

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VINICIUS MONTEIRO SCHAFFKA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.

PONTA GROSSA

2023

VINICIUS MONTEIRO SCHAFFKA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Estadual de Ponta Grossa para obtenção do
título de Mestre em Química .

Orientadora: Prof. Dra. Romaiana Picada
Pereira

Coorientadora: Prof. Dra. Cássia Gonçalves
Magalhães

PONTA GROSSA

2023

S296 Schaffka, Vinicius Monteiro
Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de extratos das folhas de *Eugenia uniflora* L. / Vinicius Monteiro Schaffka. Ponta Grossa, 2024.
84 f.

Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira.
Coorientadora: Profa. Dra. Cássia Gonçalves Magalhães.

1. *Eugenia uniflora* L.. 2. Atividade antioxidante. 3. Clue-em. 4. Cg-em. 5. Compostos fenólicos. I. Pereira, Romaiana Picada. II. Magalhães, Cássia Gonçalves. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 540



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

VINÍCIUS MONTEIRO SCHAFFKA

“Caracterização química e avaliação do potencial biológico de extratos das folhas de *Eugenia uniflora*”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira

UEPG/PR

Profa. Dra. Jociani Ascari

UTFPR/PR

Profa. Dra. Barbara Celânia Fiorin

UEPG/PR

Ponta Grossa, 16 de fevereiro de 2024



Documento assinado eletronicamente por **Romaiana Picada Pereira, Professor(a)**, em 19/02/2024, às 12:06, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **JOCIANI ASCARI, Usuário Externo**, em 19/02/2024, às 16:49, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Barbara Celania Fiorin, Professor(a)**, em 01/04/2024, às 15:24, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1837549** e o código CRC **30ECA965**.

*Aos meus pais, Joyce e Orlando. A minha avó
Nariza. Aos meus irmãos, Emilly e Gustavo e
à minha noiva Letícia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora de Fátima, por todas as graças concedidas.

Aos meus pais, Joyce e Orlando, por todo o amor que me foi dado, por todo o apoio, cuidado e principalmente, por me ensinarem o valor da educação.

À minha avó Nazira, por sempre estar presente e me apoiar em tudo.

Aos meus irmãos, Emilly e Gustavo, pela parceria, apoio e estímulo, vocês são essenciais em minha vida.

À minha noiva Letícia que esteve comigo em todo esse período e que tornou esse caminho mais leve, nós nos apoiamos em toda esse percurso e isso me fez melhor.

Às minhas orientadoras, Dra Romaiana Picada Pereira e Dra Cássia Gonçalves Magalhães, por todo o apoio, suporte e ensinamentos, vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr José Carlos Rebuglio Velloso, por ter disponibilizado seu laboratório de pesquisa para o desenvolvimento de uma parte deste trabalho.

Ao professor Dr Valter Henrique Carvalho-Silva pela paciência, pelos ensinamentos e por ceder a estrutura de seu laboratório para a realização de uma parte deste trabalho.

Ao professor Dr Andersson Barison pela parceria, pelos ensinamentos e por ter me recebido em seu laboratório.

Às professoras Dra Mariza Boscacci Marques e Dra Aline Coqueiro por terem participado da minha banca de qualificação e contribuído tanto para o desenvolvimento e aprimoramento deste trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação, vocês me acolheram, apoiaram e me fizeram acreditar que estava no caminho certo. Suas contribuições nunca serão esquecidas por mim.

À CAPES pela bolsa concedida e pelo reajuste no valor da bolsa concedido no início do ano de 2023.

Muito obrigado a todos!

*"Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto."
(Carl Sagan)*

RESUMO

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae), popularmente conhecida como pitangueira, é nativa do Brasil e é reconhecida como uma fonte de compostos bioativos, principalmente polifenóis. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, são agentes oxidantes instáveis promotores do estresse oxidativo. Os antioxidantes de origem vegetal, como os compostos fenólicos, atuam como eficazes atenuadores do estresse oxidativo. Devido a vários fatores que influenciam a composição dos extratos de *E. uniflora*, como características genótípicas e fenótípicas, verificar as propriedades antioxidantes de espécimes presentes em locais distintos e sob diferentes condições é de grande importância. Neste estudo, realizou-se a caracterização dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e dos extratos das folhas por meio da determinação dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM) de três espécimes de *E. uniflora* (EU1, EU2 e EU3). Realizou-se a avaliação do potencial antioxidante dos extratos por diferentes métodos (DPPH, ABTS, HOCl, ORAC, CUPRAC, FRAP e Fosfomolibdênio). A avaliação por meio de cálculos computacionais (DFT/M062X/6-311+G*) das propriedades antioxidantes de sete compostos presentes nos extratos de *E. uniflora* também foi realizada. Pode-se identificar cerca de 60 compostos nos óleos essenciais e propor a presença de 13 compostos nos extratos. Os resultados indicaram que os extratos obtidos com acetato de etila (AcOEt) em pH 4 apresentaram maior eficiência na atenuação de espécies reativas e na doação de elétrons, devido a sua maior concentração de ácidos fenólicos. Além disso, por meio da química computacional e da avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos em acetato de etila/metanol (AcOEt/MeOH), pode-se concluir que os flavonoides glicosilados contribuem com menor intensidade, em relação aos ácidos fenólicos, para o potencial antioxidante da *E. uniflora*. A investigação conduzida com os três espécimes contribui para a análise da variabilidade química e seu impacto nas atividades biológicas de *E. uniflora*.

Palavras-chave: *Eugenia uniflora* L.. atividade antioxidante. CLUE-EM. CG-EM. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae), popularly known as pitangueira, is native to Brazil and recognized as a source of bioactive compounds, moreover polyphenols. Reactive species are unstable oxidizing agents that promote oxidative stress. Plant-derived antioxidants, such as phenolic compounds, act as powerful antioxidants, mitigating oxidative stress. Due to the several factors that influence the composition of their extracts, such as genotypic and phenotypic characteristics, assigning antioxidant properties to specimens present in distinct locations under different conditions is of great importance. In this study, essential oils were characterized using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), and leaf extracts were characterized by determining total phenolic compounds, total flavonoids, and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) of three specimens of *E. uniflora* (EU1, EU2, and EU3). The antioxidant potential of the extracts was evaluated using different methods (DPPH, ABTS, HOCl, ORAC, CUPRAC, FRAP, and phosphomolybdenum method). Computational calculations (DFT/M062X/6-311+G*) were also performed to evaluate the antioxidant properties of seven compounds present in *E. uniflora* extracts. Approximately 60 compounds were identified in the essential oils, and the presence of 13 compounds was proposed in the extracts. The results indicated that extracts obtained with ethyl acetate (EtOAc) at pH 4 showed higher efficiency in attenuating reactive species and electron donation due to their higher concentration of phenolic acids. Additionally, through computational chemistry and the evaluation of antioxidant activity in EtOAc/MeOH extracts, it was concluded that glycosylated flavonoids contribute with lower intensity, compared to phenolic acids, to the antioxidant potential of *E. uniflora*. The investigation conducted with the three specimens contributes to the analysis of chemical variability and its impact on the biological activities of *E. uniflora*.

Keywords: *Eugenia uniflora* L.. Antioxidant Activity. UPLC-MS. GC-MS. Phenolic Compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura base de um flavonoide.....	21
Figura 2: Captura de um radical por um flavonoide, via mecanismo HAT.....	24
Figura 3: Captura de um radical por um flavonoide, via mecanismo SET	25
Figura 4: Captura de um radical por um flavonoide, via mecanismo SPLET	26
Figura 5: Quelação de metais de transição por um flavonoide.....	27
Figura 6: Grupamentos presentes em flavonoides com grande atividade antioxidante	28
Figura 7: Flavonoides ligados a açúcares em diferentes posições.....	29
Figura 8: Estrutura dos principais compostos fenólicos de <i>E.uniflora</i>	34
Figura 9 - Fluxograma relativo ao processo de extração e fracionamento	39
Figura 10 - Cromatogramas sobrepostos das frações EU1, EU2 e EU3 obtidas em AcOEt pH 4, em 280 nm	52
Figura 11: Espectro de absorção UV-Vis em 11 min do extrato EU6 pH 4.	53
Figura 12 - Cromatogramas sobrepostos das frações EU1, EU2 e EU3 obtidas em AcOEt pH 8, em 320 e 380 nm.....	53
Figura 13 - Cromatogramas sobrepostos das frações EU1, EU2 e EU3 obtidas em AcOEt/MeOH 30%, em 320 e 380 nm.....	54
Figura 14 - Radical DPPH'.....	57
Figura 15 - Radical ABTS ^{•+}	58
Figura 16 - 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB).....	59
Figura 17 - Correlação de Pearson entre Cl ₅₀ e o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais	60
Figura 18: Comparação entre os flavonoides Kaempferol e Luteolina.....	62
Figura 19 - Mapa de calor correlacionando os extratos das três árvores e sua atividade antioxidante.....	67
Figura 20: Estrutura otimizada da (A) Miricetina e (B) Miricetina-3-O-Ramnosideo.	69
Figura 21: Orbitais HOMO e LUMO para os flavonoides presentes nas folhas de <i>E. uniflora</i>	70
Figura 22: Superfície dos orbitais HOMO para a (A) Miricetina e (B) Miricetina-3-O-Ramnosideo.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de <i>E. uniflora</i>	48
Tabela 2: Análise de CG-EM dos óleos essenciais de <i>E. uniflora</i>	50
Tabela 3: Proposta de identificação dos extratos de <i>E. uniflora</i> por UPLC-MS.	55
Tabela 4 - Valores de CI_{50} para os extratos de <i>E. uniflora</i> frente aos radicais DPPH, ABTS e HOCl.....	56
Tabela 5 - ORAC dos extratos de <i>E.uniflora</i>	61
Tabela 6 - FRAP, poder redutor pelo fosfomolibdênio e CUPRAC para os extratos de <i>E.uniflora</i>	64
Tabela 7: Valores de energia dos orbitais de fronteira, E_{gap} , IP e EA para os compostos.	72
Tabela 8: Valores de dureza (η), moleza (S), potencial químico eletrônico (μ) e índice eletrolítico (Ω) para os compostos	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
AA	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propano)
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)
AcOEt	Acetato de etila
AG	Ácido gálico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BDE	Entalpia de dissociação de ligação
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catequina
CCl_4	Tetracloroeto de carbono
CHCl_3	Clorofórmio
Cl_{50}	Concentração Inibitória 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
CLUE-EM	Cromatografia de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
COX-1	Ciclo oxigenase-1
COX-2	Ciclo oxigenase-2
CUPRAC	Capacidade Redutora do Íon Cúprico
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
DM-1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM-2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2 – difenil – 1 - picrilhidrazil
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ETE	Entalpia de Transferência Eletrônica
EA	Afinidade eletrônica
FRAP	Poder Redutor do Ferro
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAT	Transferência de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
IL-1 β	Interleucina -1- beta
IL-6	Interleucina - 6
iNOS	Óxido nítrico sintase
IP	Potencial de ionização
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPH	Lactase florizina hidrolase
LUMO	Orbital Molecular Ocupado de Menor Energia
MDA	Malondialdeído
MeOH	Metanol
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₃	Gás ozônio
OH \cdot	Radical hidroxila
ORAC	Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados
PA	Afinidade ao próton
QUER	Quercetina
R \cdot	Radical
ROO \cdot	Radical peroxila
ROOH	Peróxidos
SET-PT	Transferência única de elétron e próton
SOD	Superóxido dismutase

SPLET	Perda sequencial de Próton e Transferência de Elétron
TE	Trolox
TMB	3,3',5,5' - tetrametilbenzidina
UGT	UDP-glucuronosiltransferase
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS.....	18
2.2 ANTIOXIDANTES: DEFINIÇÕES E IMPORTÂNCIA	19
2.3 QUÍMICA E BIOQUÍMICA DE FLAVONOIDES.....	21
2.4 MECANISMOS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES	24
2.5 PESQUISA EM PRODUTOS NATURAIS.....	29
2.6 <i>Eugenia uniflora</i> L.....	30
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	38
4.2.1 Coleta do material	38
4.2.2 Extração e fracionamento.....	39
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	40
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	40
4.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (CG-EM)	40
4.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE- DAD).....	41
4.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS (CLUE-EM)	41
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DPPH.....	42
4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR ABTS	42
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR HOCI.....	43

4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR ORAC	43
4.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DE FERRO.....	44
4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO FOSFOMOLIBDÊNIO	44
4.14 AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR (FRAP)	45
4.15 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REDUTORA DO ÍON CÚPRICO (CUPRAC)	45
4.16 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS.....	46
4.16.1 Otimização das Estruturas dos flavonoides.....	46
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES DOS EXTRATOS DE <i>E. uniflora</i>	48
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CG-EM.....	50
5.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DOS EXTRATOS.....	51
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLUE-EM DOS EXTRATOS:	54
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>E.uniflora</i>	55
5.5.1 Métodos de captura de espécies reativas.....	55
5.5.2 Métodos de avaliação do poder redutor	63
5.6 QUELAÇÃO DE FERRO.....	65
5.7 ANÁLISE COMPARATIVA DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DAS TRÊS ÁRVORES	66
5.8 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS.....	68
6 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de compostos com atividade antioxidante, de origem natural ou sintética, é de grande relevância na promoção da saúde humana. A ação dessas substâncias se baseia na contenção do estresse oxidativo, através da estabilização de espécies reativas (Gülcin, 2020). Espécies reativas são compostos instáveis que podem causar danos celulares e contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Pizzino *et al.*, 2017). Os antioxidantes de origem vegetal, presentes em plantas e alimentos, oferecem benefícios significativos em comparação aos compostos sintéticos, devido a sua semelhança a compostos endógenos. A variedade estrutural, somada à sua maior segurança, possibilitam sua aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica (Singh *et al.*, 2019).

A família Myrtaceae compreende cerca de 150 gêneros e 5800 espécies, sendo uma das maiores famílias de árvores comerciais. As espécies dessa família são reconhecidas pela sua composição fitoquímica e potenciais farmacêutico, cosmético, alimentício e industrial. Como exemplo, as espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* spp. são utilizadas como matéria prima na produção de papel. Os terpenos presentes em seus óleos essenciais, como o 1-8 cineol, apresentam vasta aplicação na indústria farmacêutica, devido à sua ação descongestionante e broncodilatadora (Cascaes *et al.*, 2015). A espécie *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira, é utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas gastrointestinais, aplicação que pode ser observada para a maioria das mirtáceas (Saber *et al.*, 2023).

Espécies da família Myrtaceae se configuram como uma expressiva fonte de compostos com ação antioxidante, como por exemplo a jaboticaba, espécie do gênero *Myrciaria*, conhecida pelo alto teor de antocianinas, e apresentando atividade antitumoral e atividade antioxidante (Inada *et al.*, 2021). Os estudos realizados com espécies do gênero *Eugenia* destacam o potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos, como por exemplo a *Eugenia dysenterica*, espécie nativa do Brasil, conhecida como cagaita (Silva *et al.*, 2019).

Eugenia uniflora L. é popularmente conhecida como pitangueira. Trata-se de uma árvore nativa brasileira e amplamente distribuída por toda a América do Sul. As suas folhas são utilizadas popularmente em infusões, decoctos e tinturas para o

tratamento de diarreia, dores estomacais, verminoses, febre, gripe, hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensão. Contudo, há trabalhos que apontam a variabilidade de composição dos metabólitos secundários de *E. uniflora* de acordo com a coloração dos frutos e influência sazonal. Também foi demonstrada a variabilidade de compostos fenólicos de acordo com a maturação das árvores (Migues *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2011).

Os extratos das folhas desta planta apresentam os compostos fenólicos como principal classe de metabólitos secundários, sendo verificados ácidos fenólicos, flavonoides e derivados glicosilados como os mais prevalentes. Os diversos trabalhos sobre *E. uniflora* atribuem aos seus metabólitos secundários e extratos uma série de bioatividades, como antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, anticâncer, neuroprotetora e antioxidante. A atribuição das bioatividades descritas se deve principalmente à alta concentração e variabilidade de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos (Fortes *et al.*, 2015; Rattmann *et al.*, 2012; Sobeh *et al.*, 2020b). A atividade antioxidante dos extratos de *E. uniflora* é a mais descrita na literatura para essa espécie, sendo a principal responsável pelo mecanismo no qual os compostos fenólicos e flavonoides irão desempenhar outras bioatividades distintas.

Tendo em vista que o perfil químico de extratos vegetais é influenciado por uma série de fatores, como condições ambientais, o potencial biológico de seus produtos pode mudar. Assim, o estudo fitoquímico de plantas coletadas em regiões distintas, bem como de suas propriedades biológicas é relevante, pois pode direcionar a colheita com base nos compostos químicos de maior interesse. Em adição a este propósito, a abordagem teórico-computacional foi utilizada para avaliar as propriedades eletrônicas que favorecem a atividade antioxidante dos flavonoides presentes nas folhas de *E. uniflora*.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil químico e o potencial antioxidante das folhas de espécimes de *E. uniflora*, situadas em condições ambientais distintas. A pesquisa contínua nessa área é essencial para explorar o potencial terapêutico desta espécie, levando em consideração os fatores que podem influenciar suas atividades biológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS

A oxidação de biomoléculas é um fenômeno natural e essencial para o metabolismo. A captura de elétrons pelo oxigênio, ao final da cadeia transportadora de elétrons, é um processo oxidativo primordial para a geração de ATP na maioria dos seres vivos. Este e outros processos podem acabar gerando espécies com elétrons desemparelhados, chamados de radicais livres, que irão promover a oxidação em sistemas biológicos (Gülcin, 2020).

São diversas as definições de radicais livres presentes na literatura, sendo que a mais abrangente compreende qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Essa definição se faz completa, pois engloba não somente as espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, mas também a maior parte dos metais de transição e o oxigênio molecular (O_2) (Halliwell, 1990, 1992). Porém, moléculas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), oxigênio singleto (1O_2) e o gás ozônio (O_3) também são caracterizadas como oxidantes. Para abranger estas moléculas, foram atribuídos os termos espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs).

As EROs e ERNs, em baixas concentrações, exercem diversas funções biológicas relevantes, de sinalizadores intracelulares a moduladores da apoptose celular, sendo necessários para a manutenção da homeostase (Pizzino *et al.*, 2017). Sob condições que favorecem a produção destas espécies reativas, ocorre uma sobrecarga das defesas antioxidantes endógenas, gerando um balanço negativo que irá ocasionar o chamado estresse oxidativo. Essa condição é capaz de causar danos a lipídios, proteínas e DNA, além de danos irreversíveis aos componentes celulares (Vekic *et al.*, 2023).

O estresse oxidativo se apresenta como uma condição associada a uma série de patologias. O acúmulo intracelular de radicais como o $HOCl$ e o 1O_2 pode levar à oxidação da guanidina, gerando seu respectivo radical, que está associado a mutagênese e à consequente formação de células cancerosas (Zuo *et al.*, 2015). Em doenças cardiovasculares o estresse oxidativo é o principal causador da oxidação de lipoproteínas, como lipoproteína de baixa densidade (LDL), fisiopatologia associada a formação de placas ateroscleróticas, que levam a obstrução de vasos e capilares

(Kattoor *et al.*, 2017; Vekic *et al.*, 2023). As patologias neurodegenerativas também estão associadas ao estresse oxidativo, como a doença de Parkinson e Alzheimer (Singh *et al.*, 2019).

2.2 ANTIOXIDANTES: DEFINIÇÕES E IMPORTÂNCIA

Um antioxidante é aquele composto que, quando presente em concentração menor que a de um substrato, é capaz de prevenir ou retardar a oxidação deste. Essa definição engloba enzimas complexas, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) presentes em sistemas biológicos, mas também moléculas mais simples, como o ácido ascórbico (AA) e a glutathiona (GSH). O termo substrato abrange proteínas, lipídeos, carboidratos e o DNA, moléculas essas suscetíveis ao dano oxidativo causado por acúmulo de EROs e ERNs em sistemas biológicos e alimentos (Halliwell, 1990; Lipinski, 2011).

Os antioxidantes podem agir de várias formas: pela captura direta de radicais livres, pela quelação de metais e restaurando ou induzindo a formação de antioxidantes. Tais substâncias podem ser classificadas em enzimáticas e não enzimáticas (Gülcin, 2020).

Dentre o aparato enzimático utilizado pelo organismo para compensar o acúmulo de EROs, estão a SOD, a CAT e a glutathiona peroxidase (GPx), denominados de antioxidantes enzimáticos (Valko *et al.*, 2006). A SOD é a enzima capaz de catalisar a transformação do $^1O_2^-$ em H_2O_2 , uma espécie com menor potencial danoso. A catalase é uma enzima prevalente nos animais, plantas e bactérias, e se faz necessária para a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). A GPx é a enzima que catalisa a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) formando a glutathiona oxidada (GSSG) (de Oliveira *et al.*, 2018).

Como representantes dos antioxidantes não enzimáticos, têm-se as vitaminas como o ácido ascórbico (AA) e os tocoferóis, peptídeos como a GSH e os polifenóis, como os ácidos fenólicos e os flavonoides.

