

Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sbraleanum* Proença & Landrum contra metais pesados

Evaluación de la actividad citoprotectora y antioxidante de los extractos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sbraleanum* Proença & Landrum contra metales pesados

Evaluation of the Cytoprotective and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia Uniflora* Lineau e *Psidium Sbraleanum* Proença & Landrum Against Heavy Metals

Celestina E. Sobral-Souza MSc,¹ Nadghia F. Leite MSc,¹ Francisco A. B. Cunha PhD,¹ Antonio I. Pinho PhD,¹ José G. M. Costa PhD,¹ Henrique D. M. Coutinho PhD¹

Recibido: 2 de octubre de 2013 • Aceptado: 10 de junio de 2014

doi: dx.doi.org/10.12804/revsalud12.03.2014.08

Para citar este artículo: Sobral-Souza CE, Leite NF, Cunha FAB, Pinho AI, Costa JGM, Coutinho HDM. Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sbraleanum* Proença & Landrum contra metais pesados. Rev Cienc Salud. 2014;12(3): 401-9. doi: dx.doi.org/10.12804/revsalud12.03.2014.08

Resumo

Objetivo: Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças. **Materiais e métodos:** Neste contexto, avaliaram-se os potenciais antioxidantes, *in vitro*, dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Psidium sbraleanum*, além de quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos. **Resultados:** De acordo com os resultados obtidos, observou-se uma melhor atividade antioxidante para o extrato de *Eugenia uniflora*, para o teste de TBARS com fosfolípídio de ovo, os extratos reduziram os níveis basais no processo de peroxidação lipídica, e quando induzidos por Fe²⁺ o extrato de *Psidium sbraleanum* mostrou-se mais eficiente. **Conclusões:** Portanto, através destes ensaios pode-se verificar que os extratos das folhas das espécies, *Eugenia uniflora* e *Psidium sbraleanum*, apresentam uma atividade antioxidante, diretamente relacionada com substâncias fenólicas produzidas a partir do seu metabolismo secundário.

Palavras-chave: Peroxidação lipídica, compostos fenólicos, sulfato de ferro, produto natural.

¹ Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato (CE), Brasil. Correspondencia: hdmcoutinho@gmail.com

Resumen

Objetivo: Estudios recientes reportan la utilización de plantas en forma de zumos o té como fuente de agentes antioxidantes naturales que presentan bajo riesgo, pudiendo ser utilizados como complemento del tratamiento de diversas enfermedades. *Materiales y métodos:* En este contexto, se evaluarán *in vitro*, los potenciales antioxidantes, de los extractos de *Eugenia uniflora* y *Psidium sbraleanum*, además de cuantificar fenoles y flavonoides presentes en los extractos. *Resultados:* De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó una mejor actividad antioxidante con el extracto de *Eugenia uniflora*, en el test de TBARS con fofolípidos de huevo, los extractos redujeron los niveles basales en el proceso de peroxidación lipídica; y cuando fue inducida con Fe^{+2} , el extracto de *Psidium sbraleanum* se mostró más eficiente. *Conclusiones:* Por lo tanto, a través de estos ensayos se pudo comprobar que los extractos de las hojas de las especies *Eugenia uniflora* y *Psidium sbraleanum* presentan actividad antioxidante, directamente relacionada con sustancias fenólicas producidas a partir de sus metabolitos secundarios.

Palabras clave: Peroxidación lipídica, compuestos fenólicos, sulfato de hierro, producto natural.

Abstract

Objective: Evaluation of antioxidant activity has been an important issue considering its importance in human health. Recent studies show that the use of plants in the form of juices or teas as sources of natural antioxidants with low risk can be used as an aid to the treatment of various diseases. *Material and Methods:* Evaluation of the antioxidant potential *in vitro*, extracts of *Eugenia uniflora* and *Psidium sbraleanum*, as well as the quantification of phenols and flavonoids present in the extracts. *Results:* Findings showed a better antioxidant activity for the extract of *Eugenia uniflora*. In the TBARS test with egg phospholipids, extracts presented a reduction in the basal levels in the lipid peroxidation process; and when the Fe^{2+} + extract was inducted, *Psidium sbraleanum* proved to be more efficient.. *Conclusions:* These tests proved that the extracts of leaves of the species *Eugenia uniflora* and *Psidium sbraleanum* present antioxidant activity which is directly related to phenolic substances produced in its secondary metabolism.

