



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

**EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE
Psidium guajava VAR. *pomifera* L.**

TESE DE DOUTORADO

Antonio Ivanildo Pinho

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE
Psidium guajava VAR. *pomifera* L.**

por

Antonio Ivanildo Pinho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),

como requisito parcial para a obtenção do grau de

Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Luís Franco

Santa Maria, RS, Brasil
Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL E DO
EXTRATO HIDRO ALCÓOLICO DAS FOLHAS DE
Psidium guajava VAR. *pomifera* L.**

Elaborada por **Antonio Ivanildo Pinho**
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jeferson Luís Franco (Presidente/Orientador)

Prof^ª. Dr^ª. Daiana Silva de Ávila (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (URCA)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Ester Pereira (UFSM)

Prof^ª. Dr^ª. Nilda Berenice de Vargas Barbosa (UFSM)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jeferson Luís Franco, por acreditar que mesmo estando tão distante de você, eu seria capaz de chegar aqui nesse momento. Obrigado, Professor, assim realmente se muda o mundo.

Ao Professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, por incentivar os primeiros passos, e, literalmente nos empurrar de cabeça nesse doutorado. Sem a tua preciosa ajuda, eu não teria começado.

Ao Professor Dr. João Batista Teixeira da Rocha, pela coragem de desbravar esse Brasil, indo nos locais mais distantes, levando oportunidades àqueles que dificilmente as teriam sem a tua intervenção. Continue com esse ideal, pois somente assim a pesquisa terá futuro em nosso país.

Aos companheiros do laboratório da URCA: Saulo, João Vitor, Aldilene, Flaviana, Elba, e tantos outros que sempre se mostraram presentes quando mais precisava de vocês. Estou voltando para ajudar na árdua tarefa de fazer pesquisa no interior do Nordeste.

Aos companheiros do laboratório da UNIPAMPA, Denis, Litiele, Mauro, Gabriel Wallau, pelas contribuições nos experimentos e elaboração do primeiro artigo. Crescemos juntos.

Aos companheiros do laboratório da UFSM, Emylli, Claudia Vargas, Marcos, Diego, Bruna, Letícia, Fabrício Lovato, Fernanda, Jean Paul, pelas contribuições nesse momento de finalização de tese. Obrigado pela ajuda.

À amiga Cláudia Sirlene pela preciosa ajuda nessa reta final. Acredite sempre em você, pois a duplicata perfeita existe.

À Nadghia, por abrir as portas de tua casa para coleta de material e, prestar uma ajuda tão intensa nos primeiros passos.

Ao companheiro de batalha Francisco Cunha, pelas colaborações e mostrar-se sempre prestativo àqueles que de você precisa. Sempre saúde e paz.

Ao amigo Válter Barbosa, que sempre esteve presente em todos os momentos mais difíceis dessa caminhada. Obrigado pelas orientações que sempre me transmite,

pelo exemplo que sempre pregas e nunca desistir do que acredita. Você sabe da minha gratidão por tudo.

Aos professores e colegas do Programa de Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica que de alguma maneira contribuíram para minha formação científica.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, obrigada pela ajuda e amizade.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o período de Doutorado.

A Universidade Regional do Cariri – URCA pelo apoio e incentivo para a realização desse projeto.

E, em especial à minha família: Valéria, Lucas, Tiago e Letícia. Vocês são a base de tudo na minha vida. Obrigado por compreender a minha ausência física em tantos momentos dessas viagens intermináveis. Obrigado pelos telefonemas que acalentam a alma e revigoram o corpo. Obrigado por vocês existirem.

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Goiabeira | 16 |
| FIGURA 2. Goiabeira Fruto | 16 |
| FIGURA 3. Produção de Radicais Livres | 20 |
| FIGURA 4. Estresse Oxidativo | 21 |
| FIGURA 5. O sistema antioxidante | 22 |

2. RESULTADOS :

Artigo: Fumigant Activity of the *Psidium guajava* Var. Pomifera (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by Means of Oxidative Stress

FIGURE 1: Effect of the *P. guajava* var. pomifera essential oil in the survivorship of *D. melanogaster*. 32

FIGURE 2: Effect of *P. guajava* var. pomifera essential oil in the locomotor activity (negative geotaxis behavior) of *D. melanogaster*. 33

FIGURE 3: Analysis of the Nrf2/NQO-1/HSP70 signaling pathway in *D. melanogaster* exposed to *P. guajava* var. pomifera essential oil. 33

Manuscrito I: Scavenger and mercury chelating effects of hydro alcoholic *Psidium guajava* var. pomifera L. leaves extract

FIGURE 1: Representative high performance liquid chromatography profile of hydro alcoholic extract of *P. guajava* leaves. 66

FIGURE 2: Quenching of DPPH color by hydro alcoholic *Psidium guajava* leaves extract (HEPG). 67

FIGURE 3: Effect of hydro alcoholic *Psidium guajava* leaves extract (HEPG) on lipid peroxidation induced by iron. 68

FIGURE 4: Mercury chelating effect of hydro alcoholic *Psidium guajava* leaves extract (HEPG) – colorimetric assay. 69

FIGURE 5: Effect of of hydroalcolic extrat *P. Guajava* leaves (A) and HgCl₂ (B) on *S. cerevisiae* growth. 71

FIGURE 6: Effects of hydro alcoholic extract of *P. guajava* a leaves and 100 (A), 125 (B) and 150 (C) uM of HgCl₂ in *S. cerevisiae* growth. 72

LISTA DE TABELAS

3. RESULTADOS:

Artigo: Fumigant Activity of the *Psidium guajava* Var. Pomifera (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by Means of Oxidative Stress

Table 1: Chemical composition (%) of the *P. guajava* var. pomifera essential oil. ... 32

Table 2: Oxidative stress markers and activity of enzymes involved in the antioxidant metabolic routes in *D. melanogaster* exposed to the *P. guajava* var. pomifera essential oil. 33

Manuscrito I: Scavenger and mercury chelating effects of hydro alcoholic *Psidium guajava* var. pomifera L. leaves extract

Table 1: Composition of hydro alcoholic extract of *P. guajava* leaves. 64

Table 2: Amount of Hg in supernatant and pellet of hydroalcolic extrat *P. Guajava* leaves. 65

LISTA DE REDUÇÕES (ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS)

°C: graus Celsius;

µg: micrograma;

µL: microlitro;

µmol: micromol;

ANOVA: análise de variância;

ARE: resposta antioxidante;

BAL: 2,3 – dimercaptopropanol;

BHA: butil hidroxianisol;

BHT: butil hidroxitolueno;

CAT: catalase;

CDNB: 1-cloro -2,4-dinitrobenzeno;

cm: centrímetro;

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila;

DFCZ: 1,5-diphenylcarbazon;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

DFCDA: 2,7- diclorofluoresceína diacetato;

DMSA: ácido meso-2-3-dimercaptosuccinico;

DMPS: ácido 2,3-dimercapto-1-propanesulfonico;

FLONA: Floresta Nacional do Araripe;

g: grama;

GCL: glutamato cisteína;

GCMS: cromatografia gasosa com espectrofotômetro de massa;

GS-SG: glutationa dissulfeto;

GSH: glutationa;

GSH-Px: glutationa peroxidase;

GST: glutationa S-transferase;

GPHR: glutationa redutase;

h: hora;

ha: hectare;

HEPG: extrato hidro alcóolico das folhas de *Psidium guajava* var. *pomifera* L.;

Hg: mercúrio;

HO•: radical hidroxila;

H₂O₂: peróxido de hidrogênio;
H₂S: Cinnabar;
HSP70; proteína do choque térmico;
ICP-AES: espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente;
Keap1: kelch-like EHC-associated protein 1;
kg: quilograma;
L.: Linneu;
LC₅₀: concentração letal mediana;
LP: peroxidação lipídica;
LOD: limite de detecção;
LOQ: limite de quantificação;
MAPK: mitogen activated protein kinases;
MDA: malonaldeído;
mg: miligrama;
min: minuto(s);
mM: milimolar;
NAD(P)H: nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato hidrogenado;
nm: nanômetro;
NQ01: NADH quinona oxirredutase 1;
NPSH: tióis não proteicos;
Nrf2: fator de transcrição nuclear;
OE: óleos essenciais;
OEPGP: óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* var. *pomifera* L;
pH: potencial hidrogeniônico;
PSH: tióis proteicos;
ppm: partes por milhão
PhSe₂: disseleneto de difenila;
ROS: espécies reativas de oxigênio;
rpm: rotações por minuto;
SD: desvio padrão;
SOD: superóxido dismutase;
S. cerevisae: *Sacharomyces cerevisae*;
TBA: ácido tiobarbitúrico;
TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico;

var.: variação;

1-NQO: quinona oxidoreductase;

YPD: levedura peptonada dextrose;

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1.INTRODUÇÃO | 16 |
| 2.OBJETIVOS | 27 |
| 3.RESULTADOS | 28 |
| 3.1Artigo: Fumigant Activity of the <i>Psidium guajava</i> Var. Pomifera (Myrtaceae) Essential Oil in <i>Drosophila melanogaster</i> by Means of Oxidative Stress | |
| <i>Abstract</i> | 29 |
| <i>1.Introduction</i> | 29 |
| <i>2.Materials and methods</i> | 30 |
| <i>3.Results</i> | 31 |
| <i>4.Discussion</i> | 32 |
| <i>References</i> | 35 |
| 3.2Manuscrito I Scavenger and mercury chelating effects of hydro alcoholic <i>Psidium guajava</i> var. pomifera L. leaves extract | |
| <i>Abstract</i> | 38 |
| <i>1.Introduction</i> | 39 |
| <i>2.Materials and methods</i> | 41 |
| <i>3.Results</i> | 48 |
| <i>4.Discussion</i> | 50 |
| <i>References</i> | 54 |
| 4.DISSCUSSÃO | 75 |
| 5.CONCLUSÕES | 82 |
| PERSPECTIVAS | 83 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 84 |

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrito uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta tese. No final deste item estão apresentados os objetivos geral e específicos.

Os **RESULTADOS** estão dispostos na forma de artigo científico e manuscrito submetido à publicação. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no artigo e nos manuscritos e representam a integra deste estudo.

No item **DISCUSSÃO** estão apresentados as interpretações e comentários gerais sobre o artigo e o manuscrito científico apresentados.

No item **CONCLUSÕES** são apresentadas as conclusões gerais do presente trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** apresentadas no final da tese referem-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO**.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS BIOLÓGICOS DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO HIDRO ALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Psidium guajava* VAR. POMIFERA L.

Autor: Antonio Ivanildo Pinho
Orientador: Prof. Dr. Jeferson Luís Franco
Local e data da defesa: Santa Maria, 17 de dezembro de 2015.

A família Myrtaceae possui 145 gêneros. No Brasil são registrados 23 gêneros e cerca de 1.013 espécies. Muitas plantas desta família são utilizadas na alimentação, como os frutos da *Psidium guajava* L., popularmente conhecidos como goiaba. As folhas da goiabeira são utilizadas na medicina popular para cólicas, colite, diarreia, disenteria e dor de barriga. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos biológicos do óleo essencial (OEPGP) e do extrato hidro alcóolico (HEPG) das folhas de *Psidium guajava* var. *pomifera* L. Para avaliar a ação bioinseticida do OEPGP foram utilizadas *Drosophila melanogaster*. A exposição das moscas ao OEPGP foi realizada por um protocolo de fumigação: moscas adultas (machos e fêmeas) foram colocadas em frascos de vidro, contendo um papel filtro embebido em 1% de sacarose. Um papel filtro foi fixado no lado interior da tampa para aplicação de diferentes doses de óleo essencial (0, 3, 7,5, 15, 23,5 e 30 µg/mL). A mortalidade das moscas foi avaliada 6, 12, 24 e 48 h. Por sua vez, para avaliar a ação antioxidante e quelante contra o mercúrio foram elaborados ensaios de DPPH, TBARS e 1,5-difenilcarbazona, nas concentrações de 0, 0,1, 0,2 e 0,4 mM de HgCl₂ e concentrações de 0, 25, 33, 50, 100 e 200 µg/mL do HEPG. O crescimento celular foi avaliado utilizando *Sacharomices cerevisiae*, os quais foram expostos a concentrações de 100, 125 e 150 µM de HgCl₂ e 0, 0,25, 0,5, 1, 1,25, 2,25 e 5 µg/mL de HEPG. Os resultados mostram que o OEPGP apresenta uma ação bioinseticida quando as moscas foram expostas às concentrações de 23,5 e 30 µg/mL. A atividade locomotora foi comprometida nas concentrações de 15, 23,5, e 30 µg/mL nas primeiras 6 h de tratamento. O OEPGP causou aumento nos níveis de TBARS e na atividade das enzimas antioxidantes GST e CAT. Por sua vez, o HEPG apresenta elevadas concentrações de fenóis e flavonoides e apresentou atividade antioxidante, comprovada nos ensaios de TBARS e DPPH. A ação quelante do HEPG foi comprovada pelo ensaio da 1,5-difenilcarbazona e pelas dosagens dos níveis de Hg por ICP-AES. O HEPG evitou parcialmente a morte celular causada por HgCl₂. Nosso estudo indicou que HEPG tem efeitos antioxidantes e de proteção contra o estresse oxidativo causado pelo HgCl₂, enquanto que o óleo essencial apresenta uma ação bioinseticida por desencadear uma ação pró-oxidante.

Palavras-chaves: *Psidium guajava*, óleo essencial, extrato hidro alcóolico, enzimas antioxidantes, quelação, mercúrio, bioinseticida.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Graduate Program in Biological Science: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

BIOLOGIC EFFECTS OF ESSENTIAL OIL AND HIDROALCOOLIC EXTRACT OF *Psidium guajava* VAR *POMIFERA* L.

Author: Antonio Ivanildo Pinho

Advisor: Jeferson Luis Franco

Date and place of the defense: Santa Maria, December 17, 2015.

The Myrtaceae family has 145 genera. In Brazil are recorded 23 genera and about 1,013 species. Several plants of this family are used in food stuffs, for example, *Psidium guajava* L. fruits, commonly known as guava. In folk medicine *Psidium guajava* L. leaves are used for colic, colitis, diarrhea, dysentery, and stomach illness. The objective of this study was to evaluate the biological effects of essential oil (OEPGP) and hydro alcoholic extract (HEPG) of *Psidium guajava* var. *pomifera* L. To evaluate the OEPGP bioinsecticide effect *Drosophila melanogaster* were used. The flies exposure to OEPGP was performed by a fumigation protocol: Adult flies (males and females) were placed in glass vials containing a filter paper soaked in 1% sucrose. Then, a filter paper was set on the inner side of the cover containing the OEPGP (0, 3, 7.5, 15, 23.5 and 30 µg/ml). The flies mortality was assessed 6, 12, 24 and 48 h. In turn, to assess antioxidant and chelating action against inorganic mercury, DPPH, TBARS, and 1,5 diphenylcarbazone assays were carried out using 0, 0.1, 0.2, and 0.4 mM HgCl₂ and 0, 25, 33, 50, 100 and 200 µg/ml of EHAPGP. Cell growth was assessed using *Sacharomices cerevisiae*, which were exposed to concentrations of 100, 125 and 150 mM of HgCl₂ and 0, 0.25, 0.5, 1, 1.25, 2.5, and 5 µg/ml of HEPG. Our results showed that OEPGP has a bioinsecticide action when flies were exposed to concentrations of 23.5 and 30 µg/ml. Locomotor activity was impaired at concentrations of 15, 23.5, and 30 µg/ml during the first 6 hours of treatment. The OEPGP caused an increase in TBARS levels and in antioxidant enzymes activities. In turn, the HEPG has high concentrations of phenols and flavonoids and showed antioxidant activity, as demonstrated in the DPPH and TBARS assays. The chelating action of HEPG was proven by the test of 1.5 difenilcarbazone and the dosages of Hg levels by ICP-AES. The HEPG partially prevented the cell death caused by HgCl₂. Our study indicated that HEPG has antioxidant and HgCl₂ protection purposes, while the essential oil presents a bioinsecticide action to trigger a pro-oxidant action.

Keywords: *Psidium guajava*, essential oil, hydro alcoholic extract, antioxidant enzymes, chelation, mercury, biopesticide

1.INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Psidium guajava* var. *pomífera* L. corresponde a goiabeira (Figura 1 e 2), cujo fruto constitui a goiaba vermelha, pertencente à família das Myrtaceae, assim como são também o Eucaliptus e plantas frutíferas dos trópicos como a pitanga, a grumichama, o jambo e a Feijoa sellowiana. É originária da América Tropical, possivelmente entre o México e o Peru, onde ainda pode ser encontrada em estado silvestre. Sua capacidade de dispersão e rápida adaptação a diferentes ambientes possibilitaram a presença dessa planta em amplas áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo mesmo considerada uma praga em algumas regiões (MENZEL, 1985).



Figura 1: Goiabeira. Retirado de “<http://www.jardindasideias.com.br/907-goiabeira>”, acessado em 23 de novembro de 2015 as 09:41h. (http://www.jardindasideias.com.br/public/userfiles/image/2014/ABR/10/10_04%20Goiabeira%20Cr%C3%83%C2%A9dito%20Culturamix.jpg)



Figura 2: Goiabeira Fruto. Retirado de “<http://www.achetudoeregiao.com.br/arvores/goiabeira.htm>”, acessado em 23 de novembro de 2015 as 09:54h. (http://www.achetudoeregiao.com.br/arvores/Arvores.gif/goiabeira_fruto.jpg)

O Brasil, com uma área estimada em torno de 18.000 ha, é o terceiro maior produtor mundial de goiaba, destacando-se entre os maiores produtores, como Índia,

Paquistão, México, Egito, Venezuela, África do Sul, Jamaica, Quênia e Austrália. (ZAMBÃO E NETO, 1998) Os estados brasileiros de São Paulo e Pernambuco distinguem-se como os mais importantes e respondem, em conjunto, por 46% da área cultivada de goiaba no país. Os Estados da Bahia, do Rio Grande do Sul, do Rio de Janeiro e do Ceará também tem grandes áreas produtoras de goiaba. (PECHE, 2012). A goiaba possui lugar de destaque entre as frutas tropicais, principalmente devido ao seu valor nutritivo com elevados teores de vitamina C e A, e ao sabor e aroma característicos, que lhe conferem excelente qualidade organoléptica (RISTERUCCI et al., 2005). Estas características do fruto fazem com que o cultivo da goiabeira ganhe cada vez mais espaço. É comum doces, geleias, compotas, sucos a partir dos frutos da goiabeira (SÃO JOSÉ et al., 2003).

As plantas do gênero *Psidium* são utilizadas pela população como agentes anti-infecciosos e muitas são utilizadas na forma de chás, destacando-se dentre estas a goiabeira de polpa vermelha (*Psidium guajava* var. *pomifera* L). O relato de sucesso terapêutico deste procedimento sugere uma ação antimicrobiana no mecanismo de ação destes chás (GUTIERREZ et al. 2008). Gonçalves et al. (2005) e Lima et. al. (2008) mencionaram em seus estudos no controle de lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) que o óleo essencial das folhas de *Psidium guajava* var. *pomifera* L. apresentou uma ação bioinseticida, sugerindo também que a goiabeira poderia ser potencialmente importante no controle de pragas na agricultura. Escrig et al. (2001) relatam que o principal constituinte do extrato metanólico das folhas da goiabeira é a quercetina, sendo um flavonóide reconhecido por suas propriedades antioxidantes. Dessa forma, temos nas folhas de *Psidium guajava* var *pomifera* L um potencial bioinseticida (óleo essencial) e antioxidante (extrato) a ser estudado.