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é uma molécula polihidroxilada, hidrofílica, capaz de atuar como agente redutor formando o radical ascorbato e ácido dihidroascorbato, que facilmente é oxidado novamente até a sua forma oxidada (Gęgotek; Skrzydlewska, 2022). Essas características o fazem um

potente antioxidante, capaz de capturar O_2^- , OH^\bullet e o O_2 , atuando tanto em sistemas biológicos quanto em alimentos.

Dentre os tocoferóis, classe de vitaminas lipossolúveis, tem-se o α -tocoferol, chamado também de vitamina E, como sua forma mais ativa, estando presente principalmente ligado à membrana celular. Sua principal ação é a doação de um átomo de hidrogênio a um radical peroxila (ROO^\bullet), responsável pela oxidação de ácidos graxos, fosfolípidos de membrana e lipoproteínas como o LDL. Este processo, chamado de lipoperoxidação, é um dos principais fatores responsáveis pela formação de placas ateroscleróticas, fisiopatologia associada à doença cardiovascular e perda de mobilidade da membrana celular. Em alimentos, a lipoperoxidação é um processo que leva à alteração das propriedades nutricionais e organolépticas de um produto, diminuindo seu tempo de prateleira. O radical α -tocoferol é facilmente reduzido à sua forma ativa pelo ácido ascórbico (Brewer, 2011).

A GSH é um tripeptídeo composto por glicina, cisteína e ácido glutâmico. Presente em diferentes tecidos, é sintetizada nos hepatócitos e pode ser encontrada tanto em sua forma reduzida quanto em sua forma oxidada (GSSG). É um antioxidante multifuncional em sistemas biológicos, que desempenha um papel importante na prevenção do estresse oxidativo, decorrente de sua atuação como cofator de diversas enzimas relevantes para o catabolismo de espécies reativas, como a GPx, glutathione transferase e na captura de espécies reativas como o OH^\bullet e o oxigênio singleto (1O_2). Além disso, a glutathione também é capaz de regenerar outras substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (de Oliveira et al., 2018; Gülçin, 2020; Mirończuk-Chodakowska; Witkowska; Zujko, 2018).

Os antioxidantes de origem sintética são uma classe bastante relevante, principalmente por serem amplamente utilizados em alimentos. Compostos como o butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) são utilizados basicamente para prevenir a lipoperoxidação de ácidos graxos. Como são de baixo custo e não alteram as características dos produtos, como cor e odor, são utilizados na maioria dos produtos ricos em lipídeos. Apesar de utilizados por mais de 70 anos na indústria alimentícia, estes compostos estão mais recentemente sendo associados ao dano hepático e à carcinogênese, tornando seu uso cada vez mais restrito (Dolatbadi; Kashanian, 2010).

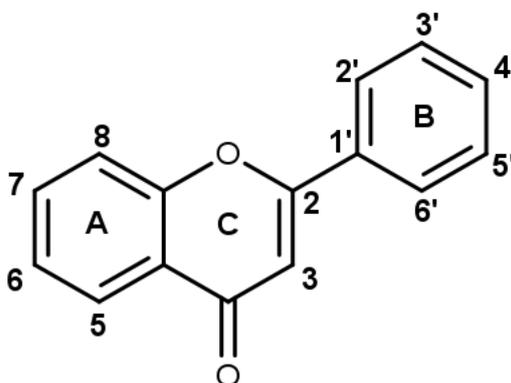
Os polifenóis são metabólitos secundários de origem vegetal encontrados na maioria das plantas. São classificados como antioxidantes de origem natural. Essa

ação se deve à sua composição química, já que compostos fenólicos podem atuar na captura direta de espécies reativas, na quelação de metais e na restauração dos antioxidantes endógenos, protegendo contra o estresse oxidativo (Gülçin, 2020).

2.3 QUÍMICA E BIOQUÍMICA DE FLAVONOIDES

Flavonoides são um grupo de compostos fenólicos presente nos vegetais, biossintetizados pela rota dos fenilpropanoides. São os compostos mais abundantes entre os metabólitos secundários, e a eles é atribuída diversificada atividade biológica (Simões *et al.*, 2017). O esqueleto base de um flavonoide é composto por quinze átomos de carbono, formando dois anéis benzênicos e um heterociclo pirano. Os anéis da estrutura são nomeados de A, B e C, e a partir desse esqueleto, podem ser ligados diferentes substituintes, levando a diferentes subclasses (Figura 1).

Figura 1: Estrutura base de um flavonoide.



Fonte: O autor

As principais classes são as flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas. As flavonas são identificadas pela presença da carbonila no carbono 4 e da insaturação entre os átomos de carbono C2-C3, já os flavonóis vão apresentar uma hidroxila no carbono C3. Em contraponto, os flavanóis não apresentam a carbonila nem a insaturação no anel pirano, mas mantêm a hidroxila no C3. As flavanonas diferem dos flavanóis pela ausência da hidroxila no C3. As isoflavonas mantem o mesmo esqueleto das flavonas, mas o anel B se encontra ligado ao carbono C3, o que as difere de todas as demais classes. As antocianinas são flavonoides que possuem uma carga formal positiva, geralmente relacionadas à coloração das frutas

e folhas. Os flavonoides podem ser encontrados como glicosídeos, quando ligados a açúcares, e agliconas, quando não ligados (Berga *et al.*, 2023).

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais comumente encontrados nas plantas. Ocorrem em todas as partes do vegetal e se acumulam principalmente nas folhas e frutos, sendo os principais responsáveis pela coloração. Possuem uma série de funções, desde proteção contra fatores bióticos, como herbívoros e patógenos, quanto contra fatores abióticos, como proteção à exposição à luz UV, calor e suprimento nutricional. Os flavonoides também são responsáveis por controlar o acúmulo de EROs e ERNs nas plantas, através de sua atividade antioxidante (Mierziak; Kostyn; Kulma, 2014). A ingestão de flavonoides por humanos se dá principalmente pelo consumo de vegetais ou de suplementos contendo flavonoides.

Apesar de sua diversificada bioatividade, vasta ocorrência na dieta e inúmeras aplicações, o uso de flavonoides é limitado devido aos fatores que influenciam negativamente sua biodisponibilidade. Esse processo é determinado principalmente por características físico-químicas, como: peso molecular, conformação estrutural, grau de ionização, lipossolubilidade e ligação a proteínas plasmáticas. Outros fatores relevantes são relativos às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, especificamente os que determinam as etapas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma substância. Para que um flavonoide exerça uma função biológica, ele deve permear na corrente sanguínea, chegar ao tecido alvo, na forma biologicamente ativa, em quantidade suficiente (Abotaleb *et al.*, 2019).

Flavonoides glicosilados, depois de consumidos, são normalmente hidrolisados em suas respectivas agliconas antes de serem absorvidos, o que ocorre no lúmen pela enzima lactase florizina hidrolase (LPH). Os glicosídeos têm uma absorção ao menos duas vezes maior do que suas respectivas agliconas, mesmo que o processo de deglicosilação seja uma exigência do mecanismo. Agliconas adentram o epitélio intestinal via difusão passiva, devido à sua lipofilicidade e consequente interação com os fosfolípídeos de membrana. Os glicosídeos, por sua vez, somente serão absorvidos via transportadores de membrana, o que limita a biodisponibilidade (Gonzales *et al.*, 2015).

Após absorvidos, os flavonoides sofrerão metabolismo de fase I (oxidação e O-demetilação) no fígado via citocromo P450. Em sequência, sofrerão mais rapidamente glucuronidação, sulfatação ou metilação, via metabolismo de fase II, através da conjugação com enzimas como a UDP-glucuronosiltransferase (UGT),

sulfotransferase e catecol-O-metiltransferase. Essa etapa produz metabólitos de flavonoides mais polares, que serão, portanto, absorvidos. Há pouca informação sobre os mecanismos que levam à absorção destes metabólitos. Porém, as características estruturais de um flavonoide que levem à sua melhor glucoronidação influenciam diretamente sua biodisponibilidade. A presença da hidroxila em C3, a insaturação entre os átomos de carbono C2 e C3 e o número de hidroxilas presentes nos anéis A e B são alguns dos fatores que influenciam na biodisponibilidade de flavonoides. Em suma, com relação à biodisponibilidade, as antocianidinas são as menos absorvidas, seguidas dos flavonóis, flavanonas, flavanóis e então as isoflavonas, tendo a melhor absorção (Gonzales *et al.*, 2015; Xiao, 2017).

Após absorção, os flavonoides têm de adentrar a corrente sanguínea e ser distribuídos para que possam exercer a bioatividade. Esse processo depende principalmente da ligação dos flavonoides a proteínas plasmáticas. Tal ligação se faz importante pela característica carreadora das proteínas séricas. A albumina é a principal carreadora de substâncias ácidas, o caso dos flavonoides. Porém, um flavonoide somente poderá exercer sua função em sua forma “livre”. Portanto, a reversão da ligação à albumina é um fator determinante para a bioatividade de um flavonoide. A fração dessa substância ligada à proteína plasmática é determinada pela concentração, sítios de ligação e afinidade (Cassidy; Minihane, 2017; Gonzales *et al.*, 2015; Williams; Spencer; Rice-Evans, 2004).

Foi reportado que o aumento de grupos hidroxila nos anéis A e B, a presença da insaturação no carbono C2 e C3 e metilação dos grupos hidroxila são fatores que aumentam a ligação dos flavonoides a proteínas plasmáticas. Já a glicosilação e a glucoronidação favorecem a distribuição dos flavonoides por ocupar os sítios de ligação, além de aumentar a hidrofobicidade, fator determinante na ligação a proteínas plasmáticas. Após exercerem suas funções, os flavonoides são primariamente excretados na urina. Porém, há relatos de metabólitos de flavonoides sendo excretados via bile nas fezes (Cassidy; Minihane, 2017; Gonzales *et al.*, 2015).

A maior parte das bioatividades atribuídas aos flavonoides é relacionada a seu potencial antioxidante, visto que uma gama de patologias está relacionada ao dano oxidativo (Pandey; Rizvi, 2009).

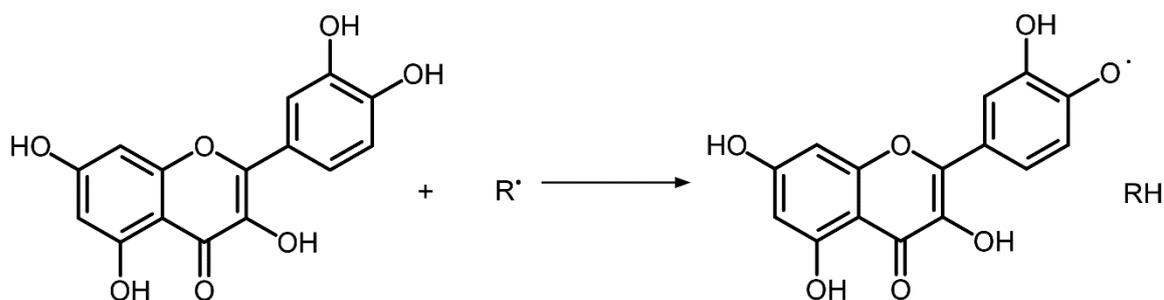
2.4 MECANISMOS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES

Considerando a variedade estrutural das diferentes subclasses de flavonoides, esses compostos podem atuar como antioxidantes por diferentes caminhos: retardando ou inibindo a produção de espécies reativas, capturando ou atenuando as espécies reativas já formadas, restaurando as defesas antioxidantes endógenas, atuando em sinergismo com os antioxidantes endógenos ou quelando metais de transição (Losada-Barreiro *et al.*, 2022).

Os principais mecanismos pelos quais um flavonoide irá capturar espécies reativas são a transferência de um átomo de hidrogênio (HAT), transferência única de elétron e próton (SET-PT) e a perda sequencial de próton e transferência de elétron (SPLET). As características estruturais de um flavonoide e o solvente em que esses compostos se encontram levarão a mudanças nos parâmetros termodinâmicos que conduzem a tais mecanismos.

Na transferência de um átomo de hidrogênio (HAT), o radical é estabilizado, formando uma espécie neutra enquanto se forma um radical flavonoide (Figura 2). A entalpia de ligação (BDE) é um parâmetro usado para direcionar para o mecanismo HAT. Quanto menor o valor, mais termodinamicamente favorável será a transferência do elétron (Alov; Tsakovska; Pajeva, 2015; Pandithavidana; Hewage, 2020). Nesse mecanismo, as características estruturais que levem à maior estabilização do radical flavonoide formado serão preferidas.

Figura 2: Captura de um radical por um flavonoide, via mecanismo HAT.

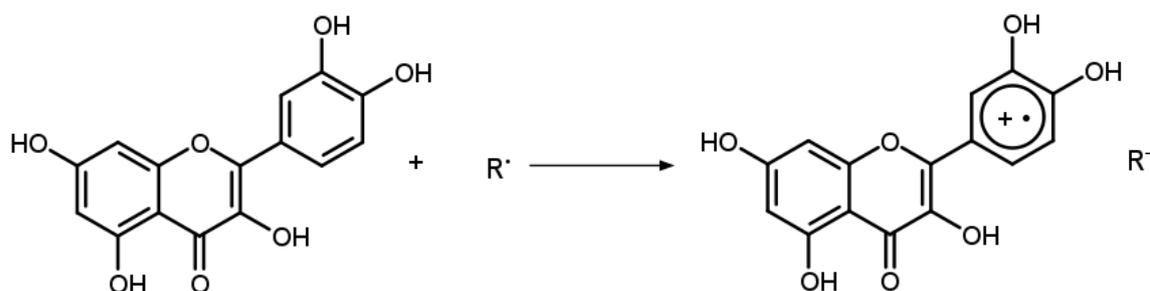


Fonte: o autor

A transferência única de elétron e próton (SET-PT), determinada principalmente pelo potencial de ionização (IP), formará uma espécie reativa neutra e a consequente formação de um radical flavonoide catiônico. Quanto menor o valor de

IP, mais termodinamicamente favorável será a perda de um elétron e, portanto, mais efetiva será a estabilização de uma espécie reativa (Figura 3).

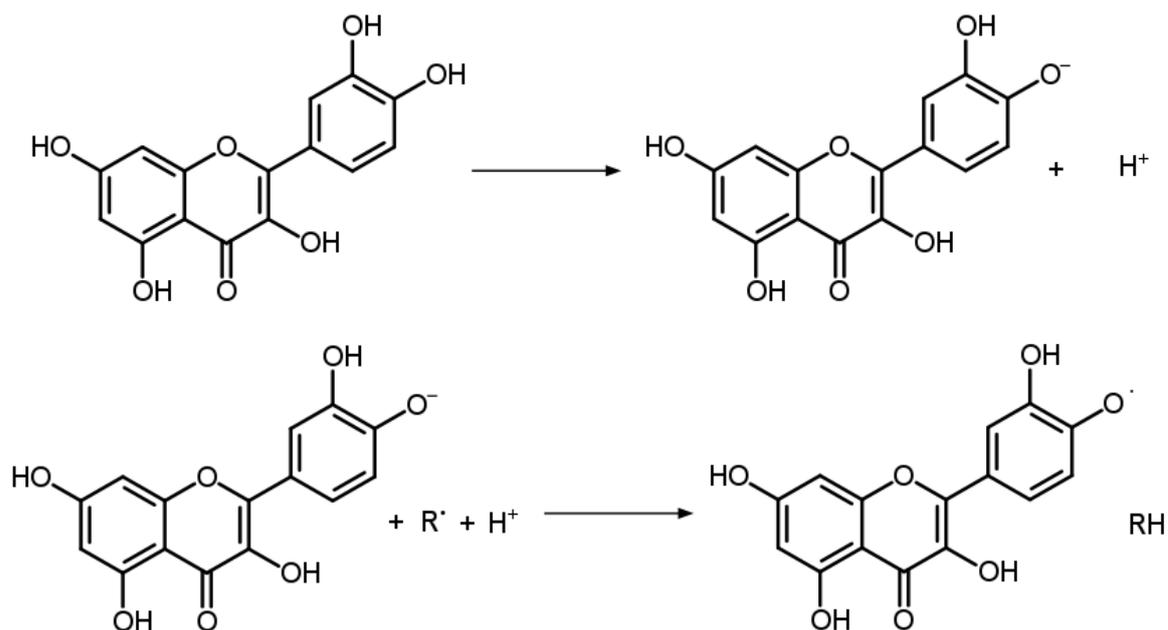
Figura 3: Captura de um radical por um flavonoide, via mecanismo SET



Fonte: o autor.

Já na perda sequencial de próton e transferência de elétron (SPLET), um flavonoide doará um próton, estabilizando uma espécie reativa. Forma-se um ânion flavonoide que, em sequência, doará um elétron, formando uma espécie neutra (Figura 4, p. 31). Os parâmetros de afinidade pelo próton (PA) e entalpia de transferência eletrônica (ETE) direcionam ao mecanismo de SPLET. A afinidade pelo próton (PA) direciona a capacidade dos grupamentos hidroxila em doar o seu próton, formando um ânion flavonoide. A capacidade de doação de um elétron pelo ânion flavonoide é determinada pela entalpia de transferência eletrônica (ETE) (Alov; Tsakovska; Pajeva, 2015; Pandithavidana; Hewage, 2020).

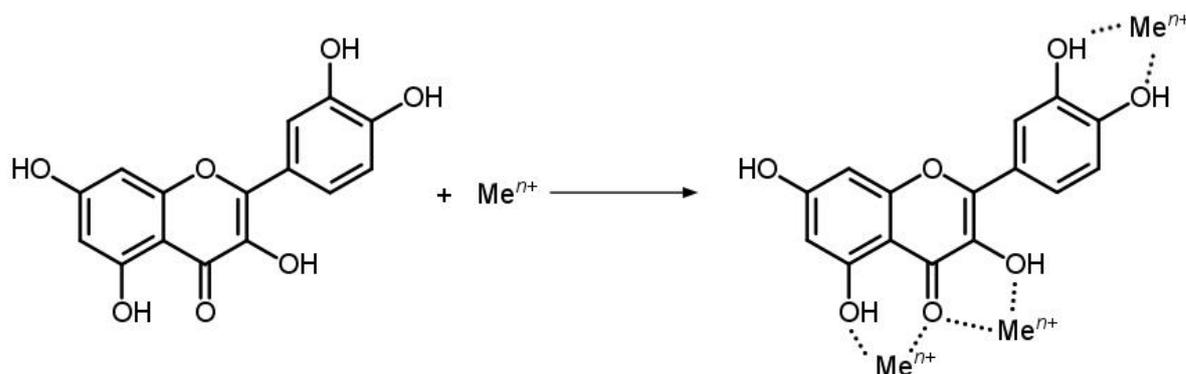
Figura 4: Captura de um radical por um flavonoide, via mecanismo SPLET



Fonte: O autor.

Outro mecanismo de atividade antioxidante é a quelação de metais de transição (Figura 5, p. 32). Nesse mecanismo, avalia-se a capacidade de um flavonoide formar um complexo flavonoide-metal estável, que atuará sequestrando os metais envolvidos em reações que levam à formação de espécies reativas. Nesse mesmo sentido, a mudança do estado de oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} , reduzido por um flavonoide, impossibilita as reações do tipo Fenton, onde há formação de radical hidroxila (OH^\cdot). O mecanismo de controle da concentração intracelular de metais é um mecanismo de ação antioxidante indireto, onde o flavonoide não atuará na captura direta de espécies reativas, mas na formação delas (Leopoldini; Russo; Toscano, 2011b).

Figura 5: Quelação de metais de transição por um flavonoide



Fonte: O autor.

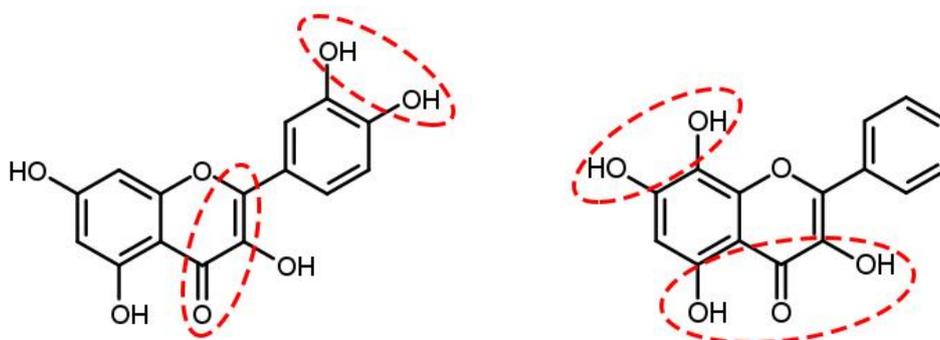
A atividade antioxidante de um flavonoide é influenciada por diversos fatores, tais com grau de substituição, posição e características dos grupos funcionais, além de características conformacionais (Kumar; Pandey, 2013a). Os sítios farmacofóricos de um flavonoide estão representados na figura 6, p. 33.

A presença e a configuração de grupamentos hidroxila (OH) são fatores determinantes na capacidade antioxidante de um flavonoide. A adição de grupos doadores de elétrons diminui os valores de BDE e IP e, portanto, favorece a atividade antioxidante (Pandithavidana; Hewage, 2020). O grupamento 3',4'-catecol no anel B demonstra ser o responsável pelo considerável aumento da inibição da peroxidação lipídica dos flavonoides, por favorecer a captura de espécies reativas e por conter um sítio de coordenação de metais como o Fe^{2+} . Flavonoides que possuem o grupamento catecol no anel B, após oxidados, formam um radical orto-semiquinona mais bem estabilizado pela deslocalização do elétron.