Key Words: Lipid Peroxidation, Phenolic Compounds, Iron Sulfate, Natural Products.

Introdução

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante considerando sua importância sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais que apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de várias doenças (1).

Para além de doenças crônicas, o estresse oxidativo também pode desempenhar um papel fundamental na hepatotoxicidade aguda de vários fármacos, incluindo o analgésico utilizado mundialmente e antipirético paracetamol (2). Estudos têm mostrado que a utilização de compostos polifenólicos encontrados no chá, frutas e vegetais está associada com um risco baixo de tais doenças (3). Consequentemente, existe

uma grande quantidade de interesse em plantas comestíveis que contêm antioxidantes e de promoção da saúde fitoquímicos como potenciais agentes terapêuticos (4).

O malondialdeído MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 532 nm e fluorescência em 553 nm (5).

Plantas medicinais possuem diversos compostos químicos com potencial antioxidante. Dentre as classes com essa propriedade, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por apresentarem comprovada atividade de inibição da peroxidação lipídica e da lipoxigenase *in vitro* (6, 7).

A espécie *Eugenia uniflora*, conhecida no Brasil como pitanga é uma planta arbórea da família Myrtaceae presente em todo o país. Além da sua atividade antimicrobiana, apresenta inúmeras atividades biológicas, como: antioxidante (8), hipotensor, anti-hipertensivo e diurético (9). Diversos fitoconstituintes de *E. uniflora* já foram isolados como os flavonoides, miricitrina, quercetina e o ramnosídeo 3- quercitrina, além de esteróides, compostos mono e triterpenóides, taninos, antraquinonas, fenóis, cineol e óleos essenciais (10, 11).

O gênero *Psidium* se destaca por apresentar espécies com grande potencial terapêutico e diversas atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas: atividade antioxidante, hepatoprotetora, antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, e anticestodea (12, 13-19). A espécie *Psidium socraleanum* Proença Landrum, é conhecida popularmente como araçá de veado e está presente na região da Chapada do Araripe, no estado do Ceará. O óleo essencial apresenta, dentre outros constituintes, 1,8-cineol, α -pineno β -pineno, acetato de mentila, α -cadinol,

globulol, elemol. O óleo apresentou atividade antimicrobiana (14).

Este trabalho teve como objetivo verificar os potenciais antioxidantes, *in vitro*, dos extratos de *Eugenia uniflora* e *Psidium socraleanum* por DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) e quantificar fenóis e flavonoides presentes nos extratos como forma de demonstrar o potencial protetor destes produtos naturais contra os efeitos tóxicos de metais pesados.

Materiais e métodos

Material vegetal

As folhas de *Psidium socraleanum* foram coletadas na fazenda Barreiro Grande, na Chapada do Araripe, município de Crato, Ceará. As folhas de *Eugenia uniflora* foram coletadas no Horto Botânico de Plantas Medicinais do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN), da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Preparação do extrato

O extrato de *Eugenia uniflora* foi preparado por imersão utilizando 600 g de folhas frescas em etanol durante 72 horas à temperatura ambiente e 308 g de folhas frescas de *Psidium socraleanum* submersas em etanol e água (1:1) durante 72 horas à temperatura ambiente. As soluções foram filtradas e concentradas utilizando um evaporador rotativo de vácuo (modelo Q-344B-Quimis, Brasil) e banho de água quente (modelo Q214M2-Quimis Brasil). O extrato bruto de *Eugenia uniflora* e *Psidium socraleanum*, obtiveram um rendimento de 6,31 g e 49,2 g, respectivamente.

Quantificação de Fenóis totais

A quantidade de fenóis totais, foi determinada adicionando-se 200 μ L da solução dos extratos

(300, 100, 50 e 25 µg/mL em etanol 99,6 %) a 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (10 % v/v) sendo agitada por 1 minuto. Em seguida acrescentou-se 800 µL de carbonato de sódio 7,5 %, sendo a amostra homogeneizada por 30 segundos. Após 1 hora foi medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 765 nm. O branco foi determinado com todos os reagentes, porém o extrato foi substituído por água destilada. O teste foi realizado em triplicata. A média das três leituras foi usada para determinar os fenóis totais, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico/ grama de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico. A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (300, 100, 75, 25 e 10 µg/mL).