1.1 CONTROLE DE PRAGAS NA AGRICULTURA

Inseticidas são substâncias químicas utilizadas para matar, atrair e repelir insetos, sendo sua descoberta, isolamento, síntese, avaliação toxicológica e de impacto ambiental um vasto tópico de pesquisas no mundo inteiro e que tem se desenvolvido bastante nas últimas décadas. A toxicidade de uma substância química em insetos não a qualifica necessariamente como um inseticida. Diversas propriedades devem estar

associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos (MARICONI, 1963; JÚNIOR, 2003).

Na Índia, por volta de 2.000 A.C., já fazia-se o uso de inseticidas botânicos (provenientes de plantas) para o controle de pragas. No Egito, durante a época dos Faraós, e na China, por volta do ano de 1.200 A.C., inseticidas derivados de plantas já eram usados para controle de pragas de grãos armazenados. Os mesmos eram aplicados diretamente nos grãos ou por fumigação destes. Já no século 16 os europeus faziam uso de diversas plantas para efetuarem o controle de pragas. Entretanto, após a II Guerra Mundial, com o advento dos inseticidas organosintéticos, o uso de inseticidas botânicos foi reduzido (FLINT E BOSCH, 1981; CASIDA E QUISTAD, 1998; THACKER, 2002). Esses inseticidas apresentam a vantagem de um controle mais rápido gerando uma maior produtividade.

No Brasil, observamos cada vez mais a expansão das áreas agricultáveis e, com isso aumentou também consideravelmente o número de pragas, deixando os agricultores muitas vezes na dependência de controle químico. Isso pode trazer diversas consequências ao meio ambiente e a saúde humana, e nem sempre proporcionando resultados de controle satisfatórios (LEITE et al., 2006). Com o aumento dos danos e o surgimento de populações de insetos-praga resistentes a diversos defensivos agrícolas, os produtores voltaram-se para os métodos alternativos de controle que, se utilizados corretamente, podem manter a população da praga em níveis satisfatórios, ou seja, em níveis abaixo daqueles que causariam danos econômicos (FERNANDES E CARNEIRO, 2006). Dentre estes métodos destacam-se os bioinseticidas extraídos de plantas.

As plantas, como organismos que coevoluem com insetos e outros microorganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico. Inúmeras substâncias acumulam-se no vegetal para sua defesa contra microorganismos (SIMAS et al., 2004). Os derivados de plantas, extratos e óleos, são amplamente conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação na indústria. As plantas possuem uma rica fonte de bioativos químicos que podem ajudar no controle de pragas. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas contribui de forma

relevante para a divulgação de suas propriedades, despertando o interesse de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento (MACIEL, 2002).

Os inseticidas naturais, dentre os quais pode ser destacado o uso de produtos alternativos, como pós e extratos botânicos, e óleos essenciais de origem vegetal (ARRUDA e BATISTA, 1998), podem ser utilizados tanto no manejo integrado de pragas em cultivos comerciais, como também, na agricultura orgânica. Esses óleos devem ser utilizados como um método de controle eficaz, para redução dos custos, preservação do ambiente e dos alimentos da contaminação química, tornando-se prática adequada à agricultura sustentável (KÉITA et al., 2001; ROEL, 2001). O uso de óleos e extratos vegetais ou de metabólitos secundários de plantas é uma ferramenta a mais a ser incorporada nos sistemas alternativos de produção de alimentos e nos sistemas convencionais como forma de aumentar a sustentabilidade e segurança dos mesmos (SILVA et al., 2010).

Os óleos essenciais (OE) são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007). São compostos naturais, voláteis e complexos. As propriedades farmacológicas atribuídas aos OE são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações (BANDONI e CZEPAK, 2008). São de fácil aquisição, baixo custo e ainda favorece o pequeno agricultor (SILVA et al. 2007).

Os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida, (RAJKUMAR et al., 2010), atividade antioxidante (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), fungicida (CARMO et al., 2008) e atividade antitumoral (SILVA, 2008).

A capacidade citotóxica baseada em sua capacidade pró-oxidante podem fazer dos OE excelentes inseticidas para preservação de grãos e estoques de alimentos (SILVA, 2008). Os organismos dispõem de mecanismos de proteção contra a ação pró-oxidante desses agentes. Ela se dá através de mecanismos de defesa antioxidante enzimática e não enzimática. A avaliação das defesas antioxidantes representam uma ferramenta importante para identificar a ação de agentes pró-oxidantes, dentre estas, os óleos essenciais de plantas.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.

Compostos pró-oxidantes têm a capacidade de gerar um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os mecanismos de reparo. Alterações nas defesas antioxidantes são marcadores de toxicidade induzida por pesticidas, seja naturais ou sintéticos, metais pesados como o Hg, e outros agentes que gerem radicais livres.

Um radical livre é qualquer espécie que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (HALIWELL, 1987). Os radicais livres derivados de oxigênio são genericamente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS) e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo (MILLER et al., 1990).

Várias vias de produção de ROS são descritas e apresentadas na Figura 3

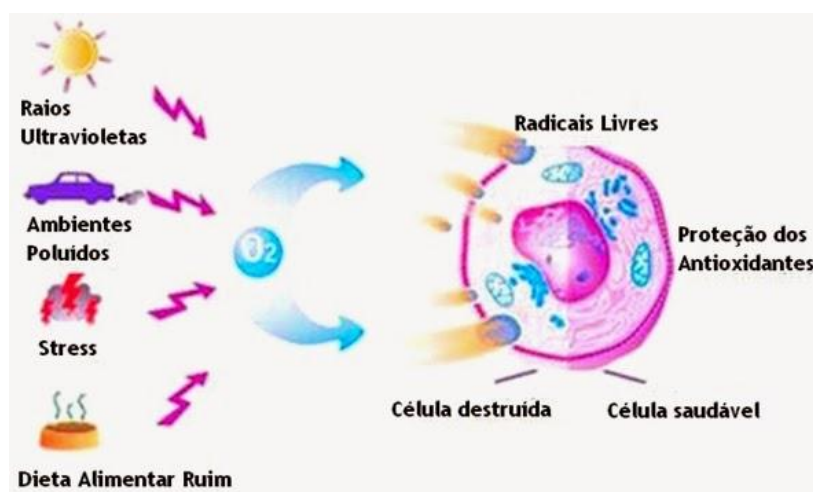


Figura 3: Produção de Radicais Livres. Retirado de “ <http://varievo.com/informacoes/cinco-excelentes-fontes-alimentares-com-antioxidantes>”, acessado em 23 de novembro de 2015 as 10:17h. (<http://varievo.com/wp-content/uploads/Antioxidantes.jpg>)

Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS são benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (FRIDOVICH, 1999). No entanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva de ROS, ou porque existe uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula (MACHLIM, 1987). A este desequilíbrio chamamos estresse oxidativo (Figura 4) e nestas situações as ROS em excesso podem oxidar e danificar lípideos, proteínas e

DNA, causando perdas de suas funções (VALKO, et al., 2007, FU et al., 1998; RIDNOUR, 2005).



Figura 4: Estresse Oxidativo. Retirado de “<http://vidanutritiva.net/wp/estresse-oxidativo-e-desenvolvimento-de-doencas/>”, acessado em 23 de novembro de 2015 as 10:24h. (<http://vidanutritiva.net/wp/wp-content/uploads/2013/10/EO-2-compressed.jpg>)

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são neutralizados pelas defesas antioxidantes da célula, que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (VALKO et al., 2007).

As defesas antioxidantes enzimáticas são em grande número e encontram-se distribuídas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular. A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutaciona peroxidase (GSH-Px), a glutaciona redutase (GPHR), são importantes enzimas com ação antioxidante nos sistemas biológicos (VALKO et al., 2007).

A SOD converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio que é em seguida transformado em água pela CAT nos lisossomos, ou pela GSH-Px. Outra enzima importante é a GSH-R que regenera a GSH que é depletada pela GSH-Px comoadora de hidrogênio necessário para a redução do peróxido de hidrogênio em água (JOHANSEN, 2005).

A ação das enzimas antioxidantes pode ser analisada na Figura 5:

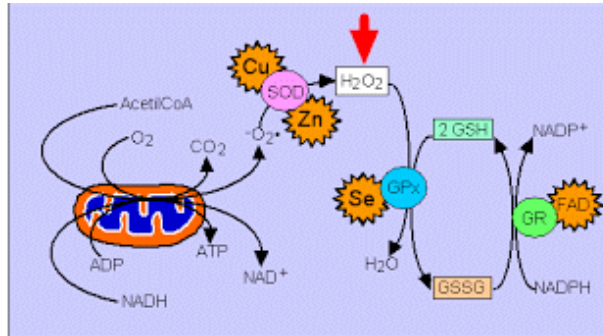


Figura 5: O sistema antioxidante. Retirado de “ <http://biobioradicaais.blogspot.com.br/>”, acessado em 23 de novembro de 2015 as 10:45h. (http://3.bp.blogspot.com/_Bx9TlpLoC00/SRDIU4elq0I/AAAAAAAAAEE/7QJjZ5Cm84U/s320/figura05.gif)

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a glutatona (GSH) o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides, entre outros (VALKO et al., 2007). A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular, composto por glutamato, cisteína e glicina. É muito abundante, sendo o principal tampão redox intracelular. Como defesa antioxidante desempenha várias funções. É um quelante de radicais livres ($\text{HO}\cdot$, H_2O_2 , $\text{LOO}\cdot$ e ONOO^-), quer reagindo diretamente com estes, quer indiretamente como cofator de enzimas antioxidantes como a GSH-Px e a GST, entre outras. No processo de neutralização de radicais livres, a GSH é oxidada com a formação do radical $\text{GS}\cdot$. Este radical livre também é reativo mas rapidamente reage com um segundo radical $\text{GS}\cdot$ formando a molécula glutatona dissulfeto (GS-SG), que não é oxidante. A GS-SG é novamente reduzida a duas GSH pela enzima GPHR (PASTORE et al., 2003). Uma das principais vias para se obter estes antioxidantes são encontrados, principalmente, nos extratos vegetais.

1.3 EXTRATOS VEGETAIS E AÇÃO ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em pequenas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação. Estes compostos inibem não só a peroxidação dos lipídeos, mas também, a oxidação de outras moléculas, como proteínas, DNA, entre outras (HALLIWELL et al., 1995).

Compostos químicos que possuem atividade antioxidante geralmente são aromáticos e contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria de alimentos. Os antioxidantes naturais, denominados substâncias bioativas, incluem organosulfurados, os fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), os terpenos, carotenóides e o ácido ascórbico que fazem parte da constituição de diversos alimentos (VELIOGLU, 1998).

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade dos antioxidantes sintéticos causarem efeito carcinogênico em experimentos com animais (BOTTERWECK et al., 2000). Em alguns estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido. Em humanos, a relevância dessa observação não está clara (CRUCES-BLANCO et al., 1999). A redução dos níveis de hemoglobina e a hiperplasia de células basais foram atribuídas ao uso de BHT (MADHAVI et al., 1995).

Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado. BHT não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Européia (REISHE et al., 1997). No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita 200 mg/kg para BHA e 100 mg/g para BHT como concentrações máximas permitidas (ANVISA, 2015).

Em virtude desses indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002). Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados os tocoferóis e os ácidos fenólicos.

As plantas sintetizam compostos antioxidantes, principalmente fenólicos, como um mecanismo de defesa contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio. A atividade antioxidante destes compostos fenólicos está relacionada a vários mecanismos, como a captura ou neutralização de radicais livres, a doação de hidrogênio, a inativação do oxigênio *singlete*, a quelação de íons metálicos, além de atuarem como substrato para radicais superóxido e hidroxil (RICE-EVANS et al., 1995; PIETTA, 2000; NÍCIFOROVÍČ et al., 2010). Desta forma, atuam tanto na etapa de

iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUZA et al., 2007). Assim, os extratos da planta, que podem ser a partir de raízes, caules, folhas, frutos ou sementes, são importantes fontes destes compostos.

Segundo Iha et al. (2008) o extrato etanólico das folhas de *Psidium guajava* apresenta flavonoides e taninos. Este dado corrobora com o estudo de Silva et al. (2013) que detectaram no extrato hidroetanólico das folhas de *P. guajava* flavonoides e taninos como também saponinas, alcaloides e cumarinas. Segundo Silva et al. (1998) os compostos fenólicos podem quelar metais.

1.4 MERCÚRIO: CONTAMINAÇÃO E TOXICIDADE

O Mercúrio (Hg) é um metal naturalmente encontrado na crosta terrestre, presente no ar, no solo e na água. Este metal assume diversas formas químicas, que podem ser divididas nas seguintes categorias: mercúrio metálico ou elementar (Hg), mercúrio inorgânico, principalmente na forma de sais mercúricos (HgCl_2 , HgS) e mercurosos (Hg_2Cl_2), e mercúrio orgânico, ligado a radicais de carbono, por exemplo metilmercúrio e etilmercúrio (MMA, 2015).

Os primeiros relatos de uso do Hg pela população humana foram creditados aos chineses, os quais utilizavam o cinnabar (HgS) como pigmento para fabricação de tinta vermelha (PARK E ZHENG, 2012). Os alquimistas utilizavam o mercúrio na forma líquida, fazendo amálgamas com o ouro (princípio da mineração), e após a evaporação do mercúrio diziam ter produzido ouro. Com o decorrer do desenvolvimento de novas tecnologias, o Hg passou a ser utilizado na fabricação destes produtos, sendo este, parte integrante ou participante no processo de produção (CLARKSON et al., 2007).

O mercúrio, sob condições normais, é encontrado em baixas concentrações no ambiente, sendo naturalmente liberado devido a processos erosivos e erupções vulcânicas. A contaminação ambiental por mercúrio é, portanto, resultado de ações antrópicas (resultado da ação humana) que envolvem este elemento. As principais fontes antropogênicas de mercúrio são (ECYCLE, 2015):

- Queima de carvão, petróleo e madeira: o processo emite, na atmosfera, o mercúrio contido nesses materiais;

- Fabricação de produtos que utilizam o mercúrio como matéria-prima, como termômetros e lâmpadas fluorescentes;
- Descarte inadequado do mercúrio após sua utilização em processos industriais, como produção de cloro-soda;
- Descarte incorreto de produtos eletroeletrônicos contendo mercúrio;
- Mineração do ouro, na qual o mercúrio é usado para facilitar o processo de separação de partículas.

Uma vez na forma orgânica de metilmercúrio, o mercúrio entra na cadeia alimentar através da rápida difusão e forte ligação com as proteínas da biota aquática, atingindo sua concentração máxima em tecidos de peixes do topo da cadeia (HORVAT, 1996). Dessa forma, ao se alimentar de organismos aquáticos, o homem incorpora o mercúrio ao seu metabolismo, gerando diversas ações danosas a sua atividade metabólica (BARKAY et al., 2003; DOREA et al., 2003).

No organismo humano o sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, onde afeta, principalmente, áreas específicas do cérebro, como cerebelo e lobos temporais. A intoxicação por metilmercúrio se caracteriza por ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários), disartria (problemas nas articulações das palavras), parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e pés e em torno da boca), visão de túnel (constricção do campo visual) e perda da audição. Os primeiros sintomas aparecem alguns dias após a exposição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia, freqüentemente, de 16 a 38 dias (BAHIA, 1997; BAKIR et al., 1973).

Entre as décadas de 50 e 70, no Japão, ocorreu o mais famoso caso de contaminação com mercúrio orgânico. A contaminação ocorreu na Baía de Minamata. Em virtude disto, os sintomas apresentados pela população ficaram conhecidos como doença de Minamata. Uma fábrica de acetaldeído da região despejava seus resíduos na baía; estes continham mercúrio inorgânico, o qual acabou sendo incorporado na cadeia alimentar, na forma de metilmercúrio (MeHg) (CLARKSON, 2002; EKINO et al., 2007). Os habitantes da região, os quais se alimentavam basicamente de peixe, foram expostos ao MeHg por um longo período. Após um período de latência, a população da região começou a apresentar elevada irritabilidade, cansaço, visão turva, diminuição da audição, distúrbios olfativos e gustativos e tremores. Entretanto, os danos mais graves

foram observados em crianças expostas ao metal no útero e, após o nascimento, através do leite materno. As mesmas apresentaram danos irreversíveis no desenvolvimento motor e mental (EKINO et al., 2007; TSUDA et al., 2009).

Apesar dos distúrbios neurológicos estarem mais relacionados à contaminação por mercúrio orgânico (principalmente metilmercúrio), alguns estudos têm demonstrado uma relação do mercúrio inorgânico (como por exemplo, o cloreto de mercúrio), com sintomas neurológicos, como a insônia. A insônia é reconhecida entre um dos sintomas de contaminação crônica do mercúrio há vários anos e desde os primeiros estudos ela vem sendo relacionada à irritabilidade, dificuldade na concentração, perda de memória, apatia e baixa estima acentuada. Acredita-se que estas alterações no ciclo de sono possam ser explicadas por um severo prejuízo neuropatológico, incluindo múltiplos circuitos neurais, associados com a absorção e a ação do mercúrio pelo sistema nervoso central (ROSSINI et al., 2000).

Além desses problemas, a exposição ao mercúrio pode também desencadear disfunções imunológicas (SILBERGELD et al., 1998), efeitos teratogênicos, pois o mercúrio tanto pode passar a barreira placentária como também pode ser transferido via leite materno (SCHUURS, 1999), problemas hormonais do eixo hipotalâmico-hipofisário, gerando inclusive esterilidade nos organismos (SIKORSKI et al., 1987).

Portanto, estudos com OE e extratos de folhas de goiabeiras mostram-se de grande relevância pois, por ser essa uma planta de ampla disseminação, seria de fácil acesso à população. O OE mostra-se com um grande potencial no controle de pragas na agricultura, podendo se constituir em uma alternativa para os inseticidas sintéticos. No caso específico do extratos de folhas de goiaba, estudo demonstram seu uso na medicina popular, indicando seu baixo nível de toxicidade. Além disso, ele se revela com um potencial antioxidante e com capacidade de quelar metais. Dessa forma, estudos que identifiquem a ação de extratos e óleos essenciais de plantas são cada vez mais necessários visto que precisamos explorar os potenciais usos das plantas que fazem parte da flora de cada região.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos biológicos do óleo essencial (OEPGP) e do extrato hidro alcóolico (HEPG) das folhas de *Psidium guajava* var. *pomifera* L

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Analisar o efeito do OEPGP em cultura de *Drosophila melanogaster* submetidas a um mecanismo de fumigação sobre:
 - A taxa de mortalidade e o desempenho locomotor
 - Avaliar marcadores de estresse oxidativo
 - Ativação da via de sinalização relacionadas ao estresse oxidativo.

- ✓ Avaliar a ação antioxidante e quelante contra HgCl₂ do HEPG em modelos *in vitro* analisando:
 - Atividade antioxidante *in vitro*
 - Níveis de peroxidação lipídica
 - Atividade quelante contra HgCl₂
 - Atividade protetora do extrato contra a toxicidade induzida por HgCl₂ em modelo de leveduras

3. RESULTADOS

Os nossos resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigo científico e manuscrito submetido a publicação. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos respectivos artigo e manuscrito.