A presença do grupo hidroxila ligado a C3 influencia diretamente a captura de radicais pelos flavonoides. É observado que flavonoides que possuem esse substituinte em C3, juntamente com o grupamento 3',4'-catecol, apresentam atividade antioxidante cerca de dez vezes superior a análogos que carecem desses grupamentos. Essas características são a principal razão pela qual a quercetina é o padrão de referência quando se fala de atividade antioxidante de flavonoides. A grande influência da hidroxila em C3, em flavonóis, se dá principalmente pela característica planar da estrutura, que favorece a conjugação entre os membros, favorecendo termodinamicamente a redução de espécies reativas (Ami *et al.*, 2007).

A conjugação entre os anéis A e B é uma característica estrutural necessária para melhor atividade antioxidante. Neste sentido, flavonoides que contêm a insaturação entre os átomos de carbono C2 e C3, juntamente com a carbonila em C4, são melhores antioxidantes que análogos que não contêm essas características. A insaturação mencionada também favorece a característica planar de um flavonoide, contribuindo para a atividade antioxidante (Kumar; Pandey, 2013b).

Figura 6: Grupamentos presentes em flavonoides com grande atividade antioxidante

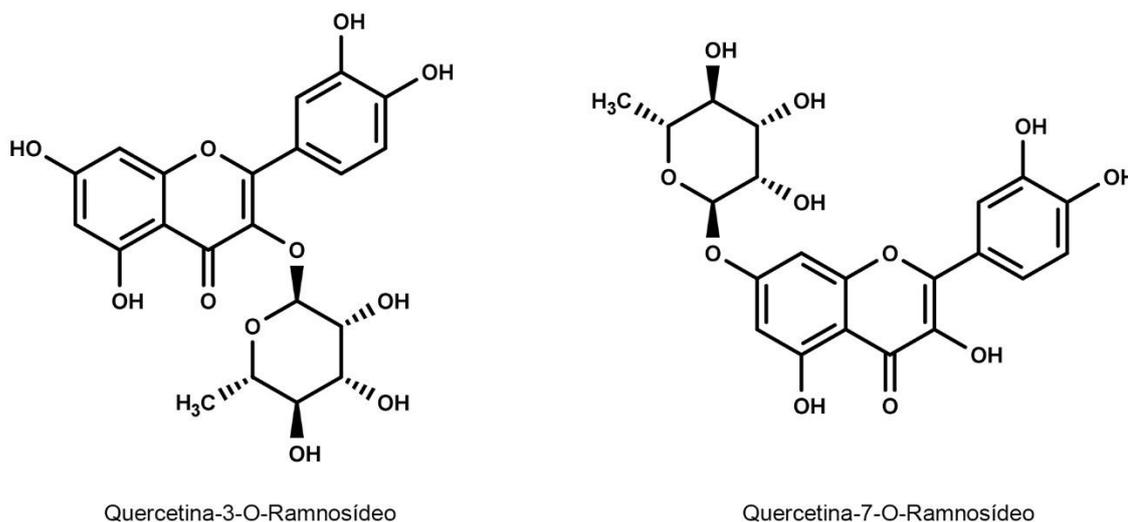


Fonte: O autor

A presença de grupamentos metoxila influencia diretamente na característica planar da estrutura de um flavonoide, diminuindo a conjugação entre os membros e, por consequência, sua atividade antioxidante. O impedimento estérico causado pela adição de um grupo metoxila ao sistema 3',4'-catecol compromete a atividade antioxidante via captura de espécies reativas (Kumar; Pandey, 2013b).

A presença, número e posição de glicosídeos comprometem de maneira significativa a atividade antioxidante de flavonoides. Apesar de melhorar características farmacocinéticas, quando observados os valores comparativos entre diferentes metodologias de avaliação da capacidade antioxidante, flavonoides glicosilados tem seu desempenho expressivamente menor quando comparado a suas respectivas agliconas. Glicosídeos podem estar ligados em átomos de carbono, preferencialmente o carbono 7, quanto a grupamentos hidroxila presentes no anel; os mais prevalentes são os 3-O-glicosídeos e 7-O-glicosídeos (Figura 7, p. 34).

Figura 7: Flavonoides ligados a açúcares em diferentes posições.



Fonte: O autor.

O decréscimo da atividade antioxidante de flavonoides glicosilados não se dá somente pelo impedimento estérico causado às hidroxilas de um flavonoide, visto que C-glicosídeos também tem seu potencial limitado, mas pela característica intrínseca ao açúcar. Qualquer carboidrato, seja glucose, ramnose ou pentose, tem como principal consequência a diminuição do caráter planar de um flavonoide, já descrito como um fator determinante para a atividade antioxidante (Ami *et al.*, 2007; Heim; Tagliaferro; Bobilya, 2002; Kumar; Pandey, 2013b).

Tendo em vista que os flavonoides exercem atividade antioxidante via mecanismos distintos, não há método de avaliação algum que descreva por completo essa atuação. Portanto, faz-se necessário que, durante a avaliação *in vitro* de um flavonoide que seja candidato a fármaco, sejam avaliadas técnicas que abranjam a maior quantidade de mecanismos possível. A utilização de métodos padronizados, validados pela comunidade científica e robustos é de crucial importância (Prior; Wu; Schaich, 2005).

2.5 PESQUISA EM PRODUTOS NATURAIS

Ao longo da história, a pesquisa na área de produtos naturais exerce um papel importante principalmente no descobrimento de novos fármacos. A utilização de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças está presente em várias

culturas ao redor do globo. Compostos que mudaram a história, como a morfina e artemisinina, foram descobertos a partir de fontes naturais. O prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2015 foi concedido a YouYou Tu, pela sua contribuição no desenvolvimento da artemisinina, medicamento utilizado para o tratamento da malária, sendo o principal agente responsável pelo declínio da incidência de malária no planeta no último século (Su; Miller, 2015). Grande porção dos fármacos lançados nas últimas duas décadas são produtos naturais ou derivados sintéticos de produtos naturais (Camargo *et al.*, 2021; Dzobo, 2022).

O Brasil detém cerca de um 1/3 de toda a biodiversidade do planeta, o que o coloca em posição de destaque. É estimado que 2/3 dos produtos de exportação brasileira sejam de origem vegetal, a maior parte sendo *comodities*. O primeiro medicamento totalmente desenvolvido em solo brasileiro, Acheflan®, é um analgésico de uso tópico produzido a partir do óleo essencial da erva baleira (*Cordia verbenacea*). Possui ação anti-inflamatória e representa um grande avanço na indústria de fitoterápicos nacional (Calixto, 2019).

A pesquisa em produtos naturais visa descobrir moléculas bioativas e processos de refinamento de matérias primas que agreguem valor econômico à extensa biodiversidade presente. Esse processo levará ao desenvolvimento sustentável do país através da industrialização e o fortalecimento da bioeconomia (Atanasov *et al.*, 2021; Camargo *et al.*, 2021; Newman; Cragg, 2020).

Nesse sentido, estudos envolvendo as espécies nativas brasileiras são de grande relevância, representando uma fonte de compostos bioativos que podem ser explorados e avaliados frente a uma série de condições e patologias.

2.6 *Eugenia uniflora* L.

Dentre as espécies da família Myrtaceae que possuem expressivo valor agregado, encontra-se *Eugenia uniflora* L. Conhecida como pitangueira, cereja brasileira ou cereja do Suriname, é uma árvore nativa brasileira. O Brasil é o país onde a pitangueira se destaca, sendo encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul. No entanto, sua distribuição é global, concentrada em regiões tropicais e subtropicais, como a América do Sul, América Central, sudeste da Ásia e África (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Além do potencial nutracêutico de seus frutos, a infusão das suas folhas vem sendo popularmente utilizada para o tratamento de doenças respiratórias, febre, hipertensão, doenças gastrointestinais, reumatismo, hemorroida e como diurético. Para os extratos oriundos das suas folhas foram descritas atividade antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, anti-inflamatória, antineoplásico, neuroprotetor, hepatoprotetora e antioxidante, evidenciando o potencial farmacológico da espécie (Fidelis *et al.*, 2022a; Sobeh *et al.*, 2019a, 2020a).

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *E.uniflora* foi demonstrada pela redução da formação de biofilme de *Streptococcus mutans*, *S. oralis* e *Lactobacillus caseii*, evidenciando o potencial controle da gengivite em crianças (Jovito *et al.*, 2016). O trabalho de Borges Monteiro *et al.*, 2019, demonstrou a atividade bacteriostática de um extrato metanólico de *E.uniflora*, rico em compostos fenólicos, contra *Helicobacter pylori*, principal fator etiológico de gastrite e úlcera. Este trabalho também fornece dados que ratificam a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, *in vitro*, dos extratos, através da captura de espécies reativas e consequente diminuição dos marcadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e NO, em macrófagos.

A atividade hepatoprotetora de uma fração obtida em acetato de etila (AcOEt), rica em flavonoides glicosilados de *E. uniflora*, foi descrita por Sobeh e colaboradores (2020). Neste trabalho, foi avaliada a atividade antioxidante frente ao estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄), além da avaliação da concentração das aminotransferases hepáticas (ALT, AST), bilirrubina total, colesterol total e triglicerídeos totais em ratos Wistar. O controle das defesas antioxidantes endógenas como a glutatona (GSH) e a superóxido dismutase (SOD) e a concentração inalterada de malonaldeído (MDA) naqueles indivíduos, somado ao controle dos parâmetros hepáticos, fornecem maior embasamento às propriedades antioxidantes e hepatoprotetoras dos extratos de *E.uniflora*.

Uma fração butanólica de extrato hidroalcoólico de *E.uniflora* no tratamento da septicemia em roedores foi avaliada por Rattmann e colaboradores (2012). O controle foi feito através da avaliação de parâmetros inflamatórios, como a determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) pulmonar, citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e pela expressão tecidual de óxido nítrico sintase (*i*NOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2). O extrato utilizado era composto principalmente por

flavonoides glicosilados, ratificando as propriedades farmacológicas de *E.uniflora* e seus constituintes.

O potencial antineoplásico de *E.uniflora* foi demonstrado pelo estudo de Núñez e colaboradores (2018) avaliaram a citotoxicidade de um extrato bruto de pitangueira frente a células cervicais tumorais (SiHa), células não tumorais (HaCaT) e linfócitos humanos. O extrato testado foi capaz de inibir a viabilidade das células tumorais nos tempos avaliados e não demonstrou citotoxicidade às células não tumorais ensaiadas. Tal resultado foi confirmado pelos testes de adesão, migração, pela habilidade de formação de colônias e pela integridade celular por citometria de fluxo. Apesar da carência da caracterização química do extrato utilizado, este estudo contribuiu para se verificar o potencial antineoplásico da *E.uniflora* frente a câncer cervical humano.

A atividade antioxidante é a bioatividade mais amplamente relatada para extratos e compostos isolados de *E.uniflora*. Adicionalmente, sugere-se que o mecanismo provável pelo qual esses compostos manifestam outras bioatividades esteja relacionado à sua atividade antioxidante.

No trabalho realizado por Schumacher e colaboradores (2015) avaliou-se atividade antioxidante de três diferentes extratos, aquoso, etanólico e metanol/acetona, frente aos métodos DPPH, ABTS e ORAC. Foi possível observar o melhor resultado do extrato aquoso das folhas de *E.uniflora* nos três diferentes testes, com os valores de inibição do DPPH de 39,9%, para o ABTS sendo 35,79 $\mu\text{M TE g}^{-1}$ e para ORAC de 1118 $\mu\text{M TE g}^{-1}$. Os resultados foram significativamente maiores do que os demais para DPPH e ABTS. Em seguida, os autores correlacionaram a atividade antioxidante observada *in vitro* com o modelo de tratamento do *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) em ratos. Observou-se melhora nos marcadores inflamatórios, estresse oxidativo, aumento da concentração de GSH e aumento da concentração de insulina sérica. Os resultados obtidos corroboram para o potencial antioxidante dos compostos presentes na pitangueira e trilham o início do caminho até sua utilização farmacológica.

Falcão e colaboradores (2018) avaliaram a atividade antioxidante *in vivo* de um extrato bruto e das frações obtidas em AcOEt e aquosa da pitangueira. Para isso, a migração de leucócitos, fenômeno induzido pelo estresse oxidativo, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), indicativo de infiltração tecidual de leucócitos, a concentração total de glutatona e a concentração de malondialdeído (MDA),

marcador da peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo, foram avaliadas em camundongos. Em adição a esses testes, avaliou-se também a atividade anti-inflamatória pelo doseamento de citocinas pró inflamatórias, IL-1 β e TNF- α .

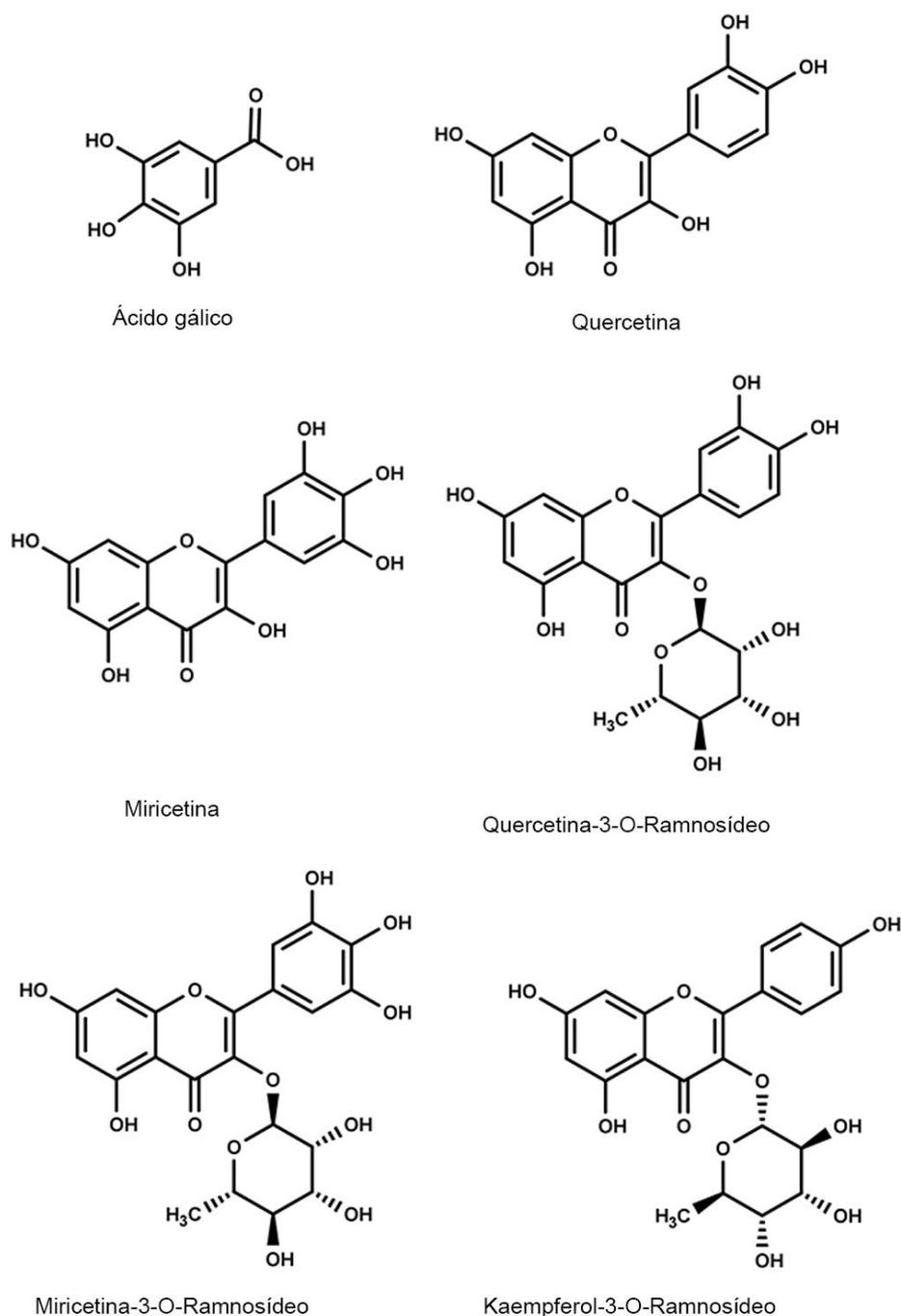
Os trabalhos realizados por Sobeh, M. e colaboradores até o momento da publicação deste trabalho foram os que mais avançaram com relação à atividade antioxidante de *E. uniflora*. Esse grupo de pesquisa isolou 17 compostos presentes nas folhas dessa espécie e avaliou a bioatividade de tais metabólitos (Sobeh *et al.*, 2019b). O estudo em questão avaliou a atividade anti-inflamatória e a seletividade frente às enzimas ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), demonstrando maior seletividade para COX-2. Este estudo também avança com relação às propriedades antidiabéticas de *E.uniflora*, fornecendo dados de *docking* molecular para os metabólitos secundários e as enzimas α -amilase pancreática, maltase glucoamilase, aldose redutase, cuja inibição se configura como alvo de novos fármacos para o tratamento do *Diabetes mellitus* do tipo 2 (DM-2).

Como observado, diversas são as bioatividades que podem ser atribuídas à pitangueira, em razão dos compostos presentes em seus extratos, com destaque para grande prevalência de flavonoides glicosilados e ácidos fenólicos, como o ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido elágico e derivados glicosilados de ácido gálico (Sobeh *et al.*, 2019b, 2020b), como pode-se observar na figura 8, p. 39. No estudo de Sobral de Souza e colaboradores (2017), foi possível identificar 18 flavonoides, destacando-se a miricetina, quercetina, miricetina-ramnosídeo, quercetina-pentosídeo por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-ESI-ITMS). Sobeh e colaboradores (2020) identificaram 22 compostos presentes em uma fração AcOEt a partir das folhas de *E. uniflora* utilizando a técnica LC-ESI-ITMS, sendo eles miricetina-3-O- β -glucosídeo, miricetina-3-O- β -galactosídeo, miricetina-3-O-ramnosídeo, miricetina-pentosídeo, quercetina-glucosídeo, quercetina-pentosídeo, quercetina-ramnosídeo, apigenina-glucosídeo e kaempferol-ramnosídeo. A presença de um glicosídeo de kaempferol na composição desta fração é destaque entre os demais trabalhos.

O estudo de Rattmann e colaboradores (2012) apresenta a identificação de 13 compostos presentes na fração butanólica das folhas de *E. uniflora*. Sendo glicosídeos de quercetina e miricetina como, miricetina-hexosil-galato, miricetina-hexosídeo, quercetina-hexosídeo, miricetina-arabnose, quercetina-arabnose, miricetina-ramnosídeo e quercetina-ramnosídeo. A presença dos flavonoides ligados

à ramnose é reportada na maioria dos trabalhos em que há a identificação dos metabólitos (Rattmann *et al.*, 2012).

Figura 8: Estrutura dos principais compostos fenólicos de *E.uniflora*



Fonte: O autor.

A ocorrência e concentração de compostos fenólicos se altera ao longo do desenvolvimento da planta e como resposta a fatores ambientais. O estresse salino,

estresse hídrico e o conteúdo mineral das folhas desencadeiam expressões de rotas bioquímicas específicas que aumentam o conteúdo dos seus metabólitos secundários como mecanismo de sinalização intracelular, defesa e de manutenção da homeostase (Crizel *et al.*, 2020; PERIN *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2011).

A influência da concentração de minerais nas folhas de uma árvore de *E.uniflora* coletada mensalmente ao longo de dois anos foi avaliada por Santos e colaboradores (2011). Avaliaram-se, ainda, o teor de fenólicos, taninos hidrolisáveis e flavonoides. Condições climáticas, como a umidade, temperatura e precipitação foram também estudadas. Verificou-se a influência exercida pelo estágio de desenvolvimento da planta como fator determinante para expressão de uma classe específica de compostos fenólicos, sendo o grupo das árvores adultas o que mais expressou flavonoides e taninos hidrolisáveis. A moderada correlação positiva entre a concentração de minerais e flavonoides e taninos hidrolisáveis foi observada, com destaque ao conteúdo de zinco. Concluiu-se que a expressão de uma determinada classe de compostos fenólicos é regulada por uma série de fatores bióticos e abióticos, não podendo ser regulada por um único fator, mas que o balanço entre os micronutrientes é necessário e pode influenciar na preferência por rotas biosintéticas específicas, levando à maior concentração de determinada classe de compostos fenólicos nas folhas de *E.uniflora*.

A variação da constituição do óleo essencial das folhas de *E.uniflora* em relação ao biotipo dos frutos maduros foi reportada por Costa e colaboradores (2010). Pode-se observar uma diferença tanto de constituição quanto em atividade antifúngica do óleo essencial frente a *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da Paracoccidioidomicose.