Quantificação de Flavonóides

Foram preparadas soluções do extrato (300, 200, 100 e 50 µg/mL) e utilizado 1 mL destas adicionando-se 1 mL cloreto de alumínio (AlCl₃) com contração de 2 % peso/volume. No tubo que foi determinado como branco, o volume adicionado de cloreto de alumínio foi substituído por água destilada. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi medida no filtro de 415 nm. O teste foi feito em triplicata, resultando assim na utilização da média para determinação da quantidade de flavonóides totais e expresso como miligramas de quercetina equivalentes/grama de extrato. A curva de calibração da quercetina foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL) diluída em etanol 99,6 %.

Atividade antioxidante por DPPH

Foram preparadas soluções com diferentes concentrações de cada extrato de *Psidium so-*

braleanum e *Eugenia uniflora* (250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL) em triplicata. Em um tubo foram misturados 100 µL da solução do extrato e 3,9 mL de solução de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,06 mM e homogenizado com agitador de tubos, procedimento realizado em ambiente escuro. Para o branco, a amostra foi substituída por 100 µL de metanol. As leituras foram realizadas utilizando um filtro de comprimento de onda de 520 nm e repetidas a cada minuto até que foi observada a estabilização da leitura.

A curva padrão foi determinada realizando leituras no mesmo comprimento de onda (515 nm), porém com soluções de DPPH em diferentes concentrações (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM), sendo o branco determinado por metanol (20).

Atividade antioxidante por TBAR

A produção de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) de fosfolípido foi determinada usando o método de Ohkawa, et al, com modificações (21). Foi preparada uma solução de vitelo da espécie *Gallus gallus* L., misturada com uma solução de hexano-isoprano (3:2). Essa solução foi filtrada e rotaevaporada até a obtenção de resíduo sólido. Para ensaio TBARS solubilizou-se 0,05g do resíduo em 10 mL de água mili-Q. Para pré-incubação foi utilizado 100 µL de fosfolípido, 50 µL de extrato nas concentrações de 100, 40, 10 e 4 µg/mL juntamente com um volume adequado de água deionizada. As amostras foram repetidas adicionando 14 µL de Fe (60 µM) e incubadas a 37 °C, durante 1 h. Após a pré incubação foi adicionado 500 µL de tampão ácido acético e 500 µL de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,6 % e incubado por 1h a uma temperatura de 100 °C. Os tubos foram adicionados 2 mL de n-butanol e a mistura centrifugada. O sobrenadante foi retirado e a absorbância foi lida a 532 nm num espectrofotômetro.

Para a curva de MDA (malonaldeído) foi utilizada 500 µL de ácido acético, 500 µL de TBA (0,6 %), MDA nas concentrações de 50, 100, 150, 200 µL e volume adequado de água destilada para completar um volume de 1,5 mL. Os testes foram feitos em triplicata e repetido duas vezes.

Avaliação do potencial citoprotetor do produto natural EEFEU e EHFPS contra metais pesados

De acordo com Coutinho et al, modificado, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) do EEFEU e EHFPS, foram determinados pelo ensaio de microdiluição usando suspensões de 105 UFC/mL em solução salina e extratos na concentração inicial de 1024 µg/mL (22). A CIM foi definida como a concentração mais baixa à qual não foi observado crescimento. Para a avaliação do efeito protetor EEFEU e EHFPS ao metal pesado, foi realizada uma modulação utilizando concentrações sub-inibitórias dos extratos, suspensões de 105 UFC/mL de *Escherichia coli* ATTC 11105 e *Candida albicans* 62 em meio M9 Tris com 2 % de glicose e uma de concentração do sulfato de ferro II variando de 100 mM a 0,0488 mM. As placas de microdiluição

foram incubadas por 48 h a 37 °C. A concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

Análise estatística

Os resultados dos testes foram feitos em triplicata e expressos como média. Para análise estatística foi aplicada a Anova seguida do teste de Tukey. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados e discussão

O extrato das folhas *P. soraLEANUM* possui alto teor de polifenóis (417,48 mg/g) quando comparado com o extrato das folhas de *E. uniflora* (75,65 mg/g). Já em relação à quantidade de flavonóides o extrato de *E. uniflora* (42,46 mg/g) obteve um maior valor se comparado com *P. soraLEANUM* (12,54 mg/g) (tabela 1).

