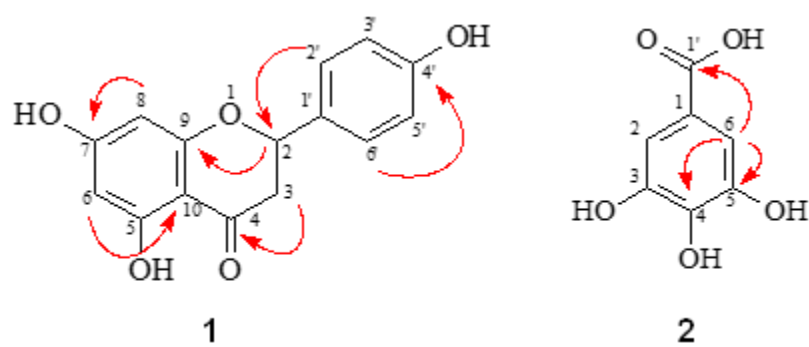
**Figure S4:** COSY spectrum of compound 1 and 2 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figure S5:** HSQC spectrum of compound 1 and 2 (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figure S6:** HMBC spectrum of compound **1** and **2** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figure S7:** Structures of compound **1** and **2** assembled with the aid of COSY correlations.

## 5.2 Identification of the chemical substance responsible to the antifungal action of *Schinus terebinthifolius* Raddi

Lorena L. Glória-das-Virgens<sup>a</sup>, Mariana B.S. Arantes<sup>a</sup>, Solange S. Samarão<sup>b</sup>,  
Silvia M. F. Pereira<sup>a</sup>, Larissa L. Cruz<sup>a</sup>, Almir R.C. Junior<sup>c</sup>, Ivo J.C. Vieira<sup>c</sup>, Olney  
Vieira-da-Motta<sup>b</sup>, Daniela B. Oliveira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratório de Sanidade Animal (LSA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil*

<sup>c</sup> *Laboratório de Ciências Químicas (LCQ), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil*

\* Corresponding author: Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Av. Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. Tel.: +55-22-2748-6517.

E-mail addresses: lorena\_limagloria@hotmail.com (L.L.Glória-das-Virgens), mariana.arant@yahoo.com.br (M.B.S.Arantes), solangesamarao@gmail.com (S.S.Samarão), silvia@uenf.br (S.M.F.Pereira), larissa.leandrocruz@gmail.com (L.L.Cruz), almir@uenf.br (A.R.C.Junior), curcino@uenf.br (I.J.C.Vieira), olney.motta@gmail.com (O.Vieira-da-Motta), dbarrosoliveira@uenf.br (D.B.Oliveira).

## ABSTRACT

*Ethnopharmacological relevance:* *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) is a species which is widely used for the treatment and prevention of several pathologies in the popular medicine worldwide. As considering its biological applications, mainly based on ethnobotanical studies, this plant was included in the Farmacopeia Brasileira since its first edition, in 1926. This species is one of 71 medicinal plants reported in the National Relation of Medicinal Plants (RENISUS), which are of interest to the Brazilian Unified Health System (SUS).

*Aim of the study:* The use of *S. terebinthifolius* to treat microbial diseases is a common practice. This work aimed to isolate and identify the compound of this plant which inhibits microbial growth, assess synergic effects of the association of synthetic antibiotic compounds and assess if this effect could be associated with oxidative stress.

*Material and methods:* The fractioning of the methanolic extract of the fruits of *S. terebinthifolius* was performed by liquid-liquid partitioning after isolation of the active compound by opened column chromatography. The chemical profile and UV-Vis spectrum of the isolated substance were verified by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) and its structure defined by the combination of combination of advanced Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS). Antimicrobial activity was determined by the inhibition of microbial growth in liquid medium using 0.5 mg/mL sample, followed by antifungigram test. The antioxidative action was assessed by DPPH method.

*Results:* The isolated substance was identified as the biflavone amentoflavone. This compound was active to inhibit the growth of the fungi *Candida kefyr* (81.4 CFU) and *Candida parapsilosis* (152.6 CFU). Besides this, the substance had synergic effect as associated to all the tested antifungal substances. The compound had an antioxidant result (57.61%) causing inhibition of the oxidative stress.

**Conclusions:** The amentoflavone which was isolated from the fruits of *S. terebinthifolius* inhibits the growth of the fungi *C. kefyr* e *C. parapsilosis*. Its action was to favor (to cause) oxidative stress inhibiting the growth of the fungi.

**Keywords:** Anacardiaceae; *Schinus terebinthifolius* Raddi; amentoflavone; antifungal activity; *Candida* spp; antifungal agents susceptibility.

## 1. Introduction

The social and cultural context of each population influence and determines the practices of health care along the history. The man always searched for products in the natural environment, which could improve his live conditions and increase his chances of survival (Wannes and Marzouk, 2016).

It is widely known, most of the world population use medicinal plants for primary health cares. A significant part of the users of traditional medicine belongs to developing countries, motivated by the maintenance of cultural or religious traditions, by the availability of a great botanic diversity, the low cost and the lack of access to the modern medicine (Moura-Costa et al., 2012).

Brazil has vast biodiversity of plants in all the country. There are approximatively 350-550 thousand species have been described. Among these, 55 thousand have been classified (Torres et al., 2016). The therapeutic knowledge of the traditional use of medicinal plants is a common practice, which is transmitted along the generations, to prevent and to treat several health disturbances (Barbieri et al., 2014).

*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), also known as pink pepper is a native species of Brazilian flora, widely diffused in all the territory of the country (Silva et al., 2017). This species has also been described in several other parts of the world, such as South and Central America, Mediterranean Europe, Africa and USA (Fedel-Miyasato et al., 2014). This species was included in the *Farmacopeia Brasileira* since its first edition, in 1926, as given the importance of its study and its biological applications in traditional medicine (Silva et al., 2017). This same species is found in the RENISUS (National list of the plants of the



interest of the united health system of Brazil: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS): a program of Brazilian Ministry of Health to promote and recognize popular and traditional medical practices of medical plants and home-made remedies use (DiCiaula et al., 2014).

In popular medicine, the shell of the bark (cortex) and leaves of *S. terebinthifolius* are used to stimulate the healing of wounds, for the treatment of ulcerations and have anti-inflammatory properties (Sartorelli et al., 2012). Infusions and decoctions of this plant are used for the treatment of bacterial infections (El-Massry et al., 2009). The fruits of this plant have also already been described as having antioxidative and antitumoral properties (Bernardes et al., 2014; El-Massry et al., 2009). Observations of the traditional application of this species fostered some authors to perform *in-vitro* experiences to prove the efficiency of this plant to inhibit the growth of some microorganisms. Among these microbes, the fungi (Torres et al., 2016).

Candidiasis is an infection, which is caused by opportunistic fungi belonging to several species of the genus *Candida*. This disease is a serious problem of public health concern. The sensibility of *Candida* spp. to the commonly used remedies (such as Fluconazole and Amphotericin B) is decreasing. This decrease of sensitivity causes severe disturbance to the infected (Campoy and Adrio, 2017; Torres et al., 2016). For this reason, we decided to study the antifungal potential of natural products, which could help finding an alternative and cheap treatment for infections caused by *Candida* spp.

It is believed, at least half of the existing medical plants have active compounds, *id est* chemical substances which are responsible to the therapeutic effects of the plants. Even the same, investments for the research and identification of these components are still lacking (Torres et al., 2016).

Considering the lack of informations on the relationship between the chemical compound and its biologic activity, this study aimed to isolate and identify the molecules which are presents in the fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and which are responsive for its antimicrobial effect, to assess the antibiotic and antifungal resistance profile of the isolated substance, verify the synergy between this natural substance and several classes of synthetic antifungals, and prove if the antifungal inhibition can be related to the oxidative stress of microorganisms metabolism, inhibiting the development of new colonies.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Deutero methanol (MeOH- $d_4$  purity > 99.8%), 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH purity  $\geq$  99%), Butylated hydroxy toluene (BHT 99% purity) were all purchased from Sigma-Aldrich, Germany. Merck acetonitrile (HPLC purity  $\geq$  99.9%) was obtained from Merck, Germany. All other reagents and solvents were VETEC, Brazil.

### 2.2. Plant material

The fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi were collected in Campos dos Goytacazes, a municipality in Rio de Janeiro State, Brazil (Latitude 21°44' South and 41°18' West; Altitude 12m above sea level) in April 2014. A voucher specimen was identified and deposited at the Herbarium in the Centro de Biociências e Biotecnologia of Universidade Estadual do Norte Fluminense under the code H5073.

### 2.3. Extraction, fractionation and isolation

The fruits of *S. terebinthifolius* (250g) were cleaned, washed and subjected to methanol extraction (10% w/v) by static maceration for 30 days. Every seven days, the solvent was filtered through a paper filter (QUANTY number 41), placed to evaporate in a water bath at 35 °C and protected from light (AOAC, 1995) to obtain the crude extract (49.2 g). Then, the crude extract was partitioned with ethyl acetate resulting in two fractions: aqueous and organic. The organic fraction was rotary evaporated at 40 °C. The fractionation of the organic fraction (25.3 g) occurred in open *Sephadex* LH-20 Chromatographic Column (25-100  $\mu$ m, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using methanol as the eluent, which resulted in three fractions: G1 (3.2 g), G2 (12.1 g) and G3 (6.6 g). The G3 fraction was injected again into the *Sephadex* LH-20 column with methanol, and two more fractions were obtained: G4 (2.3 g) and G5 (3.8 g). The G5 fraction was injected again into

the *Sephadex* LH-20 column with methanol, and three more fractions were obtained: G6 (0.2 g), G7 (2.6 g) and G8 (0.4 g). The fraction G7 was the one used in the present work due to its profile in Thin Layer Chromatography (TLC) similar to flavonoids and phenolic compounds with chromatographic profiles of reference substances in the literature (Skoog et al., 2002).

#### 2.4. Instrumentation and chromatographic conditions

High Performance Liquid Chromatography analyses were performed using a Shimadzu Prominence HPLC system with two LC10AT pumps, a scanning ultraviolet SPD-M10A photodiode array detector and a Rheodyne 7725i injector. UV/Vis spectra were recorded in 290 nm. The reverse-phase column used was an RP-18 (5  $\mu$ m, 250 mm, 4.5 mm i.d., Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA). Temperature: 35 °C. Mobile phase: A = 1% (v/v) acetic acid in purified water, B = 1% (v/v) acetic acid in acetonitrile was used as eluent. Flow elution rate was 0.3 mL/min; 20  $\mu$ L of the samples (5 mg/mL) were injected. Solvent composition during analysis: 0': 100% A; 11': 90% A; 15': 70% A; 19': 60% A; 78': 0% A; 80': 100% A; 80': stop (based on a method reported by Feuereisen et al. (2017) with modifications).

#### 2.5. Characterization of isolated substance

The isolated substance from the fruits of *S. terebinthifolius* has been characterized using a combination of NMR spectra and mass spectrometry.

##### 2.5.1. NMR spectra

The NMR spectra were recorded on a Bruker Advance II 9.4 T instrument (Centro de Ciências e Tecnologia, UENF), operating at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$  using  $\text{MeOH-}d_4$  as a solvent.  $^{13}\text{C}$  NMR and  $^1\text{H}$  NMR-spectra of G7 fraction are shown in Supplementary Materials. The structures of the compounds were confirmed by comparison with reference data from the literature.

##### 2.5.2. Mass spectrometry

ESI-MS (high resolution) mass spectra were obtained by using an HR-ESI-MS mass spectrometer (Centro de Ciências e Tecnologia, UENF) were obtained on a micrOTOF-Q II Bruker Daltonic mass spectrometer, using the negative ion mode of analysis. Mass spectrometry chromatograms of the G7 fraction is shown in Supplementary Materials.

## 2.6. *In vitro* antimicrobial activity

### 2.6.1. Microorganisms

Amentoflavone were also evaluated for their antimicrobial activity against eight bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* methicillin resistant - MRSA (ATCC 33591), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* LSA 88 (bovine mastitis strain) *Staphylococcus pseudointermedius* (ATCC 22019), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13096), and six yeasts: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida kefyr* (ATCC 40039), *Candida dubliniensis* (ATCC MYA-646), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida guilliermondii* (ATCC 6260) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). All ATCC strains belonged to the collection of the Animal Health Laboratory of the UENF University originally obtained in the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, RJ - Brazil). Bovine LSA88 strains belong to the collection of the Animal Health Laboratory of the UENF University (Vieira-Da-Motta et al., 2001). The concentration of the inoculum of each strain (0.5 McFarland scale for bacteria and 0.3 McFarland scale for yeasts) was calculated in a photometer and read at D.O<sub>550nm</sub> (Densimat, Biomérieux – France).

### 2.6.2. Antimicrobial activity determination

The evaluation of the potential antibacterial and antifungal of amentoflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract was

evaluated by the inhibition method in liquid media with modifications (National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002b) for bacteria and National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002a) for yeast). All strains were reactivated in Brain Heart Infusion broth (BHI) (Himedia-Mumbai, India). The colonies were suspended in sterile saline and read by photometry (Densimat, bioMérieux, France) adjusted to  $n^{\circ}$  0.5 McFarland scale for bacteria and  $n^{\circ}$  0.3 McFarland scale for yeasts. Ten  $\mu\text{L}$  of amentoflavone (0.5 mg/mL) solubilized in DMSO (Sigma, EUA) was diluted in 170  $\mu\text{L}$  of Mueller Hinton broth (MH) (Himedia-Mumbai, India) for bacteria or Sabouraud Dextrose broth (SAB) (Difco, USA) for yeasts. Afterwards, 20  $\mu\text{L}$  of inoculum were added, and the solution was incubated at 37 °C or 30 °C for six hours. After this, 50  $\mu\text{L}$  of the solution was spread using a swab (Copan Innovation, Italy) in solid MH medium or solid SAB medium and stored at 37 °C or 30 °C for 24 hours, for bacterial and yeasts, respectively. Gentamicin (0.2 mg/mL) (Sigma, USA) and miconazole (União Química, Brazil) (1.0 mg/mL) was used as positive control. Solvent control was included in each experiment as a negative control. Antimicrobial activity was measured by the increase in the number of Colony Forming Units (CFU), respecting the limit of minimal 30 CFU and maximal 300 CFU in a solid medium, determining in this form the Minimal Inhibitory Concentration (MIC).

### 2.6.3. Antifugigrams

After the exposition of the fungal inoculum to the amentoflavone isolated from *S. terebinthifolius*, antifugigrams were performed to analyze the capacity of the biflavone to act as an adjuvant to the antifungal effect. Colonies of the strains *Candida kefyr* (ATCC 40039) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) were spread on SAB agar plates to perform the standard disk diffusion method for resistance to antifungals according to the indications of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002a). The experiments were performed as described in item 2.6.2 and before the last incubation at 30 °C for 24 hours; antifungal discs were inserted into the plates containing sample and inoculum. Inhibition halos around the antifungal disks were measured using a digital caliper gauge (Mytutoio, São Paulo-SP, Brazil) and expressed in millimeters (mm). The disks used (Cecon, Maranguape-SP, Brazil) were: amphotericin B (AB, 100  $\mu\text{g}$ ),

clotrimazol (CTR, 50 µg), econazole (EC, 50 µg), fluconazole (FLU, 25 µg), itraconazole (ICZ, 10 µg), ketoconazole (KET, 50 µg) and miconazole (MCZ, 50 µg).

### 2.7. DPPH radical scavenging assay

Free radical scavenging activity of amentoflavone was measured by the bleaching of a purple-colored methanolic solution of the stable radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) (Brand-Williams et al., 1995). The samples were prepared in methanol at 2, 0.2 and 0.02 mg/mL. Samples (0.5 mL) were added to 0.5 mL methanolic solution of DPPH (4%) to final concentrations of 1, 0.1 and 0.01 mg/mL. The reaction was incubated in darkness, for 60 min at 25 °C. The absorbance values were measured at 515 nm, using a UV/VIS spectrophotometer (Epoch – BioTek -versão: Gen 5 1:10, Winooski, VT, USA). BHT was used as a reference compound. The radical scavenging activity (% inhibition) was expressed as a percentage of scavenged DPPH and calculated according to the following equation:

$$\% \text{ of Inhibition} = [(ADPPH - A_{\text{sample}})/ADPPH] \times 100,$$

where ADPPH is the absorbance of DPPH solution (negative control) and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the sample in the presence of DPPH.

### 2.8. Statistical analysis

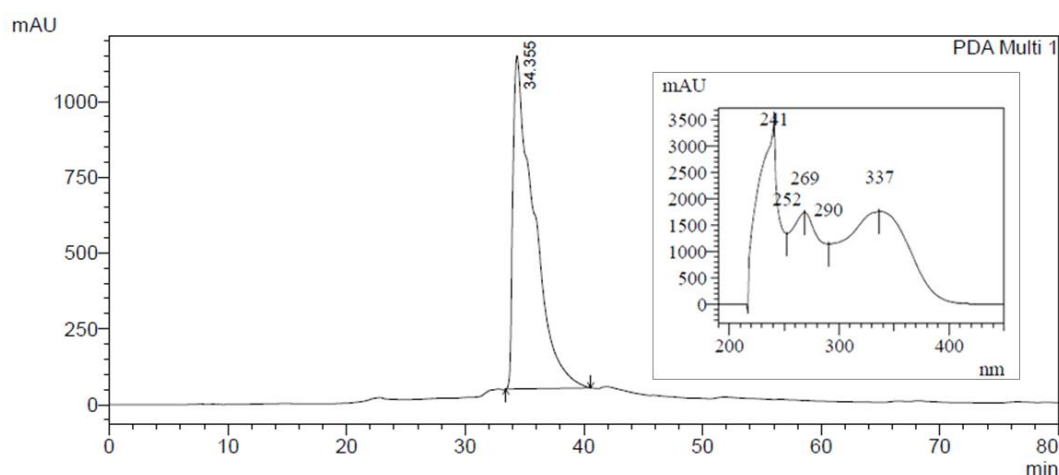
All experiments were performed in triplicates, and the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical significance was defined by the analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. The results were considered statistically significant for  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical profile and identification of G7 product (compound)

TLC analyses suggested the presence of phenolic compounds or flavonoid in G7 fraction *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract, according to the color spots compared with literature. The presence the substance was confirmed by further analyzes performed by HPLC-DAD.