Research Article

Fumigant Activity of the *Psidium guajava* Var. *Pomifera* (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by Means of Oxidative Stress

Antonio Ivanildo Pinho,¹ Gabriel Luz Wallau,² Mauro Eugenio Medina Nunes,² Nadghia Figueiredo Leite,¹ Saulo Relison Tintino,¹ Litiele Cezar da Cruz,² Francisco Assis Bezerra da Cunha,¹ José Galberto Martins da Costa,³ Henrique Douglas Melo Coutinho,¹ Thais Posser,² and Jeferson Luis Franco²

¹ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, 63105-000 Crato, CE, Brazil

² Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia (CIPBIOTEC), Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, Avenida Av Antonio Trilha 1847, Centro, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

³ Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, 63105-000 Crato, CE, Brazil

Correspondence should be addressed to Jeferson Luis Franco; jefersonfranco@gmail.com

Received 6 June 2014; Revised 15 October 2014; Accepted 16 October 2014; Published 12 November 2014

Academic Editor: Swaran J. S. Flora

Copyright © 2014 Antonio Ivanildo Pinho et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The guava fruit, *Psidium guajava* var. *pomifera* (Myrtaceae family), is a native plant from South America. Its leaves and fruits are widely used in popular medicine in tropical and subtropical countries. *Drosophila melanogaster* has been used as one of the main model organisms in genetic studies since the 1900s. The extensive knowledge about this species makes it one of the most suitable organisms to study many aspects of toxic compound effects. Due to the lack of studies on the effects of the bioactive compounds present in the *P. guajava* var. *pomifera* essential oil, we performed a phytochemical characterization by CG-MS and evaluated the toxicity induced by the essential oil in the *D. melanogaster* insect model. In order to understand the biochemical mechanisms of toxicity, changes on the Nrf2 signaling as well as hallmarks of oxidative stress response were followed in the exposed flies. Our results showed that exposure of insects to the *P. guajava* oil increased mortality and locomotor deficits in parallel with an oxidative stress response signaling. Therefore, it suggested a bioinsecticidal activity for *P. guajava* volatile compounds by means of oxidative stress. Further studies are ongoing to identify which oil compounds are responsible for such effect.

1. Introduction

With the continual increase in the human population worldwide, one of the most challenging situations is to provide enough food to the human population. There are two possibilities to reach such endeavor: (1) increase the agricultural area or (2) optimize the production of the already cultivated fields. Insect pests are one of the most important threats for the cultivated crops causing a serious reduction in the global production [1].

Synthetic insecticides are widely used to control insect pests. However, the chemical properties of these products make them dangerous for both humans and the environment [2]. Moreover, the plasticity of insect pests makes them

prone to develop resistance to many of these compounds [3]. Searching new insecticides that offer no or low risks and that are decomposed to safe compounds after its action is needed in order to overcome these issues. Plant derived insecticides can be a suitable alternative, since vegetables species have evolved molecular mechanisms that protect them against herbivorous insects and other animal species [4]. Essential oils from plant species have been reported as acting on digestive and neurological enzymes as well as with insects tegument [5, 6]. Some authors suggested that such insecticide effect is probably due to the secondary metabolites as terpenoids and phenylpropanoids [7]. An insecticidal activity of some monoterpenes as α -pinene, β -pinene, 3-carene, limonene,

myrcene, α -terpinene, and camphene had been demonstrated in literature [8].

Psidium guajava (Myrtaceae family) is a native bush species from South America known as “goiaba.” There are two more common cultivated varieties of *P. guajava*: *P. guajava* var. *pomifera* and *P. guajava* var. *pyrifera*. The *P. guajava* var. *pomifera* produces a fruit highly appreciated in the tropical and subtropical culinary and also is used in the popular medicine [9]. Extracts from leaves and fruits of this species presented several pharmacological properties as antispasmodic, antimicrobial and anti-inflammatory [10]. Moreover, these extracts also have been used as hypoglycemic [11]. Despite the available reports on benefits of guava to human health, little is known about its potential in biotechnological applications (e.g., fumigant activity) of guava extracts, oils, and derived compounds.

In the last decade, *Drosophila melanogaster* became a model for testing toxicity *in vivo*. It is due to the fact that this species has many homologous genes with humans and can be easily kept at the laboratory allowing many assays to be performed [12–15]. Therefore, *D. melanogaster* model can be widely used for evaluating fumigant activity screenings.

In summary, considering (i) the undesired adverse effects of synthetic means of pest control to humans and the environment, (ii) the ability of plant metabolites to induce toxicity to insects, and (iii) the lack of studies on the biotechnological potential of guava fruit derived compounds, the main goal of this work was to evaluate the biological activity of the essential oil from *Psidium guajava* var. *pomifera* and investigate the mechanism by which this oil promotes toxicity using the model organism *D. melanogaster*. Toxicity was evaluated as mortality and locomotor deficits. In parallel, oxidative stress signaling markers were determined in order to search for potential mechanisms of toxicity induced by the essential oil in *Drosophila*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material. The plant material of *Psidium guajava* var. *pomifera*, was collected in the Horto Botânico de Plantas Medicinais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) of Universidade Regional do Cariri (URCA), Ceará, Brazil. The plant material was identified, and a voucher specimen was deposited in the Herbarium Dardano Andrade Lima of URCA, under number 3930.

2.2. Collection of Essential Oil. Leaves of *Psidium guajava* var. *pomifera* L. were collected, chopped into pieces of approximately 1 cm², and placed in a 5-liter glass flask. The leaves were extracted with a cleveger apparatus, according to the method described by de Matos [16], giving a yield of 0.05%.

2.3. GC—MS Analysis. Oil analysis was performed using a Shimadzu GC MS—QP2010 series (GC/MS system): Rtx-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness); helium carrier gas at 1.5 mL/min; injector temperature 250°C; detector temperature 290°C; column temperature

60–180°C at 5°C/min, and then 180–280°C at 10°C/min (10 min). Scanning speed was 0.5 scan/s from *m/z* 40 to 350; split ratio (1:200); injected volume: 1 μ L of 25 μ L essential oil/5 mL CHCl₃ (1:200); solvent cut time = 2.5 min. The mass spectrometer was operated using 70 eV ionization energy. Identification of individual components was based on their mass spectral fragmentation based on mass spectral library NIST 08, retention indices, and comparison with published data.

2.4. *Drosophila* Stock and Culture. *D. melanogaster* (Harwich strain) was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH. Flies were reared in 2.5 × 6.5 cm² glass bottles containing 10 mL of standard medium (1% w/v brewer's yeast; 2% w/v sucrose; 1% w/v powdered milk; 1% w/v agar; 0.08% v/w nepagin) at constant temperature and humidity (25 ± 1°C; 60% relative humidity, resp.). All experiments were performed with the same strain.

2.5. Essential Oil Exposure and Flies Survival Assay. The exposure of flies to the essential oil was performed by a fumigation protocol as described: adult flies (males and females) were placed in 330 cm³ glass vials, containing a filter paper soaked with 1% sucrose in distilled water at the bottom. A counter-lid of polyethylene terephthalate (PET) was introduced on the screw cap of the vial, to which a filter paper was fixed at the inner side of the cap for application of different doses of essential oil. By doing this, the flies feed and hydrate on sucrose solution at the bottom of the vials and the essential oil is allowed to volatilize from the top in order to reach flies' respiratory system. The vials received the following treatments: 1% sucrose (control) and 3, 7.5, 15, 23.5, and 30 μ g/mL of essential oil. The final concentration of the essential oil was estimated by approximation, taking into account the volume (in microliters) of the oil applied to a glass vial with a final volume equivalent to 330 mL. Readings of flies' survivorship were taken at 6, 12, 24, and 48 h. Results are presented as percentage (%) of live flies (mean ± SD) obtained from three independent experiments.

2.6. Locomotor Assay. The locomotor capacity was evaluated by following the negative geotaxis behavior as described by Coulom and Birman [17] with some modifications. Twenty adult flies (1–4-day old; both genders) were subjected to essential oil exposure as detailed above. After treatments were finished, flies were immobilized on ice for 1–2 minutes and placed separately in vertical glass columns (length, 25 cm; diameter, 1.5 cm). After 30 min recovery, flies were gently tapped to the bottom of the column and the number of flies that reached 6 cm of the column (top) and flies that remained below this mark (bottom) were registered. The assays were repeated three times for each fly. Results are presented as number of flies on top (mean ± SD) obtained from three independent experiments.

2.7. Oxidative Stress Markers. Oxidative stress was determined by measuring lipid peroxidation, reactive oxygen species formation (ROS), nonprotein thiols (NPSH), and

protein thiols (PSH). Byproducts of lipid peroxidation were quantified by the thiobarbituric acid reactive substances method (TBARS) following Ohkawa et al. [18] with few modifications. Briefly, 20 flies from each treatment were homogenized in 1 mL of phosphate buffer 0.1 M pH 7.0 and centrifuged at 1000 g during 5 min at 4°C. Immediately after centrifugation, the supernatant was incubated in acetic acid 0.45 M/HCl buffer pH 3.4, containing thiobarbituric acid 0.28%, SDS 1.2%, at 95°C during 60 min for color development, and then absorbance was measured at 532 nm. Malondialdehyde (0–3 nmol) was used as standard. The 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) oxidation was used as a general index of ROS formation following Pérez-Severiano et al. [19]. The fluorescence emission of DCF resulting from DCFDA oxidation was monitored at an excitation wave length of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm in a multimode plate reader (Enspire PerkinElmer, USA). Protein and nonprotein thiols were determined according to the method described by Ellman et al. [20] and adapted to our lab conditions. In summary, after treatments were finished, flies were homogenized in 0.5 M perchloric acid and centrifuged at 5000 g for 5 min at 4°C. The NPSH content was determined in the supernatant while the pellet was used for PSH measurement. Total protein was quantified according to Bradford [21].

2.8. Enzymatic Assays. For antioxidant enzymes activity, groups of 20 flies were homogenized in 1 mL 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, and centrifuged at 20,000 g for 30 min. The resulted supernatant was used for determination of glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) according to methods described earlier [22]. Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) activity was assayed following the procedure of Habig and Jakoby [23] using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. The assay is based on the formation of the conjugated complex of CDNB and GSH at 340 nm. The reaction was conducted in a mix consisting of 100 mM phosphate buffer pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, and 2.5 mM CDNB. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed following the clearance of H₂O₂ at 240 nm in reaction media containing 50 mM phosphate buffer pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 10 mM H₂O₂, and 0.012% TRITON X100 according to the procedure of Aebi [24]. Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity was assayed following the procedure of Kostyuk and Potapovich [25]. The assay consists in the inhibition of superoxide-driven oxidation of quercetin by SOD at 406 nm. The complete reaction system consisted of 25 mM phosphate buffer, pH 10, 0.25 mM EDTA, 0.8 mM TEMED, and 0.05 mM quercetin. All enzyme activities were performed at room temperature (25 ± 1°C) using a Thermo Scientific Evolution 60s UV-vis spectrophotometer. Total protein was quantified according to Bradford [21].

2.9. Western Blot Analysis of Nrf2/NQO-1/HSP70 Signaling Pathway. Protein expression was determined by Western blotting according to Posser [26] with minor modifications. Thirty flies were homogenized at 4°C in 300 µL of buffer (pH

7.0) containing 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 mM Na₃VO₄, 100 mM sodium fluoride and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, MO). The homogenates were centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C and the supernatants (S1) collected. After protein determination (following Bradford [21]) using bovine serum albumin as standard, β-mercaptoethanol and glycerol were added to samples to a final concentration of 8 and 25%, respectively, and the samples were frozen until further analysis. Proteins were separated using SDS-PAGE with 10% gels and then electrotransferred to nitrocellulose membranes as previously described by Posser [26]. Membranes were washed in Tris-buffered saline with Tween (TBST; 100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, and 0.1% Tween-20, pH 7.5) and incubated overnight (4°C) with different primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, TX), all produced in rabbit (anti-Nrf2, anti-NQO-1, anti-HSP70 anti-β-actin; 1:1000 dilution in TBST). Following incubation, membranes were washed in TBST and incubated for 1 h at 25°C with HRP-linked anti-rabbit-IgG secondary specific antibodies (Sigma, MO). The immunoblots were visualized in the Image Station 4000MM PRO using ECL reagent (Santa Cruz Biotechnology, TX). Immunoreactive bands were quantified using the Scion Image software and expressed as a fold change of the mean relative to control group (treated only with sucrose).

2.10. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test when necessary. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. LC50 values were determined by the Trimmed Spearman-Kärber method (v 1.5).

3. Results

3.1. Chemical Composition. The five most abundant compounds in the *P. guajava* essential oil are epiglobulol (19.20%), 1,8-cineole (13.31%), isoaromadendrene oxide (11.13%), caryophyllene alcohol (10.21%), and (E)-caryophyllene (9.51%), as demonstrated by the GC-MS analysis (Table 1).

3.2. Toxicity in *D. melanogaster*. The exposure of fruit flies to *P. guajava* essential oil by fumigation caused a significant increase in mortality. Such an effect was dependent on time and oil concentration. The calculated LC₅₀ at 48 h was 13.8 µg/mL (Figure 1). The concentrations of 23.5 and 30 µg/mL had the most evident biocide effect, a result that could be compared with a food deprivation treatment (water only; data not shown). The highest concentrations tested killed almost the totality of flies at 48 h, showing a potent insecticide action for the essential oil. In Figure 2 the results from the locomotor activity tests are depicted. In agreement with the mortality results, a significant decrease in locomotor activity of *D. melanogaster* in the first 6 hs of treatment at 15, 23.5, and 30 µg/mL can be observed. Moreover, at 48 h of exposure, the highest concentrations tested caused almost completely loss of motor ability in flies (Figure 2).

TABLE 1: Chemical composition (%) of the *P. guajava* var. pomifera essential oil.

| Compound | RT (min) | IK | (%) |
|-------------------------|----------|-------|-------|
| Benzaldehyde | 3.93 | 952 | 0.99 |
| 1,8-Cineole | 5.03 | 1009 | 13.31 |
| Linalool | 6.21 | 1117 | 0.39 |
| α -Terpineol | 8.37 | 1178 | 2.21 |
| (E)-Caryophyllene | 14.14 | 1411 | 9.51 |
| (Z)-Caryophyllene | 15.00 | 1419 | 1.49 |
| Eudesmen-4-ol | 15.83 | 1448 | 6.65 |
| α -Guaiene | 16.04 | 1461 | 5.06 |
| Nerolidol | 17.54 | 1556 | 3.49 |
| Caryophyllene alcohol | 17.95 | 1570 | 0.54 |
| Caryophyllene oxide | 18.28 | 1580 | 10.21 |
| Selina-6-en-4-ol | 18.95 | 1588 | 3.05 |
| Alloaromadendrene oxide | 19.43 | 1646 | 4.05 |
| Isoaromadendrene oxide | 19.52 | 1648 | 11.13 |
| Cadinol | 19.60 | 1669 | 2.49 |
| Epiglobulol | 19.95 | 1688 | 19.20 |
| | | Total | 93.77 |

3.3. *Oxidative Stress Markers and Antioxidant Response.* In order to clarify potential mechanisms by which *D. melanogaster* is affected by the *P. guajava* essential oil, flies were exposed to 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of oil during 3, 6, and 12 h. Then, oxidative stress markers and the activity of antioxidant enzymes were determined (Table 2). This concentration is below the LC_{50} 48 h for *D. melanogaster*. It was possible to observe a significant increase in ROS formation at 3 h exposure to the essential oil, a result that was maintained after 6 and 12 h as well. Our results showed an increased level of TBARS after 12 h of exposure indicating that lipid peroxidation took place. The levels of protein thiols (PSH) were not changed, but nonprotein thiols (NPSH) significantly increased after 3 h of exposure, returning to basal levels at 6 and 12 h. We also evaluated the activity of three enzymes involved in the antioxidant metabolic route: GST, SOD, and CAT, as well as the expression of protein targets involved in stress response and antioxidant signaling (Nrf2, NQO-1 and HSP70). A significant increase in the activity of GST and CAT was observed when compared to control at 6 and 12 h (Table 2). However, the activity of SOD was not significantly different from the control at the time periods analyzed. As demonstrated in Figure 3, flies exposed to the essential oil presented a significant increase in the expression of NQO-1 at 3 h of exposure, indicating an early activation of the Nrf2-ARE signaling pathway. The protein levels of Nrf2 and HSP70 were not changed at the analyzed time points.

4. Discussion

Chemical pesticides used for insect control may be dangerous to humans and wild life. In addition, these compounds may induce insect resistance and other adverse effects, which have

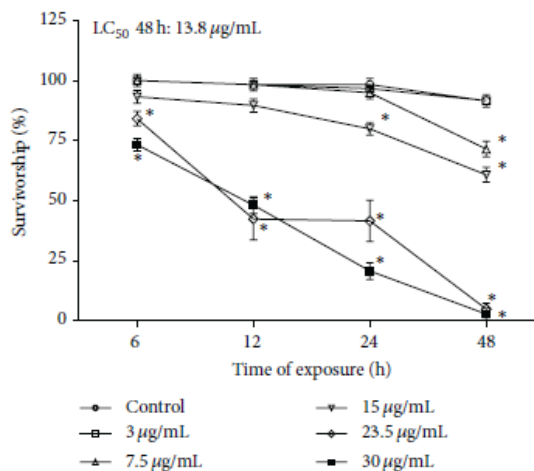


FIGURE 1: Effect of the *P. guajava* var. pomifera essential oil in the survivorship of *D. melanogaster*. Flies were exposed according to described in Section 2. Results are expressed as mean \pm SD of the percentage (%) of live flies after each exposure time. * $P < 0.05$ compared to control.

motivated the search for alternative forms of control [3]. In the present study we demonstrate the toxicity induced by the *Psidium guajava* var. pomifera essential oil in *Drosophila melanogaster*. The exposure of flies by the fumigation method induced substantial decreases in survivorship as well as locomotor activity. As a mechanism for the observed toxicity, the results suggest the establishment of a prooxidant condition after flies were in contact with oil derived volatile compounds. Such an effect is confirmed by increased production of reactive species and accumulation of lipid peroxidation byproducts. In addition, a clear adaptive response to oxidative stress was apparent in the oil exposed flies, since it was possible to observe an activation of antioxidant signaling pathways and increased activity of key cellular antioxidant enzymes.

Plant derived compounds are reported to induce toxicity to a wide range of insects and may interfere directly with all developmental stages of fruit fly, *Drosophila melanogaster*, and cockroaches [27, 28]. Compounds such as terpenes, flavonoids, alkaloids, steroids, and saponins are important phytochemicals when considering the insecticide activity of plant extracts [29]. In addition to acute toxicity and mortality, terpenoids and flavonoids have been also studied for their insect repellent activity [29, 30]. There are a variety of chemical compounds present in the *P. guajava* essential oil as α -terpineol, α -humulene, β -caryophyllene and β -guaiene, 1,8-cineole, caryophyllene oxide, β -bisabolene, aromadendrene, p-selinene, α -pinene, among others [31–34]. Leal et al. [35] showed the insecticidal activity of the 1,8-cineole compound obtained from the *S. aromaticum*, *H. martiusii*, and *Lippia sidoides* essential oils. Some authors suggested that most of the monoterpenes are nontoxic for mammals and can be considered an alternative to synthetic insecticides [36, 37].

TABLE 2: Oxidative stress markers and activity of enzymes involved in the antioxidant metabolic routes in *D. melanogaster* exposed to the *P. guajava* var. pomifera essential oil.

| | TBARS | ROS | PSH | NPSH | GST | SOD | CAT |
|--------------|------------|---------------|-----------|------------|---------------|-------------|--------------|
| Control 3 h | 1.2 ± 0.2 | 100 ± 12.8 | 5.7 ± 0.8 | 1.8 ± 0.2 | 109.6 ± 6.7 | 60.4 ± 3.9 | 42.7 ± 7.2 |
| Oil 3 h | 1.4 ± 0.2 | 127 ± 6.9* | 5.9 ± 1.1 | 2.7 ± 0.2* | 122.5 ± 10.7 | 69.3 ± 11.8 | 45.6 ± 6.1 |
| Control 6 h | 1.4 ± 0.1 | 100 ± 8.9 | 6.2 ± 0.9 | 1.9 ± 0.1 | 116.7 ± 12.4 | 56.5 ± 5.6 | 41.3 ± 2.8 |
| Oil 6 h | 1.5 ± 0.1 | 144.7 ± 10.2* | 6.7 ± 0.8 | 2.1 ± 0.1 | 155.4 ± 14.5* | 58.2 ± 12.6 | 66.8 ± 12.9* |
| Control 12 h | 1.3 ± 0.1 | 100 ± 7.5 | 5.6 ± 0.3 | 2.1 ± 0.1 | 118.1 ± 7.7 | 58.4 ± 5.9 | 48.8 ± 3.2 |
| Oil 12 h | 1.9 ± 0.3* | 167 ± 11.3* | 5.7 ± 0.4 | 2.3 ± 0.1 | 179.7 ± 23.8* | 77.2 ± 15.4 | 58.3 ± 7.6* |

TBARS: nmol mg⁻¹ protein⁻¹.