A determinação de fenóis totais ou compostos fenólicos é a determinação de flavonóides, tocoferóis e ácidos fenólicos juntos, que são antioxidantes naturais (23). Segundo Ratty e Das, já foram relatados em alguns trabalhos os efei-

Tabela 1. Valores de Fenóis totais e Flavonoides do EEFEU e EHFPS

	Ác. Gálico (padrão) (mg/g)	Quercetina (padrão) (mg/g)	EEFEU (mg/g)	EHFPS (mg/g)
Fenóis Totais	1079,06		75,65	42,46
Flavonóides		946,94	417,48	12,54

* EEFEU: Extrato etanólico de *Eugenia uniflora*; EHFPS: Extrato hidroalcolólico de *Psidium soraLEANUM*

Tabela 2. Atividade antioxidante e valores da CL50 e CE50 de EEFEU e EHFPS

Amostra	CL ₅₀ (mg/mL)		CE ₅₀ (mg/mL)
	TBARS- basal	TBARS - Fe ²⁺	DPPH
EEFEU	19,16	100,10	185,47
EHFPS	75,67	80,45	305,10

* EEFEU: Extrato etanólico de *Eugenia uniflora*; EHFPS: Extrato hidroalcolólico de *Psidium soraLEANUM*; TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.

tos dos flavonoides sobre os sistemas biológicos e, dentre eles: capacidade antioxidativa (24); atividades anti-inflamatórias e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra o desenvolvimento de tumores, antihepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais.

A inibição do processo de peroxidação lipídica utilizando fosfolipídio de ovo apresentou indício de redução quanto aos níveis basais para os extratos das folhas, esta redução não foi considerada significativa para EEFEU. Foi observada inibição significativa para o EHFPS em todas as concentrações utilizadas tendo como melhor resultado as concentrações de 40 µg/mL e 10 µg/mL, quando o estresse oxidativo foi induzido com auxílio de Fe²⁺ (figura 1).

Existe uma forte correlação entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como um marcador de peroxidação lipídica e os produtos que refletem o dano oxidativo ao DNA (25). Aumento do stress oxidativo induzido por sulfato de ferro (II) na formação

de TBARS, em comparação com o normal, sugerem um possível dano de tecidos com uma sobrecarga de ferro (26).

Sabir e Rocha determinaram a atividade antioxidante de *Phyllanthus niruri* (Euforbiaceae), utilizando diversas metodologias, entre elas, TBARS com fosfolipídio de ovo, nesse estudo foi induzido estresse oxidativo com ferro e nitroprussiato de sódio separadamente (27). Nas duas situações foram observadas reduções significativas da produção de malondialdeído (MDA) ($p > 0,05$) na concentração de 100 µg/mL de extratos aquosos e metanólicos, sendo que os melhores resultados foram observados em relação ao ferro.

O ensaio utilizando DPPH avalia a capacidade sequestrante de radicais livres da amostra analisada. O radical livre DPPH é relativamente estável e sua ação sequestrante deve-se à abstração de um radical hidrogênio de compostos presentes nos extratos e frações, geralmente fenólicos (28). Magina et al, demonstraram que extratos etanólicos e frações hexanicas,