HPLC-DADA chromatogram displayed just one peak at 34.355 minutes retention time (Figure 1). This observation confirms it is only one isolated substance. UV spectrum of this element has a profile, which is the same as the biflavone amentoflavone identified by Zhang et al. (2011) with absorbing bands at the same wavelengths.



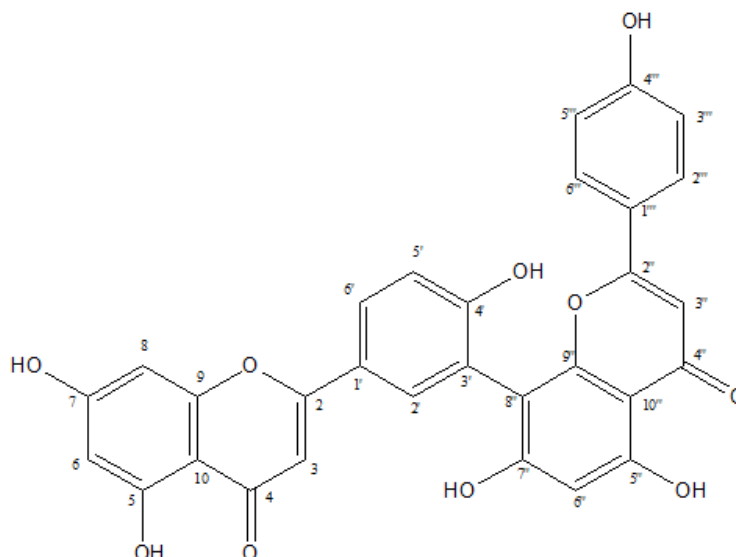
**Fig. 1.** HPLC-DAD chromatograms of G7 fraction from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract (5.0 mg/mL) at a wavelength of 290 nm and ultraviolet spectra of peaks with retention time 34.355 minutes.

We confirmed the identity of the amentoflavone by  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR analyses and their spectrum masses (figures shown in Supplementary Materials) compared with literature values (Bahia et al., 2010; Yao et al., 2017).

G7 fraction was confirmed as the amentoflavone biflavone (Fig. 2) and was obtained as a yellow powder.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta = 5.99$  (d,  $J = 2.9$  Hz, H-6),  $\delta = 6.06$  (d,  $J = 3.1$  Hz, H-8),  $\delta = 6.23$  (s, H-6''),  $\delta = 6.48$  (s, H-3),  $\delta = 6.56$  (s, H-3''),  $\delta = 6.57$  (d,  $J = 10.7$  Hz, H-3''' and H-5'''),  $\delta = 7.08$  (d,  $J = 8.2$  Hz, H-5'),  $\delta = 7.66$  (d,  $J = 7.4$  Hz, H-2''' and H-6'''),  $\delta = 7.87$  (dd,  $J = 8.6$  and  $2.4$  Hz, H-6'),  $\delta = 8.26$  (d,  $J = 3.3$  Hz, H-2').  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta = 96.1$  (CH, C-8),  $\delta = 100.8$  (CH, C-6),  $\delta = 101.3$  (CH, C-6''),  $\delta = 101.9$  (CH, C-3''),  $\delta = 102.1$  (C, C-8''),  $\delta = 102.4$  (CH, C-3),  $\delta = 107.6$  (C, C-10 and C-10''),  $\delta = 116.3$  (CH, C-

3''' and C-5'''),  $\delta = 119.5$  (CH, C-5'),  $\delta = 120.6$  (C, C-1'''),  $\delta = 123.7$  (C, C-1' and C-3'),  $125.7$  (CH, C-6'),  $\delta = 127.9$  (CH, C-2''' and C-6'''),  $\delta = 131.0$  (CH, C-2'),  $\delta = 155.1$  (C, C-9 and C-9''),  $\delta = 158.6$  (C, C-4'),  $\delta = 160.7$  (C, C-5''),  $\delta = 161.9$  (C, C-5),  $\delta = 163.9$  (C, C-7),  $\delta = 164.4$  (C, C-7''),  $\delta = 164.5$  (C, C-2''),  $\delta = 165.2$  (C, C-2),  $\delta = 181.3$  (C, C-4''),  $\delta = 182.3$  (C, C-4). The molecular formula was confirmed to be  $C_{30}H_{18}O_{10}$  ( $m/z = 538$ ) from its HR-ESI-MS mass spectrum ( $[M - H]^-$   $m/z$  537.0810; calc.  $m/z$  537.0822;  $\Delta m/z = 2.23$  ppm).

This substance was in the methanolic crude extract of the fruits of *S. terebinthifolius* as 3.6% of the total weight of the extract. After the liquid-liquid partitioning, it concentrated approximately three times more, corresponding to 10.3% of the total weight of the organic fraction.



**Fig. 2.** Chemical structure of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract.

The knowledge of the chemical substance responsible for the biological effect of the vegetal material is of great importance, mainly for the development of new antibiotics or antifungal products, as considering the increasing resistance to the traditional remedies worldwide (Alves et al., 2013).

The amentoflavone was first described as isolated from the drupe of *Schinus terebinthifolius* Raddi, by Skopp and Schwenker (1986). Since then, several researchers isolated and identified this flavonoid from different parts of this plant: from the extracts of the cortex (Dantas De Carvalho et al., 2003; Varela-Barca et al., 2007), and from the epicarp of the fruits of pink pepper



(Feuereisen et al., 2014). Even the same, this is the first study demonstrating the biflavone amentoflavone isolated from *S. terebinthifolius* is the chemical substance which is responsive for the antifungal activity of this species, widely used in the traditional medicine for this purpose.

### 3.2. Antimicrobial properties

The use of several parts of *S. terebinthifolius* Raddi is shared among several primitive populations to treat infections caused by microorganisms (Gomes et al., 2013; Torres et al., 2016). In the present paper, we assessed the potential of the amentoflavone isolated from *S. terebinthifolius* to inhibit the growth of several species of bacteria and fungi. The experiments were repeated three times in triplicate (n = 9), and the results are displayed in Table 1.

**Table 1**Antimicrobial activity of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract.

Microorganisms		Tested sample		
		Amentoflavone (0.5 mg/mL)	Gentamicin (0.2 mg/mL)	Myconazole (1.0 mg/mL)
Bacterial strains	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i> LSA 88	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
	<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> ATCC 22019	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13096	CFU ≥ 300	CFU ≤ 1	NT
Fungal strains	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	CFU ≥ 300	NT	CFU ≤ 1
	<i>Candida kefyr</i> ATCC 40039	81.4 ± 7.8 CFU	NT	CFU ≤ 1
	<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA-646	CFU ≥ 300	NT	CFU ≤ 1
	<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	CFU ≥ 300	NT	CFU ≤ 1
	<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 6260	CFU ≥ 300	NT	CFU ≤ 1
	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	152.6 ± 3.6 CFU	NT	CFU ≤ 1

Data are presented as mean ± S.D. CFU = Colony Forming Units. NT (not tested).

Among the fungal strains tested, observed inhibition of the growth in *C. kefyr* and *C. parapsilosis*, with less than 300 CFU. As concerns the remaining strains, even the literature describing growth inhibition by *S. terebinthifolius* (Moura-Costa et al., 2012; Torres et al., 2016), we could not observe this phenomenon in our experience. The explication for this result is that the chemical substance which is responsive for the antifungal effect found by other authors in *S. terebinthifolius* is not the amentoflavone, but rather other chemical compounds presents in this species.

Moura-Costa et al. (2012) described the extract of the stem of *S. terebinthifolius* inhibited the growth of *Candida parapsilosis* by the method of broth microdilution. However, this essay is the first study of the effect of *S. terebinthifolius* on *C. kefyr*, and the first time, the antifungal effect on the tested strains is being associated with the chemical substance responsive to it.

In this study, eight types of bacterial strains were tested, both gram-positive and negative. The amentoflavone did not inhibit the growth of any of these strains.

Other authors, which used the leaves of this plant demonstrated *S. terebinthifolius* has antimicrobial capacity against the same bacteria we used in our study (El-Massrri et al., 2009; Gomes et al., 2013; Uliana et al., 2016). Until now, no research has ever proved the inhibition of the growth of *Salmonella* spp. by samples of pink pepper. Thus the antibacterial activity which has been observed in *S. terebinthifolius* in the traditional medicine and *in vitro* experiments cannot be associated to the biflavone amentoflavone.

The yeasts of the genus *Candida* are saprophytic microorganisms which, depending on pre-elimination factors, which can alter their organic integrity, can modify their conformation to a fusiform shape, becoming pathogenic in this configuration (Campoy and Adrio, 2017). In this form, *Candida* are related to strong virulence factors, such as biofilm formation. This capability is strongly associated with the infectiveness (Ramage et al., 2005). The frequent appearance of antifungal resistance worldwide demands the research for new antifungal agents.

New substances shall be proposed to minimize the problems associated to the use of synthetic antifungal products (increase of the resistance, decrease of the effect, collateral effects, among the others), new agents should be proposed in an attempt to minimize these problems (Pianalto and Alspaugh, 2016).

To achieve these aims, it was assessed whether biflavone amentoflavone, isolated from *S. terebinthifolius* could act in synergy with other antifungals. We performed the antifungigram of amentoflavone together with other seven commercial antifungals against the species of *Candida* whose growth was inhibited by the biflavone: *C. kefyr* and *C. parapsilosis* (Table 2).

**Table 2**

Antifungigram (inhibition method in liquid media, inhibition halo measured in mm) of *Candida* spp. strains treated with amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract and exposed to 7 antifungal drugs.

Drugs	Strains			
	<i>Candida kefyr</i> ATCC 40039		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	
	<sup>1</sup> Treat	<sup>2</sup> Cont	<sup>1</sup> Treat	<sup>2</sup> Cont
Amphotericin B	15.62Ad	13.64Ad	13.34Ae	8.27Be
Clotrimazole	35.73Aa	32.38Ba	40.68Ab	36.79Bb
Econazole	36.21Aa	34.22Ba	36.27Ac	35.21Ab
Fluconazole	27.75Abc	15.81Bcd	25.18Ad	22.31Bd
Itraconazole	27.06Ac	18.35Bc	25.09Ad	21.05Bd
Ketoconazole	31.44Ab	22.49Bb	43.85Aa	41.28Ba
Myconazole	28.40Abc	21.67Bb	35.72Ac	31.41Bc

<sup>1</sup>Treat = Amentoflavone and Drugs, <sup>2</sup>Cont = Drugs. Means followed by the same small letter in the column (drug) and capital letter in the line (amentoflavone treatment), do not differ among themselves. Tukey test, 5% probability.

The association of amentoflavone with the tested drugs was very active: was observed an increase of the inhibition halo in all tests, with both *Candida* species.

*C. kefyr* displayed a higher synergism in the association with the antifungals fluconazole and itraconazole. In these cases, the classification of the therapeutic effect passed from intermediate to sensitive (according to criteria established by CLSI, 2005). We also observed a significative increase ( $p < 0.05$ ) of the diameter of the halo of all drugs, but amphotericin B, that, in fact, is the least effective product to treat this species of fungus, as it displayed the smallest inhibition halo. The drugs with the most significant halo were clotrimazole and econazole.

In *C. parapsilosis* it was observed the best synergic effect in the contemporary treatment with amentoflavone and amphotericin B, whose inhibition

action passed from sensitive to resistant (CLSI, 2005). The synergy of the isolated biflavone with all the other drug but econazole had significant effects ( $p < 0.05$ ). The best treatment for this species of *Candida* is ketoconazole (widest inhibition halo).

The use of several diagnostic methods and therapy protocols is crucial as considering the variety of clinical manifestations caused by *Candida*. The available antifungal drugs have a significant toxicity, and fungal strains have an increased resistance to them. For these reasons, there is a continuous search for new antifungal products, more powerful and safer than the existing ones (Campoy and Adrio, 2017).

This emerging antifungal resistance may lead to consequences such as administration of more expensive alternative antifungal agents, prolonged hospitalization, and increased morbidity and mortality among high-risk individuals (Hoh and Dhanashree, 2017).

The results obtained confirms the association between the amentoflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* and some synthetic antifungals provides more effective therapeutic action. Studies on the synergy between natural products and chemical drugs contribute improving the cares associated with *Candida* spp..

### 3.3. Free radical scavenging

The oxidative damage of cells and tissues is associated to the etiology of several diseases, including microbial ones. Natural products are strong candidates to act in these situations: the insertion (inclusion) of food compounds or remedies from a vegetal origin that can operate by scavenging free radicals may be an essential alternative to treat infections caused by bacteria or fungi (Silva et al., 2017). Antioxidants act as free radicals scavengers and sometimes as chelating agents of metals, performing at the beginning of the propagation of the oxidative process (Bernardes et al., 2014).

This work verified the antioxidative activity of the amentoflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* by DPPH method to assess the free radicals scavenging activity of this natural biflavone. BHT was used as a positive control as this substance is one of the leading synthetic antioxidants used in the formulation of several products (Ramalho and Jorge, 2006). Table 3 displays the results.

**Table 3**

Antioxidant activity of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract and standard 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) by DPPH assay.

Concentrations		Amentoflavone	BHT
1 mg/mL	MEAN (%)	57.61	79.09
	S.D.	4.81	0.92
	C.V. (%)	8.34	1.17
0.1 mg/mL	MEAN (%)	36.47	78.40
	S.D.	1.22	1.26
	C.V. (%)	3.36	1.60
0.01 mg/mL	MEAN (%)	18.12	71.78
	S.D.	1.26	6.30
	C.V. (%)	6.93	8.78

S.D. = Standard Deviation C.V. = Coefficient of Variation

The amentoflavone isolated from the fruits of the pink pepper displayed high free radicals scavenging activity at the higher concentration tested (1 mg/mL). Its action was only about 25% lower than that of the synthetic antioxidant used as a reference. At the remaining concentrations, its antioxidative activity was lower than 50% of the reference.

*S. terebinthifolius* is a well-known species for its antioxidative potential. Glória et al. (2017) described 77.5% of antioxidative activity from the fraction extracted from the fruits. Ribeiro et al. (2015) demonstrated nearly 60% of activity in the crude extract of the fruits, and Bernardes et al. (2014) found 80% of antioxidant activity in another flavonoid isolated from the fruit of this species.

The products of secondary metabolism of plant sources can act in two ways: as "potentiators of antimicrobial activity", favoring the activity of antibiotics and synthetic antifungals whose action is limited by multiresistance mechanisms developed by microorganisms; or as "attenuating virulence", adjusting the response of the host's immune system to infection (González-Lamothe et al., 2009).

Considering the significant antioxidant activity in *S. terebinthifolius*, and the correlation of antimicrobial and antioxidant activity, it suggests that the results of combination of amentoflavone activity and antifungal drugs (Table 2) may have influenced the reduction of halo observed, due to interferences in oxidative processes.

Antioxidants are highly effective in inhibiting oxidative processes. An essential form of reducing the oxidation is by scavenging free radicals, which can

be performed by phytochemical substances from compounds of vegetal origin: the natural antioxidants (Cesari et al., 2013; Li et al., 2012). The oxidative stress can act on the metabolism of microorganisms as tissue damage, causing damages at any target molecule (DNA, proteins, and lipids) or may cause the cellular death by necrosis or apoptosis (Halliwell, 2011).

As a consequence, the antioxidant potential we observed in the amentoflavone might have improved the inhibition of the growth of the fungi that have been used in the present work by the scavenging of free radicals.

#### **4. Conclusion**

The results of the present study provide scientific grounds for the traditional use of the fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi to treat and prevent mycotic diseases caused by yeasts of the genus *Candida* spp. on the basis of the presence of the amentoflavone, which acts inhibiting the growth of these strains by inhibiting the oxidative processes. Our work also points out, the combination of this biflavone and synthetic antifungals is a viable therapeutic alternative: the synergy from the use of both products at the same time can increase the fungicidal activity in comparison with the use of both the agents isolated.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) by grant and for project financial support; to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), and UENF for research fellow ships and the financial support.

#### **Author contributions**

LLGV and DBO conceived and designed all the experiments; LLGV, ARCJ and IJCV performed the experiments on NMR analysis; LLGV and SMFP performed the analysis on HPLC; LLGV, LLC and MBSA performed the extraction, fractionation and isolation the fruits and DPPH tests; LLGV, SSS and OVM performed the

antimicrobial analysis; LLGC and SSS analyzed the statistical data; LLGV, LLC and DBO wrote the article. All the authors read, improved and approved the final version of the manuscript.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Appendix A. Supplementary Materials

Supplementary data associated with this article are available in the online version.