ROS: percentage of control (%).

PSH and NPSH: μmol mg⁻¹ protein⁻¹.

Enzyme activity: mU mg⁻¹ protein⁻¹.

*P < 0.05 compared to control.

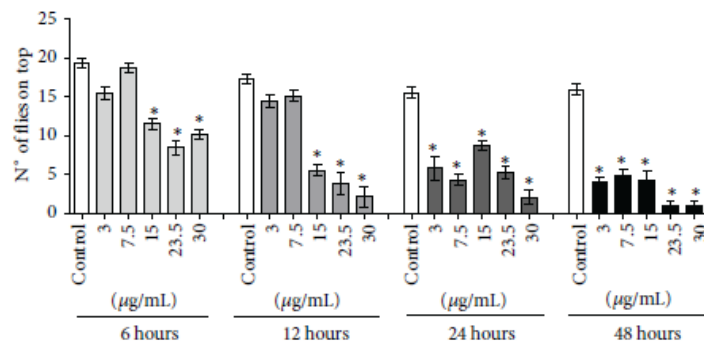


FIGURE 2: Effect of *P. guajava* var. pomifera essential oil in the locomotor activity (negative geotaxis behavior) of *D. melanogaster*. After treatments were finished, flies were submitted to negative geotaxis behavior test as described in Section 2. Y-axis represents the number of flies able to climb at least 6 cm of a glass column after 5 seconds (number of flies on top). The less the number of flies able to reach the 6 cm mark, the more affected the locomotor ability. Results are expressed as mean ± SD. *P < 0.05 compared to control at each exposure time.

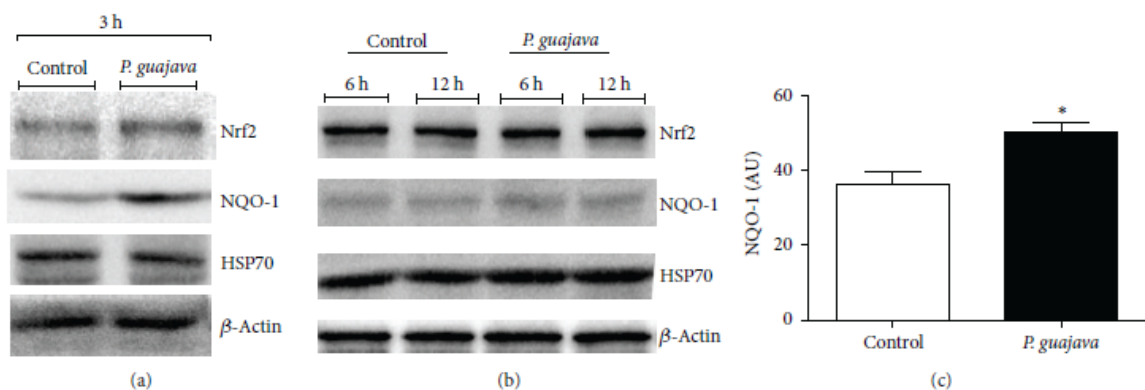


FIGURE 3: Analysis of the Nrf2/NQO-1/HSP70 signaling pathway in *D. melanogaster* exposed to *P. guajava* var. pomifera essential oil. After treatments were finished, samples were collected at each time point indicated and processed for western blot evaluation of each protein target. (a) Representative immunoblots for protein targets at 3 h of exposure to the essential oil. (b) Representative immunoblots for protein targets at 6 h and 12 h of exposure to the essential oil. (c) Optical densitometry of immunoreactive bands of NQO-1. Results are expressed as arbitrary units (mean ± SD). *P < 0.05 compared to control.

We observed, in this study, that the *P. guajava* oil presented mono and sesquiterpenoid compounds, with the 1,8-cineole being the second most abundant (Table 1). Although we did not perform essays to evaluate the insecticide activity of each compound, the presence and abundance of the 1,8-cineole suggest that it may be one of the compounds responsible for such effect. Studies are ongoing in order to clarify the role of the different compounds presented in the essential oil tested here.

According to Ennan et al. [7] some compounds from essential oils as terpenoids and phenylpropanoids can alter the insect neurotransmitters system, including the dopaminergic and cholinergic apparatus [38, 39]. We observed a significant change in the negative geotaxis behavior of flies treated with *P. guajava* oil, which reflects in a locomotor deficit. Although we were not able to directly evaluate changes in the dopaminergic and cholinergic systems in our experimental design, some of the effects observed may be linked to a potential interaction between oil components and flies neurotransmitters pathway. In this context, it has been shown that many terpenes are known as inhibitors of the acetylcholinesterase (AChE) [39]. As reported by the same authors the α -terpinene found in *Salvia leriifolia* showed an AChE inhibitor effect. In general, it suggests that the terpenoid compounds found in *P. guajava* may be involved in the fumigant effect and in the damage to the locomotor apparatus.

In parallel with the induced mortality and locomotor deficits, flies exposed to *P. guajava* also showed signs of oxidative stress, including ROS and TBARS formation as well as changes in important antioxidant response systems. The cellular response to oxidative stress is mostly regulated by the Nrf2 nuclear transcription factor [40]. ROS/xenobiotics induced alterations in the cellular redox state constitute an important signal to promote adaptive responses mediated by Nrf2 [41, 42]. The upregulation of detoxifying enzymes by natural compounds appears to be related to activation of Nrf2-ARE pathway [41, 42]. The Nrf2 nuclear translocation and subsequent binding to the DNA sequence known as the "antioxidant response element, ARE" may be triggered by dissociation from the inhibitory protein Keap1 as well as by phosphorylation of serine residues at the Nrf2 protein by upstream kinases such as PKC and MAPK [42]. Among proteins that are usually involved in response to oxidative stress-driven Nrf2 activation, the NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 oxidoreductase (NQO-1), glutamate cysteine ligase (GCL), GST, and CAT play central role [43]. Our results showed a time dependent activation of key factors on the regulation of an antioxidant response. Since a high mortality rate at almost all doses of essential oil was apparent at the first 24 h of exposure, we measured oxidative stress markers up to 12 h, in order to have a profile of the antioxidant response in animals under *P. guajava* oil treatments. Apparently, in response to the toxicity induced by oil compounds, flies presented increased ROS levels and a peak of GSH and NQO-1 (Table 2) at the first 3 h of treatment, a phenomenon that is consistent with an early activation of the Nrf2-ARE pathway [44]. While ROS continued to increase from 3 h up to 12 h, lipid peroxidation took place only at 12 h time point (Table 2).

The antioxidant enzymes GST and CAT were increased during the period of 6 h up to 12 h after essential oil treatments. Despite the increased activity of antioxidant enzymes from 6 to 12 h after administration of *P. guajava* oil, such effect did not protect flies against the late onset of lipid oxidative damage. These results clearly suggest a two-phase adaptive response to oxidative stress induced by *P. guajava* oil derived compounds. An early phase triggered by ROS induction, resulting in activation of the master regulator of cellular antioxidant response, the Nrf2 transcription factor, and a late phase, characterized by oxidative damage and increased ROS/xenobiotic detoxifying enzymes (CAT and GST). Later on, mortality and locomotor deficits accomplished the toxicity induced by the essential oil.

Glutathione S-transferase is an important antioxidant enzyme involved in phase II detoxification systems [45]. GSTs belong to a family of multifunctional enzymes that catalyze the conjugation of GSH to various other molecules and play a role in mechanisms of intracellular detoxification of endo- and xenobiotic compounds [46, 47]. The observed increase of GST activity in *Drosophila melanogaster* exposed to *P. guajava* oil can be related to an adaptive response related to enhanced elimination of toxic plant derivatives [48, 49]. Singh et al. [50] demonstrated that natural compounds are able to increase the expression of GST that together with endogenous GSH favors the elimination of plant metabolites from organisms. Catalysis plays a crucial role in the clearance of hydrogen peroxide from cells as well as for oxidative stress defense [24]. Our results demonstrated a significant increase in CAT activity in flies treated with guava essential oil (Table 2). This effect was in parallel with a rise in ROS production. The method used in the present study to detect ROS was based on the oxidation of the fluorescent dye DCFDA, which is considered a general reactive species indicator; however, hydrogen peroxide is one major species detected by this probe [51]. The observed rise in GST and CAT activity by *P. guajava* in fruit flies may be explained by a potential activation of the Nrf2 signaling pathway. In fact, an early activation of this signaling pathway was noted in flies exposed to the essential oil, by means of increased NQO-1 expression as well as a rise in GSH (Figure 3 and Table 2).

5. Conclusion

According to our results, the essential oil of *P. guajava* var. pomifera showed a fumigant action by compromising survivorship and locomotor activity of *D. melanogaster*. As a potential molecular mechanism of toxicity, oxidative stress appeared to be central, since markers of oxidative damage of biomolecules and a clear adaptive antioxidant response were observed in exposed flies. Therefore, our results point out to the potential application of *P. guajava* essential oil and/or its compounds as an alternative to the synthetic insecticides in agricultural and pest control practices. Additional experiments are necessary to clarify the exact mechanisms of toxicity induced by *P. guajava* oil in insects and to identify candidate compounds derived from this oil.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors acknowledge CNPq (482313/2013-7 and 311512/2011-9), FAPERGS (1954-2551/13-7), and PROPESQ-Unipampa for the financial support.

References

- [1] E.-C. Oerke, "Crop losses to pests," *The Journal of Agricultural Science*, vol. 144, no. 1, pp. 31–43, 2006.
- [2] D. G. Heckel, "Insecticide resistance after silent spring," *Science*, vol. 337, no. 6102, pp. 1612–1614, 2012.
- [3] P. M. Mendonça, M. G. Lima, L. R. M. Albuquerque, M. G. Carvalho, and M. M. C. Queiroz, "Effects of latex from "Amapazeiro" Parahancornia amapa (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development," *Veterinary Parasitology*, vol. 178, no. 3–4, pp. 379–382, 2011.
- [4] S. Sujatha, "Essential oil and its insecticidal activity of medicinal aromatic plant *Vetiveria zizanioides* (L.) against the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst)," *Asian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 2, pp. 84–88, 2010.
- [5] M. B. Isman, "Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world," *Annual Review of Entomology*, vol. 51, pp. 45–66, 2006.
- [6] R. K. Lima, *Caracterização bi Química e Bioatividades do Óleo Essencial de Folhas de Goiabeira Sobre a Lagarta-do-Cartucho do Milho*, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil, 2006.
- [7] E. Ennan, M. Beigler, and A. Kende, "Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches effects on octopamine receptors," in *Proceedings of the International Symposium on Plant Protection*, Ghent, Belgium, 1998.
- [8] C. Viegas Jr., "Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos," *Química Nova*, vol. 26, no. 3, pp. 390–400, 2003.
- [9] C. E. Almeida, M. G. O. Karnikowski, R. Foletto, and B. Baldissarotto, "Analysis of antiarrhoic effect of plants used in popular medicine," *Revista de Saude Publica*, vol. 29, no. 6, pp. 428–433, 1995.
- [10] R. M. Gutiérrez, S. Mitchell, and R. V. Solis, "*Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 117, no. 1, pp. 1–27, 2008.
- [11] X. Guo, H. Yoshitomi, M. Gao et al., "Guava leaf extracts promote glucose metabolism in SHRSP.Z-Leprfa/Izm rats by improving insulin resistance in skeletal muscle," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, article 52, 2013.
- [12] P. B. Bagatini, L. Saur, M. F. Rodrigues et al., "The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis," *Invertebrate Neuroscience*, vol. 11, no. 1, pp. 43–51, 2011.
- [13] M. Jimenez-Del-Rio, C. Guzman-Martinez, and C. Velez-Pardo, "The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat," *Neurochemical Research*, vol. 35, no. 2, pp. 227–238, 2010.
- [14] H. R. Siddique, S. C. Gupta, A. Dhawan, R. C. Murthy, D. K. Saxena, and D. K. Chowdhuri, "Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 46, no. 3, pp. 189–197, 2005.
- [15] A. P. P. Zemolin, L. C. Cruz, M. T. Paula et al., "Toxicity induced by *prasiola crispera* to fruit fly *Drosophila melanogaster* and cockroach *nauphoeta cinerea*: evidence for bioinsecticide action," *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A: Current Issues*, vol. 77, no. 1–3, pp. 115–124, 2014.
- [16] F. J. A. de Matos, *Introdução a Fitoquímica Experimental*, UFC, Fortaleza, Brazil, 2009.
- [17] H. Coulom and S. Birman, "Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 48, pp. 10993–10998, 2004.
- [18] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [19] F. Pérez-Severiano, R. Salvatierra-Sánchez, M. Rodríguez-Pérez et al., "S-Allylcysteine prevents amyloid- β peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits," *European Journal of Pharmacology*, vol. 489, no. 3, pp. 197–202, 2004.
- [20] G. L. Ellman, K. D. Courtney, and V. Andres, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochemical Pharmacology*, vol. 77, pp. 88–95, 1961.
- [21] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [22] J. L. Franco, T. Posser, J. J. Mattos et al., "Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses," *Toxicology Letters*, vol. 187, no. 3, pp. 137–143, 2009.
- [23] W. H. Habig and W. B. Jakoby, "Glutathione S-transferases (rat and human)," *Methods in Enzymology C*, vol. 77, pp. 218–231, 1981.
- [24] H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 121–126, 1984.
- [25] V. A. Kostyuk and A. I. Potapovich, "Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase," *Biochemistry International*, vol. 19, no. 5, pp. 1117–1124, 1989.
- [26] T. Posser, J. L. Franco, L. Bobrovskaya, R. B. Leal, P. W. Dickson, and P. R. Dunkley, "Manganese induces sustained Ser40 phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells," *Journal of Neurochemistry*, vol. 110, no. 3, pp. 848–856, 2009.
- [27] K. Ravi, D. Sita, and R. Janardhan, "Bioactivity of essential oils and sesquiterpenes of *Chloroxylon swietenia* DC against *Helicoverpa armigera*," *Current Science*, vol. 93, no. 4, pp. 544–548, 2007.
- [28] M. Miyazawa, Y. Ishikawa, H. Kasahara, J.-I. Yamanaka, and H. Kameoka, "An insect growth inhibitory lignan from flower buds of *Magnolia fargesii*," *Phytochemistry*, vol. 35, no. 3, pp. 611–613, 1994.
- [29] M. Belo, J. C. Barbosa, D. Braganholi et al., "Avaliação do efeito bioinseticida dos extratos de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae) e *Zeyheriamontana* Mart. (Bignoniaceae) sobre a mosca *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) (Gupta,1970)," *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 7, pp. 235–239, 2009.
- [30] R. Ndemah, S. Gounou, and F. Schulthess, "The role of wild grasses in the management of lepidopterous stem-borers on maize in the humid tropics of western Africa," *Bulletin of Entomological Research*, vol. 92, no. 6, pp. 507–519, 2002.

- [31] A. A. Craveiro, A. G. Fernandes, C. H. S. Andrade, F. J. A. Matos, J. W. Alencar, and M. I. L. Machado, *Óleos essenciais de plantas do nordeste*, UFC, 1981.
- [32] I. A. Ogunwande, N. O. Olawore, K. A. Adeleke, O. Ekundayo, and W. A. Koenig, "Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 18, no. 2, pp. 136–138, 2003.
- [33] J. A. Pino, J. Agüero, R. Marbot, and V. Fuentes, "Leaf oil of *Psidium guajava* L. from Cuba," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 13, no. 1, pp. 61–62, 2001.
- [34] J. D. da Silva, A. I. R. Luz, M. H. L. da Silva, E. H. A. Andrade, M. D. G. B. Zoghbi, and J. G. S. Maia, "Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp.," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 240–243, 2003.
- [35] L. K. A. M. Leal, V. M. Oliveira, S. M. Araruna, M. C. C. Miranda, and F. M. A. Oliveira, "Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 13, supplement 1, pp. 9–10, 2003.
- [36] A. C. S. Chagas, W. M. Passos, H. T. Prates, R. C. Leitern, J. Furlong, and I. C. P. Fortes, "Acaricide effect of Eucalyptus spp. essential oils and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*," *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, vol. 39, pp. 247–253, 2002.
- [37] P. J. Rice and J. R. Coats, "Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)," *Journal of Economic Entomology*, vol. 87, no. 5, pp. 1172–1179, 1994.
- [38] C. E. Sobral-Souza, N. F. Leite, F. A. B. Cunha et al., "Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam.," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 7, no. 1, pp. 165–170, 2014.
- [39] M. R. Loizzo, R. Tundis, F. Conforti et al., "*Salvia lerifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates in vitro antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity," *Nutrition Research*, vol. 30, no. 12, pp. 823–830, 2010.
- [40] T. Nguyen, P. Nioi, and C. B. Pickett, "The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 20, pp. 13291–13295, 2009.
- [41] T. Nguyen, P. J. Sherratt, and C. B. Pickett, "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 43, pp. 233–260, 2003.
- [42] C.-L. Liu, Y.-T. Chiu, and M.-L. Hu, "Fucoxanthin enhances HO-1 and NQO1 expression in murine hepatic BNL CL2 Cells through activation of the Nrf2/ARE system partially by its pro-oxidant activity," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 20, pp. 11344–11351, 2011.
- [43] W. Hur and N. S. Gray, "Small molecule modulators of antioxidant response pathway," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 15, no. 1, pp. 162–173, 2011.
- [44] A. K. Jaiswal, "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 36, no. 10, pp. 1199–1207, 2004.
- [45] A. Sau, F. Pellizzari Tregno, F. Valentino, G. Federici, and A. M. Caccuri, "Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 500, no. 2, pp. 116–122, 2010.
- [46] G. Chelvanayagama, M. W. Parker, and P. G. Board, "Fly fishing for GSTs: A unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 133, no. 1–3, pp. 256–260, 2001.
- [47] K. B. Walters, P. Grant, and D. L. E. Johnson, "Evolution of the GST omega gene family in 12 *Drosophila* species," *Journal of Heredity*, vol. 100, no. 6, pp. 742–753, 2009.
- [48] B. Agianian, P. A. Tucker, A. Schouten, K. Leonard, B. Bullard, and P. Gros, "Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products," *Journal of Molecular Biology*, vol. 326, no. 1, pp. 151–165, 2003.
- [49] S. H. Wei, A. G. Clark, and M. Syvanen, "Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticid-resistant strain of the housefly *Musca domestica*," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 31, no. 12, pp. 1145–1153, 2001.
- [50] R. P. Singh, B. Padmavathi, and A. R. Rao, "Modulatory influence of *Adhatoda vesica* (*Justicia adhatoda*) leaf extract on the enzymes of xenobiotic metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation in mice," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 213, no. 1-2, pp. 99–109, 2000.
- [51] B. O. Lund, D. M. Miller, and J. S. Woods, "Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria," *Biochemical Pharmacology*, vol. 45, no. 10, pp. 2017–2024, 1993.