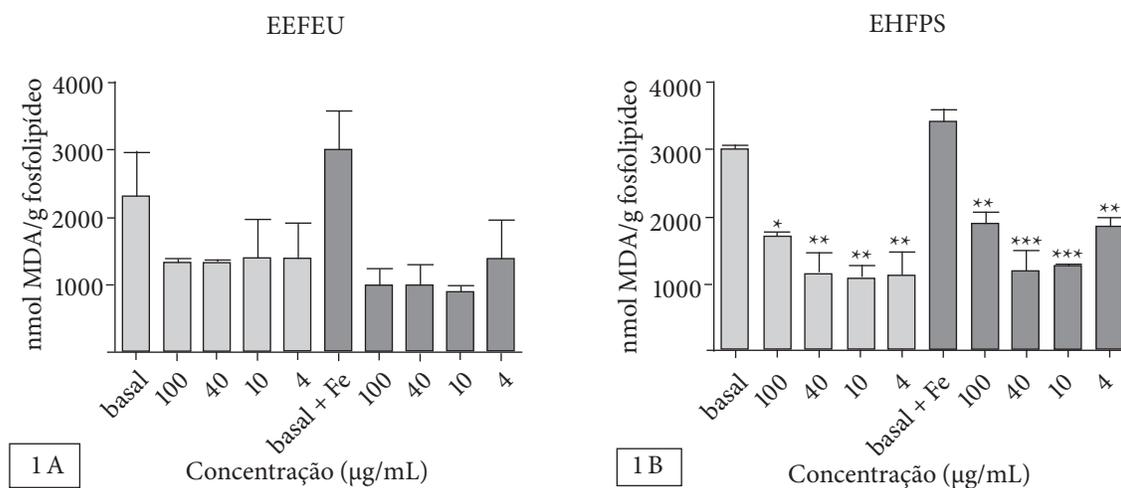


Figura 1: Propriedade antioxidante de EEFEU E EHFPS. Peroxidação lipídica (produção de TBARS) em fosfolipídeos de ovo foi determinada na ausência ou na presença de Fe²⁺ (10 mM). EEFEU: Extrato etanólico de *Eugenia uniflora*; EHFPS: Extrato hidroalcolólico de *Psidium soraleanum*; TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico. Os valores são expressos como média ± SEM de 2 experimentos independentes efetuadas em triplicata. * $p < 0,05$ vs Fe²⁺ induzido; ** $p < 0,01$ vs Fe²⁺ induzido

diclorometano, acetato de etila, n-butanol e aquosa principalmente das folhas, de espécies de *Eugenia* testadas apresentam uma atividade antioxidante bastante eficaz (29).

A atividade antioxidante foi mensurada com o método do DPPH e o resultado expresso em um valor de CE50 185,47 µg/mL e 305,10 µg/mL, para a *E. uniflora* e *P. soraLEANUM*, respectivamente (tabela 2). Com os dados obtidos no teste de TBARS, foi possível determinar a concentração letal média (CL50) de 19,16 mg/mL para EEFEU e de 75,67 mg/mL para EHFPS e de 100,10 mg/mL para EEFEU e de 80,45 mg/mL para EHFPS. Quanto mais baixo for o valor da CL50 e da CE50, maior é a potência antioxidante. Nesse contexto, o EEFEU, mostra-se mais efetivo quando comparado ao EHFPS, que pode está relacionada à elevada presença de flavonoides.

Os resultados obtidos evidenciaram que os microrganismos conseguiram resistir ao sulfato de ferro II em todas as concentrações utilizadas. O mesmo resultado foi visto no teste de citoproteção onde foram testados as concentrações de sulfato de ferro II em conjunto com os extratos de EEFEU e EHFPS. Com isso, a presença dos extratos não mostrou atividade

citoprotetora *in vitro*, visto que não alterou o perfil de sobrevivência das cepas bacterianas nos ensaios empregados.

Nas células eucarióticas e em grande parte de células procarióticas, o ferro é particularmente necessário para a sobrevivência e propagação, tal como um membro de um grupo diverso de hemoproteínas que inclui proteínas envolvidas no transporte de oxigênio e de armazenamento (hemoglobina e mioglobina), a transferência de elétrons (citocromos) e síntese de DNA (ribonucleótido-redutase) (30).

Conclusão

Observou-se através da captura do radical livre DPPH, uma melhor atividade antioxidante no extrato de *E. uniflora*. Para o teste de TBARS, os extratos reduziram os níveis basais no processo de peroxidação lipídica, e quando induzidos por Fe²⁺, mas o extrato de *P. soraLEANUM* mostrou-se mais eficiente. Portanto, através destes ensaios pode-se verificar que os extratos das folhas das espécies, *Eugenia uniflora* e *Psidium soraLEANUM*, apresentam uma atividade antioxidante, diretamente relacionada com substâncias fenólicas produzidas.