### References

- AOAC, 1995. Official methods of analysis of the Association of Official Analysis Chemists.
- Alves, L.A., Freires, I.D.A., Pereira, T.M., Souza, A. De, Lima, E.D.O., Castro, R.D. De, 2013. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. *Acta Odontol. Scand.* 71, 965–971. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.741694>
- Bahia, M. V, David, J.P., David, J.M., 2010. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. *Quim. Nova* 33, 1297–1300. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600015>
- Barbieri, D.S. V, Tonial, F., Lopez, P.V.A., Sales Maia, B.H.L.N., Santos, G.D., Ribas, M.O., Glienke, C., Vicente, V.A., 2014. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 59, 887–896. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.05.006>
- Bernardes, N.R., Heggdorne-Araújo, M., Borges, I.F.J.C., Almeida, F.M., Amaral, E.P., Lasunskaja, E.B., Muzitano, M.F., Oliveira, D.B., 2014. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 24, 644–650. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.012>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Campoy, S., Adrio, J.L., 2017. Antifungals. *Biochem. Pharmacol.* 133, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>
- CLSI 2005. Methods for dilution antimicrobialsusceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standards. Document CLSI M45-P CLSI: Wayne, Pennsylvania.
- Cesari, I., Hoerlé, M., Simoes-Pires, C., Grisoli, P., Queiroz, E.F., Dacarro, C., Marcourt, L., Moundipa, P.F., Carrupt, P.A., Cuendet, M., Caccialanza, G., Wolfender, J.L., Brusotti, G., 2013. Anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities of *Diospyros bipindensis* (Gürke) extracts and its main constituents. *J. Ethnopharmacol.* 146, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.041>



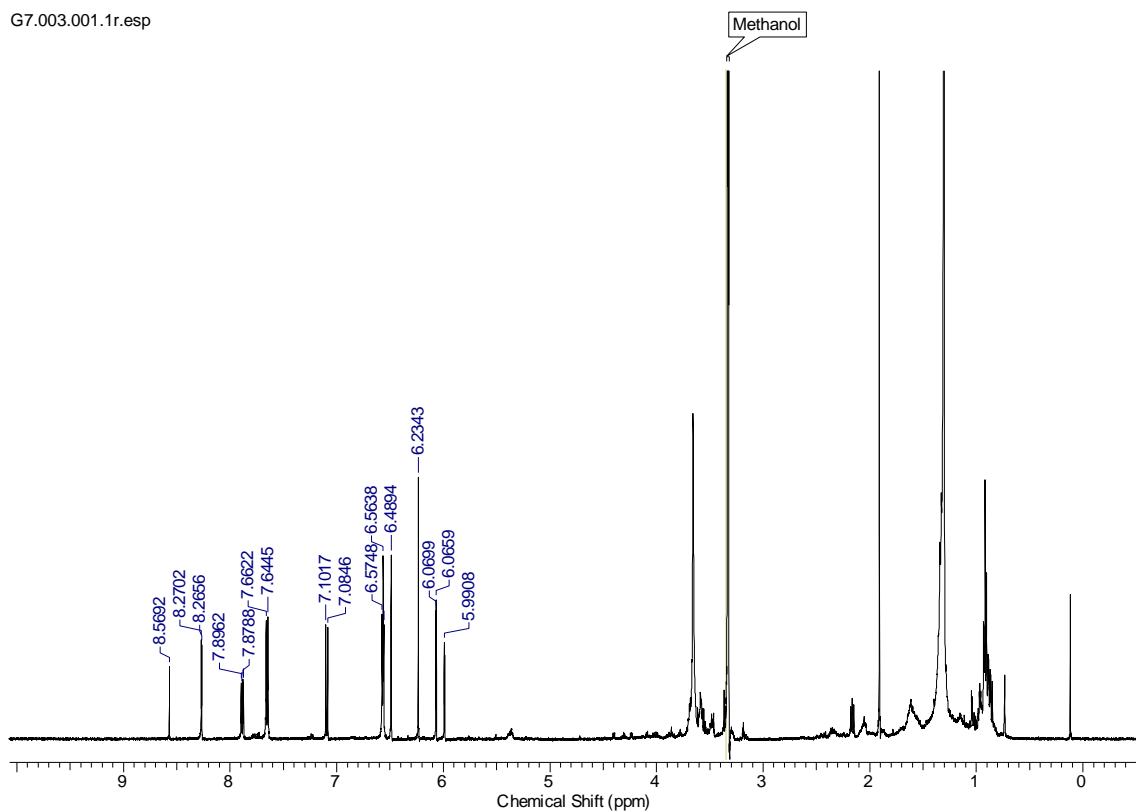
- Dantas De Carvalho, M.C.R., Varela Barca, F.N.T., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo De Medeiros, S.R., 2003. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environ. Mol. Mutagen.* 42, 185–191. <https://doi.org/10.1002/em.10183>
- Glória, L.L., De Souza Arantes, M.B., De Faria Pereira, S.M., De Souza Vieira, G., Martins, C.X., De Carvalho Junior, A.R., Antunes, F., Braz-Filho, R., Vieira, I.J.C., Da Cruz, L.L., De Almeida Chaves, D.S., De Paiva Freitas, S., De Oliveira, D.B., 2017. Phenolic compounds present *Schinus terebinthifolius* raddi influence the lowering of blood pressure in rats. *Molecules* 22, 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22101792>
- El-Massry, K.F., El-Ghorab, A.H., Shaaban, H.A., Shibamoto, T., 2009. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5265–5270. <https://doi.org/10.1021/jf900638c>
- Fedel-Miyasato, L.E.S., Kassuya, C.A.L., Auharek, S.A., Formagio, A.S.N., Cardoso, C.A.L., Mauro, M.O., Cunha-Lauraa, A.L., Monreal, A.C.D., Vieira, M.C., Oliveira, R.J., 2014. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Brazilian J. Pharmacogn.* 24, 565–575. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.08.004>
- Feuereisen, M.M., Gamero Barraza, M., Zimmermann, B.F., Schieber, A., Schulze-Kaysers, N., 2017. Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. *Food Chem.* 214, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.002>
- Feuereisen, M.M., Hoppe, J., Zimmermann, B.F., Weber, F., Schulze-Kaysers, N., Schieber, A., 2014. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* raddi) exocarp. *J. Agric. Food Chem.* 62, 6219–6226. <https://doi.org/10.1021/jf500977d>
- Gomes, F.S., Procópio, T.F., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J. Appl. Microbiol.* 114, 672–679. <https://doi.org/10.1111/jam.12086>
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F., Bouarab, K., 2009. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3400–3419. <https://doi.org/10.3390/ijms10083400>
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
- Hoh, J.M., Dhanashree, B., 2017. Antifungal effect of cow's urine distillate on *Candida* species. *J. Ayurveda Integr. Med.* 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.04.009>
- Li, W.J., Nie, S.P., Liu, X.Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M.Y., 2012. Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. *Food Chem. Toxicol.* 50, 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.011>
- Moura-Costa, G.F., Nocchi, S.R., Ceole, L.F., de Mello, J.C.P., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Temponi, L.G., Ueda-Nakamura, T., Mello, J.C.P. De, Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Temponi, L.G., Ueda-Nakamura, T., de Mello, J.C.P., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Temponi, L.G., Ueda-Nakamura, T., 2012. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Parana, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 143, 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.016>

- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002a., n.d. NCCL: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, CLSI document M27-A2.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002b., n.d. NCCL: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 5th ed., Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, CLS.
- Pianalto, K., Alspaugh, J., 2016. New Horizons in Antifungal Therapy. *J. Fungi* 2, 1–26. <https://doi.org/10.3390/jof2040026>
- Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., López-Ribot, J.L., 2005. Candida Biofilms: an Update. *Eukaryot. Cell* 4, 633–638. <https://doi.org/10.1128/EC.4.4.633>
- Ramalho, V.C., Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova* 29, 755–760. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023>
- Ribeiro, P., Fernandez, L., Loureiro, M., Simões, R., de Castro, R., D'Sousa' Costa, C., 2015. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacogn. Mag.* 11, 607. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.160459>
- Sartorelli, P., Santana, J.S., Guadagnin, R.C., Lago, J.H.G., Pinto, É.G., Tempone, A.G., Stefani, H.A., Soares, M.G., Silva, A.M. da, 2012. In vitro trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim. Nova* 35, 743–747. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000400017>
- Silva, M.M. da, Iriguchi, E.K.K., Kassuya, C.A.L., Vieira, M. do C., Foglio, M.A., Carvalho, J.E. de, Ruiz, A.L.T.G., Souza, K. de P., Formagio, A.S.N., 2017. *Schinus terebinthifolius* : phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. *Rev. Bras. Farmacogn.* 27, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.007>
- Skoog, D.A., Hpller, F.J., Nieman, T.A., 2002. *Princípios da Análise Instrumental*, Porto Alegre – Brazil.
- Skopp, G., Schwenker, G., 1986. Biflavonoide aus *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)/ Biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Zeitschrift für Naturforsch. B* 41, 1479–1482. <https://doi.org/10.1515/znb-1986-1125>
- Torres, K., Lima, S., Ueda, S., 2016. Activity of the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi on strains of the *Candida* genus. *Rev. Bras. Ginecol. e Obs. / RBGO Gynecol. Obstet.* 38, 593–599. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597694>
- Uliana, M.P., Fronza, M., da Silva, A.G., Vargas, T.S., de Andrade, T.U., Scherer, R., 2016. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind. Crops Prod.* 83, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.077>
- Varela-Barca, F.N.T., Agnez-Lima, L.F., de Medeiros, S.R.B., 2007. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 672–681. <https://doi.org/10.1002/em.20334>

- Vieira-Da-Motta, O., Damasceno Ribeiro, P., Dias Da Silva, W., Medina-Acosta, E., 2001. RNAIII Inhibiting Peptide (RIP) inhibits agr-regulated toxin production. *Peptides* 22, 1621–1627. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00497-1)
- Wannes, W.A., Marzouk, B., 2016. Research progress of Tunisian medicinal plants used for acute diabetes. *J. Acute Disease*. 5, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.joad.2016.08.001>
- Yao, H., Chen, B., Zhang, Y., Ou, H., Li, Y., Li, S., Shi, P., Lin, X., 2017. Analysis of the total biflavonoids extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and its in vitro and in vivo anticancer effects. *Molecules* 22, 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules22020325>
- Zhang, Y.X., Li, Q.Y., Yan, L.L., Shi, Y., 2011. Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2173–2186. <https://doi.org/10.1002/rcm.5090>