A constituição do óleo essencial das folhas de um único exemplar de *E.uniflora*, coletada diversas vezes em meses de seca (abril a setembro) e meses de alta umidade (outubro a março) no cerrado brasileiro foi descrita (Costa *et al.*, 2009). Observou-se diferença entre a concentração de espatulenol na época de seca e a concentração de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona na época de chuvas. Avaliou-se a correlação entre a concentração de compostos voláteis com a concentração de minerais e compostos fenólicos nas folhas, fenólicos totais, flavonoides e taninos e concluiu-se que houve correlação positiva entre esses fatores. Esse trabalho demonstrou que a influência sazonal e variações ecológicas podem influenciar a composição e concentração de óleo essencial de *E.uniflora* e que este processo pode

estar correlacionado com a concentração de minerais e compostos fenólicos nas folhas.

As bioatividades atribuídas a *E. uniflora* são correlatas ao seu perfil fitoquímico, principalmente em relação ao conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides presentes nas suas folhas. A variação do teor de compostos fenólicos e flavonoides já foi observada entre os diversos biotipos de *E. uniflora* e em relação aos fatores genotípicos e fenotípicos (Ramalho *et al.*, 2019). As diversas caracterizações dos extratos de pitangueira presentes na literatura sugerem uma diferença na incidência e teor de flavonoides glicosilados entre os espécimes analisados (Falcão *et al.*, 2018; Rattmann *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2015; Sobeh *et al.*, 2020b; Sobral de Souza *et al.*, 2017).

A avaliação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, bem como a determinação estrutural dos metabólitos de espécimes de *E. uniflora* cultivados em ambientes diferentes e a avaliação da atividade antioxidante por diferentes metodologias se faz, portanto, necessária para então gerar dados que ratifiquem a correlação entre determinados compostos e suas bioatividades, além de sua eventual expressão e concentração em condições ambientais distintas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização química e a avaliação da atividade antioxidante de frações obtidas a partir de extratos de três diferentes exemplares de *E. uniflora* L.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o óleo essencial das folhas de três espécimes de *E. uniflora*.
- Obter frações do extrato aquoso seletivas para compostos fenólicos das folhas de três espécimes de *E. uniflora*.
- Caracterizar as frações obtidas, avaliando os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais
- Realizar a caracterização química dos óleos essenciais obtidos por CG-EM.
- Desenvolver um método em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com resolução suficiente e capaz de caracterizar os extratos.
- Propor a caracterização dos extratos por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectômetro de massas (CLUE-EM)
- Avaliar o potencial antioxidante das frações por diferentes métodos.
- Avaliar, através de cálculos teóricos-computacionais, as propriedades antioxidantes dos flavonoides de *E.uniflora*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados necessários para a extração e atividades antioxidantes foram de grau PA, adquiridos dos fornecedores Sigma-Aldrich® e Merck®. Os solventes utilizados para as análises de cromatografia líquida (grau HPLC) foram adquiridos da Merck®. O solvente utilizado para a análise de cromatografia em fase gasosa (grau CG) foi adquirido da Sigma-Aldrich®.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada. O 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), sulfato ferroso (FeSO₄), 1,10-fenantrolina, ferrocianeto de potássio K₃[Fe(CN)₆], neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina), fluoresceína, 2,2'-azobis(2-amidino-propano) (AAPH), Trolox, ácido gálico (98% de pureza), catequina (98% de pureza) e o reagente Folin-Ciocalteu foram adquiridos da Sigma-Aldrich®.

A análise de CG-EM foi realizada em um cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-QP2020 acoplado a um detector do tipo quadrupolo simples. Para a análise de CLAE-DAD utilizou-se um cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-20A Prominence, equipado com um detector DAD. As análises de CLUE-EM foram realizadas em um sistema Acquity-UPLC (Waters, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo com ionização por electrospray (ESI-MS) Quattro LC (Waters, MA, EUA). Para leitura das absorbâncias dos experimentos amostras, utilizou-se espectrofotômetro de placas BioTek Epoch. Para leitura da fluorescência, utilizou-se espectrofotômetro de placas BioTek Synergy H1 Hybrid Reader.

4.2 COLETA DO MATERIAL E EXTRAÇÃO

4.2.1 Coleta do material

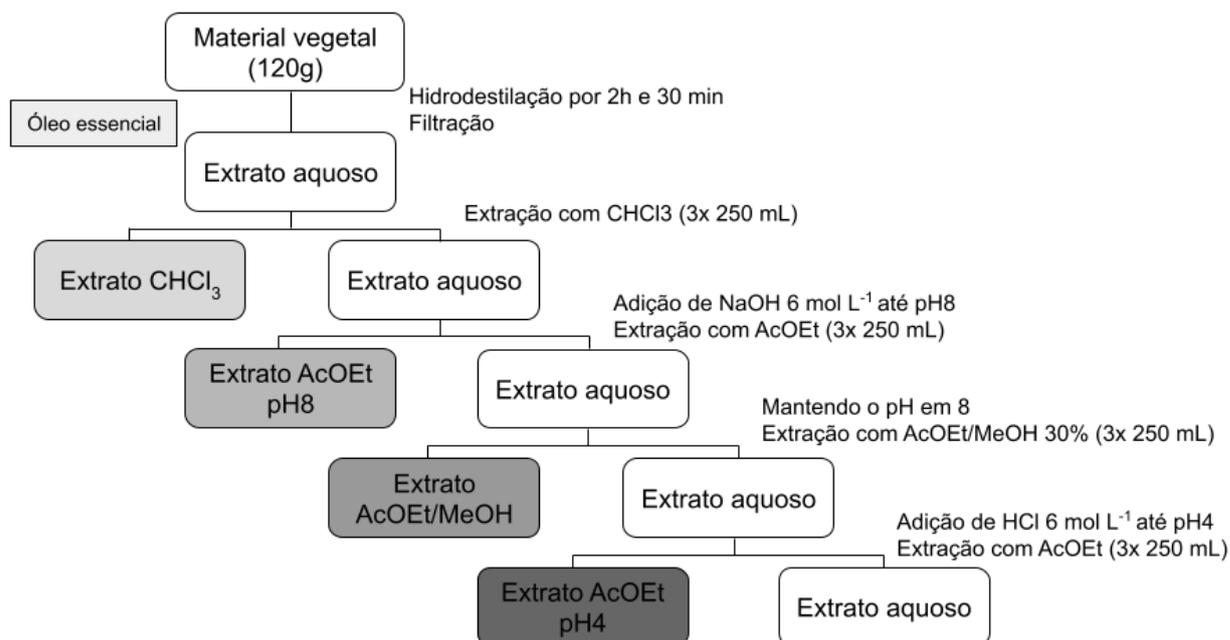
Foram coletados cerca de 300g de folhas frescas de três árvores diferentes (EU1, EU2 e EU3) de *E. uniflora*, localizadas no Campus Uvaranas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). A coleta das três espécimes foi realizada em junho de 2022 entre às 09:00 e 12:00. A temperatura média do dia da coleta foi de 21°C, 60% de umidade do ar, sem registro de precipitação nas últimas 24 horas. O indivíduo

EU1 possuía folhas pequenas e amareladas estão localizadas em uma região que o deixava completamente exposto à luz solar (25°05'39.5"S 50°06'23.6"W). A amostra EU2 estava parcialmente exposta à luz solar (25°05'42.2"S 50°06'07.3"W) e apresenta folhas pequenas e escuras. O espécime EU3 estava completamente protegido da luz solar (25°05'42.1"S 50°06'07.2"W) e possuía folhas grandes e escuras. Uma exsicata da amostra EU1 está depositada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUPG) sob o número de registro 22452. A pesquisa está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código A23FAEE.

4.2.2 Extração e fracionamento

O material vegetal foi então seco em temperatura ambiente ao abrigo da luz, durante 3 dias. Posteriormente, as folhas secas ($\cong 120\text{g}$) foram trituradas e submetidas à hidrodestilação por duas horas e meia. O óleo essencial foi coletado em éter etílico, livre do solvente, seco com Na_2SO_4 , filtrado e então armazenado sob refrigeração. O extrato aquoso obtido foi resfriado até temperatura ambiente, filtrado e então prosseguiu-se a extração por solventes quimicamente ativos descrita por Granato; Nunes (2017), conforme esquematizado na figura 9.

Figura 9 - Fluxograma relativo ao processo de extração e fracionamento



Fonte: O autor.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, foi utilizado o método de Folin Ciocalteu adaptado por Camargo e colaboradores (2016), que se baseia na adição de 100 μL de uma solução etanólica do extrato ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguido pela adição de 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e a adição de 100 μL Na_2CO_3 a 7% (m/v). Após 30 minutos, leu-se a absorbância em espectrofotômetro ELISA em 765 nm. Para a quantificação dos compostos, foi realizada uma curva de calibração com ácido gálico em concentrações de 20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2:0,99724$). Os resultados foram então expressos em mg AG g^{-1} .

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

Para determinar o conteúdo de flavonoides totais, seguiu-se a metodologia descrita por Herald; Gadgil; Tilley, (2012), que consiste na determinação espectrofotométrica do complexo flavonóide- AlCl_3 . Para isso, adicionaram-se 25 μL uma solução etanólica a 1 mg mL^{-1} dos extratos, 10 μL de NaNO_2 a 5% (m/v) e 100 μL de água destilada. Após 5 minutos, adicionaram-se 25 μL de AlCl_3 a 0,414 mol L^{-1} . Após 5 minutos adicionaram-se 50 μL de NaOH 1 mol L^{-1} . Passados 5 minutos, a absorbância foi lida em 510 nm. Para a quantificação dos flavonóides, foi realizada uma curva de calibração com (+) -catequina como padrão analítico, em concentrações de 200-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($R^2: 0,9956$). Os resultados foram então expressos em mg CAT g^{-1} .

4.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (CG-EM)

As análises de cromatografia a gás dos óleos essenciais foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia a gás-espectrometria de massa (Cromatógrafo a Gás Shimadzu GCMS-QP2020). Os óleos essenciais foram diluídos à concentração de 1 mg mL^{-1} em hexano. As amostras foram filtradas em filtro de membrana PES de 0,22 μm no momento de uso. As análises foram conduzidas em coluna capilar RTX 5MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de filme), e as condições analíticas foram as seguintes: razão de split de 1/10, temperatura do injetor a 250°C, fonte de íons a 250°C e interface a 280°C. O programa de temperatura do forno foi definido em 60°C por 5 minutos, seguido por um aumento de temperatura de

3°C/min até atingir a temperatura final de 240°C. Os componentes foram identificados com base no índice de retenção relativo, calculado para cada constituinte através da injeção de uma série homologa de padrões de n-alcenos (C8-C20) nas mesmas condições da amostra e comparando-os com valores tabelados, assim como pela comparação dos espectros de massa obtidos com o banco de dados de espectros de massa (FFNSC 3 e NIST17s) e comparações literárias (Ascari *et al.*, 2021; Weyerstahl *et al.*, 1988).

4.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada no equipamento HPLC Shimadzu LC-20A Prominence, equipado com um detector DAD. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 Shim pack VP ODS de 250 mm x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL com uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹. A fase móvel utilizada foi uma mistura de água acidificada com 1% de ácido fórmico (A) e MeOH (B) em modo gradiente, de 5% de B a 100% de B em 30 minutos. A leitura foi realizada com um detector de arranjo de diodos (DAD) em diferentes comprimentos de onda, 280 nm para flavanóis, 320 nm para ácidos hidroxicinâmicos e 350 nm para flavonóis. As amostras foram preparadas à concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol e filtradas em filtro de membrana PES de 0,22 µm no momento de uso.

4.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTOMETRO DE MASSAS (CLUE-EM)

A análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi realizada em um sistema Acquity-UPLC (Waters, MA, EUA), composto por uma bomba quaternária, gerenciador de amostras e forno de coluna. A detecção foi fornecida por um espectrômetro de massa triplo quadrupolo com ionização por electrospray (ESI-MS) Quattro LC (Waters, MA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Waters Acquity UPLC® BEH C18 de 1,7 µm (50 mm × 2,1 mm) a um fluxo de 0,3 mL min⁻¹. A fase móvel foi o solvente A, água acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v), e o solvente B, metanol. Foi utilizado um gradiente de solvente B, de 5% a 100%, ao longo de 11 minutos, seguido por 3 minutos a 100% B, e depois mais 5 minutos com 5% B. As amostras foram preparadas à concentração

de 1 mg mL⁻¹ em metanol e filtradas em filtro de membrana PES de 0,22 µm e o volume de injeção foi de 3 µL.

A detecção foi realizada por ESI-MS no modo varredura (m/z 50 - 700). Os parâmetros MS/MS para a análise foram, 3 kV no capilar, 55V no cone (modo negativo), temperatura da fonte de 130 °C e temperatura do gás de dessolvatação de 550°C. O gás do cone e o gás de dessolvatação foi nitrogênio para ambos, com taxas de fluxo ajustadas para 50 e 700 L h⁻¹, respectivamente. O gás de colisão utilizado foi argônio e a energia de colisão foi 7 eV.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DPPH

A atividade antioxidante das frações dos extratos de *E.uniflora* foi avaliada pelo método do DPPH, descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), que se baseia no sequestro do radical estável DPPH* pelos compostos presentes nos extratos, alterando a coloração do violeta do DPPH para o incolor. Para isso, adicionaram-se 80 µL de etanol, seguida da adição de 20 µL de solução etanólica dos extratos em diferentes concentrações (10 - 0,1 µg mL⁻¹) e, então, 100 µL uma solução etanólica do reagente DPPH (0,06 mmol L⁻¹). Em seguida, a placa foi incubada em ausência de luz durante 30 minutos, e realizou-se a leitura da mesma em espectrofotômetro a 518 nm. Para controle, foi realizada uma curva padrão com ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações da amostra. Calculou-se a porcentagem de inibição seguindo a equação (1), abaixo.

$$I(\%) = \left(\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{Amostra}}{Abs_{DPPH} - Abs_{Branco}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Os resultados foram então plotados em um gráfico da concentração *versus* inibição, onde pode-se verificar a concentração inibitória de 50% do radical (CI₅₀), que se refere à concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical DPPH.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR ABTS

A atividade antioxidante foi também avaliada pelo método do ABTS, descrito por Fellegrini e colaboradores (1999), que avalia a capacidade dos extratos de capturar o radical estável ABTS. Para isso, adicionaram-se 80µL de tampão fosfato

de sódio ($0,05 \text{ mmol L}^{-1}$), $20 \mu\text{L}$ de uma solução etanólica dos extratos em diferentes concentrações ($10 - 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) seguida da adição de $100 \mu\text{L}$ de solução de ABTS (7 mmol L^{-1}) diluído em tampão fosfato de sódio (10 mmol L^{-1}). A placa foi incubada durante 30 minutos em ausência de luz e em temperatura ambiente. A seguir, foi lida em espectrofotômetro em 734 nm . Para controle, foi realizada uma curva padrão com ácido ascórbico (AA) nas mesmas concentrações da amostra. Os resultados foram então plotados em um gráfico da concentração *versus* inibição, onde pode-se verificar a CI_{50} .

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR HOCl

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do HOCl foi realizada segundo a metodologia descrita por Costa; Ximenes; Fonseca, (2004), que avalia a capacidade do extrato em capturar o HOCl, impedindo que ele reaja com o TMB, produzindo uma coloração azul. Para isso, adicionou-se tampão fosfato de sódio (50 mmol L^{-1} pH 7,4) e uma solução etanólica dos extratos em diferentes concentrações ($100 - 1 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguida da adição de $50 \mu\text{L}$ de TMB 14 mmol L^{-1} e $50 \mu\text{L}$ de NaOCl 0,01%. Após 10 minutos de incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em 652 nm . Para controle, foi realizada uma curva padrão com ácido ascórbico (AA). Os resultados foram então plotados em um gráfico da concentração *versus* inibição, onde pode-se verificar a CI_{50} .

4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR ORAC

Para se verificar a atividade antioxidante pelo método da avaliação da capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) foi utilizado o método criado por Cao; Alessio; Cutler, (1993), e adaptado por Denev e colaboradores (2014). Esse método se baseia na captura do radical peroxila formado pela degradação térmica do 2,2'-azobis(2-amidino-propano) (AAPH), impedindo a degradação da sonda fluorescente, fluoresceína. Para o preparo das soluções, tanto dos reagentes quanto das amostras, utilizou-se tampão fosfato de sódio 75 mmol L^{-1} . Para isso, adicionaram-se $100 \mu\text{L}$ de solução de fluoresceína $8,4 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ em uma microplaca de 96 poços, seguido da adição de $50 \mu\text{L}$ da amostra. Após mistura, a placa foi incubada a 37°C durante 3 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados $50 \mu\text{L}$ de solução de AAPH 153 mmol L^{-1} . A placa foi então lida a cada 90 segundos em

fluorímetro de microplacas utilizando-se 485 nm de excitação e 520 nm de emissão. O efeito dos compostos na proteção da degradação da fluoresceína foi calculado pela diferença entre a integral da curva de decaimento de fluorescência da amostra ($AUC_{amostra}$) entre a curva de decaimento do branco (AUC_{branco}), chamado de Net AUC, pela equação (2) a seguir:

$$Net\ AUC = (AUC_{amostra} - AUC_{branco}) \quad (2)$$

Para controle, foi realizada uma curva padrão com Trolox® (TE). Os resultados foram expressos em mmol TE g⁻¹. Para isso, utilizou-se uma curva padrão de trolox (TE), com a concentração expressa em mmol L⁻¹ no eixo X e os valores de NetAUC no eixo Y, R²: 0,99835.

4.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DE FERRO

Para avaliação da capacidade dos extratos em quelar o Ferro foi utilizado o método descrito por Cunha e colaboradores (2019). Este método tem como princípio a interrupção da formação de um complexo O-fenantrolina-Fe²⁺ pelos extratos que possuam capacidade quelante. Para isso, adicionaram-se 50 µL do extrato (concentrações de 100 até 1750 µg mL⁻¹) e 25 µL de uma solução aquosa de FeSO₄ (2 mmol L⁻¹). Após 10 minutos de incubação, adicionaram-se 100 µL de solução etanólica de O-fenantrolina 6 mmol L⁻¹. Após mais 10 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em 510 nm. Para controle, foi realizada uma curva padrão com EDTA e os resultados foram expressos em mg EDTA g⁻¹.

4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO FOSFOMOLIBDÊNIO

A avaliação da atividade antioxidante total foi realizada pelo método do fosfomolibdênio, descrito por Prieto; Pineda; Aguilar (1999), que se baseia na redução do Mo⁶⁺ para Mo⁵⁺ pela amostra, que formará um complexo fosfato-Mo⁵⁺ de coloração verde em pH ácido. Para isso, adicionaram-se 0,1 mL da amostra (100 µg mL⁻¹) e 1 mL do reagente (0,6 mol L⁻¹ ácido sulfúrico, 28 mmol L⁻¹ fosfato de sódio e 4 mmol L⁻¹ de molibdato de amônia) ao tubo reacional e homogeneizou-se. Os tubos foram mantidos a 95°C durante 90 minutos. Após esse tempo, as amostras foram resfriadas

e lidas em espectrofotômetro em 695 nm. Como branco, foi utilizado um tubo contendo os reagentes e 0,1 mL do mesmo solvente utilizado nos extratos. Para controle, foi construída uma curva de calibração de ácido ascórbico nas mesmas condições da amostra. Os resultados foram, então, expressos em mg AA g⁻¹.

4.14 AVALIAÇÃO DO PODER REDUTOR (FRAP)

A avaliação do poder redutor foi executada segundo a metodologia descrita por Bursal; Gülçin (2011), com algumas modificações. A metodologia se baseia na determinação espectrofotométrica do complexo Azul da Prússia, formado pela redução do Fe³⁺ para Fe²⁺ pelas amostras. Para isso, adicionaram-se 0,75 mL da amostra (100 µg mL⁻¹), 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 mol L⁻¹ pH 6,6) e 1 mL de ferrocianeto de potássio [K₃Fe(CN)₆] (1%). As amostras foram incubadas a 50°C durante 20 minutos. Como branco, utilizaram-se os reagentes e 0,75 mL do mesmo solvente utilizado nas amostras. Após o tempo de incubação, o meio foi acidificado com 1 mL de ácido tricloroacético (10%) e então 0,25 mL de FeCl₃ (0,1%) foi adicionado à solução. As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 700nm. Para controle, utilizou-se uma curva de calibração de ácido ascórbico nas mesmas condições das amostras. Os resultados foram, então, expressos em mg AA g⁻¹.

4.15 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE REDUTORA DO ÍON CÚPRICO (CUPRAC)

A determinação do poder redutor foi realizada com base no método de ensaio de redução de cobre descrito por Apak e colaboradores (2008). Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 µL da amostra (100 µg mL⁻¹), 1 mL de solução de cloreto de cobre (CuCl₂ 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹), 1 mL de solução de neocuproína (7,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ em 96% de etanol), 1 mL de solução tampão de acetato de amônio a pH 7,0 (C₂H₇NO₂) e 1 mL de água destilada. Os tubos foram agitados e mantidos protegidos da luz por 30 minutos. Após o período de incubação ao abrigo da luz, 300 µL da solução de reação foram transferidos para uma placa de 96 poços, que foi lida em espectrofotômetro a 450nm. Para controle, utilizou-se uma curva de calibração de trolox nas mesmas condições das amostras. Os resultados foram, então, expressos em mmol TE g⁻¹.