**Antioxidant and mercury chelating activity of *Psidium guajava* var.
pomifera L. leaves hydroalcoholic extract**

Antonio Ivanildo Pinho¹, Cláudia Sirlene Oliveira¹, Fabricio Luís Lovato¹, Emily
Pansera Waczuk¹, Aline Augusti Boligon⁴, Nadghia Figueredo Leite², Henrique
Douglas Melo Coutinho², Thais Posser^{1,3}, João Batista Teixeira da Rocha¹ and
Jeferson Luis Franco^{1,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri,
63105-000, Crato, CE, Brazil

³Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia (CIPBIOTEC), Universidade
Federal do Pampa, 97300-000, São Gabriel, RS, Brazil

⁴Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-
900, Santa Maria, RS, Brazil

*Correspondence should be addressed to:

Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, Avenida Av. Antônio Trilha
1847, Centro, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil.

jefersonfranco@unipampa.edu.br

Abstract

Mercury is widely distributed in the environment and it may cause several toxic effects to organisms. In the present study, we evaluated the *in vitro* antioxidant activity and mercury chelating ability of the hydroalcoholic extract of *Psidium guajava* leaves (HEPG). Still, the protective effects of HEPG against inorganic mercury were evaluated using a yeast model (*Saccharomyces cerevisiae*). The HEPG presented significant antioxidant activity in DPPH and TBARS assays in a concentration dependent manner. The extract also exhibited significant Hg chelating activity at low concentrations. Regarding to yeast model study, inorganic mercury exposure caused a significant decrease in cell viability. However, HEPG partially prevented the decrease in cell viability induced by inorganic mercury in all concentrations tested. In conclusion, our results provide evidences to the protective effects of HEPG against inorganic mercury toxicity. Probably, the antioxidant and chelating activities are, at least in part, the mechanisms by which the extract exerts its beneficial effects.

Key words: Natural compound, mercury, yeast model, antioxidant activity, chelating effect, cell viability.

1. INTRODUCTION

Mercury is one of the most dangerous metals found in the environment. It can be extremely poisonous to animals and humans (WHO, 2003). This metal can be released into the environment via natural (volcanism and/or erosion) or anthropogenic (byproduct of industrial process and/or medical equipment discarded without control) sources, causing mercury accumulation in rivers and oceans (Horowitz et al. 2014). Once in aquatic environment, inorganic mercury can undergo biomethylation processes, thus forming organic forms of mercury, including methylmercury (Morel et al. 1998, Kim and Zoh 2012). In general, the population is exposed to mercury through the contaminated diet, mainly seafood (Bisen-Hersh et al. 2014). Studies have shown that inorganic mercury exposure mainly affects the renal system (Peixoto and Pereira 2007, Franciscato et al. 2011, Oliveira et al. 2014) meanwhile organic mercury forms, are neurotoxic agents (Dolbec 2000, Bisen-Hersh et al. 2014, Sheehan et al., 2014).

The most common treatment available against heavy metals, including mercury, involves chelating therapy. Nowadays, the chelating agents used to treat metal intoxications are synthetic, for instance, meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), 1-2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and, 2,3-dimercaptopropanol (BAL) (Baum et al. 1999). However, the above mentioned compounds are not completely effective and may cause undesired side effects such as, redistribution of the toxic metal in the body and disruption of essential metals homeostasis (Domingo 1995, Roza et al. 2005, Mehta et al. 2006).

Based on the absence of specificity and effectiveness of the synthetic chelating agents to toxic metals, researchers have been screening for new alternatives, such as natural compounds, which present chelating effects without the side effects observed for the synthetic chelating agents. In this way, a great number of plants have been

identified as hyper accumulators (plants that have the ability to accumulate high amounts of metals from the soil) and the ability of these plants to chelate metals have been investigated ever since (Chaney 1983). The intracellular tolerance is one mechanism triggered by plants to induce metal chelating compounds production. The metals can be accumulated either in the cell wall, the cytoplasm or vacuoles (Sousa et al. 2008). Still, plant extracts have shown greatly effective against toxic metals, such as mercury (Farina et al. 2005, Lucena et al. 2007, Sener et al. 2007, Bellé et al. 2009, Sumathi et al. 2012).

Psidium guajava L. (Myrtaceae family) is a shrub native of South America. The popular name of *P. guajava* is “goiabeira” (Portuguese) or guava tree (English). There are two common varieties of guava tree: red (*P. guajava* pomifera var.) and white (*P. guajava* pyriferia var.) (Kaneria and Chanda 2011). The species *Psidium guajava* var. pomifera L., red guava, besides being an extremely appreciated fruit in tropical and subtropical countries, is widely used in folk medicine (Gutiérrez et al. 2008). Extracts and metabolites, especially derived from the leaves and fruits, possesses useful pharmacological activities such as antispasmodic and anti-microbial in the treatment of diarrhea and dysentery (Gutiérrez et al. 2008). It has also been widely used as hypoglycemic agent (Shen et al. 2008). Recently, Pinho et al (2014) showed the bioinsecticidal activity of the *P. guajava* essential oil. On the other hand, the effects of leaves hydroalcoholic extract of *P. guajava* are still unknown.

Thus, in the present study, we aimed to identify the possible scavenger and chelating effects of the hydroalcoholic extract of *P. guajava* leaves against inorganic mercury (HgCl_2), *in vitro*, as well as, its protective effects against mercury in the yeast *Sacharomyces cerevisiae* model. The phenolic profile of the extract was also determined.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. *Plant material*

The plant material of *Psidium guajava* var. pomífera L., was collected in the Horto Botânico de Plantas Mediciniais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) of Universidade Regional do Cariri (URCA). The plant material was identified, and a voucher specimen was deposited in the Herbarium Dárdano Andrade Lima of URCA, under #3930.

2.2. *Preparation of hydroalcoholic extract of Psidium guajava leaves (HEPG)*

The extract was prepared by immersing 482 g of leaves in ethanol and water (1:1) for 72 h at room temperature. After, the extract was filtered and concentrated using a vacuum rotary evaporator (model Q-344B- Quimis, Brazil) and warm water bath (model Q214M2- Quimis Brazil), obtaining a yield of crude extract of 8 g.

2.3. *Chemicals*

All chemicals used in this study were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, caffeic acid, ellagic acid, chlorogenic acid and 1,5-diphenylcarbazone were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, quercitrin, isoquercitrin,

rutin, kaempferol, catechin and epicatechin, HgCl₂, from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). HgCl₂ was dissolved in distilled water.

2.4 HPLC-DAD

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% (B) for 2min; 25% (B) until 10 min; 40, 50, 60, 70 and 80% (B) every 10 min. The extract of *Psidium guajava* and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use, the extract of *Psidium guajava* was analyzed at a concentration of 5 mg/mL. The flow rate was 0.6 ml/min and the injection volume was 50µl. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.035 – 0.400 mg/ml for catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol and rutin, and 0.020 – 0.300 mg/ml for gallic, ellagic, caffeic and chlorogenic acids. Quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method, at 257 nm for gallic acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 325 nm for chlorogenic, ellagic and caffeic acids, and 365 for quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol and rutin. The chromatography

peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 12749x + 1187.5$ ($r = 0.9997$); caffeic acid: $Y = 11849x + 1351.4$ ($r = 0.9996$); chlorogenic acid: $Y = 12085x + 1327.9$ ($r = 0.9993$); ellagic acid: $Y = 13057x + 1238.5$ ($r = 0.9991$); catechin: $Y = 12648x + 1237.6$ ($r = 0.9999$); epicatechin: $Y = 13258x + 1269.7$ ($r = 0.9996$); rutin: $Y = 12683x + 1354.8$ ($r = 0.9999$); quercetin: $Y = 12891x + 1341.6$ ($r = 0.9997$); quercitrin: $Y = 11994x + 1349.0$ ($r = 0.9995$), isoquercitrin: $Y = 12679x + 1195.6$ ($r = 0.9998$) and kaempferol: $Y = 12657x + 1341.9$ ($r = 0.9999$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by Kamdem et al (2013). LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.5 DPPH radical scavenging assay

Scavenging activity on DPPH free radical by the HEPG was assessed according to the method described by Kamdem et al (2013). Twenty microliters of the HEPG (1–500 $\mu\text{g/mL}$) was mixed with 100 μL of 0.3 mM DPPH in ethanol. The mixture was allowed to stand at room temperature for 30 min in the dark. Blank solutions were prepared with each test sample (20 μL) and 100 μL of water. The negative control was 100 μL L of 0.3 mM DPPH with 20 μL of water, while ascorbic acid (1–400 $\mu\text{g/mL}$)

was used as positive control. The absorbance was measured at 518 nm against each blank using ELISA microplate reader (SpectraMax, USA) and the inhibition of free radical, DPPH, in percent was calculated using the formula:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{\text{Abs}^{\text{sample}} - \text{Abs}^{\text{blank}}}{\text{Abs}^{\text{control}}} \times 100$$

2.6 TBARS – Lipid peroxidation

Phospholipids were used for the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. Aliquots of 40ug phosphatidylcholine and 55 μM FeSO_4 were incubated for 30 min at 37 $^\circ\text{C}$ in the presence or absence of the HEPG (1–400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to induce lipid peroxidation. Thereafter, 100 μL of acetic acid buffer (pH 3.4) and 100 μL of 0.6% thiobarbituric acid (TBA) were subsequently added to the reaction mixture and incubated at 100 $^\circ\text{C}$ for 1 h. After cooling, 400 μL of butanol (P.A.) were added and tubes were vortexed during 30 s; after samples were centrifuged for 10 min at 6000 rpm and the butanolic fraction absorbance was measured at 532 nm using an ELISA plate reader (SpectraMax, USA). Standard curve of malondialdehyde (MDA) was used to quantify TBARS production (Ohkawa et al. 1979).

2.7 Chelating effects: colorimetric assay

1,5-Diphenylcarbazone (DFCZ) was used to determine presence of Hg. DFCZ is an orange dye and when it is kept together with mercury is possible to observe the color change to purple. To see the chelating action of the HEPG the following system was prepared: 0.5 M Tris-HCl buffer, extract solvent (H₂O and ethanol, 1:1, v:v), HgCl₂ (0, 0.1, 0.2 or 0.4 mM), and HEPG (0, 25, 33, 50, 100 or 200 µg/mL). Immediately after, 200 µL of the system was mixed with 2 mM 1,5 diphenylcarbazone and the absorbance was measured at 655 nm using an ELISA plate reader (SpectraMax, USA).

2.8 Chelating effects: ICP-AES assay

Mercury levels were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICPE-9000; Shimadzu Scientific Instruments). To see the chelating action of the HEPG the following system was prepared: 0.5 M Tris-HCl buffer, extract solvent (H₂O and ethanol, 1:1, v:v), HgCl₂ (0, 0.1, 0.2 or 0.4 mM), and HEPG (0, 25, 33, 50, 100 or 200 µg/mL). The tubes were kept at room temperature in the dark for 24 h. After incubation, the tubes that had mercury and extract presented a pellet formation. The tubes were centrifuged at 13000 rpm for 10 min, 0 °C. Pellet and supernatant were separated. To digest the samples, the supernatant was mixed with distilled nitric acid (1:1) and incubated at 70 °C for 24 h. Regarding to pellet, 100 µL of distilled nitric acid was added to pellet, mixed to resuspend and as the supernatant the tubes were kept at 70 °C for 24 h. To measure the Hg content in pellet and supernatant the samples were diluted with distilled water until 10% of nitric acid. The analytical mercury certificate standard (high purity quality) (Merck®) were used to make the curve (0-50 ppm).

2.9 *Saccharomyces cerevisiae* experiments

2.9.1 Strain and storage

The experiments were undertaken using the wild type strain BY4741 of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The strain was kindly provided by Prof. Dr. Claudio Akio Masuda, associate professor at the Institute of Medical Biochemistry at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). The yeasts were maintained in 2 mL cryogenic tubes, stored at -80° C in a solution containing YPD medium and glycerol. For the experiment, the YPD medium was used, which is a complete medium for yeast growth. It contains yeast extract (1%), peptone (2%), distilled water and glucose or dextrose (2%).

2.9.2 Preparation of HEPG

For the test in yeast, a stock solution was prepared dissolving 0.1 g of *P. guajava* leaves extract to 10 mL of YPD medium. From this initial solution, the dilutions were made in YPD medium.

2.9.3 Growth in liquid medium

Yeast cells were grown overnight in YPD medium, submitted to stirring (250 rpm) at 30 °C, in a rotary shaker. An aliquot was inoculated in the medium to re-induce exponential growth phase during the treatments. Cells were supplied with ampicillin (100 µg/mL). The first step of the experiment was determine the concentrations of HgCl₂ and extract to be used. For this, a suspension of 1 x 10⁵ wild type cells were incubated in different concentrations of HgCl₂ (10, 50, 75, 100, 125, and 150 µM) and

HEPG (0.25, 0.5, 1.0, 1.25, 2.5, and 5). The samples were submitted to stirring (250 rpm) at 30 °C overnight, in a rotary shaker. After, the samples were diluted in water and read in a UV-visible spectrophotometer Shimadzu UV-1650PC, in a wavelength of 600 nm, in order to evaluate the inhibition of growth. Data were collected through software UVProbe 2.42. Following, the concentrations were chosen: 100, 125, and 150 μM for HgCl_2 ; 1.0, 1.25, 2.5, and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ for extract. These concentrations were crossed in order to assess the ability of extract to reverse the growth inhibition caused by HgCl_2 .

2.10 Statistics

The experiments were repeated three times. The data were analyzed using 1-way ANOVA, followed by Tukey test. The differences were considered to be significant when $P < 0.05$. Data analysis was performed with the software GraphPad v. 6 for Windows.

3. RESULTS

3.1. HPLC analysis

The HPLC profile of hydro alcoholic *Psidium guajava* (HEPG) leaves extract is shown in Figure 1 and Table 1. The HPLC fingerprint of samples of HEPG indicated the presence of gallic acid ($t_R = 11.56$ min; peak 1), catechin ($t_R = 16.49$ min, peak 2), chlorogenic acid ($t_R = 23.97$ min, peak 3), caffeic acid ($t_R = 28.09$ min, peak 4), ellagic acid ($t_R = 31.02$ min, peak 5), epicatechin ($t_R = 34.96$ min, peak 6), rutin ($t_R = 39.97$ min, peak 7), quercitrin ($t_R = 44.68$ min, peak 8), isoquercitrin ($t_R = 47.53$ min, peak 9), quercetin ($t_R = 50.24$ min, peak 10) and kaempferol ($t_R = 56.19$ min, peak 11).

3.2 DPPH scavenging assay

The scavenging activity of the HEPG and ascorbic acid antioxidant activity against DPPH radical are shown in Figure 2. The positive control (ascorbic acid) exhibited antioxidant activity in a concentration-dependent manner beginning at 10 $\mu\text{g/mL}$. The HEPG exhibited antioxidant activity similar to ascorbic acid, however, the HEPG antioxidant activity started since 1 $\mu\text{g/mL}$.

3.3 TBARS (lipid peroxidation) assay

The HEPG inhibited lipid peroxidation induced by Fe^{2+} (Figure 3). The concentration of 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ of HEPG inhibited the lipid peroxidation similar to inhibition presented by $(\text{PhSe})_2$ (230 $\mu\text{g/mL}$; positive control).

3.4 Chelating effects: colorimetric assay

The chelating effects (colorimetric assay) of HEPG is shown in Figure 4 A, B, and C. HgCl_2 caused an increase in 1,5-diphenylcarbazone (DFCZ) absorbance concentration-dependent manner. The HEPG at the concentrations of 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ significantly avoid the increase in DFCZ absorbance caused by 0.2 and 0.4 mM HgCl_2 .

3.5 ICP-AES

The HEPG pellet and supernatant Hg content are shown in Table 2. The Hg levels decreased in supernatant and increased in pellet in an extract concentration-dependent manner.

3.6 Protective effects of HEPG against HgCl_2 in yeast model

The results showed in Figure 5 A indicate that the extract in all concentrations tested did not result in toxic effects to the growth of yeasts. HgCl_2 toxicity in yeast was not observed at lower concentrations tested (10-75 μM); however, at higher concentrations (100 to 150 μM), a clear decline in yeast viability was observed (Fig. 5 A). When HgCl_2 was crossed with the extract, it was possible to observe a reversal of the toxicity induced by HgCl_2 (Figs. 5 B, C, and D), although this recovery has not been comparable to growth observed in the control group.

4. DISCUSSION

Mercury (Hg) is listed by the International Program of Chemical Safety as one of the most dangerous chemicals to the environment (Gilbert and Grant-Webster 1995), and its deleterious effects to human health and ecosystems are of great concern (Kiyono et al. 2011). Various neurological and behavioral effects were related to humans under mercury contamination, such as, lack of coordination, tremors, decreased visual field, sensory disturbances (Dolbec 2000, Bisen-Hersh et al. 2014). Still, several studies have shown that inorganic mercury induces nephrotoxicity (Peixoto and Pereira 2007, Franciscato et al. 2011, Bridges et al. 2014, Favero et al. 2014; Oliveira et al. 2015).

Plant extracts have been studied as mitigators of heavy metals toxic effects, including mercury. Plants ability to remove and accumulate metals from soil varies among the species (Válega et al. 2008). In our work, we observed that the hydro alcoholic *Psidium guajava* leaves extract (HEPG) presented antioxidant and metal chelating activities. Also, the pre-treatment with HEPG presented protective effect against inorganic mercury in *S. cerevisie* model.

The antioxidant activity of HEPG was demonstrated by DPPH and TBARS assays. DPPH assay relies in transfer of eletrons from an antioxidant compound to a free radical (DPPH•) (Huang et al. 2005). In this way, it was possible to evaluate the reducing power of the HEPG. As a positive control we used ascorbic acid, a substance that has a great antioxidant activity (Duarte-Almeida et al. 2006). Low HEPG concentrations showed antioxidant activity similar to positive control. This result can be correlated with the compounds presented in the extract, for instance, quercetin and caffeic acid, which are molecules that present high antioxidant activity (Cuyckens and Claeys 2004).

Regarding to TBARS assay, the HEPG inhibited the malondialdehyde (MDA) formation induced by iron in phosphatidylcholine. Lipid peroxidation (LP) is defined as the lipid damage caused by free radicals that are formed during oxidative stress, one of the LP products is MDA (Sreelatha and Padma 2009). Manian et al. (2008) demonstrated that some medicinal plant extracts inhibited lipid peroxidation induced by iron *in vitro*, similarly that we found in our work with the HEPG reinforcing the observed antioxidant activity towards DPPH free radical. The anti-peroxidative capacity of natural compounds are of great importance, since protection of biomolecules, such as phospholipids, triglycerides and polyunsaturated fatty acids, which are essential for the cell functions, is vital for cellular homeostasis (Costa et al, 2012).

Since the HEPG presented strong scavenging activity, we tested the extract effects against inorganic mercury, which has been shown to induce ROS and oxidative stress (Farina et al. 2013). In this work, we observed that *P. guajava* extract can chelate Hg using two different protocols, *in vitro*. At the first moment, the chelating effect was observed by colorimetric method using as chromophore 1,5-dyphenilcarbazone (DFCZ). DFCZ forms a purple coloration at the presence of mercury, resulting in absorbance increments at 655 nm (Ohweiler 1974). When the HEPG was incubated together with inorganic mercury the purple color formation was not observed. We also observed that HEPG, when incubated (24 h, at room temperature) with inorganic mercury, formed a pellet in a concentration dependent-manner. The mercury levels were measured in pellet and supernatant. Interestingly, the amount of mercury increased in pellet and decreased in supernatant when the HEPG concentration was increased showing the extract chelating effect. Probably, the phenolic antioxidants present in the HEPG are acting as scavenger and as metal chelating. The phenolic compound prevalent in HEPG is caffeic acid.