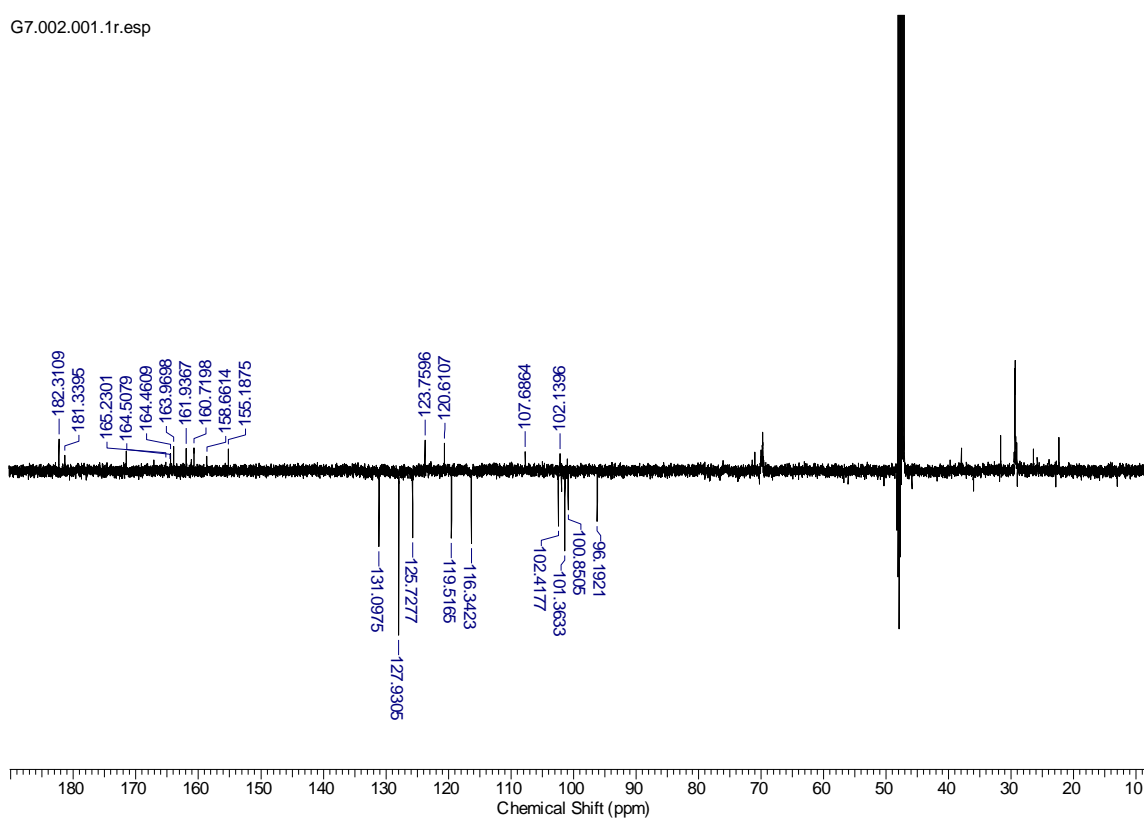
### ***Supplementary Materials***

G7.003.001.1r.esp

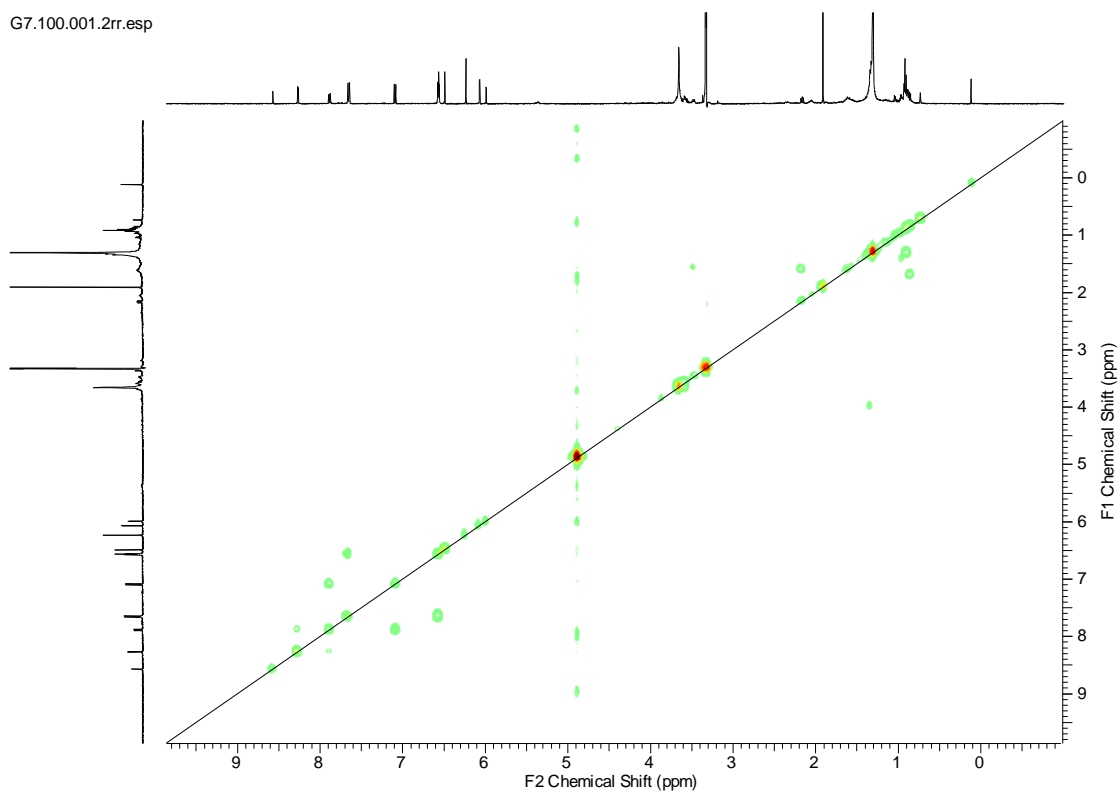


**Fig. S1.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).

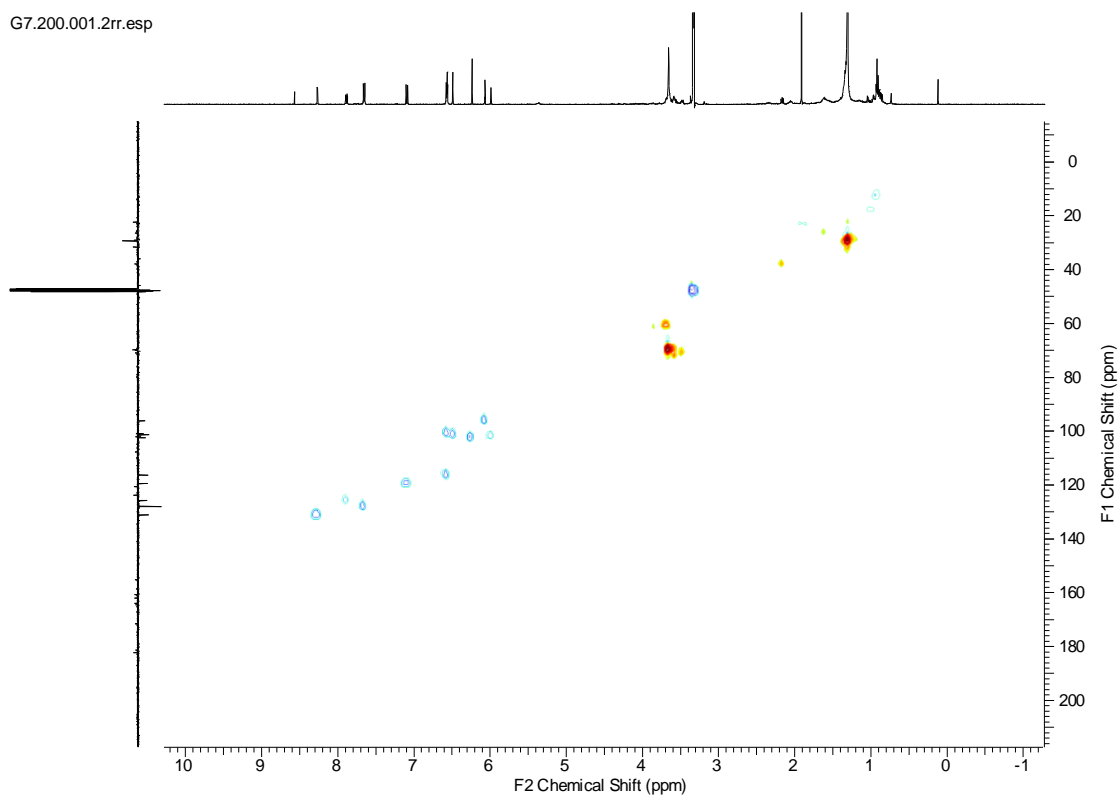
G7.002.001.1r.esp



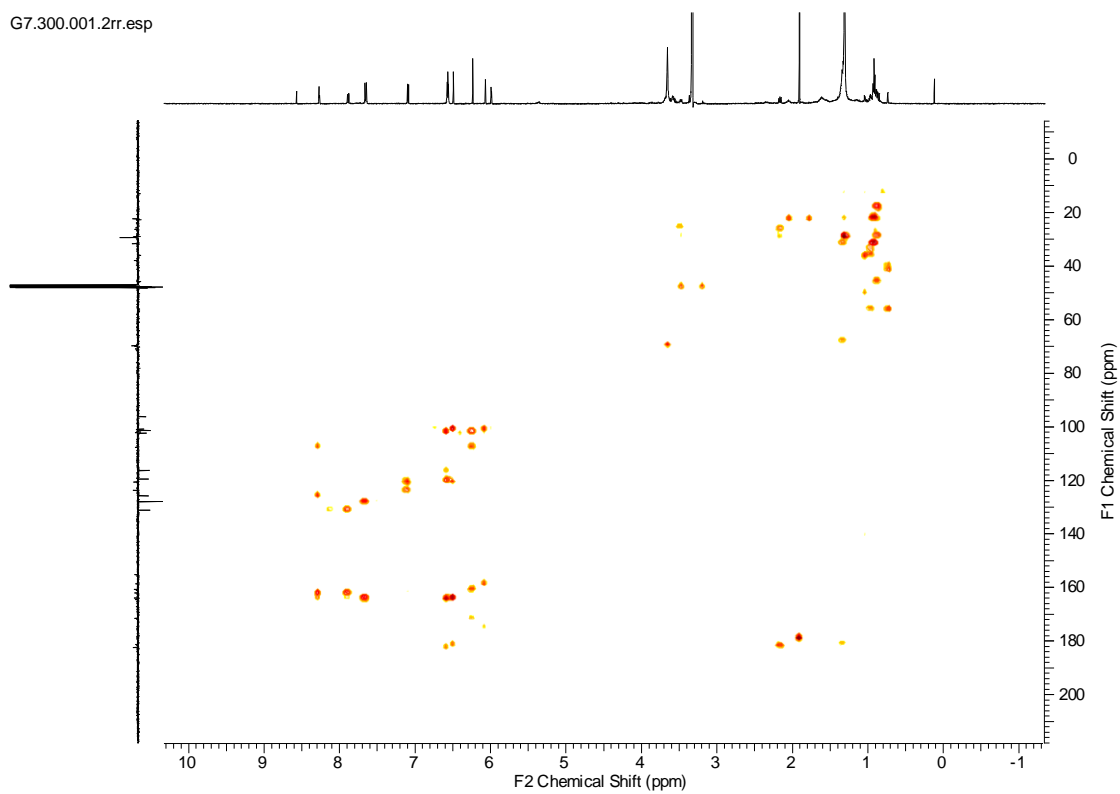
**Fig. S2.**  $^{13}\text{CDEPTQ}$  NMR spectrum of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract ( $\text{MeOH-}d_4$ , 125 MHz).



**Fig. S3.** COSY spectrum of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).

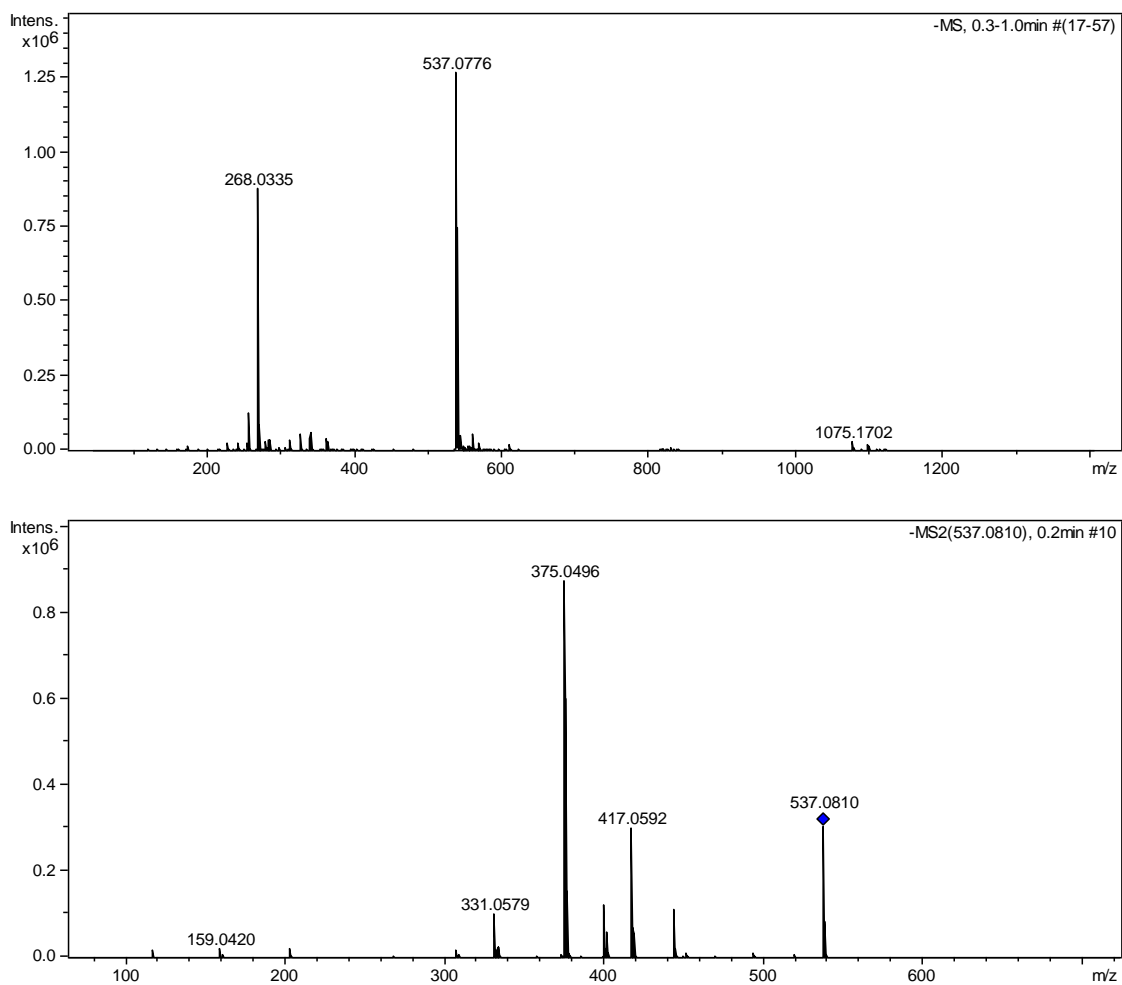


**Fig. S4.** HSQC spectrum of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).



**Fig. S5.** HMBC spectrum of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).





**Fig. S6.** Mass spectrum  $[M - H]^-$  of amentoflavone biflavone isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit extract.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

*Schinus terebinthifolius* Raddi, que é uma espécie pertencente à flora nativa da região de Campos dos Goytacazes, é uma fonte vegetal comumente utilizada para o tratamento e prevenção de várias patologias. Suas atividades biológicas são atribuídas às substâncias químicas presentes na sua composição, destacando as substâncias fenólicas. Essas moléculas são responsáveis pelo efeito protetor das células contra os danos oxidativos causados por Espécies Reativas de Oxigênio, agindo como antioxidantes naturais, provocando a eliminação de radicais livres e favorecendo efeitos benéficos no organismo humano.

O primeiro trabalho dessa tese forneceu evidências acerca do potencial farmacológico anti-hipertensivo e antioxidante de compostos presentes nos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. As investigações fitoquímicas identificaram dois compostos majoritários presentes na fração G5 do extrato metanólico: ácido gálico e naringenina, sendo este o primeiro relato dessa flavanona na espécie. Ficou comprovado que o potencial cardiovascular da *S. terebinthifolius* está relacionado às substâncias fenólicas majoritárias identificadas, as quais desempenham um excelente poder de sequestro de radicais livres (atividade antioxidante), inibindo o estresse oxidativo possivelmente no Sistema Nervoso Central.

No segundo trabalho dessa tese, os resultados fornecem base científica para o uso popular dos frutos de *S. terebinthifolius* Raddi no tratamento de doenças antifúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* spp. devido à presença da amentoflavona que possui a capacidade de inibir o crescimento dessas cepas, através do favorecimento de processos oxidativos no metabolismo dos

microrganismos. Como tal, comprovou-se *in vitro*, que a associação entre a biflavona e antifúngicos sintéticos é uma alternativa terapêutica viável, considerando que o efeito sinérgico alcançado por ambos os produtos pode ser responsável pelo aumento na ação fungicida, em comparação com o uso dos agentes por si mesmos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76.
- Aidi Wannes, W., Marzouk, B. (2016) Research progress of Tunisian medicinal plants used for acute diabetes. *J. Acute Dis.* 5, 357–363.
- Alcantara, R.G.L., Joaquim, R.H.V.T., Sampaio, S.F. (2015) *Plantas Mediciniais: O Conhecimento E Uso Popular* 18, 470–482.
- Amensour, M., Bouhdid, S., Fernández-López, J., Idaomar, M., Senhaji, N.S., Abrini, J. (2010) Antibacterial activity of extracts of *myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Int. J. Food Prop.* 13, 1215–1224.
- Amorim, M.M.R. De, Santos, L.C. (2003) Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 25, 95–102.
- Andrae-Marobela, K., Ghislain, F.W., Okatch, H., Majinda, R.R.T. (2013) Polyphenols: A Diverse Class of Multi-Target Anti-HIV-1 Agents. *Curr. Drug Metab.* 14, 392–413.
- Bae, J.W., Kim, D.H., Lee, W.W., Kim, H.Y., Son, C.G. (2015) Characterizing the human equivalent dose of herbal medicines in animal toxicity studies. *J. Ethnopharmacol.* 162, 1–6.
- Barbieri, D.S. V, Tonial, F., Lopez, P.V.A., Sales Maia, B.H.L.N., Santos, G.D., Ribas, M.O., Glienke, C., Vicente, V.A. (2014) Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on *in vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 59, 887–896.
- Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J., Clemente, A.D., De Paula, V.F., Ismail, F.M.D. (2007) Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Quim. Nova* 30, 1959–1965.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.P. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* 29, 113–123.

- Belemtougri, R.G., Constantin, B., Cognard, C., Raymond, G., Sawadogo, L. (2001) Effects of *Sclerocarya birrea* (A. rich) hochst (Anacardiaceae) leaf extracts on calcium signalling in cultured rat skeletal muscle cells. *J. Ethnopharmacol.* 76, 247–252.
- Bernardes, N.R., Heggdorne-Araújo, M., Borges, I.F.J.C., Almeida, F.M., Amaral, E.P., Lasunskiaia, E.B., Muzitano, M.F., Oliveira, D.B. (2014) Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 24, 644–650.
- Bernardes, N.R.; Sampaio, S.H; Nunes, C.R; Oliveira, D.B. (2012a) Anacardiaceae: Flavonoides x *Schinus* e Pistacia. *Química no Brasil.* 6:129-136.
- Bernardes, N.R; Glória, L.L; Reis, C.N; Pessanha, F.F; Muzitano, M. F; Oliveira, D.B. (2012b) Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de aroeira. *Vértices.* 13:117-128.
- Bernardes, N.R., Pessanha, F.F., Oliveira, D.B. (2010) Functional Foods: A Brief Review. *Cienc. Cult.* 6, 11–19.
- Campoy, S., Adrio, J.L. (2017). Antifungals. *Biochem. Pharmacol.* 133, 86–96.
- Cao, H., Chen, X., Jassbi, A.R., Xiao, J. (2015) Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnol. Adv.* 33, 214–223.
- Carvalho, A. C., Braga, J. M. A. B., Gomes, J. M. L., Souza, J. S., Nascimento, M. T. (2006) Comunidade Arbórea de Baixada Aluvial no Município de Campos dos Goytacazes, RJ. *Cerne.* 12:157-166.
- Castro, M.D.L., Capote, F.P. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography.* 1217:2383-2389.
- Cavalher-Machado, S.C., Rosas, E.C., Brito, F. de A., Heringe, A.P., de Oliveira, R.R., Kaplan, M.A.C., Figueiredo, M.R., Henriques, M. das G.M. de O. (2008) The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1552–1560.
- Ceruks, M., Romoff, P., Fávero, O.A., Lago, H.G. (2007) Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* raddi (anacardiaceae). *Quim. Nova* 30, 597–599.
- Cesari, I., Hoerlé, M., Simoes-Pires, C., Grisoli, P., Queiroz, E.F., Dacarro, C., Marcourt, L., Moundipa, P.F., Carrupt, P.A., Cuendet, M., Caccialanza, G., Wolfender, J.L., Brusotti, G. (2013) Anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities of *Diospyros bipindensis* (Gürke) extracts and its main constituents. *J. Ethnopharmacol.* 146, 264–270.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S. (2013) Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 1–20.
- Corrêa, M.P. (1984) Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Imprensa Nacional* - Rio de Janeiro: v. 6, p.170-171.
- Cruz-Galvez, A.M., Gómez-Aldapa, C.A., Villagómez-Ibarra, J.R., Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Baños, J., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J. (2013) Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies *in vitro* and in raw beef. *Food Control* 32, 289–295.

- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15:7313–7352.
- Degáspari, C.H., Waszcznskyj, N., Prado., M. (2005) Atividade Antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Addi. *Ciências agrotécnicas* 29, 617–622.
- DiCiaula, M.C., Lopes, G.C., Scarminio, I.S., De Mello, J.C.P. (2014) Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a uv-vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. *Quim. Nova* 37, 158–163.
- Dovich, S.S., Lajolo, F.M. (2011) Flavonoides e sua relação com doenças do Sistema Nervoso Central. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* 36(2):123-135.
- El-Massry, K.F., El-Ghorab, A.H., Shaaban, H.A., Shibamoto, T. (2009) Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5265–5270.
- Farzaneh, V., Carvalho, I.S. (2015) A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Ind. Crops Prod.* 65, 247–258.
- Fedel-Miyasato, L.E.S., Formagio, A.S.N., Auharek, S.A., Kassuya, C.A.L., Navarro, S.D., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Vieira, M.C., Oliveira, R.J. (2014) Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: A comparative study. *Genet. Mol. Res.* 13, 3411–3425.
- Fedel-Miyasato, L.E.S., Kassuya, C.A.L., Auharek, S.A., Formagio, A.S.N., Cardoso, C.A.L., Mauro, M.O., Cunha-Laura, A.L., Monreal, A.C.D., Vieira, M.C., Oliveira, R.J. (2014) Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Brazilian J. Pharmacogn.* 24, 565–575.
- Feuereisen, M.M., Gamero Barraza, M., Zimmermann, B.F., Schieber, A., Schulze-Kaysers, N. (2017) Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. *Food Chem.* 214, 564–571.
- Filipović, M., Marković, Z., Dorović, J., Marković, J.D., Lučić, B., Amić, D. (2015) QSAR of the free radical scavenging potency of selected hydroxybenzoic acids and simple phenolics. *Comptes Rendus Chim.* 18, 492–498.
- Forkmann, G., Martens, S. (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 155–160.
- Galanakis, C.M., Tornberg, E., Gekas, V. (2010) Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 85:1148-1155.
- Glória, L. de L., De Souza Arantes, M.B., De Faria Pereira, S.M., De Souza Vieira, G., Martins, C.X., De Carvalho Junior, A.R., Antunes, F., Braz-Filho, R., Vieira, I.J.C., Da Cruz, L.L., De Almeida Chaves, D.S., De Paiva Freitas, S., De Oliveira, D.B. (2017) Phenolic compounds present *Schinus terebinthifolius* raddi influence the lowering of blood pressure in rats. *Molecules* 22, 1–11.
- Gomes, F.S., Procópio, T.F., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G. (2013) Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J. Appl. Microbiol.* 114, 672–679.

- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F., Bouarab, K. (2009) Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3400–3419.
- Halliwell, B. (2011) Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 125–130.
- Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V., Peralta, R.M. (2012) Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology.* 47:2023–2044.
- Harborne (1994) Phenolics In Natural Products. Their chemistry and biological significance. 1. ed. New York: *Longman scientific & Technical.* p. 361-388.
- Hayashi, T., Nagayama, K. (1989) Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug in *Schinus terebinthifolius*. *J. Nat.* 52, 210–211.
- Haytowitz, D.B., Bhagwat, S., Holden, J.M. (2013) Sources of Variability in the Flavonoid Content of Foods. *Procedia Food Sci.* 2, 46–51.
- Hoh, J.M., Dhanashree, B. (2017) Antifungal effect of cow's urine distillate on *Candida* species. *J. Ayurveda Integr. Med.* 5–9.
- Holtmann, G., Talley, N.J. (2015) Herbal medicines for the treatment of functional and inflammatory bowel disorders. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 422–432.
- Jain, M.K., Bao-Zhu Yu, Rogers, J.M., Smith, A.E., Boger, E.T.A., Ostrander, R.L., Rheingold, A.L. (1995) Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 39, 537–547.
- Kassem, M.E.S., El-Desoky, S.K., Sharaf, M. (2004) Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. *Chem. Nat. Compd.* 40, 447–450.
- Katayama, S., Kukita, T., Ishikawa, E., Nakashima, S., Masuda, S., Kanda, T., Akiyama, H., Teshima, R., Nakamura, S. (2013) Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells. *Food Chem.* 138, 757–761.
- Kim, H., Bartley, G.E., Arvik, T., Lipson, R., Nah, S., Seo, K., Yokoyama, W. (2014) Dietary supplementation of chardonnay grape seed flour reduces plasma cholesterol concentration, hepatic steatosis, and abdominal fat content in high-fat diet-induced obese hamsters. *J Agric Food Chem.* 62:1919-1925.
- Kim, H.H., Bae, Y., Kim, S.H. (2013) Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation. *Food Chem. Toxicol.* 57, 209–216.
- Labat-Robert, J., Robert, L. (2014) Longevity and aging. Role of free radicals and xanthine oxidase. A review. *Pathol. Biol.* 62, 61–66.
- Leite, S.R.R.F., Amorim, M.M.R., Sereno, P.F.B., Leite, T.N.F., Ferreira, J.A.C., Ximenes, R.A.A. (2011) Randomized clinical trial comparing the efficacy of the vaginal use of metronidazole with a Brazilian pepper tree (*Schinus*) extract for the treatment of bacterial vaginosis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 44, 245–252.
- Li, W.J., Nie, S.P., Liu, X.Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., Xie, M.Y. (2012) Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from

*Ganoderma atrum*. *Food Chem. Toxicol.* 50, 689–694.