4.16 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

4.16.1 Otimização das Estruturas dos flavonoides

A otimização das estruturas dos flavonoides presentes nas folhas de *E. uniflora* foi realizada pelo método DFT com o funcional M062X e o conjunto de bases 6-311+G* no utilizando o software G16. A visualização das moléculas e orbitais moleculares foi realizada no software GausView6. Utilizando-se os valores obtidos da energia dos orbitais de fronteira HOMO (Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia) e LUMO (Orbital Molecular Ocupado de Menor Energia), calcularam-se os valores de Potencial de Ionização (IP) e Afinidade Eletrônica (EA) conforme as equações 3 e 4 a seguir:

$$IP = -E^{HOMO} \quad (3)$$

$$EA = -E^{LUMO} \quad (4)$$

Os parâmetros, moleza (S), dureza (η) potencial químico eletrônico (μ) e índice eletrofilico (Ω) foram calculados utilizando-se os valores de IP e EA com base no teorema de Koopman (equações 5-8, abaixo) (Kohn; Becke; Parr, 1996; Parr; Szentpály; Liu, 1999) .Os parâmetros calculados foram utilizados para prever e comparar a propriedade antioxidante dos compostos: ácido gálico, quercetina, quercetina-3-O-ramnosideo, miricetina, miricetina-3-O-ramnosideo, kaempferol e kaempferol-3-O-ramnosideo.

$$\eta = (IP - EA)/2 \quad (5)$$

$$\mu = -(IP + EA)/2 \quad (6)$$

$$\Omega = \mu^2/2\eta \quad (7)$$

$$S = 1/(2\eta) \quad (8)$$

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada resultado de análise realizada, foi calculada a média entre a triplicada realizada e o desvio padrão. Os resultados obtidos foram comparados

estatisticamente por ANOVA e pelo teste de Tukey. A correlação entre os dados de atividade antioxidante e caracterização fitoquímica dos extratos foi realizada através da correlação de Pearson.

Para comparação entre os valores com unidades distintas, primeiramente utilizou-se do método de normalização de dados Mínimo – Máximo (Min-Máx), pela equação 9, p. 52.

$$X_{normalizado} = \frac{X - X_{min}}{X_{máx} - X_{min}} \quad (9)$$

onde X é o valor original que está sendo normalizado, $X_{normalizado}$ é o valor normalizado de X , X_{min} é o valor menor valor do conjunto de dados de atividade antioxidante e $X_{máx}$ é o maior valor do conjunto de dados.

Após a normalização dos dados de atividade antioxidante, utilizou-se um mapa de calor para comparação entre as frações e suas atividades antioxidantes. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o software OriginPro 2023b, versão 10.0.5.157 (Learning Edition)([s. d.]).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES DOS EXTRATOS DE *E. uniflora*

Os resultados obtidos após a determinação do teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais para as frações obtidas a partir dos extratos das folhas de *E.uniflora* estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1 - Compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de *E. uniflora*

Extratos	Fenólicos Totais (mg AG g ⁻¹)	Flavonoides Totais (mg CAT g ⁻¹)
EU1 AcOEt pH 8	400,36 ± 6,31 ^{e,f}	163,31 ± 22,43 ^b
EU1 AcOEt/MeOH	605,71 ± 47,97 ^d	165,34 ± 11,03 ^b
EU1 AcOEt pH 4	796,79 ± 20,64 ^c	154,41 ± 17,80 ^b
EU2 AcOEt pH 8	329,82 ± 22,53 ^f	155,50 ± 8,66 ^b
EU2 AcOEt/MeOH	386,96 ± 48,61 ^{e,f}	223,31 ± 14,87 ^a
EU2 AcOEt pH 4	1332,50 ± 24,01 ^a	66,91 ± 6,37 ^d
EU3 AcOEt pH 8	472,68 ± 17,24 ^{e,f}	74,56 ± 8,62 ^{c,d}
EU3 AcOEt/MeOH	364,64 ± 10,80 ^f	105,50 ± 13,86 ^c
EU3 AcOEt pH 4	995,89 ± 44 ^b	68,63 ± 8,51 ^{c,d}

*Valores referentes a média ± desvio padrão (n=3)

Médias seguidas por letras diferentes (a-g) diferem estatisticamente na mesma coluna (Tukey test a p < 0,05).

Fonte: O autor.

A finalidade do processo extrativo utilizado foi levar a extratos seletivos para uma determinada classe de compostos. A extração inicial em hidroddestilador do tipo *Clevengerte* teve como objetivo obter o óleo essencial e para garantir a total exclusão da porção não fenólica, seguiu-se com a extração líquido-líquido por 3x com 250 mL de CHCl₃.

Ainda que o pH da solução aquosa seja elevado para 8, o pKa de nenhuma hidroxila fenólica presente em flavonoides é suficientemente baixo para garantir a desprotonação. No entanto, os grupamentos ácido carboxílico presentes nos ácidos fenólicos reagem com a base, formando seus respectivos carboxilatos. Nessas

condições, a extração líquido-líquido com AcOEt produzirá um extrato rico em flavonoides de média polaridade. A adição de 30% um solvente de polaridade elevada, como o MeOH, a este sistema favorece a extração de flavonoides de polaridade elevada, normalmente contendo de 3 a 5 grupos hidroxila e ligados a glicosídeos. A subsequente acidificação da fase aquosa até pH 4 desloca o equilíbrio químico dos grupamentos carboxilato novamente à sua forma molecular, podendo ser obtidos por extração líquido-líquido com AcOEt. Esta sequência de extração líquido-líquido empregada visa gerar extratos seletivos a três classes de compostos fenólicos. O extrato AcOEt em pH 8, contendo os flavonoides de média polaridade; o extrato AcOEt/MeOH 30%, com os flavonoides glicosilados e o extrato AcOEt pH 4, contendo ácidos fenólicos em maior quantidade (Granato; Nunes, 2017).

O processo de extração foi mais eficiente, com relação a seletividade aos fenólicos, para os extratos AcOEt pH 8 e AcOEt/MeOH 30%, com destaque para EU2 MeOH, onde a proporção de flavonoides totais é maior. Os extratos obtidos com AcOEt em pH 4 foram mais ricos em compostos fenólicos totais, com destaque ao extrato EU3 em pH 4, que além de conter alta quantidade de compostos fenólicos totais, exibiu pequena quantidade de flavonoides totais, apresentando considerável seletividade para os ácidos fenólicos presentes na *E. uniflora*. É possível observar que os extratos obtidos em AcOEt/MeOH 30%, apresentaram os maiores teores de flavonoides totais, podendo indicar que os flavonoides mais prevalentes nas folhas de *E. uniflora*, são do tipo glicosilados.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura para a folhas de *E. uniflora*, ao se considerar o rendimento e proporção empregada em trabalhos comparados. O estudo de Cunha e colaboradores (2019) encontrou, para um extrato etanólico, um teor de compostos fenólicos totais de 75,6 mg AG g⁻¹ e para flavonoides totais 42,5 mg QUER g⁻¹, o rendimento de extrato obtido foi de 1,07%. Borges Monteiro et al., 2019 reportaram valores 193,06 mg AG g⁻¹ e 28,64 mg QUER g⁻¹ para um extrato obtido com 10% de MeOH e 90% de água. Este trabalho está em acordo com o resultado descrito neste trabalho, por apresentar diferença significativa entre a concentração de compostos fenólicos e flavonoides.

Falcão e colaboradores (2018), determinaram a concentração de ácido gálico, ácido elágico e miricetrina no extrato bruto, fração aquosa e fração obtida em AcOEt das folhas de *E. uniflora* coletadas em Pernambuco, Brasil. Neste trabalho, o

extrato que conteve o maior teor dos compostos selecionados foi o extrato obtido em AcOEt.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CG-EM

Pode-se identificar cerca de 60 compostos nos óleos essenciais das três amostras, em sua maior parte monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Os quinze compostos com área relativa acima de 2% estão listados na Tabela 2. Os compostos identificados e mais prevalentes estão de acordo com os resultados encontrados na literatura para *E. uniflora* (Ascari *et al.*, 2021; Fidelis *et al.*, 2022b; Weyerstahl *et al.*, 1988).

Tabela 2: Análise de CG-EM dos óleos essenciais de *E. uniflora*.

IRL ^a	IRL ^b	Compostos	Área relativa (%)		
			EU1	EU2	EU3
1396	1394	β-Elemeno	3,05	2,67	3,88
1439	1435	γ-Elemeno	2,67	5,96	-
1488	1480	Germacreno D	12,64	17,01	10,02
1504	1500	Curzereno	13,28	14,61	21,51
1512	1510	Bulneseno	-	-	2,1
1529	1519	Cubebol	-	-	3,16
1530	1534	γ-Cadineno	-	2,26	-
1566	1561	Germacreno B	16,19	32,76	5,9
1584	1582	Espatuleno	-	-	2,66
1605	1605	β-Elemenona	7,68	-	-
1662	1660	Cadin-4-en-10-ol	-	-	2,37
1704		Furanodieno	4,3	-	8,55
1708	1696	Germacrona	9,03	-	8,58
1756	1755	Oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one	4	-	7,12
1765	1767	Antraceno	-	-	2,08

IRL^a: Índice de retenção linear calculado utilizando uma coluna RTx-5MS e uma sequência de n-alcenos C8-C20; IRL^b: Índice de retenção linear publicados para colunas apolares.

Fonte: O autor.

A variação na constituição do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* em relação ao biotipo de frutas maduras é relatada na literatura (da Costa *et al.*, 2020; Ramalho *et al.*, 2019). O estudo de da Costa e colaboradores (2020) agrupou uma

série de amostras em três grupos com base na composição dos seus óleos essenciais e a coloração dos seus frutos, são eles: Grupo I, contendo frutas amarelas, vermelhas escuras e roxas, que mostraram altas concentrações de germacreno B, germacrona e atractilona; Grupo II, contendo amostras de frutas vermelhas claras, com altas concentrações de curzereno, germacreno D e germacreno A; e Grupo III, contendo frutas vermelhas alaranjadas, com alto teor de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e oxiselina-1,3,7(11)-trien-8-ona. As amostras analisadas podem ser divididas da mesma forma, sendo EU1 no Grupo II, EU2 no Grupo I e EU3 no Grupo III, com base na composição química do óleo essencial.

A diferença na constituição do óleo essencial das folhas de uma única amostra de *E. uniflora*, coletada no cerrado brasileiro, foi descrita por Costa e colaboradores (2009). A correlação entre a concentração de compostos voláteis, concentração de minerais do solo e os compostos fenólicos nas folhas (fenóis totais, flavonoides e taninos) foi avaliada. Concluiu-se que havia uma correlação positiva entre esses fatores. Este estudo demonstrou que a influência sazonal e as variações ecológicas podem impactar a composição e concentração do óleo essencial de *E. uniflora*, e esse processo pode estar correlacionado com a concentração de minerais e compostos fenólicos nas folhas.

As diferenças observadas na composição dos óleos essenciais das três espécies de *E. uniflora* orientaram a seleção dessas amostras e a avaliação da variação na atividade antioxidante de seus compostos fenólicos em relação a uma série de métodos de avaliação de atividade antioxidante.

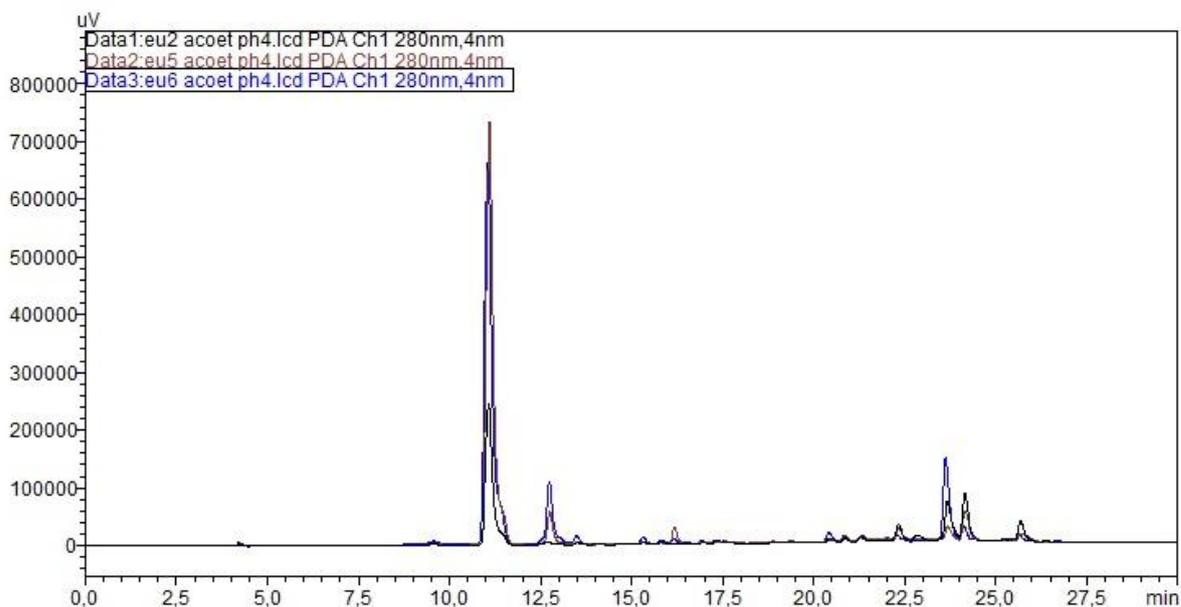
5.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DOS EXTRATOS

Esta análise preliminar teve como principal objetivo o desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) que fornecesse resolução suficiente dos compostos constituintes do extrato. Obtendo-se as condições otimizadas, essas foram transpostas para a análise ao cromatógrafo de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas (CLUE-EM) para possibilitar a tentativa de identificação dos compostos. Tendo isto em vista, o desenvolvimento do método cromatográfico se fez

satisfatório, promovendo suficiente resolução e possibilitando a obtenção de várias informações.

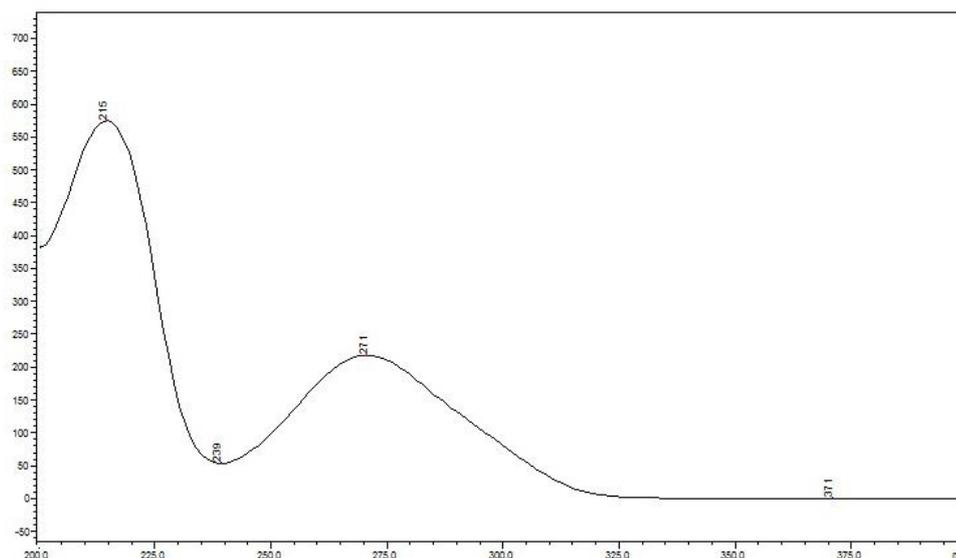
Nos cromatogramas de extratos dos três espécimes estudados, observaram-se duas regiões principais, entre 10 e 15 minutos e entre 20 e 30 minutos. Na primeira região, houve prevalência de um composto com absorbâncias máximas ($Abs_{máx}$) em 254 nm, com tempo de retenção em 11 minutos, que se repete em todos os extratos obtidos em pH 4, estando e ausente ou em menor concentração nos demais extratos (Figura 10). O composto com o tempo de retenção em 11 minutos apresenta um espectro de absorção UV com duas bandas proeminentes: uma banda curta em 215 nm e uma banda mais ampla em 270 nm (Figura 11, p.58). Essas características espectrais são consistentes com as associadas ao ácido gálico, um ácido fenólico identificado nas folhas de *E. uniflora* (G de Oliveira *et al.*, 2023; Karimova *et al.*, 2022).

Figura 10 - Cromatogramas sobrepostos das frações EU1, EU2 e EU3 obtidas em AcOEt pH 4, em 280 nm



Fonte: O autor.

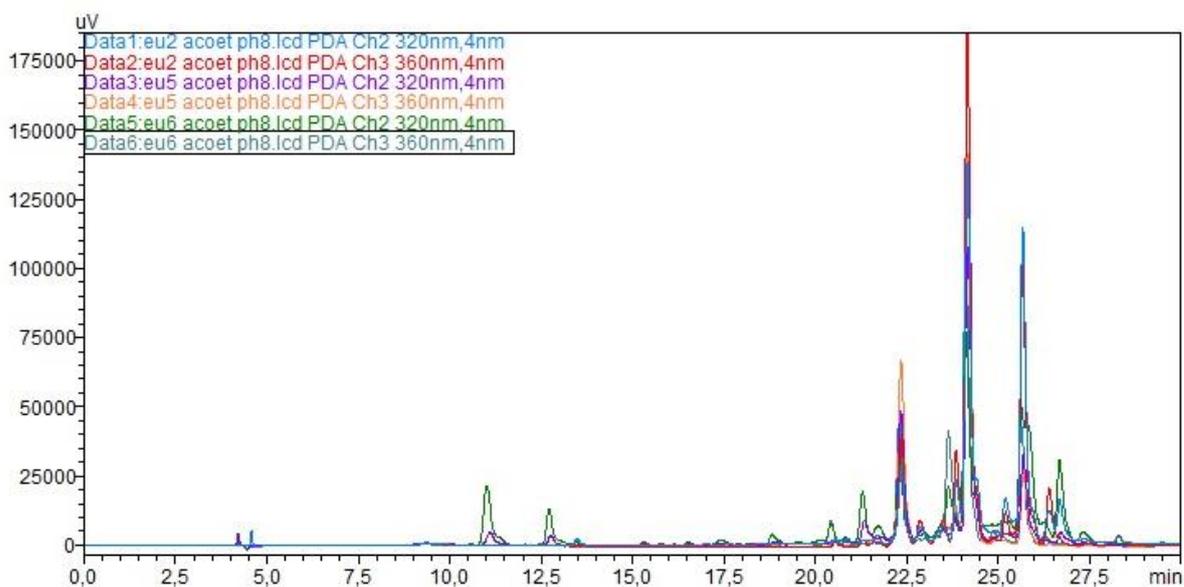
Figura 11: Espectro de absorção UV-Vis em 11 min do extrato EU6 pH 4.



Fonte: O autor.

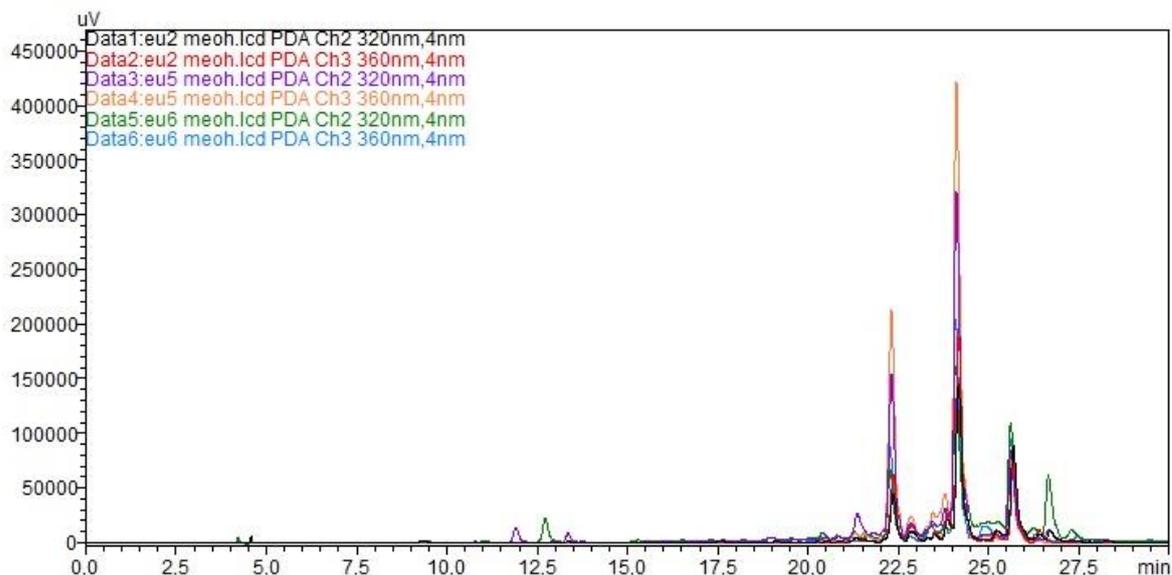
Na segunda região do cromatograma, entre 20 e 30 minutos, há maior quantidade de picos, com absorção mais intensa em 320 e 360 nm, regiões onde flavonoides como a quercetina e miricetina tem suas $Abs_{m\acute{a}x}$ (da Cunha *et al.*, 2016) (Figuras 12 e 13, p.59).