Bibliografia

1. Silva CG, Herdeiro RS, Mathias CJ, Panek AD, Silveira CS, Rodrigues VP, et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacol Res.* 2005;52(3):229-33.
2. Reid AB, Kurten RC, McCulough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(2):509-16.
3. Hertog MGL, Hollman PCH, Van Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J Agric Food Chem.* 1993;41(8):1242-6.
4. Vieira RF. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. En Janick J, editor. *Perspective in new crops and new uses.* Alexandria: AHS press; 1999. p. 152-159.
5. Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000;3(5):373-84.
6. Sun J, Shao-Fang L, Chu-Shu Z, Li-Na Y, Jie B, Feng Z, et al. Chemical composition and antioxidant activities of *Brussonetia papyfera* fruits. *Plos One* 2012;7:1-8.

7. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova*. 2007;30(2):351-5.
8. Velázquez E, Tournier HA, Mordujovich De Buschiazso P, Saavedra G, Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*. 2003;74(1-2):91-7.
9. Consolini AE, Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J Ethnopharmacol*. 2002;81(1):57-63.
10. Bandoni AL, Mendiondo ME, Rondina RV, Coussio JD. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia*. 1972;35(1):69-80.
11. Wazlawik E, Da Silva MA, Peters RR, Correia JF, Farias MR, Calixto JB, et al. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *J Pharma Pharmacol*. 1997;49(4):433-7.
12. Abreu PR, Almeida MC, Bernardo RM, Bernardo LC, Brito LC, Garcia EA, Fonseca AS, Bernardo-Filho M. Guava extract (*Psidium guajava*) alters the labelling of blood constituents with technetium-99m. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(6):429-35.
13. Pereira, CKB. Estudo químico e atividades microbiológicas de espécies do gênero *Psidium*. [teses mesurado]. [Crato]: Universidade Regional do Cariri-URCA; 2010. 120 p.
14. Arima H, Danno G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66(8):1727-30.
15. Chen HC, Sheu MJ, Lin LY, Wu CM. Chemical composition of the leaf essential oil of *Psidium guajava* L. from Taiwan. *J Essent Oil Res*. 2007;19(4):345-7.
16. Gonçalves FA, Andrade Neto M, Bezerra JN, Macrae A, Sousa OV, Fonteles-Filho AA, Vieira RH. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2008;50(1):11-5.
17. Nair R, Kalariya T, Chanda S. Antibacterial activity of some plant extracts. *Phytother Res*. 2008;22:1030-4.
18. Uboh FE, Okon IE, Ekong MB. Effect of aqueous extract of *Psidium guajava* leaves on liver enzymes. Histological Integrity and Hematological Indices in Rats. *Gastroenterol Res*. 2010;3(1):32-8.
19. Tangpu TV, Yadav AK. Anticestodal efficacy of *Psidium guajava* againsts experimental *Hymenolepis diminuta* infection in rats. *Indian J Pharmacol*. 2006;38(1):29-32.
20. Sanchez-Moreno JA, Larrauri F, Saura-Calixto A. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agricult*. 1998;76:270-6.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-8.
22. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*. 2008;54(4):328-30.
23. Verma AK, Pratap R. The biological potential of flavones. *Nat Prod Rep*. 2010;27(11):1571-93.
24. Ratty AK, Das PN. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol*. 1998;39(1):69-79.
25. Chen HJ, Wu CF, Huang JL. Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. *Toxicol Lett*. 2005;155(3):403-10.
26. Fraga CG, Oteiza PI. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 2002;180(1):23-32.

27. Sabir SM, Rocha JBT. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct *in vitro* antioxidant and *in vivo* hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. *Food Chem.* 2008;111(4):845-51.
28. Lugasi A, Horvahovich P, Dworschak E. Additional information to the *in vitro* antioxidant activity of *Ginkgo biloba* L. *Phytother Res.* 1999;13(2):160-2.
29. Magina MA, Gilioli A, Moresco HH, Colla G, Pizzolatti MG, Brighente IMC. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat Am J Pharm.* 2010;29(3):376-82.
30. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2004;117(3):285-97.