Liao, X.L., Luo, J.G., Kong, L.Y. (2013) Flavonoids from *Millettia nitida* var. *Hirsutissima* with their anticoagulative activities and inhibitory effects on NO production. *J. Nat. Med.* 67, 856–861.

Lima, L.B., Vasconcelos, C.F.B., Maranhão, H.M.L., Leite, V.R., Ferreira, P.A., Andrade, B.A., Araújo, E.L., Xavier, H.S., Lafayette, S.S.L., Wanderley, A.G. (2009) Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *J. Ethnopharmacol.* 126, 468–473.

Liu, Y., Wang, P., Chen, F., Yuan, Y., Zhu, Y., Yan, H., Hu, X. (2015) Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. *Food Chem.* 186, 46–53.

Lobo De Andrade, D.M., Reis, C.D.F., Castro, P.F.D.S., Borges, L.L., Amaral, N.O., Torres, I.M.S., Rezende, S.G., Gil, E.D.S., Cardoso Da Conceicao, E., Pedrino, G.R., Lavorenti Rocha, M. (2015) Vasorelaxant and hypotensive effects of jaborcaba fruit (*Myrciaria cauliflora*) extract in rats. *Evidence-based Complement. Altern. Med.*

Madikizela, B., Aderogba, M.A., Van Staden, J. (2013) Isolation and characterization of antimicrobial constituents of *Searsia chirindensis* L. (Anacardiaceae) leaf extracts. *J. Ethnopharmacol.* 150, 609–613.

Martins, N., Petropoulos, S., Ferreira, I.C.F.R. (2016) Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chem.* 211, 41–50.

Matsuo, A.L., Figueiredo, C.R., Arruda, D.C., Pereira, F. V., Borin Scutti, J.A., Massaoka, M.H., Travassos, L.R., Sartorelli, P., Lago, J.H.G. (2011)  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 449–454.

Milic, P.S., Rajkovic, K.M., Stamenkovic, O.S., Veljkovic, V.B. (2013) Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). *Ultrasonics Sonochemistry.* 20:525-534.

Ministério da Saúde (2017) *Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília.

Moura-Costa, G.F., Nocchi, S.R., Ceole, L.F., de Mello, J.C.P., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Temponi, L.G., Ueda-Nakamura (2012) Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Parana, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 143, 631–638.

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta.* 703: 8-18.

Ogungbe, I.V., Erwin, W.R., Setzer, W.N. (2014) Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. *J. Mol. Graph. Model.* 48, 105–117.

Ojewole, J.A. (2006) Hypoglycaemic and hypotensive effects of *Harpephyllum caffrum* Bernh ex CF Krauss (Anacardiaceae) stem - bark aqueous extract in rats. *Cardiovasc. J. South Africa* 17, 67–72.

Otaki, N., Kimira, M., Katsumata, S.-I., Uehara, M., Watanabe, S., Suzuki, K. (2009) Distribution and major sources of flavonoid intakes in the middle-aged Japanese women. *J.*



*Clin. Biochem. Nutr.* 44, 231–238.

Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M.F., Carvalho, A.P., Domingues, V.F., Gomes, A.M., Becker, H., Longhinotti, E., Delerue-Matos, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chem.* 172, 462–468.

Penso, J., Cordeiro, K.C.F.A., Da Cunha, C.R.M., Da Silva Castro, P.F., Martins, D.R., Lião, L.M., Rocha, M.L., De Oliveira, V. (2014) Vasorelaxant activity of 7- $\beta$ -O-glycosides biosynthesized from flavonoids. *Eur. J. Pharmacol.* 733, 75–80.

Pianalto, K., Alspaugh, J. (2016) New Horizons in Antifungal Therapy. *J. Fungi* 2, 1–26.

Povh, J.A., Santos, F.B., Silva, K.R. (2012) *Brazilian Geographical Journal : medium gênero Hyptis Jacq . ocorrentes no cerrado stricto sensu* 520–528.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011) Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chemie - Int.* 50, 586–621.

Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., López-Ribot, J.L. (2005) Candida Biofilms: an Update. *Eukaryot. Cell* 4, 633–638.

Rawat, P., Singh, P.K., Kumar, V. (2016) Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. *J. Herb. Med.* 6, 107–118.

Santos, I.S., Ponte, B.M., Boonme, P., Silva, A.M., Souto, E.B. (2013) Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon-rectal cancer. *Biotechnol. Adv.* 31, 514–523.

Santos, A. dos, Marques, M., Soares, A.K., Farias, L., Ferreira, A., Carvalho, M. (2014) Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. *Rev. Interdiscip.* 7, 149–156.

Sartorelli, P., Santana, J.S., Guadagnin, R.C., Lago, J.H.G., Pinto, É.G., Tempone, A.G., Stefani, H.A., Soares, M.G., Silva, A.M. (2012) *In vitro* trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim. Nova* 35, 743–747.

Seeff, L.B., Bonkovsky, H.L., Navarro, V.J., Wang, G. (2015) Herbal products and the liver: A review of adverse effects and mechanisms. *Gastroenterology* 148, 517–532.

Sen, S., De, B., Devanna, N., Chakraborty, R. (2013) Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. *Chin. J. Nat. Med.* 11, 149–157.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: *Antioxidant activity and health effects - A review.* *J. Funct. Foods* 18, 820–897.

Silva, M.M. da, Iriguchi, E.K.K., Kassuya, C.A.L., Vieira, M. do C., Foglio, M.A., Carvalho, J.E. de, Ruiz, A.L.T.G., Souza, K. de P., Formagio, A.S.N. (2017) *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and in vitro antioxidant, antiproliferative and in vivo anti-inflammatory activities. *Rev. Bras. Farmacogn.* 27, 445–452.

Taiz, L., Zeiger, E., (2013) *Fisiologia Vegetal.* 5.Ed.Porto Alegre: Artmed. 954p.

Tchikaya, F.O., Bantsielé, G.B., Kouakou-Siransy, G., Datté, J.Y., Yapo, P.A., Zirihi, N.G., Offoumou, M.A. (2011) *Anacardium occidentale* Linn. (Anacardiaceae) stem bark extract

induces hypotensive and cardio-inhibitory effects in experimental animal models. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8, 452–461.

Torres, K., Lima, S., Ueda, S. (2016) Activity of the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi on strains of the *Candida* genus. *Rev. Bras. Ginecol. e Obstet.* 38, 593–599.

Tupec, M., Hýsková, V., Bělonožníková, K., Hraníček, J., Červený, V., Ryšlavá, H. (2017) Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. *Food Biosci.* 20, 43–50.

Uliana, M.P., Fronza, M., da Silva, A.G., Vargas, T.S., de Andrade, T.U., Scherer, R. (2016) Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind. Crops Prod.* 83, 235–240.

Vo, T.S., Kim, S.K. (2013) Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. *J. Funct. Foods* 5, 16–27.

Wang, T., Li, Q., Bi, K. (2017) Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* 2-21

WHO. World Health Organization (2017) *The world medicines situation 2017: traditional medicines: global situation, issues and challenges*. Geneva.

Wong, B.Y., Tan, C.P., HO, C.W. (2013) Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of “Dukung Anak” (*Phyllanthus niruri*). *International Food Research Journal.* 20(1):25–330.

Xiao, J., Ni, X., Kai, G., Chen, X. (2015) Advance in Dietary Polyphenols as Aldose Reductases Inhibitors: Structure-Activity Relationship Aspect. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 16–31.

Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L. (2012) Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *The Journal os Supercritical Fluids.* 67:89-93.

Zhao, J., Chen, Y., LI, S. (2011) Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China. *Journal of Chromatography.* 1218(42):7453–7475.

## APÊNDICE A

No apêndice A são mostrados os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz), COSY (DMSO- $d_6$ , 500 MHz), HSQC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) e HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) da substância química naringenina, identificada na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi conforme descrito no item 5.1 (página 34) da presente tese.

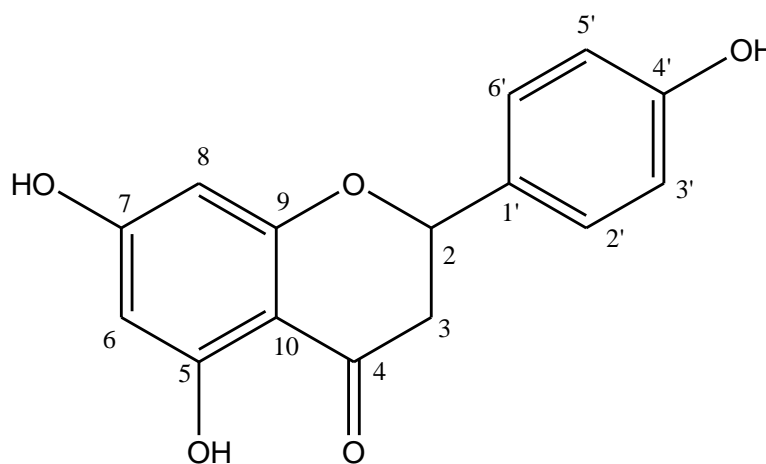


Figura A1 – Estrutura química na naringenina.

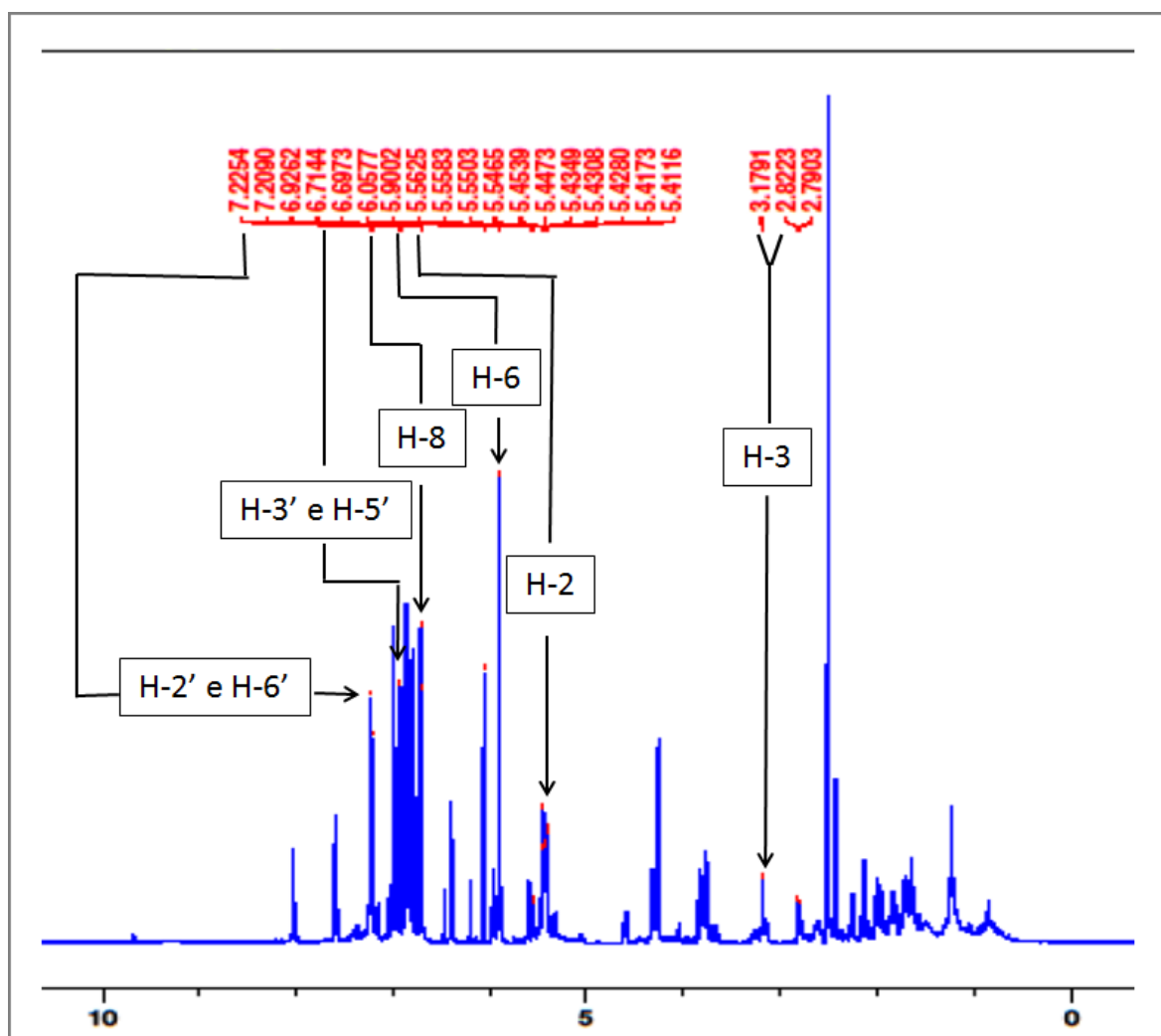


Figura A2 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da naringenina identificada na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

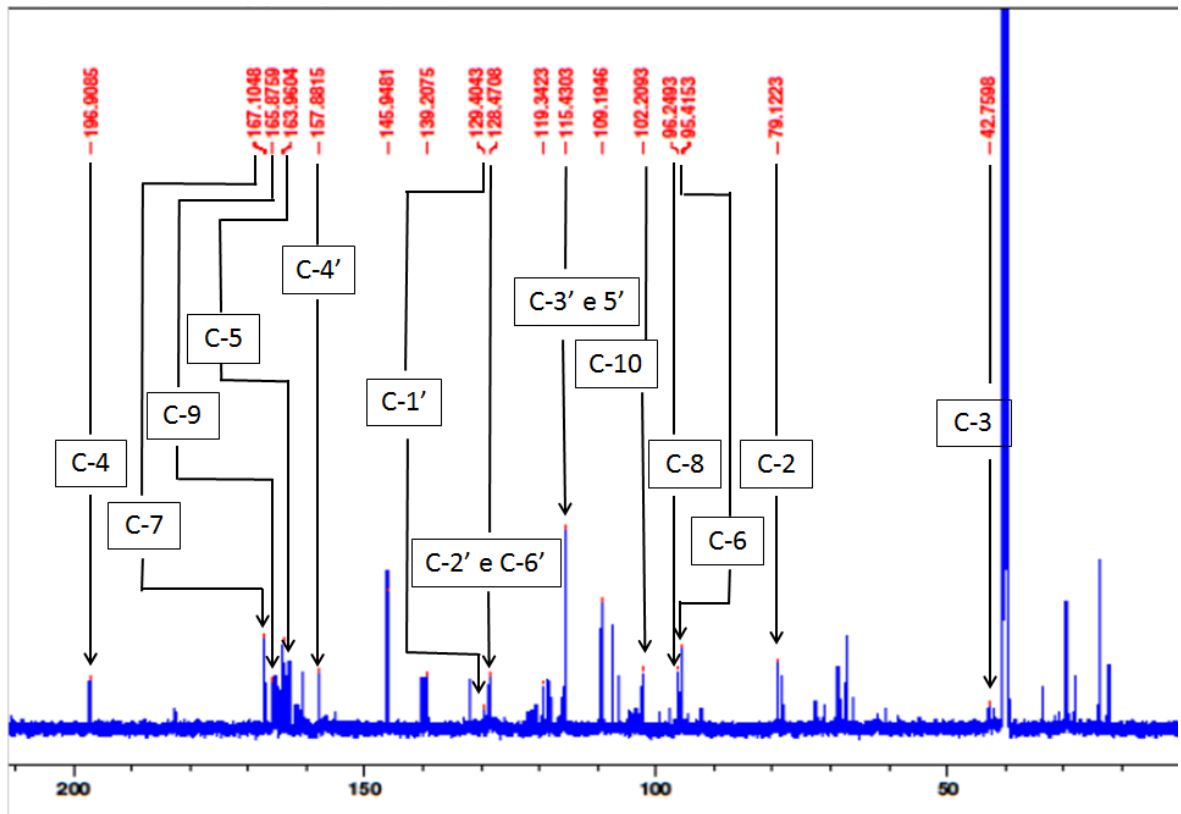


Figura A3 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da naringenina identificada na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

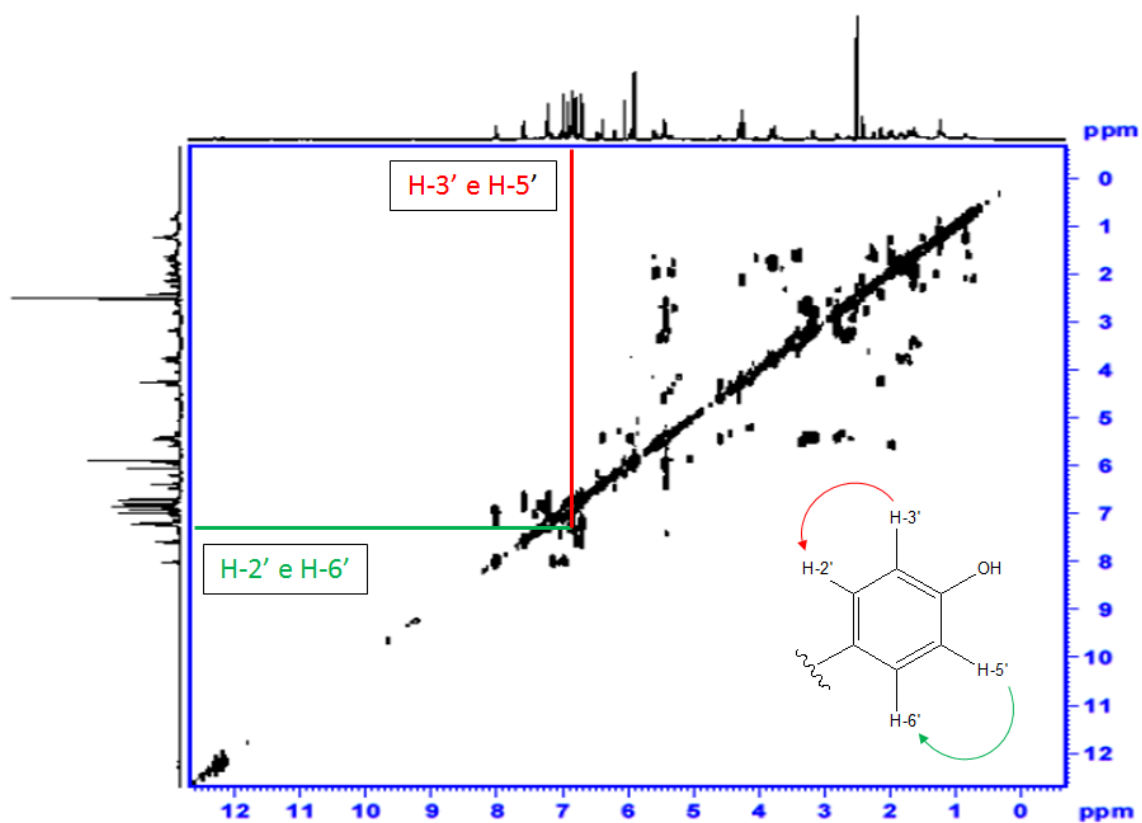


Figura A4 – Espectro de RMN – COSY da naringenina identificada na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