Figura 12 - Cromatogramas sobrepostos das frações EU1, EU2 e EU3 obtidas em AcOEt pH 8, em 320 e 380 nm



Fonte: O autor.

Figura 13 - Cromatogramas sobrepostos das frações EU1, EU2 e EU3 obtidas em AcOEt/MeOH 30%, em 320 e 380 nm



Fonte: O autor.

Quando comparado com a literatura, o perfil dos cromatogramas obtidos se faz muito semelhante, indicando que a composição dos espécimes estudadas não difere significativamente de outros espécimes já descritos (Bezerra *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2022).

Quando sobrepostos, os cromatogramas obtidos evidenciaram a grande semelhança entre a constituição fenólica dos espécimes analisadas. Porém, para ratificar essa evidência, realizou-se a identificação dos compostos presentes nos extratos de *E. uniflora* por CLUE-EM.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLUE-EM DOS EXTRATOS:

Com base na análise de CLUE-EM dos nove extratos, pode-se propor a presença de treze compostos conhecidos nos extratos das folhas de *E. uniflora*, apresentados na tabela 3, p. 60. Nos extratos obtidos em AcOEt em pH 8 e AcOEt/MeOH 30%, a presença é principalmente de glicosídeos de flavonoides como quercetina, kaempferol e miricitina. Todos os extratos obtidos em AcOEt em pH 4 mostraram a presença de ácido gálico como o principal composto, seguido por glicosídeos de flavonoides, assim como os demais extratos. A proposta dos compostos foi realizada utilizando-se a massa dos íons, fragmentação de massa e

comparação com dados publicados na literatura (Borsoi *et al.*, 2023; Rattmann *et al.*, 2012; Sobeh *et al.*, 2020b).

Tabela 3: Proposta de identificação dos extratos de *E. uniflora* por UPLC-MS.

Tempo de Retenção (Min)	[M-H] (<i>m/z</i>)	MS/MS	Proposta de Composto
2,82	169,41	125,27	Ácido Gálico
7,74	653,58	326,4	n.i
8,05	501,47	479,49/316,52	Miricetina derivado
8,35	463,37	449,4/316,26	Miricetina-3-O-ramnosideo
8,55	463,37	433,34/300,40	Quercetina glucosídeo
8,75	433,47	405,39/300,40	Quercetina pentosídeo
8,98	447,51	300,4	Quercetina-3-O-ramnosideo
9,11	521,49	447,38/301,25/209,59/187,55/125,40	Quercetina derivado
9,19	483,39	447,38/417,54/301.38	Quercetina derivado
9,26	533,64	483,46/339,60/301.38	Quercetina derivado
9,38	417,35	285,38	Kaempferol pentosídeo
9,48	431,45	285,38	Kaempferol-3-O-ramnosideo
9,72	495,55	301,39/179,29	Quercetina derivado
9,91	495,42	325,62	n.i
10,07	329,39	314,18	Quercetina 3',4'-dimetil éter

n.i: não identificado

Fonte: O autor.

A proposta de identificação dos compostos está de acordo com a encontrada na literatura para extratos de *E. uniflora* (G de Oliveira *et al.*, 2023; Sobeh *et al.*, 2020b). Apesar da diferença visível na constituição dos óleos essenciais das três amostras analisadas, não houve diferença significativa na composição dos extratos fenólicos. A composição volátil de *E. uniflora* parece ser mais sensível às condições ambientais do que a composição fenólica (da Costa *et al.*, 2020).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *E.uniflora*

5.5.1 Métodos de captura de espécies reativas

A avaliação da atividade antioxidante através da captura de radicais dos extratos de *E.uniflora* foi realizada através dos métodos DPPH, ABTS, HOCl e ORAC.

A capacidade de captura de um radical livre é determinada pela capacidade de uma determinada substância estabilizá-lo. Em sistemas biológicos, existem uma série de radicais com diferentes características químicas. A captura destes radicais exige especificidades, que necessitam ser investigadas para que seja possível considerar um determinado composto como um candidato viável a fármaco. Além disso, as características inerentes às substâncias fazem com que elas exerçam sua atividade antioxidante por um método específico, que na maioria das vezes não é capaz de estabilizar todos os radicais existentes. Portanto, a avaliação da capacidade de captura de radicais deve ser realizada frente à maior quantidade de radicais possível, a fim de se elucidar os mecanismos pelos quais determinada substância age (Halliwell, 1990).

A atividade antioxidante frente à inibição dos radicais DPPH, ABTS e HOCl foram expressos em CI_{50} , sendo a quantidade necessária de um agente ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para inibir 50% da concentração de um radical. Os valores de CI_{50} para os extratos de *E. uniflora* (Tabela 4) são apresentados a seguir:

Tabela 4 - Valores de CI_{50} para os extratos de *E. uniflora* frente aos radicais DPPH, ABTS e HOCl.

Extratos	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	ABTS CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	HOCl CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*
EU1 AcOEt pH 8	11,53 \pm 0,57 ^a	5,21 \pm 0,8 ^a	62,34 \pm 1,85 ^a
EU1 AcOEt/MeOH	10,73 \pm 0,59 ^a	4,91 \pm 0,39 ^{a,b}	61,89 \pm 2,13 ^a
EU1 AcOEt pH 4	4,08 \pm 0,47 ^{d,e}	1,44 \pm 0,1 ^{d,e}	6,67 \pm 0,33 ^d
EU2 AcOEt pH 8	5,16 \pm 0,03 ^{c,d}	2,91 \pm 0,29 ^e	13,89 \pm 1,20 ^c
EU2 AcOEt/MeOH	7,67 \pm 0,74 ^b	2,9 \pm 0,2 ^{c,d}	18,41 \pm 1,58 ^b
EU2 AcOEt pH 4	2,71 \pm 0,42 ^{e,f}	1,45 \pm 0,13 ^e	4,01 \pm 0,46 ^{d,e}
EU3 AcOEt pH 8	6,04 \pm 0,6 ^c	2,78 \pm 0,2 ^c	13,37 \pm 0,68 ^c
EU3 AcOEt/MeOH	11,69 \pm 0,27 ^a	5,41 \pm 0,7 ^a	61,48 \pm 1,88 ^a
EU3 AcOEt pH 4	2,45 \pm 0,45 ^f	1,17 \pm 0,07 ^e	3,4 \pm 0,21 ^{d,f}
Ácido Ascórbico	5,76 \pm 0,06 ^c	4,04 \pm 0,43 ^{b,c}	2,75 \pm 0,40 ^{e,f}

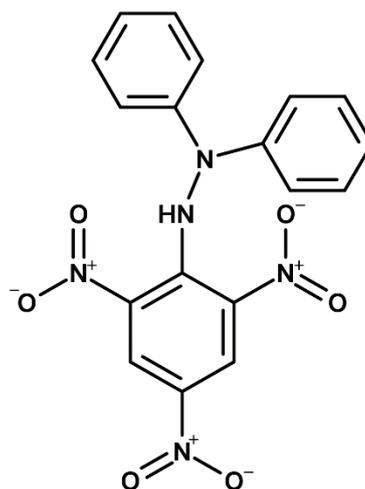
*Valores referentes a média \pm desvio padrão (n=3)

Médias seguidas por letras diferentes (a-g) diferem estatisticamente na mesma coluna (Tukey test a $p < 0,05$).

Fonte: O autor.

O DPPH• é um radical estável que possui coloração roxa e absorção intensa em 518 nm (Figura 14). Quando estabilizado, forma um produto incolor. Este teste tem como objetivo avaliar o decréscimo da absorção de uma solução de DPPH após o contato com uma espécie antioxidante. O teste do DPPH é principalmente determinado pela habilidade de um agente em transferir um elétron, atuando principalmente pelo mecanismo SET. A transferência de um átomo de hidrogênio pode acontecer, mas é considerado um mecanismo secundário para o DPPH (Prior; Wu; Schaich, 2005).

Figura 14 - Radical DPPH•



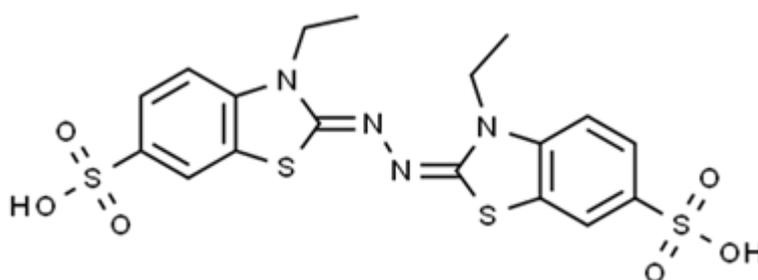
Fonte: O autor.

Todas as amostras avaliadas inibiram fortemente o radical DPPH. Contudo, os extratos obtidos em AcOEt pH 4 foram mais eficientes em comparação ao controle positivo, o ácido ascórbico (AA). Este resultado pode ser diretamente correlacionado com a caracterização química dos extratos, pois os que foram mais eficazes contêm maiores concentrações de compostos fenólicos totais.

A fração AcOEt do extrato metanólico das folhas de *E.uniflora* apresentou o valor de CI_{50} para o DPPH de $3,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Sobeh *et al.*, 2020b). Este resultado está de acordo com os encontrados neste trabalho, evidenciando o potencial inibidor do radical DPPH. O estudo de Samy e colaboradores (2014) avaliou o potencial de miricetrina, miricetin-3-O-(4"-O-galoil)- α -L-ramnopiranosídeo e miricetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo, isolados das folhas de *E.uniflora* frente ao radical DPPH. A CI_{50} observada foi de $11,3 \mu\text{M}$, $5,1 \mu\text{M}$ e $21,3 \mu\text{M}$, respectivamente.

O radical catiônico ABTS^{•+} é produzido pela sua oxidação após a reação com o persulfato de potássio (K₂S₂O₈) em meio ácido, armazenado ao abrigo da luz durante 16 horas (Figura 15). O radical formado possui coloração azul e a sua absorção máxima se dá em 734 nm. Os mecanismos pelos quais a estabilização do radical ABTS ocorre são os mesmos observados para o DPPH, ocorrendo principalmente através da doação de um elétron (SET) (Gülcin, 2020; Prior; Wu; Schaich, 2005).

Figura 15 - Radical ABTS^{•+}



Fonte: O autor

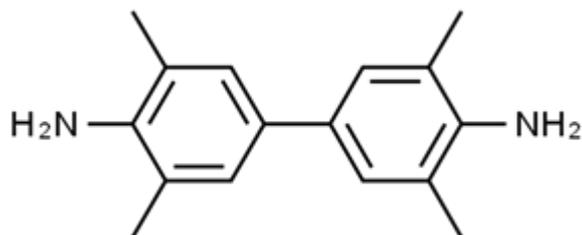
Novamente, todos os extratos estudados foram capazes de capturar 50% da concentração de ABTS em baixíssimas concentrações, em comparação ao AA, com destaque para os extratos obtidos em AcOEt pH 4, com resultados ao menos 3 vezes menores do que o AA. Os resultados obtidos para os extratos de *E. uniflora* são mais uma vez correlatos ao teor de compostos fenólicos totais.

O ácido hipocloroso (HOCl) é formado através da decomposição do H₂O₂ pela enzima mieloperoxidase (MPO). Esse processo é um conhecido fator promotor do estresse oxidativo em sistemas biológicos. Neutrófilos podem produzir HOCl para serem utilizados como sinalizadores de processos inflamatórios. O HOCl é um poderoso agente oxidante e seu acúmulo pode ser relacionado à mobilização de macrófagos e ao dano oxidativo. A captura do ácido hipocloroso pode ser associada à atividade anti-inflamatória, por inibir a geração de outras EROs que atuam como estimuladores de citocinas pró inflamatórias (Borges Monteiro *et al.*, 2019; Costa; Ximenes; Fonseca, 2004b).

O método utilizado para determinar o sequestro de HOCl é baseado na adição de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)(Figura 15, p. 64), que quando oxidada pelo

HOCl/OCl⁻, produzirá um cromóforo azul detectado a 652 nm (Costa; Ximenes; Fonseca, 2004).

Figura 16 - 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB)

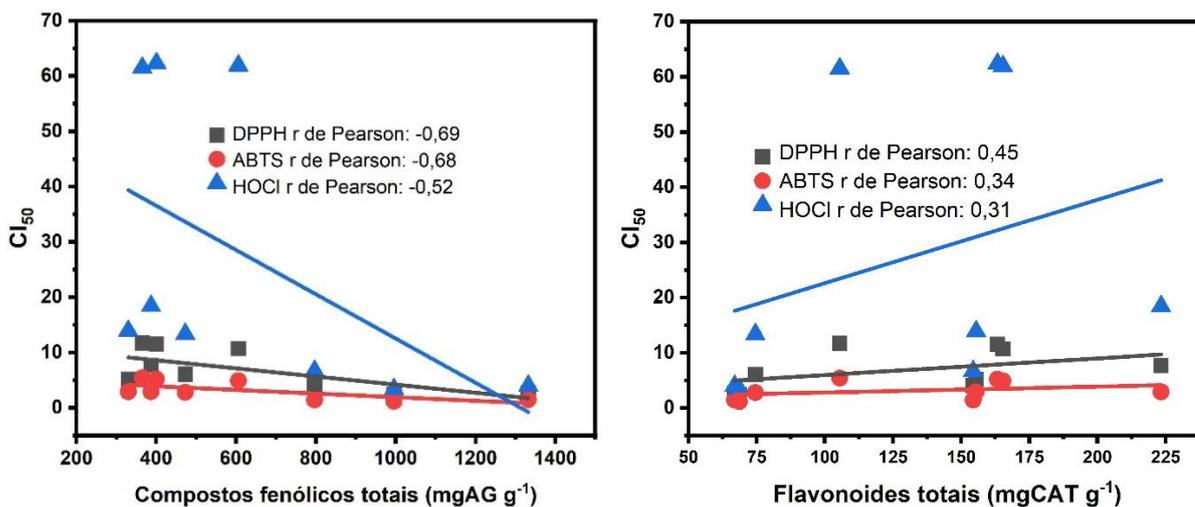


Fonte: O autor

Com relação ao sequestro do HOCl pelos extratos de *E. uniflora*, verificou-se a expressiva atividade dos extratos obtidos em AcOEt pH 4, sendo o extrato EU3 pH 4 o que apresentou o melhor resultado. Entretanto, foi possível constatar uma mudança expressiva na tendência que vinha sendo observada nos outros métodos, em relação aos extratos ricos em flavonoides. Os valores obtidos para EU1 pH 8, EU1 MeOH e EU3 MeOH diferiram dos demais por apresentarem valores de Cl₅₀ expressivamente maiores. Essa característica pode estar correlacionada com a composição química destes extratos. A maior incidência de flavonoides glicosilados nos extratos de *E. uniflora*, somado à diferença significativa do poder antioxidante entre os glicosídeos de flavonoides e suas respectivas agliconas pode ser o fator determinante para este resultado (Heim; Tagliaferro; Bobilya, 2002; Kumar; Pandey, 2013; Sobeh et al., 2019). Esta evidência se mostrou verdadeira com base na identificação dos compostos realizada por CLUE-EM. Os resultados encontrados estão de acordo com os descritos por Borges Monteiro e colaboradores (2019), onde para um extrato metanólico de *E. uniflora*, coletada no Espírito Santo, Brasil, obteve-se Cl₅₀ de 15,7 µg mL⁻¹ para o sequestro do HOCl.

Com o intuito de correlacionar diretamente a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH, ABTS e HOCl e o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, utilizou-se da correlação estatística de Pearson, que pode ser observada na figura 17, p. 65.

Figura 17 - Correlação de Pearson entre Cl_{50} e o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais



Fonte: O autor

A correlação se mostrou negativa para compostos fenólicos totais. Quando o aumentou-se o teor de compostos fenólicos, houve a diminuição dos valores de Cl_{50} para o DPPH, ABTS e HOCl, sendo uma correlação moderada para as três análises. Para o teor de flavonoides totais, a correlação se mostrou positiva. O aumento do teor de flavonoides implicou na elevação dos valores de Cl_{50} para o DPPH, ABTS e HOCl, sendo uma correlação fraca (Mukaka, 2012). Os resultados obtidos para a o coeficiente de correlação de Pearson contribuem para a evidência de que os flavonoides presentes nos extratos são de tipo glicosilado e, portanto, mais impedidos de exercerem seu potencial antioxidante frente a esses métodos, não sendo os principais responsáveis pela atividade dos extratos. Porém, para confirmar tal hipótese, mais análises devem ser realizadas.

O método da absorção do radical oxigênio (ORAC) se baseia na captura do radical peroxila (ROO^{\bullet}), formado pela degradação térmica do 2,2'-azobis(2-amidino-propano) (AAPH) pelo extrato, impedindo a perda da fluorescência pela consequente oxidação da fluoresceína. Este método fornece dados de extrema relevância, tanto para sistemas biológicos quanto para alimentos. A captura do ROO^{\bullet} promove a interrupção de uma cadeia de reações que levarão à formação de outras espécies reativas e à peroxidação lipídica, ocorrendo exclusivamente via mecanismo HAT (Gülçin, 2012). Os resultados são normalmente expressos em mmol de trolox por grama de extrato (mmol TE g⁻¹) e estão apresentados na tabela 5, p. 66, a seguir:

Tabela 5 - ORAC dos extratos de *E.uniflora*.

Extratos	ORAC (mmol TE g ⁻¹)
EU1 AcOEt pH 8	6,27 ± 0,22 ^d
EU1 AcOEt/MeOH	8,61 ± 0,19 ^c
EU1 AcOEt pH 4	10,98 ± 0,09 ^b
EU2 AcOEt pH 8	14,22 ± 0,58 ^a
EU2 AcOEt/MeOH	12,27 ± 0,65 ^b
EU2 AcOEt pH 4	12,11 ± 0,88 ^b
EU3 AcOEt pH 8	8,78 ± 0,62 ^c
EU3 AcOEt/MeOH	10,99 ± 0,64 ^b
EU3 AcOEt pH 4	9,14 ± 0,67 ^c

*Valores referentes a média ± desvio padrão (n=3)

Médias seguidas por letras diferentes (a-d) diferem estatisticamente na mesma coluna (Tukey test a p < 0,05).

Fonte: O autor.

Neste teste em específico, pode-se observar uma ruptura do padrão que havia sendo observado nos testes anteriores. Para DPPH, ABTS e HOCl, a atividade antioxidante se mostrava dependente do teor de compostos fenólicos totais. Já para o ORAC, os extratos que apresentaram os maiores valores foram os que continham maior concentração de flavonoides totais. O extrato EU2 pH 8 se destaca por seu elevado teor de flavonoides totais e por ter exibido o maior valor para o método ORAC.

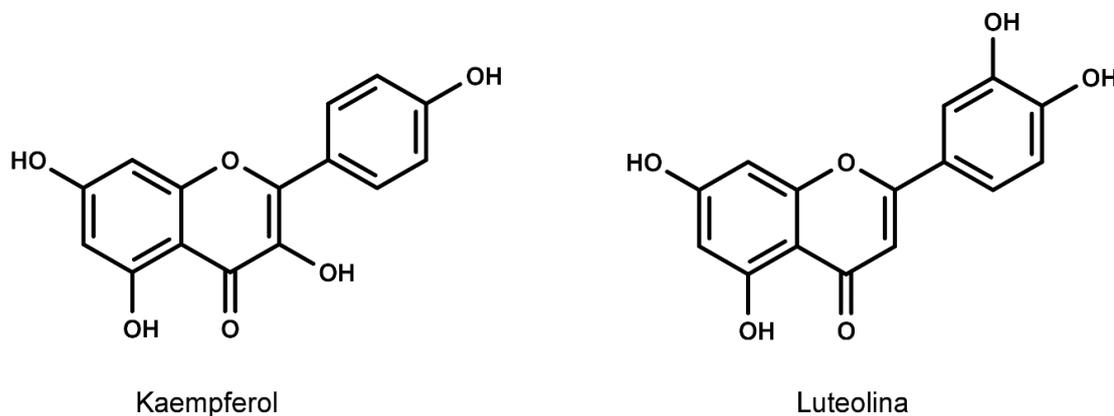
A análise comparativa entre diferentes exemplares de *E. uniflora* coletadas no Uruguai levou à identificação da miricetina-ramnosideo como o composto mais abundante na maioria das amostras. Aquele estudo também avaliou a atividade antioxidante pelo método do DPPH e ORAC para as amostras obtidas, e observou-se expressiva inibição das espécies reativas para as amostras analisadas. Porém, não foi possível correlacionar a concentração de compostos fenólicos e flavonoides com a atividade antioxidante. Contudo, através de uma correlação estatística, pode-se sugerir que a atividade antioxidante tenha correlação negativa com a presença de derivados de quercetina e correlação positiva com a presença de derivados de miricetina (Migues *et al.*, 2018).