To check whether the *in vitro* antioxidant and chelating effects of HEPG would result in protective effects towards cell viability, we use the *S. cerevisie* as a model organism. Yeasts are eukaryotic microorganisms belonging to the kingdom of fungi (Kurtzman and Fell 2006), being the first eukaryotic organisms to have its genome fully sequenced (Goffeau et al. 1996). Hundreds of homologous genes in humans have been identified for a large number of genes in yeast, occurring conservation of genes linked to numerous diseases (Wood et al. 2002). Yeast cells generate ROS in similar ways as mammalian cells do, and express many of the antioxidant defenses presented in higher organisms (Jamieson 1998). These organisms became useful tools for the study of cytotoxic, cytostatic and genotoxic potential of drugs (Fortney et al. 2013), food additives (Jabeen et al. 2013) and environmental contaminants (Sanfilippo et al. 2010). Given these properties, and the ease of handling and performing sample procedures, yeasts have also been used to test the pharmacological potentials of plant extracts (Marques et al. 2011, Oprea et al. 2014).

Regarding to Hg, it is already know that this metal is readily absorbed by the cells of *S. cerevisiae* and not easily removed. Strains deficient in DNA repair systems were more sensitive to Hg than wild-type strains. This fact implies that Hg damages the DNA of yeast (Kungolos et al. 1999). In the present study, we demonstrated that the extract of *Psidium guajava* var. *pomifera* L. protect the cells against the toxic effects of HgCl₂, reinforcing its antioxidant, protective and chelating properties.

5. CONCLUSION:

The HEPG presented a high concentration of phenolic compounds and flavonoids. Our study indicated that HEPG has antioxidant and protective effects against HgCl₂. This can be evidenced using the *S. cerevisiae* model, the HEPG prevent the yeast death caused by inorganic mercury. In addition, a strong chelating effect of HEPG towards Hg ions was evidenced. However, further studies are necessary to identify the extract components that are responsible for such effects. Also, it is necessary to check whether the observed effects would occur in complex organisms. In conclusion, our results provide evidences to the protective effects of HEPG against HgCl₂ induced toxicity, pointing to its antioxidant and chelating activity as main mechanisms by which the extract exerts its beneficial effects.

6. CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge CNPq (482313/2013-7; 456207/2014-7), FAPERGS (19542551/13-7; 23802551/14-8) and Unipampa for financial support. JLF is a CNPq research fellowship recipient.

REFERENCES:

Baum CR (1999) Treatment of mercury intoxication. *Curr Opin Pediatr* 11:265-268

Bellé LP, De Bona KS, Abdalla FH, Pimentel VC, Pigatto AS, Moretto MB. 2009. Comparative evaluation of adenosine deaminase activity in cerebral cortex and hippocampus of young and adult rats: effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on their susceptibility to heavy metal exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104:408-413

Bisen-Hersh EB, Farina M, Jr. FB, Rocha JBT, Aschner M (2014) Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. *J Trace Elem Med Biol* 28:117-124

Bridges CC, Joshee L and Zalups RK (2014) Aging and the disposition and toxicity of mercury in rats. *Exp Gerontol* 53:31-39

Chaney RL (1983) Plant uptake of inorganic waste constituents. In *Land Treatment of Hazardous Wastes*, Parr JF, Marsh PB, Kla JS (Eds). Noyes Data Corp, Park Ridge, NJ; 55–76

Costa DA, Oliveira GAL, Sousa DP, Freitas RM (2012) Atividade antioxidante da ciano-carvona. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 33:567-575

Cuyckens F, Claeys M (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 39:1-15

Dolbec J, Mergler D, Sousa CJP, Sousa SM, Lebel J (2000) Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajos 503 river, Brazilian amazon. Arch Environ Occup Health 73:195-203

Domingo JL. 1995. Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. Reprod Toxicol 9:105-113

Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH*. Ciênc Tecnol Aliment 26:446-452

Farina M, Avila DS, Rocha JBT, Aschner M (2013) Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. Neurochem Int 62:575-594

Farina M, Franco JL, Ribas CM, Meotti FC, Missau FC, Pizzolatti MG, Dafre AL, Santos AR (2005) Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. J Pharm Pharmacol 57:1503-1508

Fortney K, Xie W, Kotlyar M, Griesman J, Kotseruba Y, Jurisica I (2013) NetwoRx: connecting drugs to networks and phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res 41:720-727

Franciscato C, Moraes-Silva L, Duarte FA, Oliveira CS, Ineu RP, Flores EM, Dressler VL, Peixoto NC, Pereira ME (2011) Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:480-486

Gilbert SG, Grant-Webster KS (1995) Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 103:135-142

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546-567

Gutiérrez RM, Mitchell S, Solis RV (2008) *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 117:1-27

Horowitz HM, Jacob DJ, Amos HM, Streets DG, Sunderland EM. 2014. Historical mercury releases from commercial products: global environmental implications. *Environ Sci Technol* 48:10242-10250

Huang D, Ou B, Prior R (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-1856

Jabeen HS, Rahman SU, Mahmood S, Anwer S (2013) Genotoxicity assessment of amaranth and allura red using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull Environ Contam Toxicol* 90:22-26

Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1511–1527

Kamdem JP, Adekunle A, Boligon AA, Klimaczewski CV, Elekofehinti OO, Hassan W, Ibrahim M, Waczuck EP, Meinerz DF, Athayde ML (2013) Antioxidant, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: its potential role in neuroprotection. *Ind Crop Prod* 52:26–34

Kaneria M, Chanda S (2011) Phytochemical and pharmacognostic evaluation of leaves of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Phcog J* 3:41-45

Kim MK, Zoh KD (2012) Fate and transport of mercury in environmental media and human exposure. *J Prev Med Public Health* 45:335-343

Kiyono M, Sone Y, Miyaharaa K, Oka Y, Nakamura, M, Nakamura R, Satob MH, Pan-Hou H, Sakabed K, Inoue K (2011) Genetic expression of bacterial merC fused with plant SNARE in *Saccharomyces cerevisiae* increased mercury accumulation. *Biochem Eng J* 56:137–141

Kungolos A, Aoyama I, Muramoto S (1999) Toxicity of organic and inorganic mercury to *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:149-155

Kurtzman CP, Fell, JW (2006) Yeast systematic and phylogeny — implications of molecular identification methods for studies in ecology. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*, Springer.

Lucena GM, Franco JL, Ribas CM, Azevedo MS, Meotti FC, Gadotti VM, Dafre AL, Santos AR, Farina M (2007) *Cipura paludosa* extract prevents methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:127-131

Manian R, Anusuya N, Siddhuraju P, Manian S (2008) The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chem* 107:1000-1007

Marques F, Azevedo F, Johansson B, Oliveira R (2011) Stimulation of DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae* by *Ginkgo biloba* leaf extract. *Food Chem Toxicol* 49:1361-1366

Mehta A, Pant SC, Flora SJS (2006) Monoisoamyl dimercaptosuccinic acid induced changes in pregnant female rats during late gestation and lactation. *Reprod Toxicol* 21:94-103

Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M (1998) The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu Rev Ecol Syst* 29: 543-566

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358

Ohweiler OA (1974) *Química analítica quantitativa*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos

Oliveira CS, Joshee L, Zalups RK, Pereira ME, Bridges CC (2015) Disposition of inorganic mercury in pregnant rats and their offspring. *Toxicology* 335:62-71

Oliveira VA, Oliveira CS, Ineu RP, Moraes-Silva L, Siqueira LF, Pereira ME (2014) Lactating and non-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: protective effect of ZnCl₂. *J Trace Elem Med Biol* 28:240-246

Oprea E, Ruta LL, Nicolau I, Popa CV, Neagoe AD, Farcasanu IC (2014) *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Food Chem* 152:516-521

Peixoto NC, Pereira ME (2007) Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 66:441-446

Pinho AI, Wallau GL, Nunes ME, Leite NF, Tintino SR, Cruz LC, Cunha FA, Costa JG, Coutinho HDM, Posser T, Franco JL (2014) Fumigant activity of the *Psidium guajava* var. pomifera (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 696785

Roza T, Peixoto NC, Welter A, Flores EMM, Pereira ME (2005) 2,3-Dimercapto-1-propanol does not alter the porphobilinogen synthase inhibition but decreases the mercury content in liver and kidney of sucking rats exposed to HgCl₂. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96:302-308

Sanfilippo K, Pinto B, Colombini MP, Bartolucci U, Realli D (2010) Determination of trace endocrine disruptors in ultrapure water for laboratory use by the yeast estrogen screen (YES) and chemical analysis (GC/MS). *J Chromatogr B* 878:1190-1194

Sener G, Sehirli O, Tozan A, Velioglu-Ovunc A, Gedik N, Omurtag GZ. 2007. *Ginkgo biloba* extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food Chem Toxicol* 45:543-450

Sheehan MC, Burke TA, Navas-Acien A, Breysse PN, McGready J, Fox MA (2014) Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review. *Bull World Health Organ* 92:254-269

Shen SC, Cheng FC, Wu NJ (2008) Effect of guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf soluble solids on glucose metabolism in type 2 diabetic rats. *Phytother Res* 22:1458-1464

Sousa A, Caçador I, Lillebo A, Pardal M (2008) Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: Intra- and extra-cellular metal binding sites. *Chemosphere* 70:850-857

Sreelatha S, Padma PR (2009) Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Hum Nutr* 64:303-311

Sumathi T, Shobana C, Christinal J, Anusha C. 2012. Protective effect of *Bacopa monniera* on methylmercury-induced oxidative stress in cerebellum of rats. *Cell Mol Neurobiol* 32:979-987

Válega M, Lillebo AI, Pereira ME, Caçador I, Duarte AC (2008) Mercury in salt marshes ecosystems: *Halimione portulacoides* as biomonitor. *Chemosphere* 73:1224-1229

WHO. 2007. Exposure to mercury: a major public health concern. *Environmental Health Criteria*. Geneva: World Health Organization

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR,

Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature 415:871–880

Legends of figures:

Figure 1: Representative high performance liquid chromatography profile of HEPG. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), quercitrin (peak 8), isoquercitrin (peak 9), quercetin (peak 10) and kaempferol (peak 11).

Figure 2: DPPH scavenging activity induced by HEPG. Results are expressed as mean \pm S.E. of three determinations. Ascorbic acid and HEPG were evaluated individually. Values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Figure 3: Effect of HEPG on lipid peroxidation induced by iron. Results are expressed as mean \pm S.E. of three determinations. Values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Figure 4: Mercury chelating effect of HEPG – colorimetric assay. Results are expressed as mean \pm S.E. of three determinations. Values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Figure 5: Effect of HEPG and HgCl₂ (A) on *S. cerevisiae* growth. HgCl₂ and HEPG were evaluated individually. Values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$). Effects of HEPG and 100 (B), 125 (C) and 150 (D) μ M of HgCl₂ in *S.*

cerevisae growth. Values followed by different letters are statistically different (p<0.05).

Table 1: Composition of hydro alcoholic extract of *P. guajava* leaves.

| <i>Compounds</i> | <i>P. guajava</i> | <i>%</i> | <i>LOD</i> | <i>LOQ</i> |
|------------------|---------------------------|----------|--------------|--------------|
| | <i>mg/g</i> | | <i>µg/mL</i> | <i>µg/mL</i> |
| Gallic acid | 9.75 ± 0.01 ^a | 0.97 | 0.025 | 0.094 |
| Catechin | 3.64 ± 0.03 ^b | 0.36 | 0.007 | 0.023 |
| Chlorogenic acid | 7.03 ± 0.01 ^c | 0.70 | 0.038 | 0.127 |
| Caffeic acid | 13.27 ± 0.01 ^d | 1.32 | 0.011 | 0.034 |
| Ellagic acid | 12.19 ± 0.03 ^e | 1.21 | 0.023 | 0.076 |
| Epicatechin | 2.05 ± 0.01 ^f | 0.20 | 0.016 | 0.051 |
| Rutin | 9.82 ± 0.01 ^a | 0.98 | 0.019 | 0.062 |
| Quercitrin | 3.91 ± 0.02 ^b | 0.39 | 0.039 | 0.128 |
| Isoquercitrin | 12.36 ± 0.03 ^e | 1.23 | 0.009 | 0.031 |
| Quercetin | 10.95 ± 0.03 ^a | 1.09 | 0.015 | 0.048 |
| Kaempferol | 3.51 ± 0.01 ^b | 0.35 | 0.008 | 0.029 |

Results are expressed as mean ± S.E. of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test ($p < 0.05$). LOD: Limit of Detection; LOQ: Limit of Quantification

Table 2: Amount of Hg (μg) in supernatant and pellet of hydroalcolic extrat *P. Guajava* leaves.

| <i>P. Guajava</i> | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| HgCl₂ (mM) | SUPERNATANT | | | | | | PELLET | | | | | |
| | 0 | 25 | 33 | 50 | 100 | 200 | 0 | 25 | 33 | 50 | 100 | 200 |
| | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) | ($\mu\text{g/mL}$) |
| 0.1 | 1.6 \pm 0.3 ^a | 0.6 \pm 0.3 ^b | 0.3 \pm 0.2 ^b | N.D. | N.D. | N.D. | N.P. | 1.7 \pm 0.0 ^a | 2.1 \pm 0.0 ^{a,b} | 2.9 \pm 0.3 ^b | 4.0 \pm 0.3 ^c | 4.5 \pm 0.2 ^c |
| 0.2 | 4.7 \pm 0.1 ^a | 2.9 \pm 0.3 ^b | 2.8 \pm 0.5 ^b | 1.0 \pm 0.2 ^c | N.D. | N.D. | N.P. | 2.5 \pm 0.1 ^a | 3.8 \pm 0.3 ^{a,b} | 5.0 \pm 0.4 ^b | 7.2 \pm 0.5 ^c | 8.9 \pm 0.4 ^d |
| 0.4 | 10.9 \pm 0.5 ^a | 8.6 \pm 0.1 ^b | 7.5 \pm 0.2 ^b | 5.5 \pm 0.4 ^c | 2.0 \pm 0.4 ^d | 0.3 \pm 0.3 ^e | N.P. | 0.8 \pm 0.4 ^a | 4.7 \pm 0.3 ^{a,b} | 6.8 \pm 0.5 ^b | 13.8 \pm 2.1 ^c | 17.1 \pm 1.0 ^c |

Data are expressed as mean \pm SEM (n = 3) and the values followed by different letters in the same to supernatant line and the same line to pellet are statistically different (p < 0.05, Tukey's multiple range test).

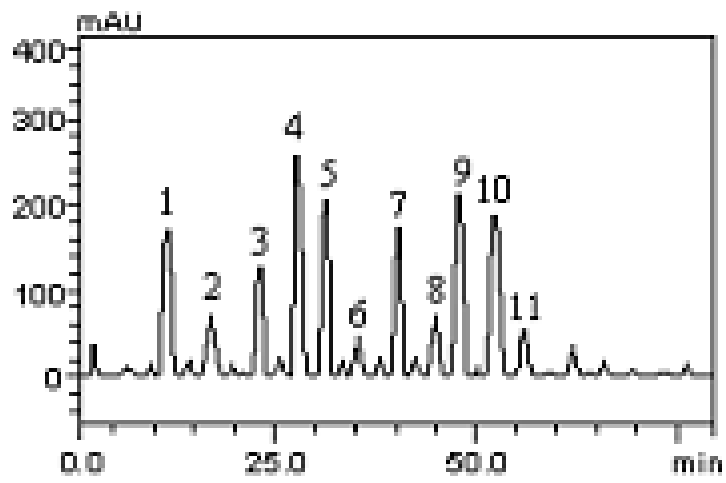


Figure 1

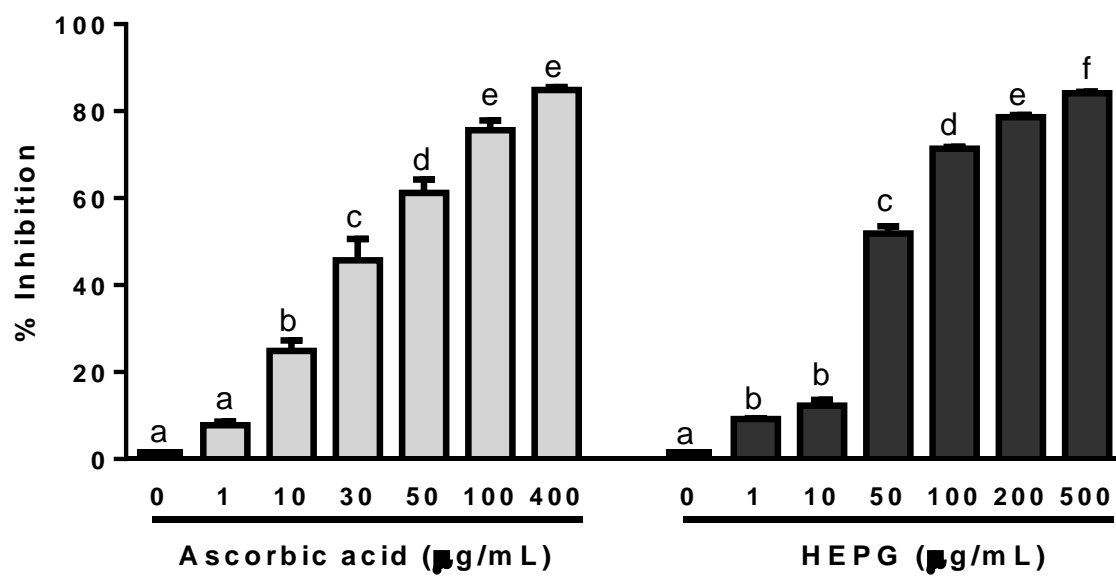


Figure 2:

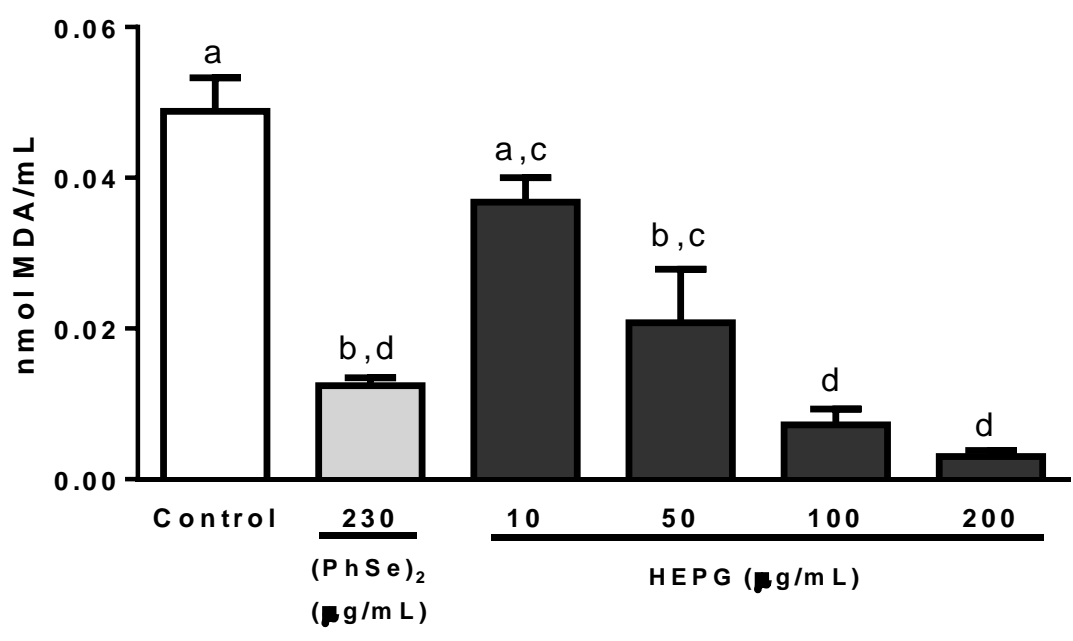


Figure 3:

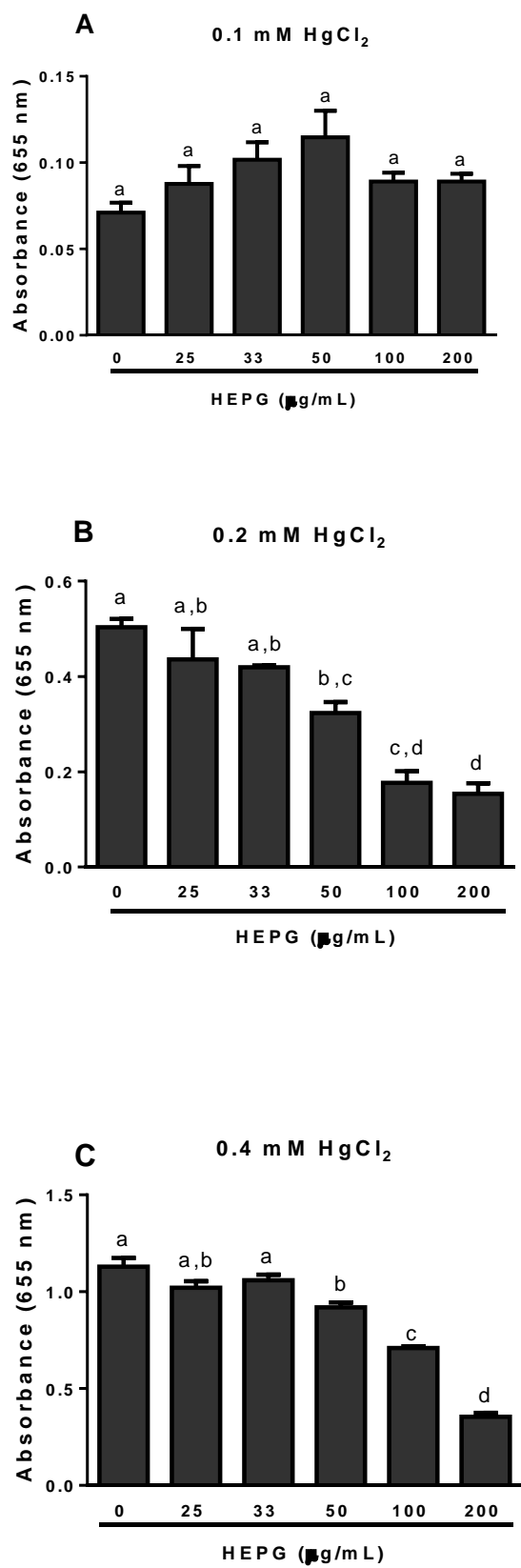


Figure 4:

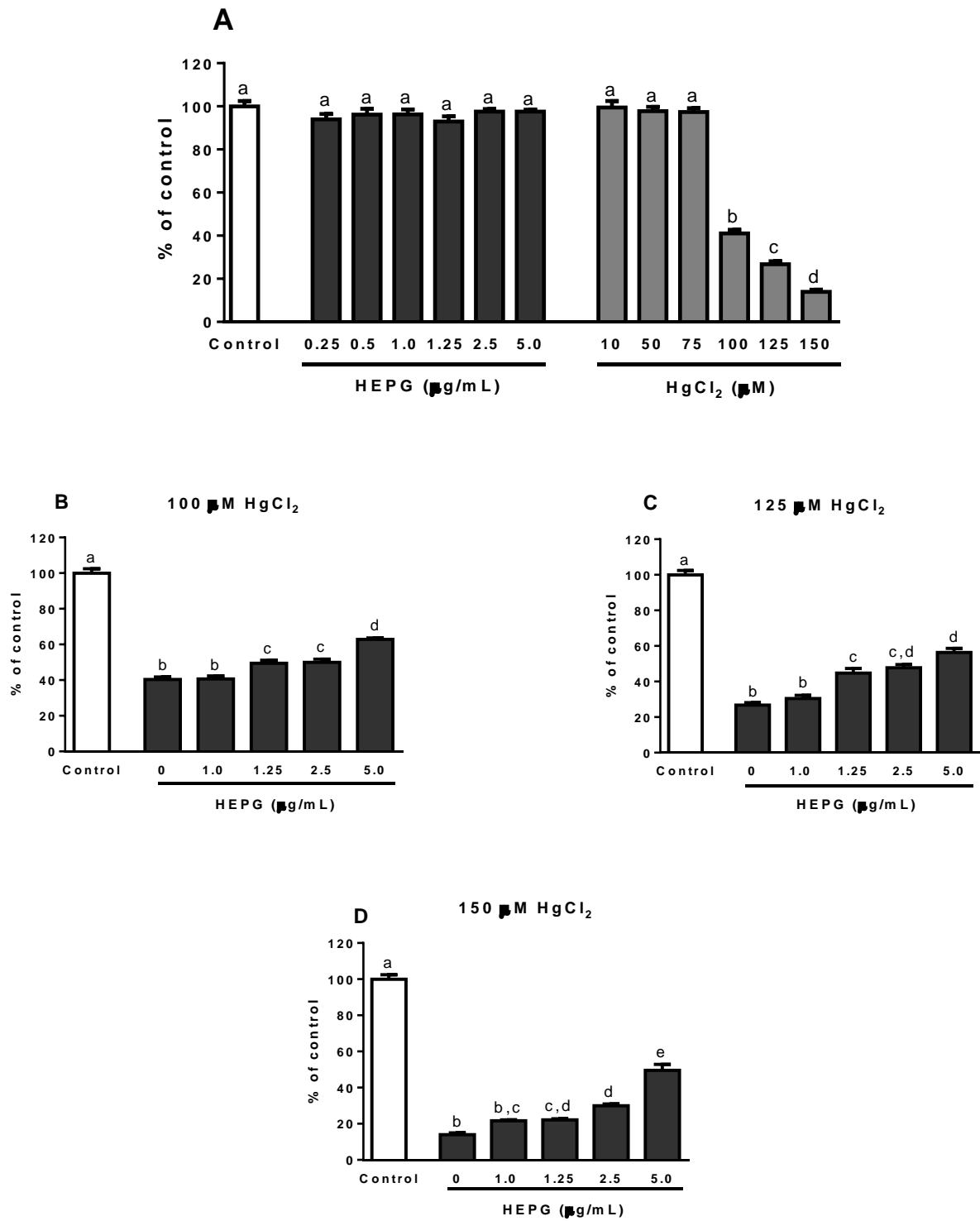


Figure 5:

4. DISCUSSÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que 65 a 80% da população mundial buscam nas plantas fins terapêuticos, seja por motivo cultural ou precariedade no sistema de saúde (CALIXTO, 2000). Nesse sentido, o Brasil tem enorme biodiversidade, possuindo uma das mais ricas floras do mundo e os poucos estudos existentes deste material justificam a busca de maior desenvolvimento nesta área. Uma vez que a biodiversidade brasileira não é totalmente estudada, milhões de espécies distintas de vegetais, microrganismos ou animais podem ser pesquisados (GUERRA E NODARI, 2001).

A goiabeira (*Psidium guajava* var. *pomifera* L) conhecida como goiaba vermelha se caracteriza como uma espécie de grande potencial de estudo, uma vez que na medicina popular ela já é utilizada para cólicas, colite, disenteria e dor de barriga (VENDRUSCOLO et al., 2005; TÔRRES et al., 2005). Constitui-se em uma planta de ampla distribuição no Brasil, e portanto tornam-se importantes estudos que enfoquem os efeitos do óleo essencial e do extrato de suas folhas. Lima et al. (2009) já se refere ao óleo essencial das folhas de goiabeira como ação bioinseticida contra lagartas de cartucho, indicando que ele pode se caracterizar com potencial de controle de pragas na agricultura.

Pragas agrícolas são cada vez mais comuns na agricultura, gerando grandes prejuízos. Por isso, ao propor nesse estudo uma fonte de bioinseticida, acreditamos que ele irá contribuir para uma agricultura sustentável com menor dano ao meio ambiente, diminuindo os custos de produção e melhorando a qualidade dos produtos ofertados.

Pesticidas químicos utilizados para o controle de insetos pode ser perigoso para os seres humanos e a vida selvagem. Além disso, estes compostos podem induzir a resistência a insetos e outros efeitos adversos, o que tem motivado a busca por formas alternativas de controle (MENDONÇA et al., 2011). O presente estudo demonstra a toxicidade induzida pelo óleo essencial de *Psidium Guajava* var. *pomifera* L.(OEPPG) em modelo de *Drosophila melanogaster*. A exposição das moscas pelo método de fumigação induziu queda na sobrevivência bem como danos na atividade locomotora. Como um mecanismo de toxicidade observados, os resultados sugerem a criação de um estado pró-oxidante após as moscas entrarem em contato com compostos voláteis derivados do OEPPG. Tal efeito é confirmado pelo aumento da produção de espécies reativas o que causou a peroxidação lipídica indicando a ocorrência de um estresse oxidativo. Além disso, uma resposta clara para o estresse oxidativo desencadeado pelas moscas quando expostas ao óleo foi a

ativação das vias de sinalização antioxidantes e consequentemente aumento da atividade das enzimas antioxidantes, tais como a Glutathione S-Transferase (GST) e a Catalase (CAT).

Compostos derivados de plantas são relatados como indutores de toxicidade para uma ampla gama de insetos e pode interferir diretamente em todos os estágios de desenvolvimento da mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, bem como em outros diversos tipos de insetos (RAVI et al., 2007; MIYAZAWA et al., 1994). Os compostos tais como terpenos, flavonóides, alcalóides, esteróides e saponinas são importantes fitoquímicos quando se considera a atividade inseticida de extratos de plantas (BELO et al., 2009). Em adição à toxicidade aguda e mortalidade, terpenóides e flavonóides foram também estudados para determinar sua atividade como repelente de insetos (BELO et al., 2009; NDEMAH et al., 2002). Há uma variedade de compostos químicos presentes no OEPPG tais como α -terpineol, α -humuleno, β -cariofileno e β -guaiene, 1,8-cineol, óxido de cariofileno, β -bisaboleno, aromadendreno, p-selineno, α -pineno, entre outros (SILVA, et al., 2003; CRAVEIRO, et al., 2003). Leal et al. (2003) mostraram a atividade inseticida do composto 1,8-cineol obtido a partir de óleos essenciais de *S. aromaticum*, *H. martiusii* e *L. sidoides*. Alguns autores sugeriram que a maioria desses monoterpenos não são tóxicos para os mamíferos e podem ser considerados como uma alternativa viável para os inseticidas sintéticos (CHAGAS et al., 2002; RICE E COATS, 2002)

Observou-se, neste estudo, que o óleo de goiaba apresenta mono e compostos sesquiterpeno, com o 1,8-cineol sendo o segundo composto mais abundante. Embora não tenhamos feito ensaios para avaliar a atividade inseticida de cada composto, a presença e abundância do 1,8 – cineol sugere que ele pode ter sido um dos compostos responsáveis por este efeito. Porém, estudos estão sendo feitos para esclarecer o papel dos diferentes compostos encontrados no óleo essencial que foi testado nos nossos experimentos.

De acordo com Ennan et al. (1998) alguns compostos encontrados nos óleos essenciais como terpenóides e fenilpropanóides podem alterar o sistema de neurotransmissores de insetos, incluindo as vias dopaminérgica e colinérgicas do aparelho locomotor (SOBRAL-SOUZA et al., 2014; LOIZZO et al., 2010). Observamos alterações nos testes de geotaxia negativa das moscas quando tratadas com o OEPPG, refletindo um déficit locomotor das mesmas. Embora não fosse capaz de avaliar diretamente mudanças nas vias dopaminérgicas e colinérgicas no nosso modelo experimental, alguns dos efeitos observados podem estar ligados a uma potencial interação entre os componentes do óleo e as via neurotransmissoras. Neste contexto, tem sido mostrado que muitos terpenos são conhecidos como inibidores da acetilcolinesterase (AChE) (LOIZZO et al., 2010).

Conforme relatado pelos mesmos autores, o α -terpinene encontrado em *Salvia leriifolia* mostrou um efeito inibidor de AChE. Então, isso sugere que os compostos terpenóides encontrados em goiaba absorvidos pelo efeito fumigante podem estar envolvidos no dano ao aparelho locomotor das moscas.

Em paralelo com a indução da mortalidade e déficit ao aparelho locomotor, as moscas expostas ao óleo essencial (OEPGP) também mostraram sinais de estresse oxidativo, incluindo a geração de ROS e formação de TBARS, acentuando alterações importantes nos sistemas de resposta antioxidante. A indução de diversas enzimas citoprotetoras em resposta a situações de estresse ocorre principalmente em nível transcricional e é mediada pelo elemento de resposta antioxidante (ARE), encontrado na região promotora de diversos genes que codificam enzimas de detoxificação. A ativação da transcrição gênica por meio do ARE é mediada, em grande parte, pelo Nrf2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear E2), um fator de transcrição que, devido à esta interação, regula as respostas celulares ao estresse oxidativo. Substâncias produzidas em resposta ao estresse oxidativo são indutoras potentes da ativação do ARE e, portanto, alterações no estado celular redox em resposta a níveis elevados de ROS ou a capacidade antioxidante reduzida constituem sinais importantes para promover as respostas transcricionais mediadas por este elemento de resposta. A atividade do Nrf2 é controlada, parcialmente, pela proteína Keap1 (do inglês: Kelch-like ECH-associated protein 1), via ubiquitinação em um processo que permite ao Nrf2 controlar a expressão tanto de genes constitutivos quanto induzíveis (NGUYEN et al., 2009).

Alterações na razão entre xenobióticos e a geração de ROS se constituem em um sinal importante para promover respostas adaptativas mediadas pelo fator de transcrição Nrf2 (NGUYEN et al., 2009; LIU, 2011). A ativação do fator de transcrição Nrf2-ARE por compostos naturais é fundamental para regular a ação das enzimas antioxidantes (NGUYEN et al., 2009; LIU, 2011). A translocação nuclear de Nrf2 e subsequente ligação à sequência de DNA-ARE pode ser desencadeada a partir de uma proteína inibidora Keap 1, bem como fosforilação dos resíduos de serina na proteína Nrf2 por quinases tais como PKC e MAPK. Dentre as proteínas que são normalmente envolvidas em resposta ao estresse oxidativo ativado pela Nrf2, podemos dizer que a desidrogenase NAD(P)H, quinona oxidoredutase 1 (1-NQO), ligase de glutamato cisteína (GCL), GST e CAT desempenham um papel central (HUR E GRAY, 2011). Os resultados do nosso estudo mostraram que é necessário um tempo de exposição ao óleo para desencadear uma resposta oxidante. Uma vez que há uma elevada taxa de mortalidade em quase todas as doses de óleo essencial nas primeiras 24 h de exposição ao óleo, medimos marcadores de estresse oxidativo até 12

h de exposição, de modo a traçar um perfil da resposta oxidante dos animais até esse período. Aparentemente, em resposta para a toxicidade induzida por compostos do óleo, moscas apresentaram um aumento nos níveis de ROS e um pico de GSH e NQO-1 nas primeiras 3 h de tratamento, que é um fenômeno consistente com um início de ativação da via Nrf2-ARE (JAISWAL, 2004). Enquanto ROS aumentaram a partir de 3 h prolongando-se até 12 h, a peroxidação lipídica ocorreu somente em 12 h de exposição.

As enzimas antioxidantes GST e CAT foram aumentadas durante o período de 6 h até 12 h após os tratamentos do óleo essencial. Apesar do aumento da atividade de enzimas antioxidantes de 6 a 12 h após a administração do óleo de goiaba, tais efeitos não protegeram as moscas contra danos desencadeados pela peroxidação lipídica. Estes resultados sugerem claramente que ocorreu uma resposta ao estresse oxidativo dividido em 2 fases: uma fase inicial desencadeada por indução de ROS, na qual ocorreu a ativação do fator de transcrição Nrf2, e uma fase tardia, caracterizada por danos oxidativos que promoveram um aumento das enzimas antioxidantes (CAT e GST). Estes resultados de mortalidade e déficit de atividade locomotora demonstra a toxicidade induzida pelo óleo essencial.

Glutathione-S-transferase (GST) é uma importante enzima envolvida nos sistemas de desintoxicação do organismo quando submetida a estresse oxidativo (SAU et al., 2010). GSTs pertencem a uma família de enzimas multifuncionais que catalisam a conjugação de GSH a várias outras moléculas e desempenham um papel importante no processo de desintoxicação intracelular quando os organismos são expostos a compostos xenobióticos (CHELHEVANAYAGAMA et al., 2001; WALTERS et al., 2009). O aumento observado da atividade da GST em *Drosophila melanogaster* quando expostas ao óleo essencial de *P. Guajava* pode estar relacionada como uma resposta adaptativa do organismo das moscas para eliminação de produtos tóxicos das plantas (AGIANIAN et al., 2003; WEI et al., 2001). Singh et al. (2000) demonstraram que os compostos naturais são capazes de aumentar a expressão de GST que, em conjunto com GSH endógena favorece a eliminação de metabólitos de plantas a partir de organismos. A enzima catalase (CAT) desempenha um papel crucial na depuração do peróxido de hidrogênio das células, bem como na defesa contra estresse oxidativo. Os resultados demonstraram um aumento significativo na atividade da enzima catalase no organismo das moscas tratada com o óleo essencial da goiaba. Este efeito ocorreu em paralelo com um aumento na produção de ROS. O método utilizado no presente estudo para detectar ROS foi baseado na oxidação do corante DCFDA, que é considerado um indicador de espécies reativas em geral. Contudo, peróxido de hidrogênio é uma das principais espécies

detectadas por esta sonda (LUND et al., 1993). O aumento observado na atividade das enzimas CAT e GST em *Drosophila melanogaster* quando expostas ao óleo essencial da goiaba pode ser explicado pela ativação da via de sinalização Nrf2. De fato, uma ativação precoce desta via de sinalização nas moscas quando expostas ao óleo também foi observado quando ocorreu um aumento da expressão da proteína NQO-1, bem como um aumento nos níveis de GSH.

Por sua vez, as folhas de goiabeira também são utilizadas pela população em geral no tratamento de diarreia e diabetes (GUTIERREZ, et al. 2008). Visto que as folhas da goiabeira são utilizadas amplamente na medicina popular, o presente estudo buscou avaliar além da atividade antioxidante do extrato, seu potencial quelante contra cloreto de mercúrio. Sabemos dos efeitos danosos ao organismo da contaminação por mercúrio e, dessa forma o presente estudo procurou identificar mais um composto que possa ter um efeito protetor e terapêutico quando ocorrer a contaminação por mercúrio.

Mercúrio (Hg) é listado pelo Programa Internacional de Segurança Química como um dos mais perigosos produtos químicos no ambiente (GILBERT E GRANT-WEBSTER, 1995), e seus efeitos sobre a saúde humana e os ecossistemas são de grande preocupação (KIYONO et al., 2011). Vários efeitos neurológicos e comportamentais foram relacionados aos seres humanos quando contaminados por mercúrio, tais como: falta de coordenação motora, tremores, diminuição do campo visual, distúrbios sensoriais (TSUBAKI E IRUKIAMA, 1976). Além disso, vários estudos têm demonstrado que o mercúrio inorgânico induz nefrotoxicidade (PEIXOTO E PEREIRA, 2007; FRANCISCATO et al., 2011; FAVERO et al., 2014; BRIDGES et al., 2014; Oliveira et al., 2015).