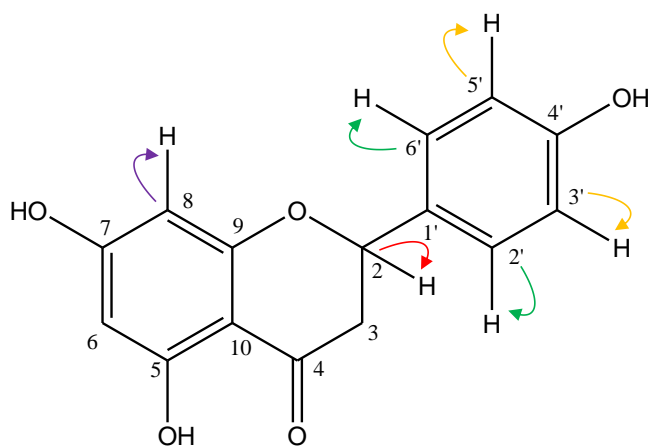
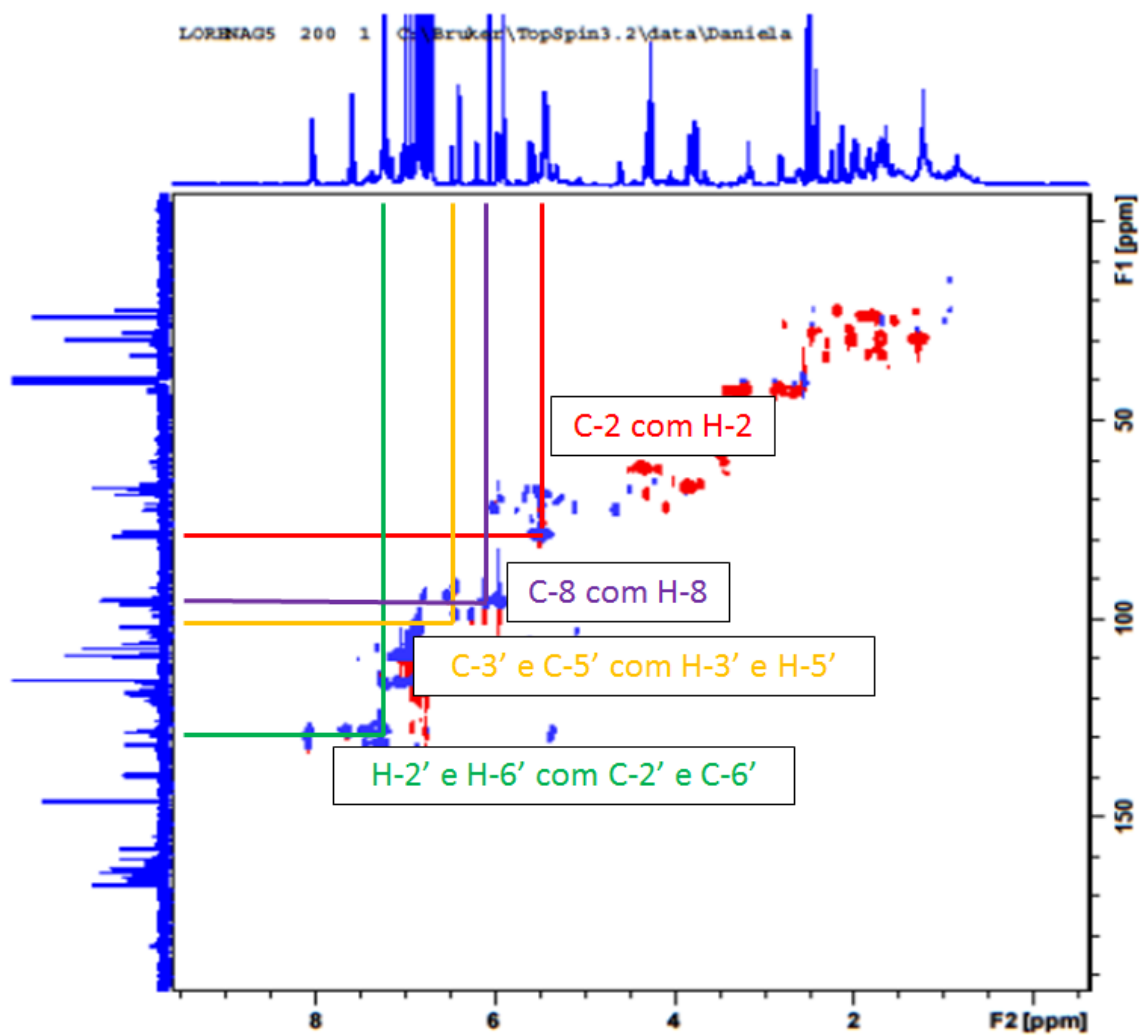


Figura A5 – Espectro de RMN – HSQC da naringenina identificada na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

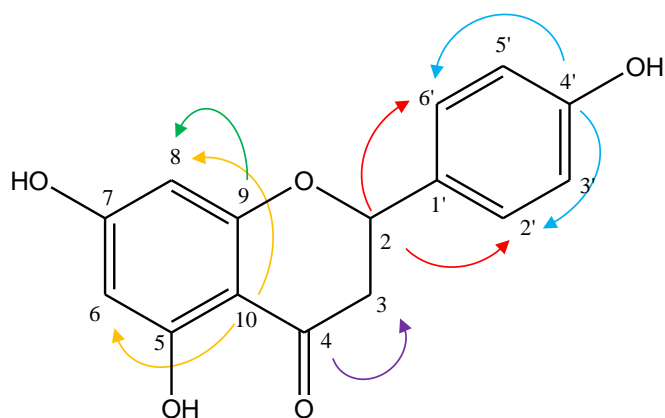
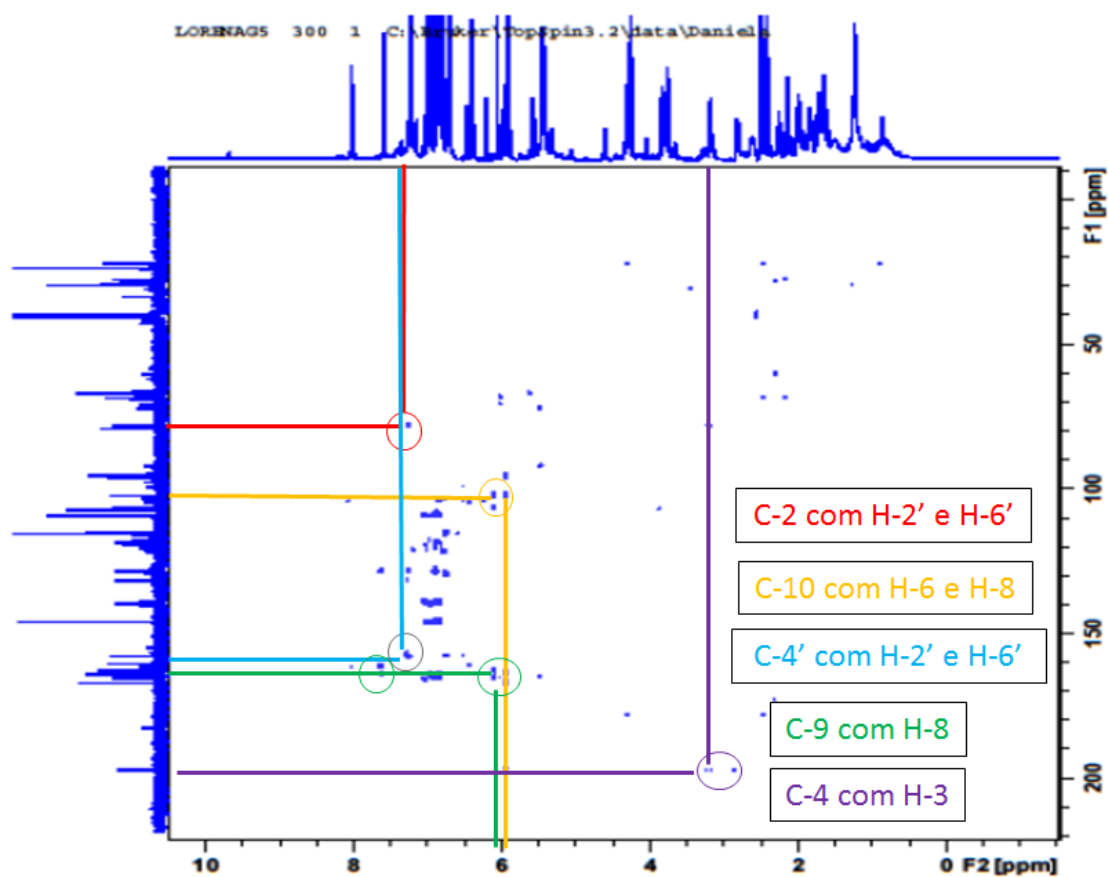


Figura A6 – Espectro de RMN – HMBC da naringenina identificada na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



## APÊNDICE B

No apêndice B são mostrados os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz), COSY (DMSO- $d_6$ , 500 MHz), HSQC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) e HMBC (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) da substância química ácido gálico, identificado na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi conforme descrito no item 5.1 (página 34) da presente tese.

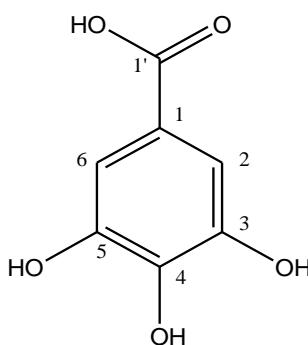


Figura B1 – Estrutura química do ácido gálico.

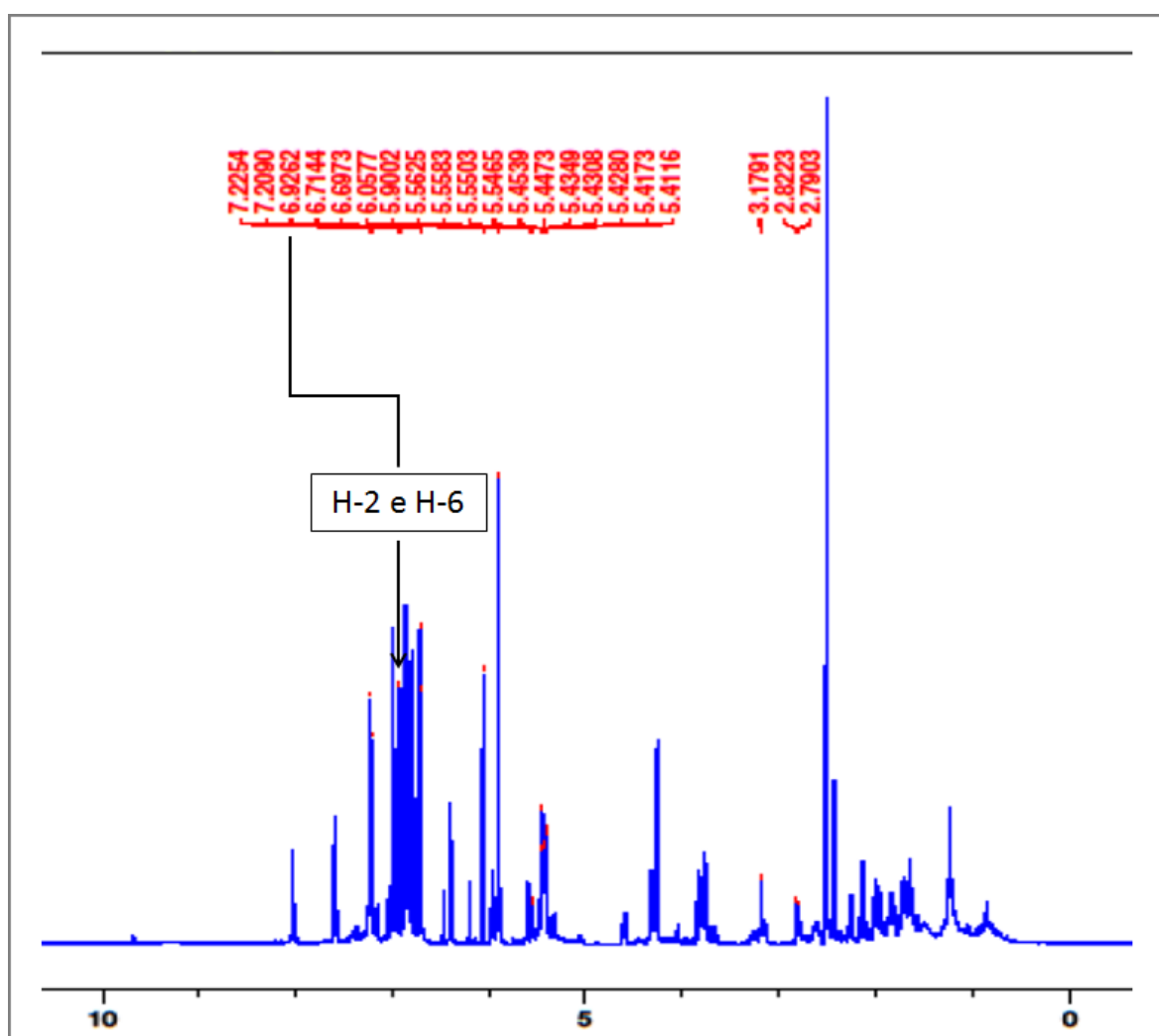


Figura B2 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do ácido gálico identificado na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

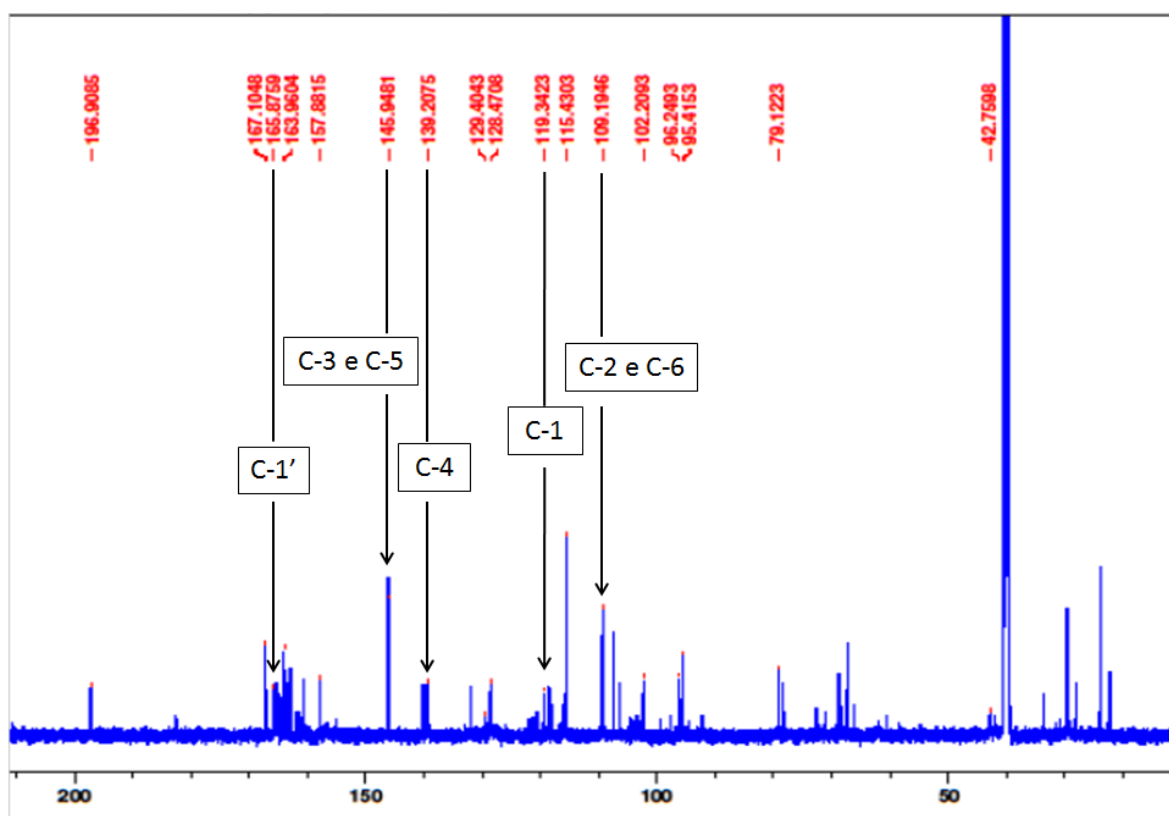


Figura B3 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do ácido gálico identificado na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