Fortes e colaboradores (2015) reportaram a atividade antioxidante pelo método do DPPH e ORAC para onze compostos isolados das folhas de *E. uniflora*,

coletadas em Góias, Brasil. Dentre eles, a quercitrina e a miricetrina chamaram a atenção pela sua diferença em relação à atividade antioxidante pelo método do ORAC, sendo 2,96 e 8,09 μmol de TE equivalente μmol^{-1} , respectivamente. Essa diferença entre a atividade do composto isolado corrobora com os resultados encontrados por Miguez e colaboradores (2018).

Para captura do radical peroxila (ROO^{\bullet}), verificou-se uma relação entre os grupamentos OH presentes no anel B dos flavonoides e o aumento do potencial antioxidante (Heim; Tagliaferro; Bobilya, 2002; Kumar; Pandey, 2013b). Esse grupamento favorece a inibição da peroxidação lipídica, tanto por fornecer um sítio de quelatação de metais, quanto por ser um potente sequestrador de radicais ROO^{\bullet} . Como pode ser observada na comparação entre o kaempferol e a luteolina, ambos possuem estrutura similar. O kaempferol não apresenta o grupamento 3',4' – catecol e, portanto, se mostra menos eficiente na captura do radical ROO^{\bullet} em relação à luteolina (Figura 18).

Figura 18: Comparação entre os flavonoides Kaempferol e Luteolina



Fonte: O autor.

Essa correlação entre o grupamento 3',4' – catecol e a atividade antioxidante pelo método do ORAC pode ser a razão pela qual a glicosilação dos flavonoides supostamente não influencie os resultados observados. Sendo dependente principalmente das hidroxilas do anel B, a ligação a um monossacarídeo, que normalmente é feita a partir da hidroxila do carbono 3 ou do átomo de carbono 7, não prejudica a atividade antioxidante da mesma maneira que nos demais métodos. A fim

de se confirmar essa afirmação, a identificação dos compostos presentes nos extratos obtidos se faz necessária.

Comparando-se o desempenho do extrato EU1 MeOH e do extrato EU2 pH 8, pode-se observar que não houve diferença estatística entre a concentração de flavonoides nos dois extratos. Porém, nos resultados do método ORAC, verificou-se diferença estatística entre os valores encontrados. Esse resultado, somado aos trabalhos presentes na literatura, demonstrou que o melhor desempenho de um extrato no método ORAC não é determinado única e exclusivamente pelo conteúdo de flavonoides, mas pela característica dos compostos nele presentes. A identificação dos compostos presentes em ambos os extratos se faz necessária para aumentar a robustez da hipótese.

5.5.2 Métodos de avaliação do poder redutor

O poder redutor de um composto ou extrato reflete a sua capacidade doadora de elétrons. Extratos que possuem poder redutor na presença de agentes oxidantes atuarão reduzindo-os a produtos mais estáveis, exercendo atividade antioxidante. Os métodos que avaliam o poder redutor ocorrem exclusivamente via mecanismo SET e não permitem determinar com clareza a capacidade doadora de prótons (Gülcin, 2020; Prior; Wu; Schaich, 2005).

Para a avaliação do poder redutor, utilizaram-se três metodologias. A avaliação do poder redutor pelo método do fosfomolibdênio é realizada através da detecção espectrofométrica complexo fosfato-Mo⁵⁺ em meio ácido. O complexo é formado através da redução do Mo⁶⁺ a Mo⁵⁺ pelo extrato. Já a avaliação do poder redutor do ferro (FRAP) é realizada pela detecção espectrofométrica do complexo azul da Prússia, formado pela redução do Fe[(CN)₆]₃ a Fe[(CN)₆]₂ em seguida da adição de FeCl₃ à reação, formando o complexo Fe₄[Fe(CN⁻)₆]₃. A avaliação da capacidade redutora do íon cúprico (CUPRAC) também foi utilizada para avaliar o poder redutor dos extratos. O ensaio é baseado na redução de Cu(II) para Cu(I) pelos extratos, e é avaliado através da formação do complexo formado após tal redução e complexação com a neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina). Os resultados são apresentados na tabela 6, p. 69, a seguir:

Tabela 6 - FRAP, poder redutor pelo fosfomolibdênio e CUPRAC para os extratos de *E. uniflora*

Extratos	Fosfomolibdênio (mg AA g ⁻¹)	FRAP (mg AA g ⁻¹)	CUPRAC (mmol TE g ⁻¹)
EU1 AcOEt pH 8	60,50 ± 0,59 ^{d,e}	15,72 ± 0,07 ^f	4,11 ± 0,18 ^e
EU1 AcOEt/MeOH	53,19 ± 1,02 ^{f,g}	15,64 ± 0,15 ^f	3,92 ± 0,06 ^e
EU1 AcOEt pH 4	63,19 ± 1,35 ^{c,d}	29,10 ± 0,19 ^b	9,24 ± 0,92 ^c
EU2 AcOEt pH 8	59,35 ± 1,33 ^{d,e,f}	27,46 ± 0,26 ^c	7,94 ± 0,37 ^{c,d}
EU2 AcOEt/MeOH	47,42 ± 2,84 ^g	13,70 ± 0,08 ^g	7,29 ± 0,45 ^d
EU2 AcOEt pH 4	90,88 ± 1,55 ^a	29,65 ± 0,12 ^{a,b}	16,01 ± 0,61 ^a
EU3 AcOEt pH 8	67,62 ± 0,27 ^c	26,70 ± 0,07 ^d	7,85 ± 0,78 ^{c,d}
EU3 AcOEt/MeOH	61,27 ± 2,78 ^{c,e}	24,71 ± 0,35 ^e	4,06 ± 0,2 ^e
EU3 AcOEt pH 4	77,81 ± 5,19 ^b	29,55 ± 0,33 ^{a,b}	10,91 ± 0,43 ^b

*Valores referentes a média ± desvio padrão (n=3)

Médias seguidas por letras diferentes (a-g) diferem estatisticamente na mesma coluna (Tukey test a $p < 0,05$).

Fonte: O autor

A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura descreve uma correlação linear clara entre o conteúdo de compostos fenólicos e poder redutor de um extrato vegetal. O estudo realizado por Benzie; Szeto, (1999), determinou o teor de compostos fenólicos totais e o poder redutor de 25 chás de diferentes espécies, verificando-se expressiva correlação linear entre eles ($r: 0,956$). O mesmo pode ser observado no trabalho realizado por Bursal; Koksall (2011), onde o maior valor encontrado para o poder redutor dos extratos de *Rhus coriaria* L. foi o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais.

Os resultados encontrados para os extratos de *E. uniflora* nesse estudo seguem a mesma correlação entre teor de compostos fenólicos totais e poder redutor para os três métodos empregados. Os extratos obtidos em pH 4, por serem os mais ricos em fenólicos, foram mais eficientes, com destaque ao EU2 pH 4, que levou a melhores resultados em ambas as metodologias. Contudo, essa consonância não apresentou correlação linear clara, principalmente para o método FRAP ($r: 0,536$). Este fenômeno pode ser explicado pelo efeito sinérgico entre os ácidos fenólicos e flavonoides, que podem contribuir com mesma intensidade para o poder redutor final. Entretanto, ao se analisar os resultados para o espécime EU2, uma leve diferença no

desempenho dos extratos EU2 pH 8, ricos em agliconas, e EU2 pH 4, ricos em ácidos fenólicos, pode ser observada em relação ao extrato EU2 AcOEt/MeOH, onde ocorreu uma diminuição drástica no poder redutor. Isso indica que os flavonoides glicosilados presentes nos extratos de *E. uniflora* podem influenciar negativamente o poder redutor pelo método FRAP (r: -0.755).

Para o método do fosfomolibdênio e CUPRAC, observou-se uma correlação mais expressiva entre os fenólicos totais e o poder redutor dos extratos (r: 0,846 e r: 0,848). Essa correlação positiva mostra que, em relação ao método de avaliação do poder redutor pela redução do Mo^{6+} a Mo^{5+} e pela redução do Cu(II) a Cu(I) , os ácidos fenólicos contribuem mais fortemente do que os flavonoides. O mesmo fenômeno observado no método FRAP, onde os glicosídeos de flavonoides influenciaram negativamente no poder redutor, se fez verdadeiro para o método do fosfomolibdênio e para o CUPRAC (r: -0,857 e r: -0,523 respectivamente). Verificou-se queda no desempenho dos extratos obtidos em AcOEt/MeOH 30%, que pode ser correlacionado com a provável característica dos flavonoides presentes nesses extratos que são em sua maioria do tipo glicosilados.

5.6 QUELAÇÃO DE FERRO

A presença de metais de transição livres em meio biológico favorece a ocorrência de reações do tipo Fenton, onde o H_2O_2 é transformado em radical hidroxila. O radical OH^{\cdot} formado é extremamente reativo e irá promover a oxidação de biomoléculas. Portanto, a quelação de metais de transição, especialmente o Fe^{2+} , interromperá este processo, evitando o estresse oxidativo (Singh *et al.*, 2019).

A atividade quelante foi avaliada através da capacidade dos compostos presentes nos extratos de *E. uniflora* em inibir a formação do complexo Fe^{2+} -1,10-fenantrolina, de coloração laranja. Nenhum extrato foi capaz de impedir a formação deste complexo, não possuindo capacidade quelante para o Fe^{2+} .

Este resultado foi diferente do reportado por Cunha e colaboradores (2019), que encontrou Cl_{50} de $2430,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para um extrato de pitangueira que contém a quercetina como seu componente majoritário, coletada no horto botânico de Crato, Brasil. Porém, o valor encontrado de Cl_{50} para o controle positivo EDTA foi o mesmo, validando o experimento.

Flavonoides são moléculas com a capacidade quelante reconhecida para uma série de metais (Malesev; Kuntic, 2007; Vlachodimitropoulou; Sharp; Naftalin, 2011). Estudos descrevem essa propriedade como o possível mecanismo pelo qual flavonoides podem atuar como adjuvantes no tratamento de doenças neurodegenerativas (Habibpour Gharacheh *et al.*, 2019). O método mais utilizado para detecção espectrofométrica de flavonoides é através da formação de um complexo com $AlCl_3$.

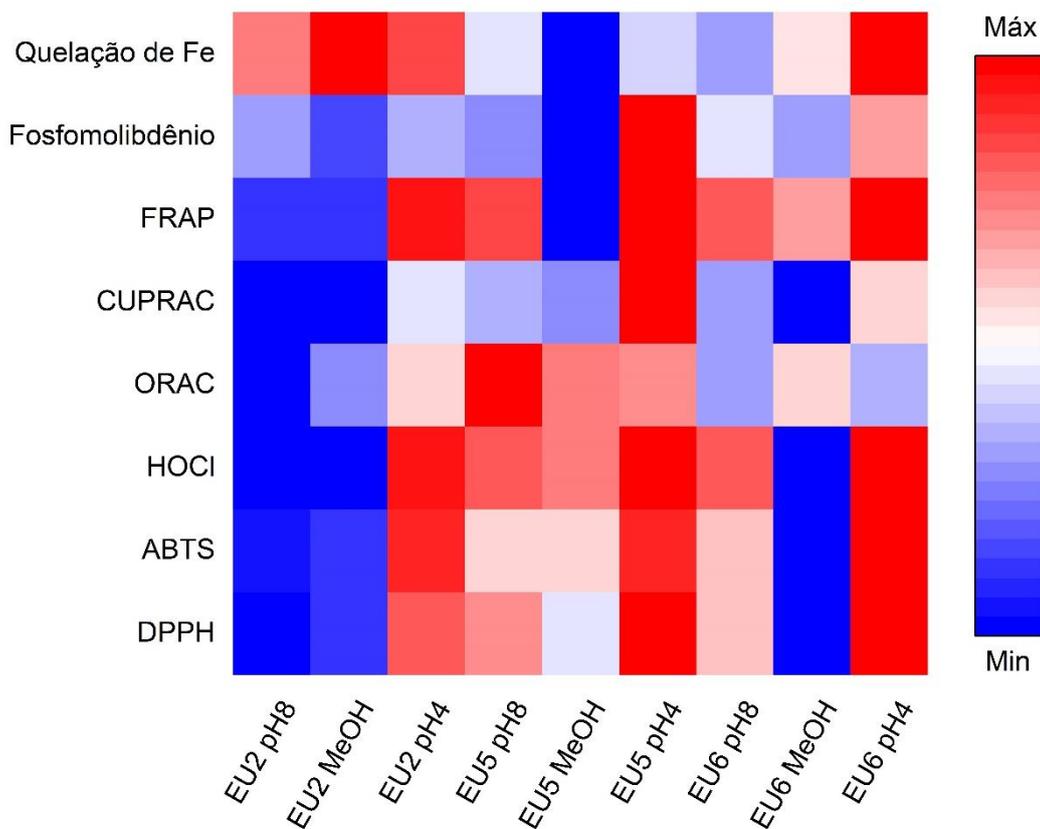
Portanto, a discrepância observada neste estudo pode estar relacionada à característica dos compostos presentes nas folhas de *E. uniflora*, que fornecem evidências de que a quelação de metais não seja o principal mecanismo pelo qual os extratos de *E. uniflora* exerçam sua atividade antioxidante.

5.7 ANÁLISE COMPARATIVA DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DAS TRÊS ÁRVORES

Para possibilitar a comparação entre os espécimes pelo desempenho dos extratos seletivos obtidos e as suas atividades antioxidantes, foi necessária a normalização dos dados. A normalização é utilizada para permitir a comparação de dados de atividade antioxidante com unidades distintas. Após a normalização, os valores antes quantitativos foram reduzidos ao intervalo entre 0 e 1, sendo 0 o menor valor encontrado e 1 o maior valor encontrado para um determinado teste.

Com os dados normalizados, construiu-se um mapa de calor onde, nas linhas verticais, apresentam-se os extratos e, na linha horizontal, os valores, agora normalizados, correspondentes a cada método utilizado (Figura 19, p. 72). Esta metodologia para comparação de dados de atividade antioxidante é descrita na literatura (Guo *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2022).

Figura 19 - Mapa de calor correlacionando os extratos das três árvores e sua atividade antioxidante



Fonte: O autor.

Os dados plotados no mapa de calor vão se apresentar de acordo com a sua coloração, indo do azul ao vermelho, sendo o 0 o azul mais intenso e o 1 o vermelho mais intenso. Isso facilita a visualização das árvores cujos extratos exibiram os melhores e piores desempenhos.

Os extratos obtidos em AcOEt em pH 4 levaram aos melhores resultados para a maioria das metodologias, com exceção ao ORAC. Essa evidência favorece a hipótese de que, em relação aos fenólicos totais, não é notada diferença na composição entre as árvores.

Ao se analisar as frações AcOEt pH 8 e AcOEt/MeOH para as diferentes árvores, verificou-se diferença no desempenho da árvore EU2 em relação às demais. Isso é um indício de diferença entre estas árvores, o que notavelmente ocorre de maneira quantitativa e não qualitativa, como observado nas análises de CLUE-EM e de caracterização dos extratos. Com relação ao método do ORAC, pode-se observar a eficácia superior dos extratos EU2 AcOEt pH 8 e EU2 AcOEt/MeOH, sendo uma evidência do mecanismo pelo qual os flavonoides têm maior influência no

desempenho dos extratos por este método, notável pela diferença na concentração de flavonoides da árvore EU2.

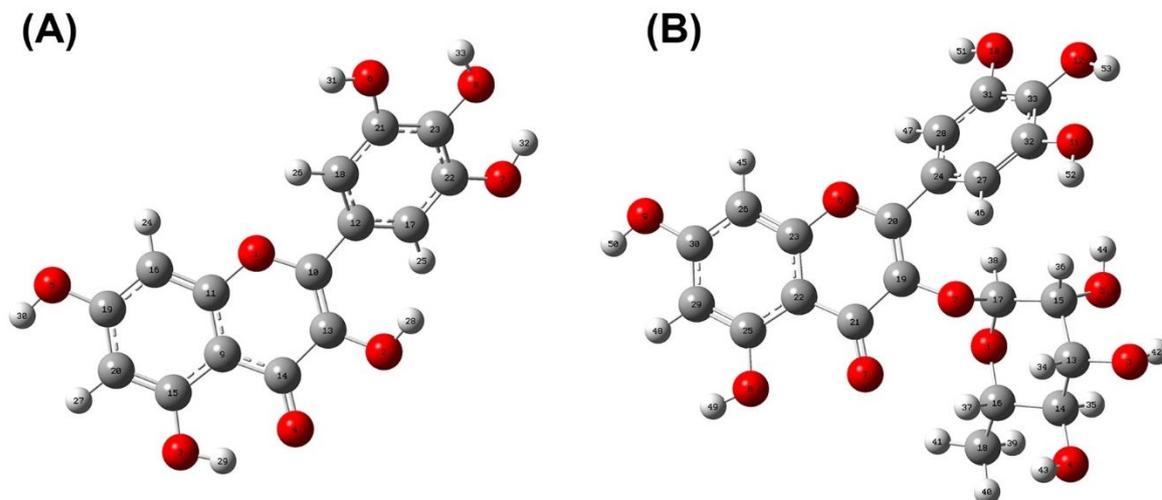
5.8 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

As estruturas analisadas foram selecionadas de acordo com as análises de CLUE-EM que indicaram a presença de flavonoides do tipo glicosilados nos extratos de *E. uniflora*. A visível mudança no padrão de atividade antioxidante observada para as amostras avaliadas indica que características estruturais dos compostos presentes nestes extratos interferem em suas propriedades antioxidantes. Portanto, a avaliação, através da química computacional, das propriedades eletrônicas desses compostos se faz necessária para fortalecer as evidências encontradas.

Os compostos escolhidos para a avaliação computacional foram as agliconas, miricetina, quercetina e kaempferol, onde pode-se avaliar a influência da adição de uma hidroxila no anel B dos flavonoides em suas propriedades eletrônicas. A adição de um glicosídeo, ramnose, foi analisada para as mesmas estruturas, para possibilitar a avaliação da inserção deste grupamento nas propriedades eletrônicas destes flavonoides. O ácido gálico também foi utilizado para avaliação de suas propriedades eletrônicas.

A otimização das estruturas foi realizada para que os cálculos posteriores fossem realizados com o estado estacionário, de menor energia, de cada molécula analisada. A estrutura otimizada da miricetina e da miricetina 3-O-ramnosídeo utilizando DFT/M062X/6-311+G* estão apresentadas na figura 20 p. 74.

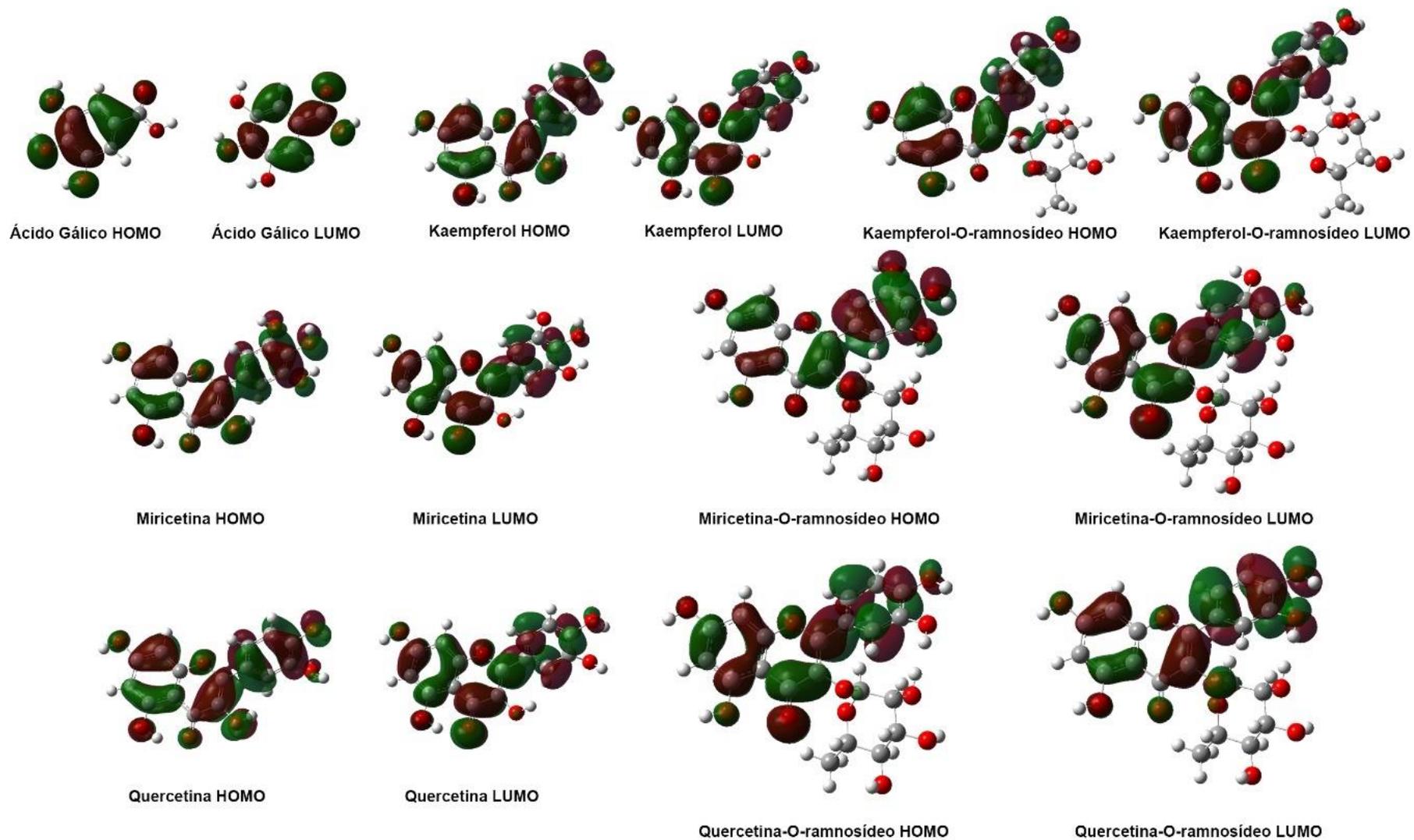
Figura 20: Estrutura otimizada da (A) Miricetina e (B) Miricetina-3-O-Ramnosideo



Fonte: O autor.