Os extratos de plantas têm sido estudados como protetores contra metais pesados, até, mesmo contra os efeitos de mercúrio. Estes extratos têm sido amplamente pesquisados como protetores contra metais pesados, pois as plantas desenvolveram mecanismos para retirar, acumular e tolerar estes metais. Esta habilidade pode diferir entre as espécie e também tecidos de uma mesma espécie (VÁLEGA et al., 2008). Em nosso trabalho, observamos que o extrato hidro alcóolico das folhas de *Psidium guajava* var *pomifera* L. (HEPG) apresentou atividade antioxidante e quelante de metais. Além disso, o pré-tratamento HEPG apresentou efeito protetor contra o mercúrio inorgânico no modelo de *S. cerevisiae*.

A atividade antioxidante de HEPG foi demonstrada por ensaios DPPH e TBARS. Os ensaios de DPPH se baseiam na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH• (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; HUANG et al., 2005). Desta forma, foi possível

avaliar o poder redutor do HEPG. Como um controle positivo utilizou-se ácido ascórbico, uma substância que tem uma grande atividade antioxidante (Duarte-Almeida et al. 2006). Baixas concentrações do HEPG mostraram atividade antioxidante similar ao controle positivo. Este resultado pode estar correlacionados com compostos prevalentes presentes no extrato, tais como quercetina e ácido cafeico, que são moléculas já estudadas por apresentarem uma elevada atividade antioxidante (CUYCKENS E CLAEYS, 2004).

Em relação ao ensaio TBARS, o HEPG inibiu a formação de malondialdeído (MDA) induzida por ferro em fosfatidilcolina. A peroxidação lipídica (LP) é definida como o dano causado aos lipídeos pelos radicais livres que se formam durante o stress oxidativo (ZIN et al., 2002), sendo que um dos produtos de LP é o MDA (SREELATHA E PADMA, 2009). Vários estudos demonstraram que alguns extratos de plantas medicinais inibem a peroxidação lipídica induzida pelo ferro *in vitro* (MANIAN et al., 2008; JEONG et al., 2011), à semelhança do que encontramos em nosso trabalho com o HEPG, reforçando a atividade antioxidante que também foi observada nos ensaios do radical livre DPPH. A capacidade anti-peroxidativa de compostos naturais são de grande importância, já que a proteção de biomoléculas, tais como fosfolipídeos, triglicerídeos e ácidos graxos poliinsaturados, que são essenciais para as funções celulares, é vital para a homeostase celular (COSTA et al., 2012).

Uma vez comprovado que o HEPG apresenta uma elevada atividade antioxidante, testamos o efeito do extrato contra o cloreto de mercúrio, uma vez que esse metal já é conhecido por induzir a formação de ROS e estresse oxidativo (FARINA et al., 2013). Neste trabalho, demonstramos que o extrato de *P. guajava* pode quelar mercúrio utilizando dois protocolos diferentes *in vitro*. No primeiro momento, o efeito quelante foi observado pelo método colorimétrico utilizando como corante o 1,5 dypnhenilcarbazon (DFCZ). A DFCZ forma uma coloração púrpura na presença de mercúrio, resultando em aumentos na absorvância a 655 nm (OHWEILER, 1974). Quando o HEPG foi incubada juntamente com mercúrio inorgânico na presença da DFCZ, a formação da cor púrpura não foi observada. Observou-se também que HEPG, quando incubados (24 h, à temperatura ambiente) com mercúrio inorgânico, formado um sedimento dependente da concentração de mercúrio e extrato. Os níveis de mercúrio foram medidos no precipitado e sobrenadante. Curiosamente, observamos o aumento da quantidade de mercúrio no pellet e diminuição no sobrenadante quando as concentrações HEPG foram aumentadas, demonstrando o efeito quelante do extrato. Provavelmente, os antioxidantes fenólicos presentes no HEPG foram os responsáveis por essa ação, pois eles têm a capacidade de funcionarem como sequestradores de radicais e, algumas

vezes, como quelantes de metais (SHARIDI et al., 1992). O composto fenólico prevalente em HEPG é ácido caféico.

Para verificar se o efeito antioxidante e quelante do HEPG observado in vitro iria resultar em efeitos protetores in vivo, utilizamos o *S. cerevisiae* como um organismo modelo. As leveduras são microrganismos eucariotas pertencem ao reino dos fungos (KURTZMAN E FELL, 2006), sendo os primeiros organismos eucarióticos a ter seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996). As leveduras possuem mais de 100 genes homólogos aos seres humanos, dentre estes genes ligados a patologias humanas (WOOD et al., 2002). As células de levedura geram ROS de formas semelhantes, como ocorrem em células de mamífero, e expressam muitas das defesas antioxidantes apresentados em organismos superiores (JAMIESON, 1998). Estes organismos tornaram-se ferramentas úteis para o estudo de citotoxicidade, o potencial genotóxico e citostático de drogas (FORTNEY et al., 2013), os aditivos alimentares (JABEEN et al., 2013) e contaminantes ambientais (SANFILIPO et al., 2010). Dadas estas propriedades, e da facilidade de manuseio e executar procedimentos simples, as leveduras também foram usados para testar as potencialidades farmacológicas de extratos de plantas (OPREA et al., 2014; MARQUES et al., 2011; CHANAK-KACZMAREK et al., 2015; KIRUTHIKA E PADMA, 2013). No que diz respeito ao Hg, já é conhecido que este metal é prontamente absorvido pelas células de *S. cerevisiae* e que não são facilmente removidos. Cepas deficientes no sistema de reparo de DNA foram mais sensíveis ao Hg do que as cepas do tipo selvagem. Este fato implica que o Hg danifica o DNA da levedura (KUNGOLOS et al., 1999). No presente estudo, demonstramos que o extrato de *Psidium guajava* var. *pomifera* L. protege as células contra os efeitos tóxicos de HgCl₂, reforçando as suas propriedades antioxidantes, protetores e quelantes.

5.CONCLUSÕES:

Observando os resultados descritos, podemos concluir que:

- 1) O óleo essencial das folhas de goiabeira quando aplicados como fumigante comprometeu a sobrevivência e a atividade locomotora da *Drosophila melanogaster*, conhecida como a mosca da fruta. O estresse oxidativo parece estar envolvido na toxicidade, uma vez que observamos nas moscas expostas ao óleo a ativação de marcadores de dano oxidativo bem como as vias de respostas antioxidantes. Portanto, os resultados apontam para um potencial promissor do óleo essencial de *P. guajava* e / ou seus compostos como uma alternativa para os inseticidas sintéticos em práticas de controle de pragas agrícolas
- 2) O HEPG apresentou uma alta concentração de compostos fenólicos e flavonóides. Nosso estudo indicou que HEPG tem efeitos antioxidantes e de proteção contra $HgCl_2$. Isto pode ser comprovado utilizando o modelo de *S. cerevisiae*, quando o HEPG impediu a morte de leveduras causada por mercúrio inorgânico. Além disso, um efeito quelante do HEPG foi evidenciado.

PERSPECTIVAS:

- Testar a toxicidade do óleo (OEPPG) em outros modelos biológicos
- Avaliar se o efeito bioinseticida do óleo (OEPPG) também será evidenciado em outros modelos de insetos.
- Verificar se o efeito quelante do extrato (HEPG) pode ser observado em mamíferos
- Identificar os mecanismos pelos quais o HEPG exerce seus efeitos quelantes
- Desenvolver novos extratos e óleos de plantas da Floresta Nacional do Araripe (FLONA) que possam ter potenciais bioinseticidas, antioxidantes e quelantes contra metais.

REFERÊNCIAS:

AGIANIAN B et al. Structure of a Drosophila sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, p. 151–165, 2003. alimentos. **Bol SBCTA**, v. 36, p. 1-11, 2002.

ANVISA. <http://www.anvisa.gov.br/legis>, acessada em novembro de 2015.

ARRUDA FP, BATISTA JL. Efeito da luz, de óleos vegetais e de cultivares de caupi na infestação do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista Caatinga**, v. 11, p. 53-57, 1998.

BAHIA MO - Le potentiel génotoxique du mercure: mutations HPRTet effects cytogénétiques. Dissertação de Mestrado, Montreal: Université du Québec à Montreal, 1997.

BAKIR F et al. Methylmercury Poisoning in Iraq. **Science**, v. 181, p. 230, 1973.

BANDONI AL, CZEPACK MP. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes, 2008.

BARKAY, T. et al. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Review**, v. 27, p. 355-384, 2003.

BELO M et al. Avaliação do efeito bioinseticida dos extratos de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae) e *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) sobre a mosca *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) (Gupta,1970). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, p. 235–239, 2009.

BISEN-HERSH EB et al. Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, p. 117-124, 2014.

BOTTERWECK AAM et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599-605, 2000.

BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARMO ES, LIMA EO, SOUZA EL. The potential of *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 362-367, 2008.

CASIDA JE, QUISTAD GB. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 1-16, 1998.

CHAGAS ACS et al. Acaricide effect of Eucalyptus spp. essential oils and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 247–253, 2002.

CHELVANAYAGAMA G, PARKER MW, BOARD PG. Fly fishing for GSTs: A unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 133, p. 256–260, 2001.

CLARKSON TW, VYAS JB, BALLATORI N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, p. 757-764, 2007.

COSTA DA et al. Atividade antioxidante da ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 567-575, 2012.

CRUCES-BLANCO C et al. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs. **Talanta**, v. 50, p. 1099-1108, 1999.

CUYCKENS F, CLAEYS M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.

DOLBEC J et al. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajos 503 river, Brazilian amazon. **Archives of Environmental and Occupational Health**, v. 73, p. 195-203, 2000.

DOREA, J. G. et al. Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v.13, p.239-248, 2003.

DUARTE-ALMEIDA JM et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

Ecycle: <http://www.ecycle.com.br/component/content/article/63/2768> em 21/11/2015.

EDRIS AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308- 323, 2007.

ENNAN E, BEIGLER M, KENDE A. Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches effects on octopamine receptors. **Proceedings of the International Symposium on Plant Protection**, Ghent, Belgium, 1998.

EKINO S, SUSAN M, NINOMIYA T, IMAMURA K, KITAMURA T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of Neurological Sciences**, v.262, p.131-144, 2007.

ESCRIG AJ et al. Guava fruit (*P. guajava L.*) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5489-5493, 2001.

FARINA M et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemical International**, v. 62, p. 575-594, 2013.

FERNANDES OA, CARNEIRO TR. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* no Brasil. In: PINTO AS, NAVA DE, ROSSI MM, MALERBO-SOUZA DT. (Eds.). Controle Biológico na Prática. ESALQ/USP, Piracicaba, 2006.

FLINT ML, BOSCH RVD. Introduction to integrated pest management. New York, Plenum, 1981.

FORTNEY K et al. NetwoRx: connecting drugs to networks and phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 720-727, 2013.

FRANCISCATO C et al. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 480-486, 2011.

FRIDOVICH I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annual New York Academic Sciences**, v. 893, p. 13-18, 1999.

FU S et al. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. **Biochemical Journal**, v. 333, p. 519-525, 1998.

GILBERT SG, GRANT-WEBSTER KS. Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 135-142, 1995.

GOFFEAU A et al. Life with 6000 genes. *Science*, v. 274, p. 546-567, 1996.

GONÇALVES AL, ALVES FILHO A, MENEZES H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 353-358, 2005.

GUERRA MP, NODARI RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR (Org.). Farmacognosia da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre- Florianópolis: Ed Universidade, p.13-40, 2001.

GUTIÉRREZ RM, MITCHELL S, SOLIS RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 117, p. 1-27, 2008.

HALIWELL D. Lipidic peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 410-418, 2000.

HALLIWELL B et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

HORVAT M. Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances. In: Baeyens, W. et al., 1996.

HUANG D, OU B, PRIOR R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUR W, GRAY NS. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 162–173, 2011.

IHA SM et al. Estudo fotoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 387-393, 2008.

JABEEN HS et al. Genotoxicity assessment of amaranth and allura red using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology**, v. 90, p. 22-26, 2013.

JAISWAL AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 1199–1207, 2004.

JAMIESON DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1511–1527, 1998.

JOHANSEN JS et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, 2005.

KÉITA SM et al. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 339-349, 2001.

KIYONO M et al. Genetic expression of bacterial merC fused with plant SNARE in *Saccharomyces cerevisiae* increased mercury accumulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 137–141, 2011.

KUNGOLOS A, AOYAMA I, MURAMOTO S. Toxicity of organic and inorganic mercury to *Saccharomyces cerevisiae*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 149-155, 1999.

KURTZMAN CP, FELL JW. Yeast systematic and phylogeny — implications of molecular identification methods for studies in ecology. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook, Springer, 2006.

LEAL LKAM et al. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 9–10, 2003.

LEITE LG et al. Nematóides entomopatogênicos no controle de pragas. In: PINTO AS, NAVA DE, ROSSI MM, MALERBO-SOUZA DT. (Eds.). Controle Biológico na Prática. ESALQ/USP, Piracicaba, 2006.

LIMA RK et al. Caracterização química do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e seus efeitos no comportamento da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência Agrotécnica**, v. 33, p. 1777 -1781, 2009.

LIU C-L, CHIU Y-T, HU M-L. Fucoxanthin enhances HO-1 and NQO1 expression in murine hepatic BNL CL2 Cells through activation of the Nrf2/ARE system partially by its prooxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11344–11351, 2011.

LOIZZO MR et al. *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates in vitro antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity. **Nutrition Research**, v. 30, p. 823–830, 2010.

LUND BO, MILLER DM, WOODS JS. Studies on Hg(II)- induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, p. 2017–2024, 1993.

MACHLIN LJ, BENDICH A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v. 1, p. 441-445, 1987.

MACIEL MAM et al. Plantas Mediciniais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-443, 2002.

MADHAVI DL, SALUNKHE DK. Antioxidants. In: MAGA J, TU AT (eds); Marcel Dekker: New York, 1995.

MANIAN R et al. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemical**, v. 107, p. 1000-1007, 2008.

MARICONI FA. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. 2ed. São Paulo: Agron. Ceres, 1963.

MARQUES F et al. Stimulation of DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae* by *Ginkgo biloba* leaf extract. **Food Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1361-1366, 2011.

MENDES SS et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.

MENDONÇA PM et al. Effects of latex from “Amapazeiro” *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) post-embryonic development. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 379–382, 2011.

MENZEL CM. Guava: an exotic fruit with potencial in Queensland. **Queensland Agricultural Journal**, v. 3, p. 93-98, 1985.

MILLER DM, BUETTNER GR, AUST SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, p. 95-108, 1990.

MIYAZAWA M et al. An insect growth inhibitory lignan from flower buds of *Magnolia fargesii*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 611–613, 1994.

MMA (Ministério do Meio Ambiente) <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/mercurio>. Acesso em 21/11/2015.

NDEMAH R, GOUNOU S, SCHULTHESS F. The role of wild grasses in the management of lepidopterous stem-borers on maize in the humid tropics of western Africa. **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, p. 507–519, 2002.

NGUYEN T, NIOI P, PICKETT CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 13291–13295, 2009.

NGUYEN T, SHERRATT PJ, PICKETT CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 233–260, 2003.

NÍCIFOROVÍČ N et al. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3125-3130, 2010.

OHWEILER OA. *Química analítica quantitativa*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1974.

OLIVEIRA VA et al. Lactating and non-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: protective effect of ZnCl₂. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, p. 240-246, 2014.

OPREA E et al. *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemical**, v. 152, p. 516-521, 2014.

PARK J-D, ZHENG W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v.45, p.344-352, 2012.

PASTORE A et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.

PECHE, PM. Produção de Mudas de goiabeira em sistema hidropônico e convencional. Lavras, UFLA, p. 54, 2012.

PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

RAJKUMAR S, JEBANESAN A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107-109, 2010.

RAVI K, SITA D, JANARDHAN R. Bioactivity of essential oils and sesquiterpenes of *Chloroxylon swietenia* DC against *Helicoverpa armigera*. **Current Science**, v. 93, p. 544–548, 2007.

REISHE DW, LILLIARD DA, EITENMILLER RR. Antioxidants. In: AKOH CC, MIN DB (eds); Marcel Dekker: New York, 1997.

RICE PJ, COATS JR. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 87, p. 1172–1179, 1994.

RICE-EVANS CA et al. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375- 383, 1995.

RIDNOUR LA et al. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 102, p. 13147-13152, 2005.

RISTERUCCI AM et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 745-748, 2005.

ROEL AR. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, p. 43-50, 2001.

ROSSINI SRG et al. Chronic Insomnia in Workers Poisoned by Inorganic Mercury. **Arquivos Neuropsiquiatria**, v. 58, p. 32-38, 2000.

SANFILIPPO K et al. Determination of trace endocrine disruptors in ultrapure water for laboratory use by the yeast estrogen screen (YES) and chemical analysis (GC/MS). **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1190-1194, 2010.

SÃO JOSÉ AR et al. Cultivo de goiabeira no Brasil. In: **Primer simpósio internacional de la guayaba**, p. 84-115, 2003.

SAU A et al. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 116–122, 2010.

SCHUURS AHB. Reproductive toxicity of occupational mercury. A Review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 27, p. 249-256, 1999.

SIKORSKI et al. Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. **International Archives of Occupational Environmental Health**, v. 59, p. 551-557, 1987.

SILBERGELD EK et al. Effects of Mercury on Resistance to *P. yoelli* Malaria in a Mouse Model. **Toxicology Science**, v. 42, p. 205, 1998.

SILVA EL et al. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Letters**, v. 430, p. 405-408, 1998.

SILVA ICA et al. Análise fitoquímica e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 76-78, 2013.

SILVA JD et al. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 240–243, 2003.

SILVA MB et al. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas In: VENZON M, JÚNIOR TJP, (coord.). Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa: EPAMIG. p. 33-54, 2010.

SILVA SL et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, v. 38, 2008.

SIMAS NK et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenoides e fenilpropanoides. **Química Nova**, v. 27, 2004.

SINGH RP, PADMAVATHI B, RAO AR. Modulatory influence of *Adhatoda vesica* (Justicia adhatoda) leaf extract on the enzymes of xenobiotic metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation in mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v 213, p. 99–109, 2000.

SOARES SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOBRAL-SOUZA CE et al. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 165–170, 2014.

SOUZA CMM et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SREELATHA S, PADMA PR. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 303-311, 2009.

THACKER JRM. An Introduction to arthropod pest control. Cambridge, Cambridge University, 2002.

TÔRRES AR et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 373-380, 2005.

TSUDA T, YORIFUJI T, TAKAO S, MIYAI M, BABAZONO A. Minamata disease: catastrophic poisoning due to a failed public health response. **Journal of Public Health Policy**, v.30, p.54-67, 2009.

UNEP – United Nations Environment Program. Chemicals: Global Mercury Assessment. Geneva, 2002.

VÁLEGA M et al. Mercury in salt marshes ecosystems: *Halimione portulacoides* as biomonitor. **Chemosphere**, v. 73, p. 1224-1229, 2008.

VALKO M et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VELIOGLU YS. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 41113-41117, 1998.

VENDRUSCOLO GS, RATES SMK, MENTZ LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 361-372, 2005.

WALTERS KB, GRANT P, JOHNSON DLE. Evolution of the GST omega gene family in 12 *Drosophila* species. **Journal of Heredity**, v. 100, p. 742–753, 2009.

WANNES WA et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.5, p. 1362-1370, 2010.

WEI SH, CLARK AG, SYVANEN M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide resistant strain of the housefly *Musca domestica*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 1145–1153, 2001.

WOOD V et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nature**, v. 415, p. 871–880, 2002.

ZAMBÃO LC, NETO AMB. Cultura da Goiaba. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, **Boletim Técnico**, v. 236, p. 23, 1998.