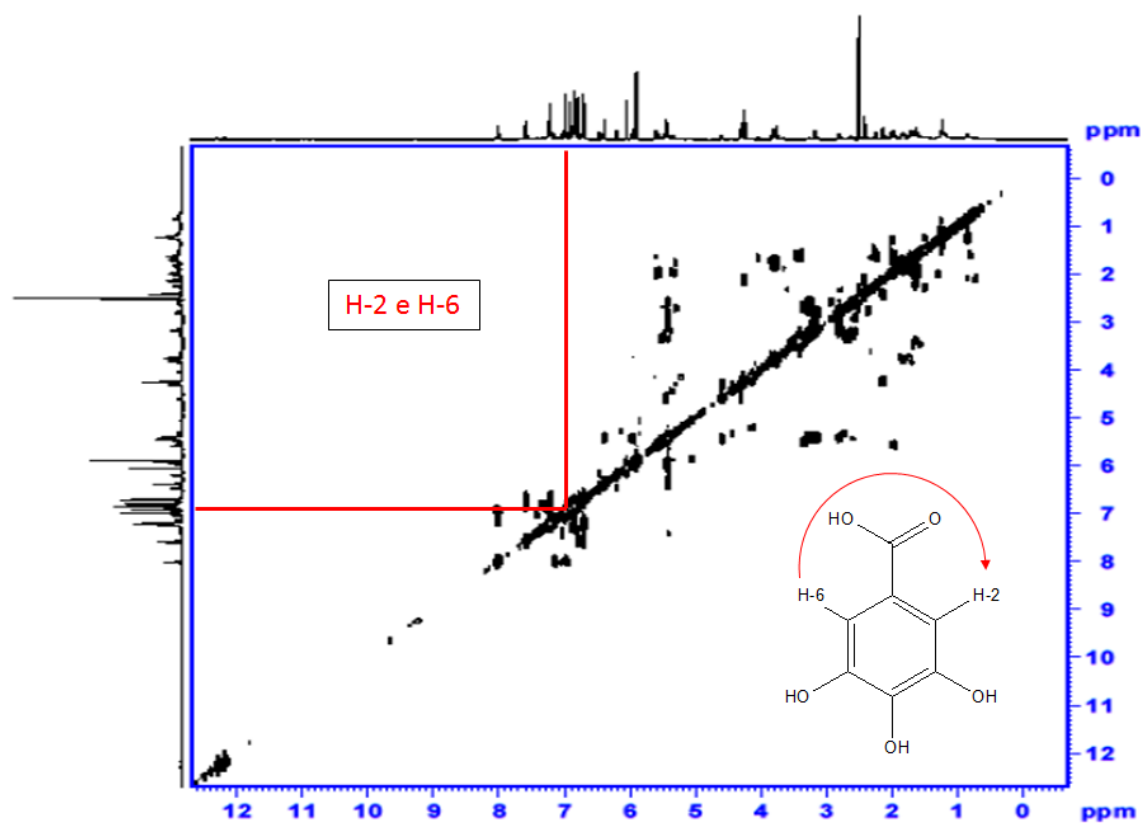


Figura B4 – Espectro de RMN – COSY do ácido gálico identificado na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

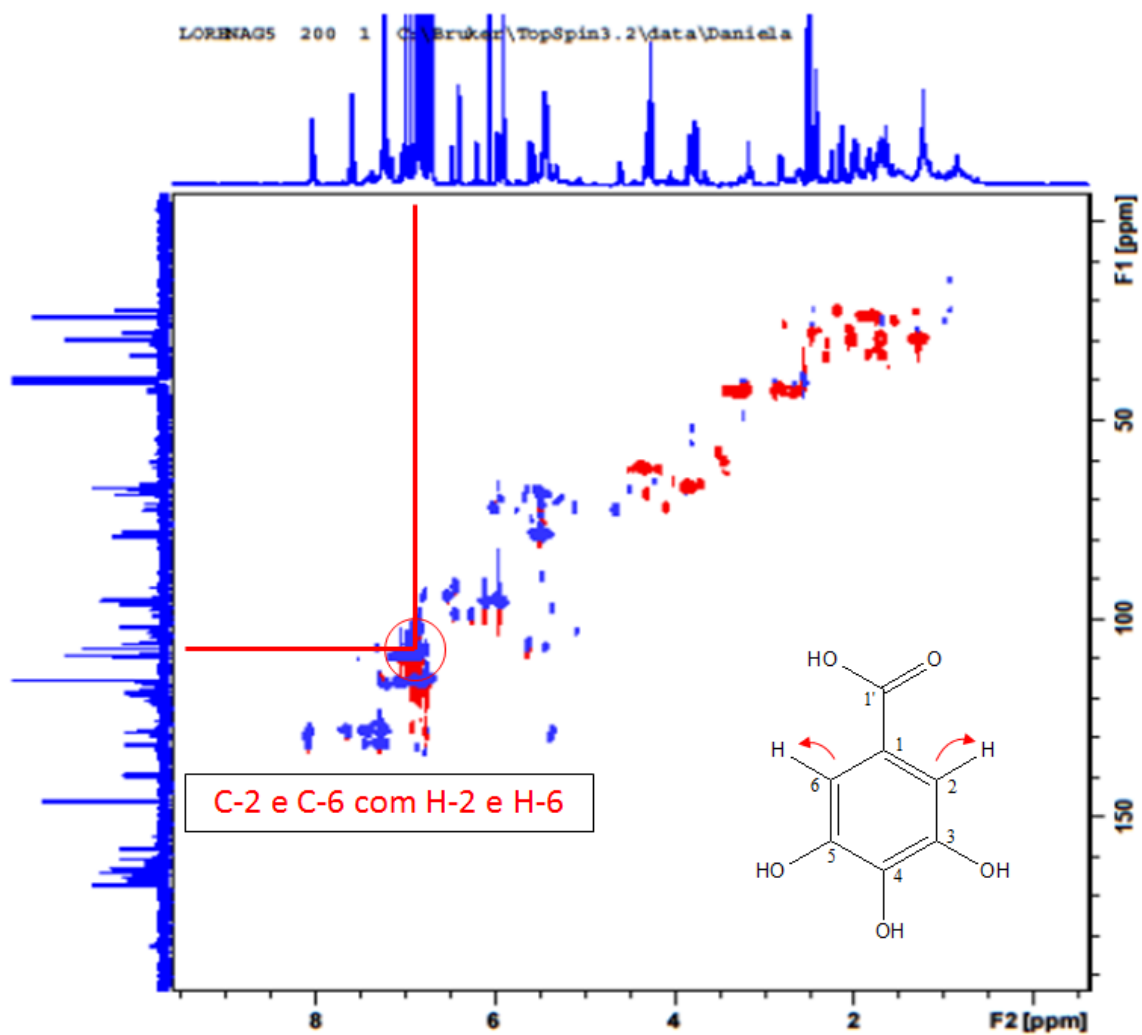


Figura B5 – Espectro de RMN – HSQC do ácido gálico identificado na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

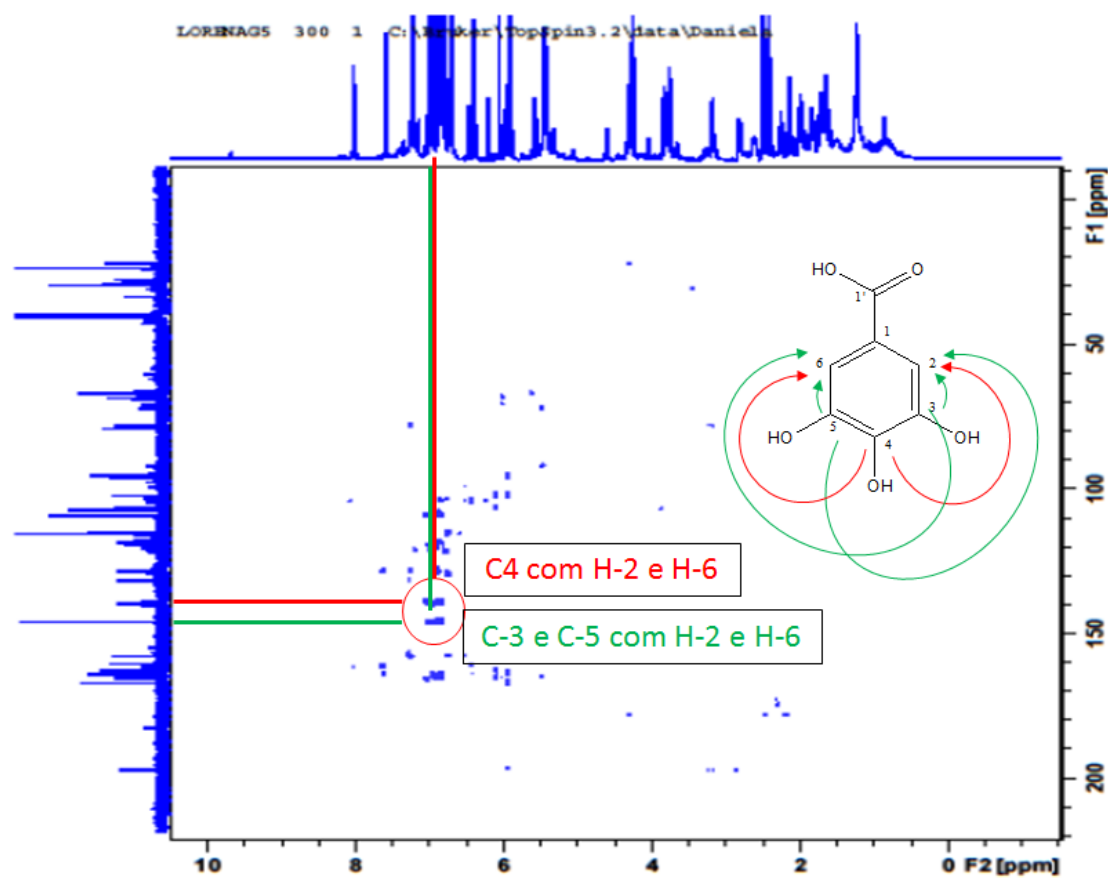


Figura B6 – Espectro de RMN – HMBC do ácido gálico identificado na fração G5 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

### APÊNDICE C

No apêndice C são mostrados os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ , 500 MHz),  $^{13}\text{DEPTQ}$  (MeOH- $d_4$ , 125 MHz), COSY (MeOH- $d_4$ , 500 MHz), HSQC (MeOH- $d_4$ , 500 MHz), HMBC (MeOH- $d_4$ , 500 MHz) e espectro de massas ESI-MS  $[\text{M} - \text{H}]^-$  da substância química amentoflavona, identificada na fração G7 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi conforme descrito no item 5.2 (página 60) da presente tese.

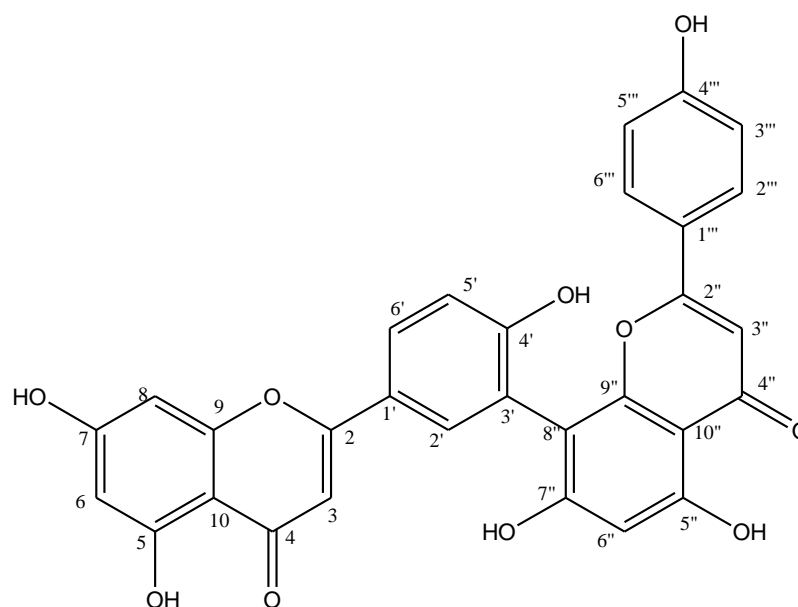


Figura C1 – Estrutura química da amentoflavona.

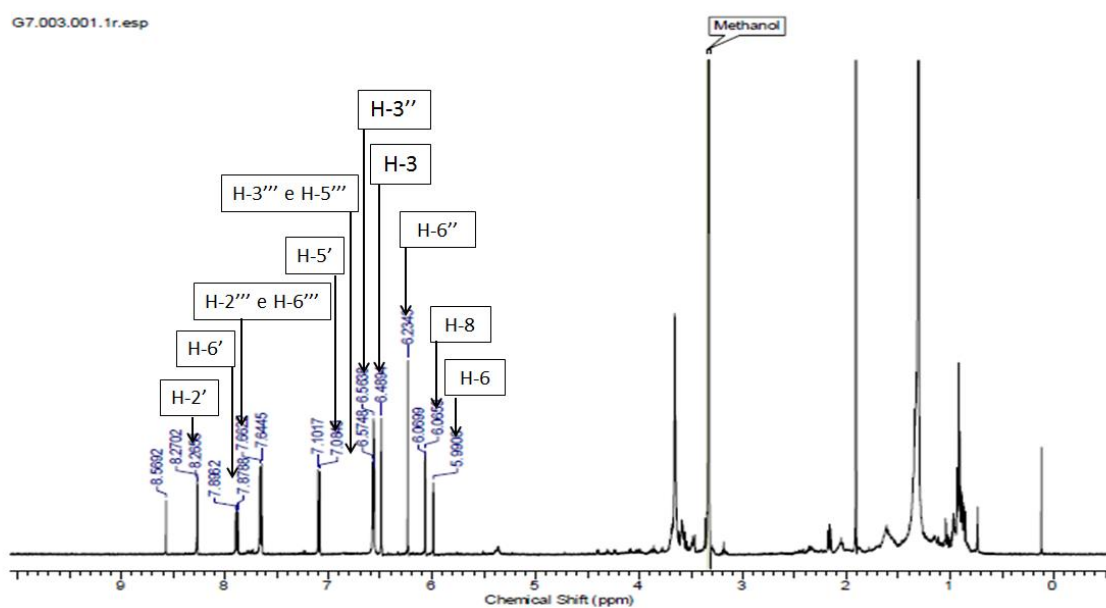


Figura C2 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da amentoflavona identificada na fração G7 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).



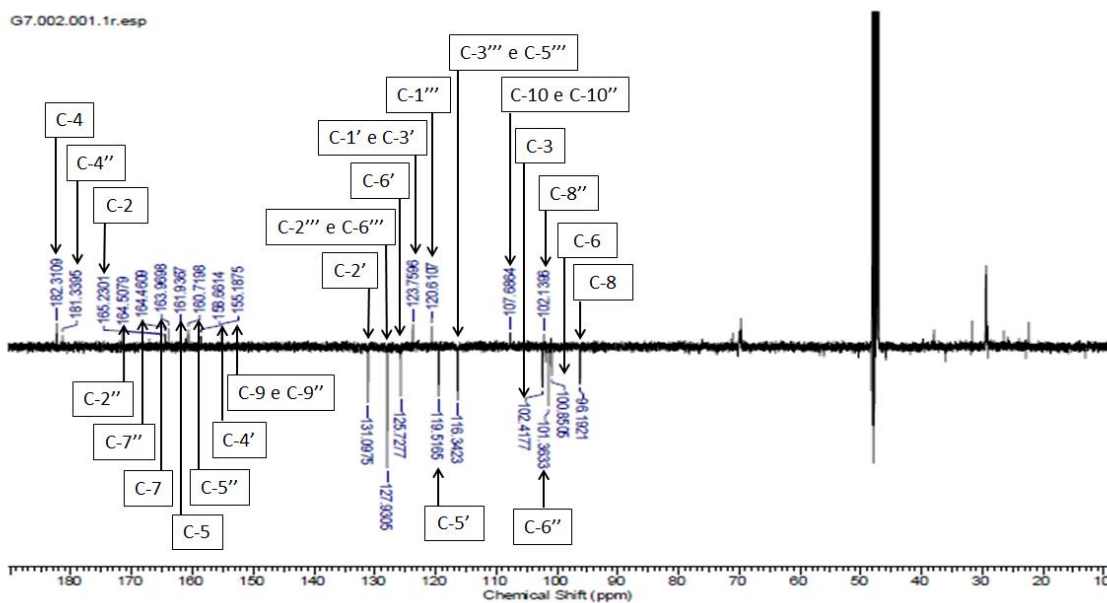


Figura C3 – Espectro de  $^{13}\text{DEPTQ}$  RMN da amentoflavona identificada na fração G7 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (MeOH- $d_4$ , 125 MHz).

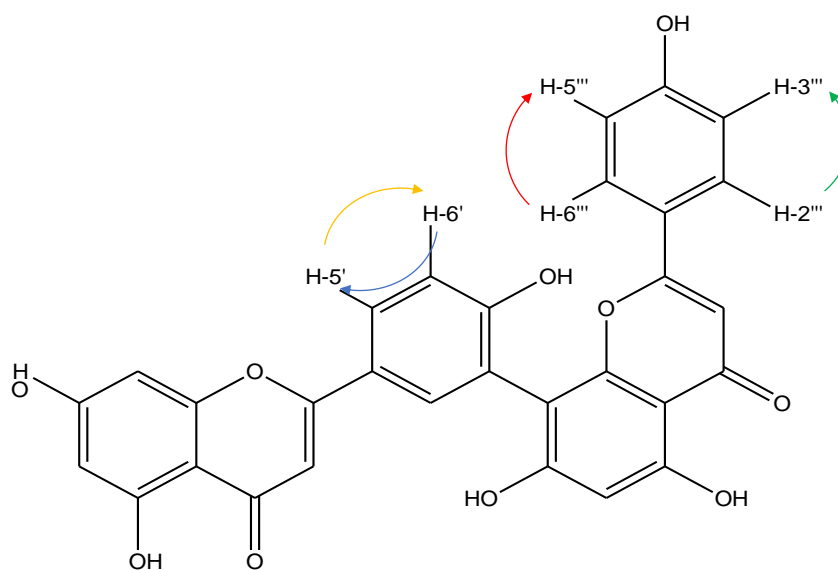
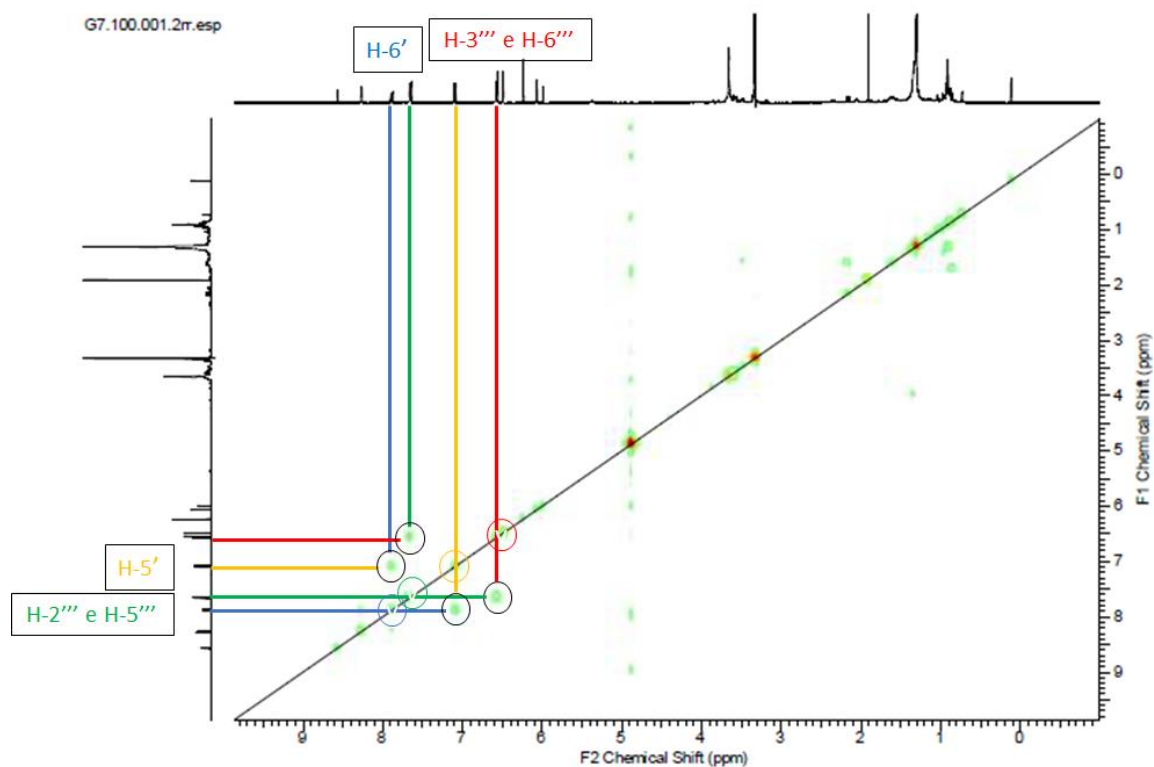


Figura C4 – Espectro de RMN - COSY da amentoflavona identificada na fração G7 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).

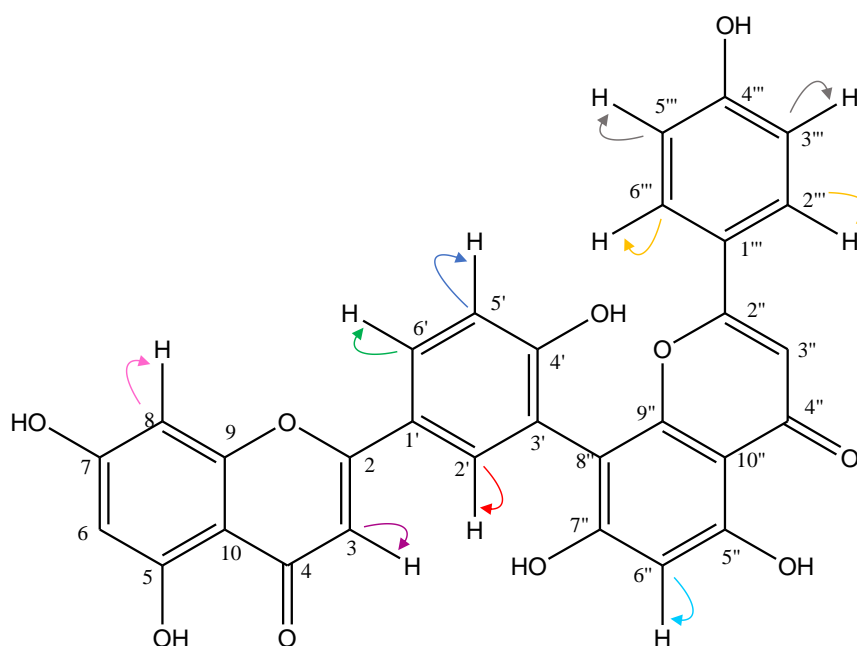
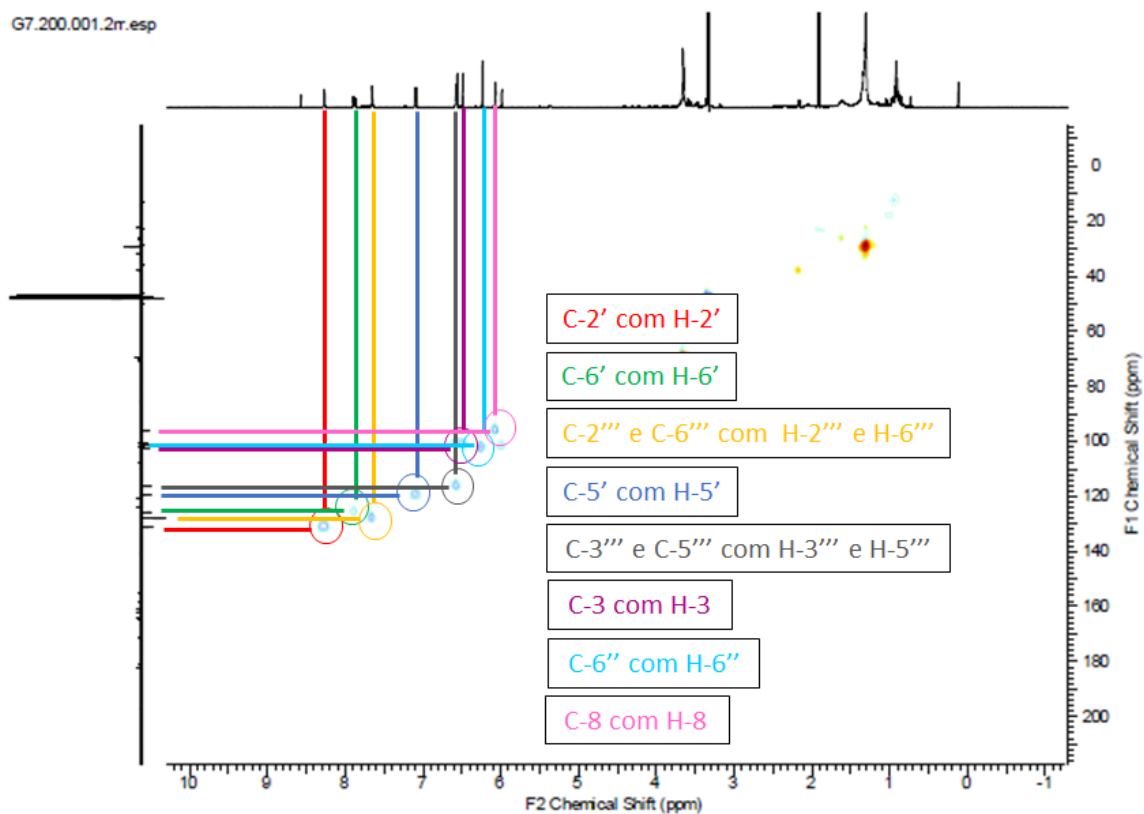


Figura C5 – Espectro de RMN - HSQC da amentoflavona identificada na fração G7 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).

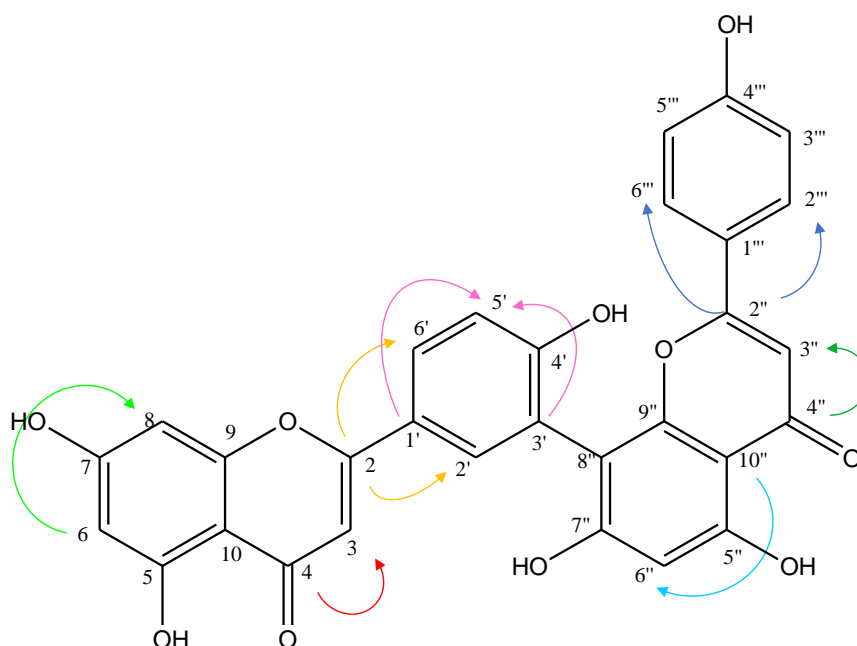
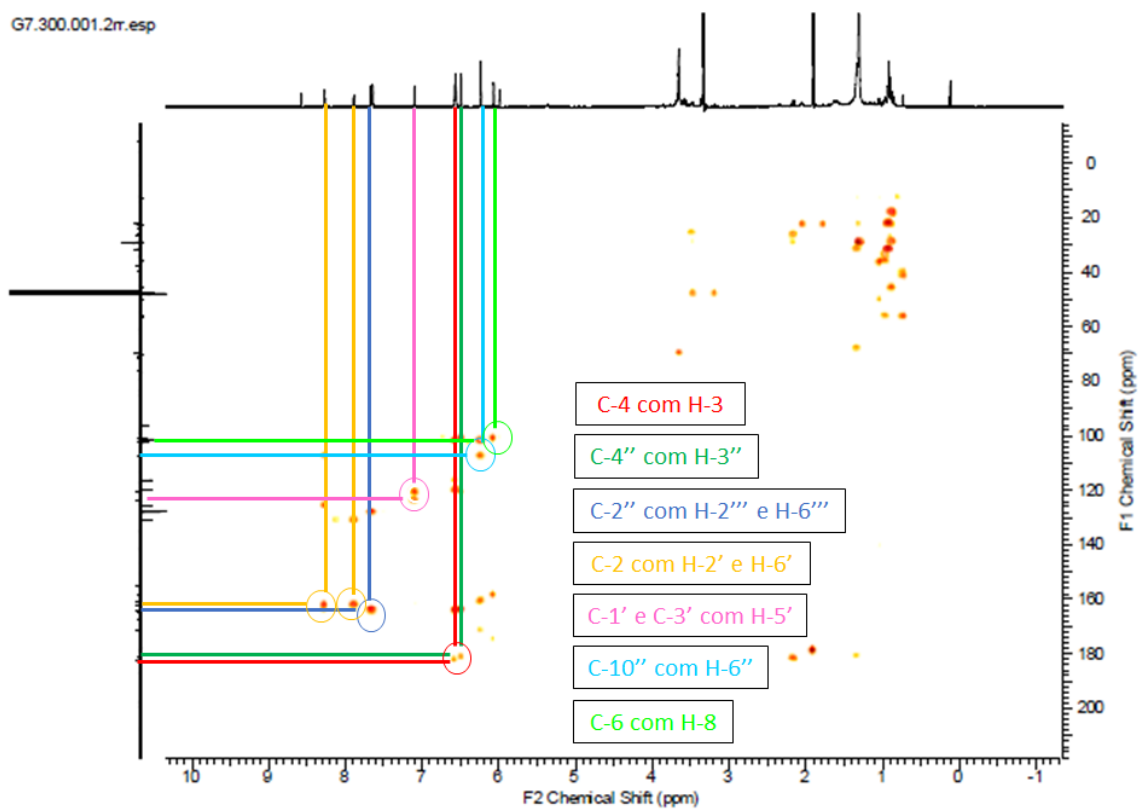


Figura C6 – Espectro de RMN - HMBC da amentoflavona identificada na fração G7 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (MeOH- $d_4$ , 500 MHz).

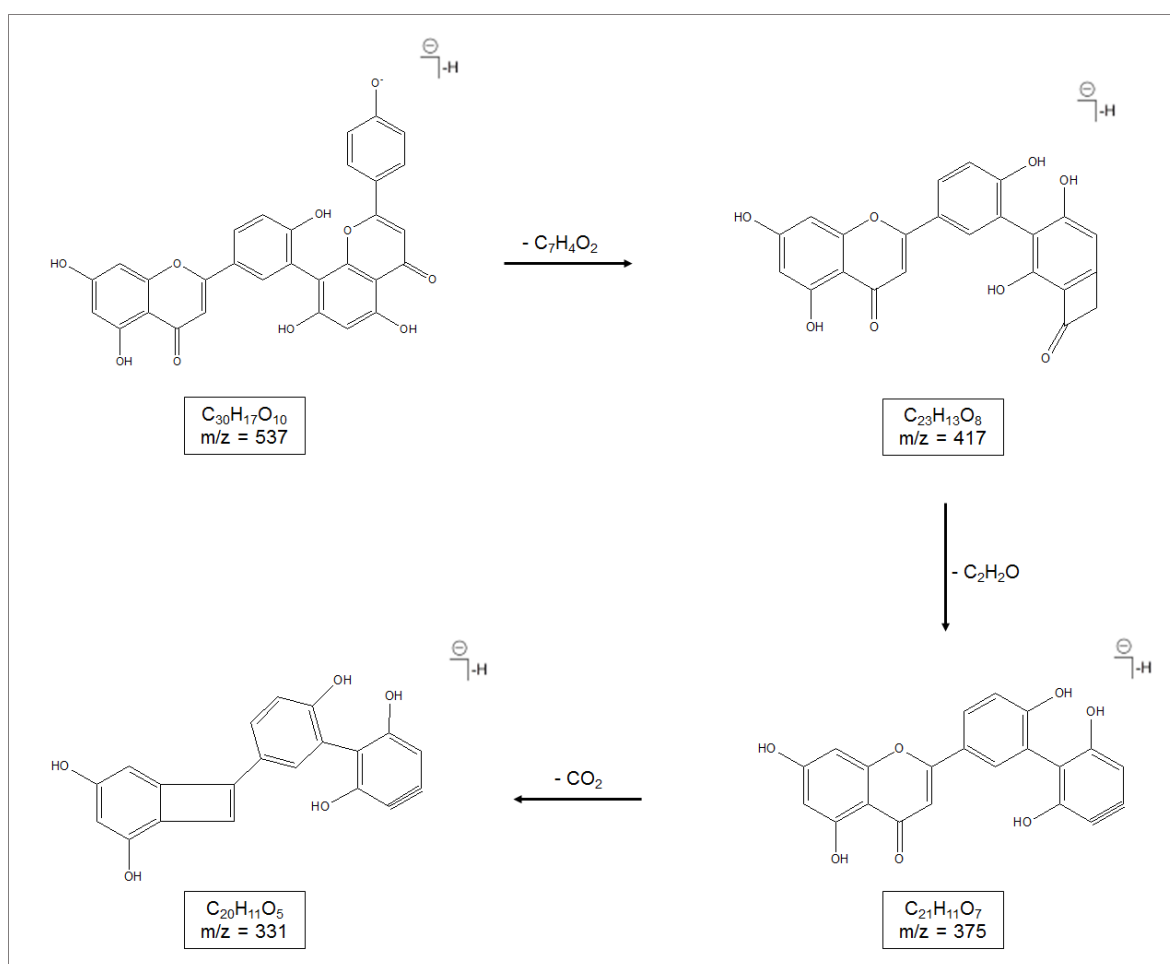
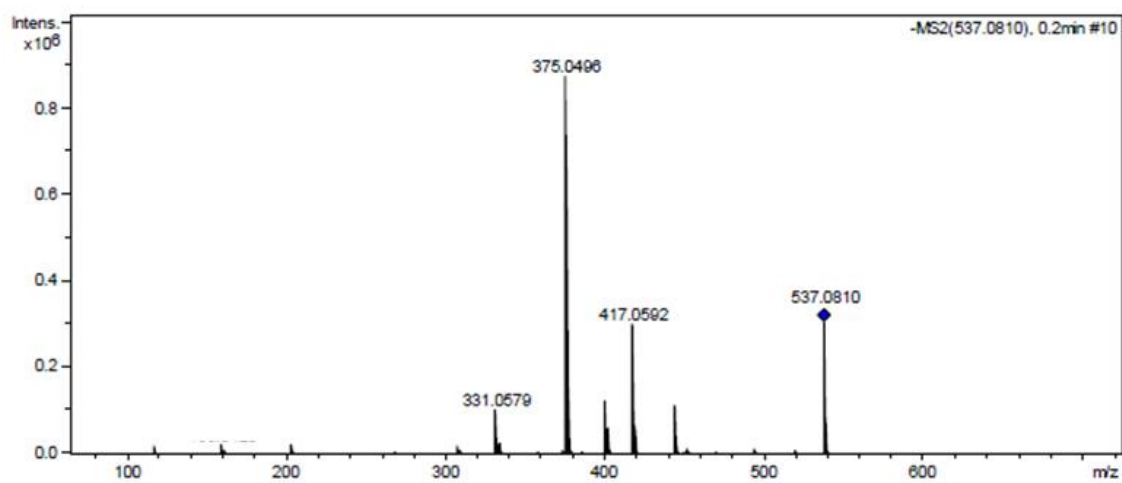


Figura C7 – Espectro de massas [M – H]<sup>-</sup> da amentoflavona identificada na fração G7 dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.