A literatura descreve a coplanaridade do esqueleto de um flavonoide como uma característica determinante para a sua atividade antioxidante (Kumar; Pandey, 2013). Conforme observado na figura 20, a adição de uma ramnose à estrutura alterou de maneira expressiva a coplanaridade do flavonoide. A característica planar de um flavonoide contribui para sua atividade antioxidante, promovendo a deslocalização da carga através do alinhamento dos orbitais. Isso favorece a ressonância ao longo de todas as conjugações, o que foi verificado na construção orbitais moleculares HOMO e LUMO para os compostos (Figura 21, p.75).

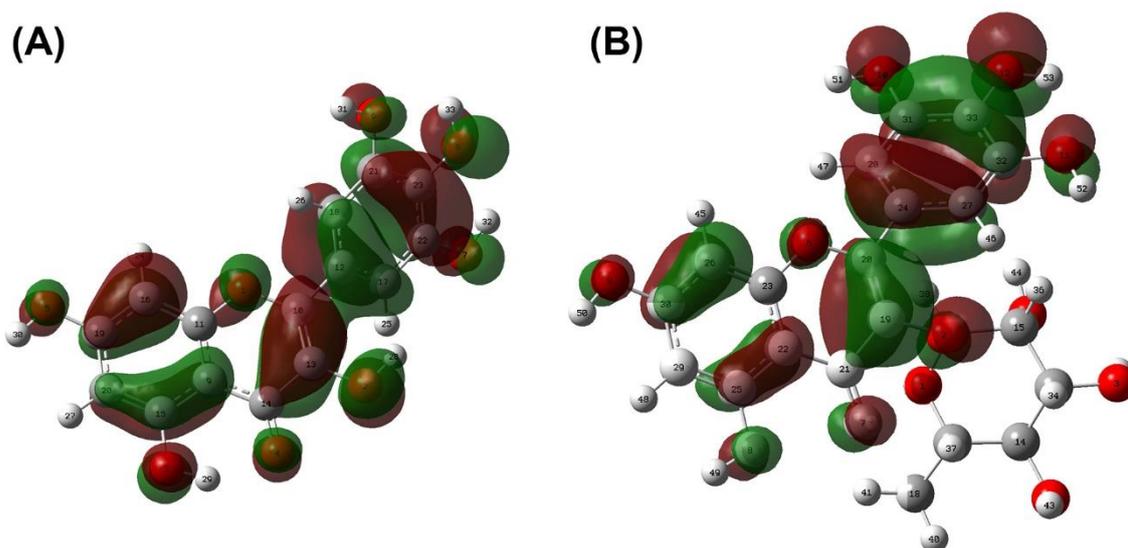
Figura 21: Orbitais HOMO e LUMO para os flavonoides presentes nas folhas de *E. uniflora*.



Fonte: O Autor.

Ao examinar a distribuição do orbital de maior energia HOMO de uma aglicona em comparação ao seu correspondente ramnosídeo, torna-se evidente a sobreposição dos orbitais entre as ligações do grupamento carbonila em C4 com a insaturação em C2 e C3, bem como o anel B dos flavonoides. Essa sobreposição é mais proeminente nas agliconas, tal fenômeno influencia positivamente suas propriedades antioxidantes, como ilustrado na Figura 22. Pode-se observar também, que a adição de um glicosídeo não favorece de maneira alguma a distribuição de energia dos orbitais de fronteira, indicando que ele não influencia positivamente as propriedades eletrônicas destas estruturas.

Figura 22: Superfície dos orbitais HOMO para a (A) Miricetina e (B) Miricetina-3-O-Ramnosídeo.



Fonte: O autor.

Com relação aos valores da energia dos orbitais de fronteira HOMO (Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia) e LUMO (Orbital Molecular Ocupado de Menor Energia), quanto maior for o valor da energia do orbital HOMO, melhor doadora de elétrons será a estrutura. A diferença entre as energias do orbital de menor energia (LUMO) e o orbital de maior energia (HOMO) é chamada de E_{gap} , quanto menor for o E_{gap} , melhor a será a atividade antioxidante da substância (Reza Nazifi *et al.*, 2019). Os valores da energia dos orbitais de fronteira para os compostos avaliados estão descritos na tabela 7, p.77.

Tabela 7: Valores de energia dos orbitais de fronteira, E_{gap} , IP e EA para os compostos.

	HOMO	LUMO	E_{gap}	IP	EA
Ácido Gálico	-7,77	-0,61	7,16	7,77	0,61
Kaempferol	-7,36	-1,17	6,19	7,36	1,17
Kaempferol-3-O-Ramnosideo	-7,61	-1,14	6,47	7,61	1,14
Miricetina	-7,31	-1,19	6,11	7,31	1,19
Miricetina-3-O-Ramnosideo	-7,38	-1,14	6,24	7,38	1,14
Quercetina	-7,36	-1,20	6,16	7,36	1,20
Quercitina-3-O-Ramnosideo	-7,42	-1,12	6,30	7,42	1,12

Fonte: O autor.

A aproximação dos valores de potencial de ionização (IP) e afinidade eletrônica (EA) estão apresentadas na tabela 8, p.78. Um alto valor de IP indica uma baixa tendência da molécula em doar elétrons a uma espécie reativa, tornando-a um antioxidante menos eficaz em comparação com uma molécula que possui valores baixos de IP. Quando o IP é baixo, a doação de elétrons do orbital HOMO desta molécula antioxidante se torna mais favorável, resultando na formação de um radical catiônico (Reis *et al.*, 2007). Quanto melhor for a estabilização do radical catiônico flavonídico formado, mais favorável será a doação de elétrons e, portanto, será um antioxidante mais potente. Esse fenômeno é observado com clareza na miricetina.

Com relação à EA, quanto maior o valor, um elétron será abstraído desta molécula com maior facilidade e doado a uma espécie reativa, tornando-a mais estável. Quando se comparam moléculas com valor de EA baixo, observa-se que essas são menos antioxidantes que moléculas com valor de EA alto (Leopoldini; Russo; Toscano, 2011a; Reza Nazifi *et al.*, 2019). A molécula que apresentou maior valor de EA foi a Quercetina (Tabela 7).

Os valores de dureza (η), moleza (S), potencial químico eletrônico (μ) e índice eletrolítico (Ω) estão apresentados na tabela 8, p.78.

Tabela 8: Valores de dureza (η), moleza (S), potencial químico eletrônico (μ) e índice eletrolítico (Ω) para os compostos

	η	S	μ	Ω
Ácido Gálico	3,58	3,80	-4,19	2,45
Kaempferol	3,09	4,40	-4,26	2,94
Kaempferol-3-O-Ramnosideo	3,24	4,20	-4,37	2,96
Miricetina	3,06	4,45	-4,25	2,96
Miricetina-3-O-Ramnosideo	3,12	4,36	-4,26	2,91
Quercetina	3,08	4,42	-4,28	2,97
Quercitina-3-O-Ramnosideo	3,15	4,32	-4,27	2,89

Fonte: O autor

Moléculas duras possuem valores de η altos e, por consequência, alto valor de E_{gap} . São menos susceptíveis à transferência de carga e, portanto, terão menor propriedade antioxidante. Já moléculas moles, com valores de S altos, possuem valores de E_{gap} baixos e podem facilmente transferir elétrons, capturando espécies reativas (Reis *et al.*, 2007; Reza Nazifi *et al.*, 2019). Os resultados encontrados para estes parâmetros corroboram com os demais, indicando uma atividade antioxidante superior da Miricetina em relação aos outros flavonoides, tanto em agliconas como em glicosídeos.

O potencial químico eletrônico (μ) indica a capacidade de transferência de um elétron de uma área de alto potencial para uma área de baixo potencial. Valores altos de potencial químico eletrônico indicam uma alta capacidade em capturar espécies reativas. O índice de nucleofilicidade (Ω) classifica as moléculas pelo fluxo de elétrons entre uma espécie aceptora de elétrons e uma espécie doadora de elétrons. Compostos com valores baixos de Ω são nucleofílicas e exibem menor potencial antioxidante. Em contraponto, compostos com valores altos de Ω são mais eletrofílicos e exibem maior potencial antioxidante (Mendoza-Wilson; Glossman-Mitnik, 2006; Parr; Szentpály; Liu, 1999). Com relação a estes parâmetros, a quercetina foi o flavonoide que obteve os melhores resultados.

Ao se analisar as propriedades eletrônicas, destaca-se que as agliconas exibem propriedade antioxidante superior em comparação com seus respectivos ramnosídeos. A introdução de uma ramnose na estrutura de um flavonoide resulta na diminuição de sua capacidade de doar elétrons a espécies reativas. A substituição do anel B dos flavonoides por um OH contribuiu positivamente com as propriedades

eletrônicas. Os resultados obtidos por meio da abordagem de química computacional corroboram a observação da atividade antioxidante nos extratos AcOEt pH 8, AcOEt/MeOH 30%, e AcOEt pH 4. Notavelmente, os extratos com teores mais elevados de flavonoides glicosilados tiveram uma performance pior na maior parte dos ensaios, indicando que estes compostos contribuem de maneira menos efetiva para a atividade antioxidante da *E. uniflora*.

6 CONCLUSÃO

As bioatividades atribuídas a pitangueira são, em sua maior parte, atribuídas à atividade antioxidante de seus metabólitos secundários. Porém, devido à variabilidade na composição dos extratos e óleos essenciais, ocasionada por uma série de fatores genotípicos e fenotípicos, a avaliação de espécimes localizados em diferentes ambientes fornece dados que permitem uma atribuição mais precisa da atividade antioxidante da *E. uniflora*.

Ao se avaliar a composição dos óleos essenciais das folhas *E. uniflora*, concluiu-se que os três espécimes apresentaram diferença expressiva tanto na constituição quanto na concentração dos compostos voláteis. Por terem sido coletadas sob as mesmas condições, sugere-se que esta diferença seja causada por características intrínsecas a cada espécime.

A diferença na composição fenólica entre os espécimes, ao contrário do observado nos óleos essenciais, é predominantemente quantitativa, com os compostos presentes em maior abundância no espécime EU2. A prevalência superior de compostos fenólicos e flavonoides no espécime EU2 refletiu em seu melhor desempenho em grande parte dos métodos de avaliação da atividade antioxidante realizados.

Ao se comparar os três extratos seletivos para compostos fenólicos, AcOEt em pH 8, AcOEt/MeOH pH8 e AcOEt em pH 4, pode-se observar a influência que cada classe distinta de compostos fenólicos exerce na atividade antioxidante. Os ácidos fenólicos, abundantes nos extratos AcOEt em pH 4, apresentaram o melhor desempenho tanto na captura de espécies reativas, quanto no poder redutor destes extratos. Os flavonoides glicosilados, abundantes nos extratos AcOEt/MeOH, demonstraram contribuir de maneira menos expressiva na atividade antioxidante da *E. uniflora*, fator que pôde ser justificado por meio da química computacional.

Através da avaliação computacional das propriedades eletrônicas dos flavonoides nos extratos de *E. uniflora*, observou-se que as agliconas demonstraram resultados superiores em comparação aos seus correspondentes ramnosídeos. Isso sugere que os flavonoides glicosilados têm uma capacidade antioxidante potencialmente inferior à de suas respectivas agliconas. A influência da substituição do anel B dos flavonoides também pode ser observada, melhorando o potencial antioxidante a medida em que é substituído por grupamentos hidroxila.

Este trabalho contribuiu com a avaliação do potencial antioxidante da espécie no sentido de fornecer resultados que possam direcionar a coleta do vegetal conforme o interesse em futuras aplicações dos seus extratos. Além disso, demonstrou a influência fenotípica na expressão de seus metabólitos secundários e para a distinção do potencial antioxidantes de flavonoides e glicosídeos de flavonoides.

REFERÊNCIAS

- ABOTALEB, Mariam *et al.* Flavonoids in cancer and apoptosis. **Cancers**, v. 11, n. 1, 2019.
- ALOV, Petko; TSAKOVSKA, Ivanka; PAJEVA, Ilza. Computational Studies of Free Radical-Scavenging Properties of Phenolic Compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 85–104, 2015.
- AMI, Dragan *et al.* SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 827–845, 2007.
- APAK, Reşat *et al.* Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, n. 4, p. 413–419, 2008.
- ASCARI, Jociani *et al.* Selina-1,3,7(11)-trien-8-one and Oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-one from *Eugenia uniflora* Leaf Essential Oil and Their Cytotoxic Effects on Human Cell Lines. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 740, 2021.
- ATANASOV, Atanas G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- BENZIE, Iris F. F.; SZETO, Y. T. Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 633–636, 1999.
- BERGA, Marta *et al.* Flavonoids in the Spotlight: Bridging the Gap between Physicochemical Properties and Formulation Strategies. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 10, p. 1407, 2023.
- BEZERRA, Isabelle C.F. *et al.* Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 92–101, 2018.
- BORGES MONTEIRO, Jessica Raquel *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* and anti-inflammatory properties of *Eugenia uniflora* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.
- BORSOI, Felipe Tecchio *et al.* *Eugenia uniflora* L. seed and pulp extracts: phytochemical profile, cytotoxic potential, antitumoral activity, and α -amylase and α -glucosidase inhibition capacity. **Natural Product Research**, v. 37, n. 22, p. 3862–3867, 2023.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BURSAL, Ercan; GÜLÇİN, İlhami. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1482–1489, 2011.

BURSAL, Ercan; KÖKSAL, Ekrem. Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2217–2221, 2011.

CALIXTO, João B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. suppl 3, 2019.

CAMARGO, L. E. A. *et al.* Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 428–434, 2016.

CAMARGO, Ricardo Botelho *et al.* Reflexões sobre a importância do aporte financeiro para a pesquisa científica brasileira com produtos naturais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e43110515001, 2021.

CAO, Guohua; ALESSIO, Helaine M; CUTLER, Richard G. OXYGEN-RADICAL ABSORBANCE CAPACITY ASSAY FOR ANTIOXIDANTS. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 303–311, 1993.

CASCAES, Márcia Moraes *et al.* Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881–23904, 2015.

CASSIDY, Aedín; MINIHANE, Anne Marie. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 10–22, 2017.

COSTA, Deomar P *et al.* Influence of Fruit Biotypes on the Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Eugenia uniflora* Leaves. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 21, n. 5, p. 851–858, 2010.

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

COSTA, Miriani da; XIMENES, Valdecir Farias; FONSECA, Luiz Marcos da. Hypochlorous Acid Inhibition by Acetoacetate: Implications on Neutrophil Functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1183–1187, 2004a.

COSTA, Miriani da; XIMENES, Valdecir Farias; FONSECA, Luiz Marcos da. Hypochlorous Acid Inhibition by Acetoacetate: Implications on Neutrophil Functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1183–1187, 2004b.

CRIZEL, R.L. *et al.* Abscisic acid and stress induced by salt: Effect on the phenylpropanoid, L-ascorbic acid and abscisic acid metabolism of strawberry fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 152, p. 211–220, 2020.

CUNHA, Francisco A.B. *et al.* Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant mercury chloride. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4197–4203, 2019.

DA COSTA, Jamile S. *et al.* Seasonal and Antioxidant Evaluation of Essential Oil from *Eugenia uniflora* L., Curzerene-Rich, Thermally Produced in Situ. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 328, 2020.

DA CUNHA, Francisco Assis Bezerra *et al.* Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614–621, 2016.

DE OLIVEIRA, Wesley Felix *et al.* Plant Antioxidants and Mechanisms of Action. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 15, n. 10, p. 1103–1115, 2018.

DENEV, Petko *et al.* Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. **Food Chemistry**, v. 157, p. 37–44, 2014.

DOLATABADI, Jafar Ezzati Nazhad; KASHANIAN, Soheila. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1223–1230, 2010.

DZOBO, Kevin. The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. **Comprehensive Pharmacology**, p. 408–422, 2022.

FALCÃO, Tamires Rocha *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 84, 2018.

FELLEGRINI, Nicoletta *et al.* Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Oxidants and Antioxidants Part A**, v. 299, Methods in Enzymology, p. 379–389, 1999.

FIDELIS, Eduarda Monteiro *et al.* Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 103691, 2022a.

FORTES, Gilmara Aparecida Corrêa *et al.* Antioxidant activities of hydrolysable tannins and flavonoid glycosides isolated from *Eugenia uniflora* L. **Records of Natural Products**, v. 9, p. 251–256, 2015.

G DE OLIVEIRA, Fernanda M. *et al.* Characterization of phenolic compounds in *Eugenia uniflora* leaves by ESI(-) FT-ICR MS, analysis of cytotoxic activity on gastric adenocarcinoma (AGS cells), and anti-*Helicobacter pylori* activity. **Natural Product Research**, p. 1–5, 2023.

GEȔOTEK, Agnieszka; SKRZYDLEWSKA, Elżbieta. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid. **Antioxidants**, v. 11, n. 10, p. 1993, 2022.

GONZALES, Gerard Bryan *et al.* Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: A sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. **Drug Metabolism Reviews**, v. 47, n. 2, p. 175–190, 2015.

GRANATO, D; NUNES, D. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas: Uma Abordagem Teórico-Prática**. Elsevier Brasil, 2017.

GÜLCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020.

GUO, Huan *et al.* Structural Characteristics of Crude Polysaccharides from 12 Selected Chinese Teas, and Their Antioxidant and Anti-Diabetic Activities. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1562, 2021.

HABIBPOUR GHARACHEH, Razieh *et al.* Tacrine-Flavonoid Quercetin Hybride as a MTDL Ligand against Alzheimer's Disease with Metal Chelating and AChE, BChE, AChE-induced A β Aggregation Inhibition Properties: A Computational Study. **Physical Chemistry Research**, v. 7, n. 3, p. 561–579, 2019.

HALLIWELL, Barry. How to Characterize a Biological Antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–32, 1990.

HALLIWELL, Barry. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609–1623, 1992.

HEIM, Kelly E; TAGLIAFERRO, Anthony R; BOBILYA, Dennis J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutricional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HERALD, Thomas J; GADGIL, Priyadarshini; TILLEY, Michael. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 11, p. 2326–2331, 2012.

INADA, Kim Ohanna Pimenta *et al.* Jaboticaba berry: A comprehensive review on its polyphenol composition, health effects, metabolism, and the development of food products. **Food Research International**, v. 147, p. 110518, 2021.

JOVITO, Vanessa De Carvalho *et al.* *Eugenia uniflora* dentifrice for treating gingivitis in children: Antibacterial assay and randomized clinical trial. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 4, p. 387–392, 2016.

KARIMOVA, Natalia V. *et al.* Absorption Spectra and the Electronic Structure of Gallic Acid in Water at Different pH: Experimental Data and Theoretical Cluster Models. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 126, n. 2, p. 190–197, 2022.

KATTOOR, Ajoe John *et al.* Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, p. 42, 2017.

KOHN, W.; BECKE, A. D.; PARR, R. G. Density Functional Theory of Electronic Structure. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 31, p. 12974–12980, 1996.

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013b.

LEOPOLDINI, Monica; RUSSO, Nino; TOSCANO, Marirosa. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011a.

LIPINSKI, Boguslaw. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

LOSADA-BARREIRO, Sonia *et al.* Biochemistry of Antioxidants: Mechanisms and Pharmaceutical Applications. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, 2022.

MALESEV, Dusan; KUNTIC, Vesna. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 10, p. 921–939, 2007.

MENDOZA-WILSON, Ana María; GLOSSMAN-MITNIK, Daniel. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (–)-epicatechin related to their antioxidant ability. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 761, n. 1–3, p. 97–106, 2006.

MIERZIAK, Justyna; KOSTYN, Kamil; KULMA, Anna. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240–16265, 2014.

MIGUES, Ignacio *et al.* Phenolic Profiling and Antioxidant Capacity of *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) Samples Collected in Different Uruguayan Locations. **Foods**, v. 7, n. 5, p. 67, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da Espécies *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira)**. Brasília, Brasil, 2015.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; WITKOWSKA, Anna Maria; ZUJKO, Małgorzata Elżbieta. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.

MUKAKA, M M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi medical journal: the journal of Medical Association of Malawi**, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NÚÑEZ, Jisette González *et al.* Antineoplastic potential of the aqueous crude extract of *Eugenia uniflora* L. in human cervical cancer. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 2, 2018.

ORIGINPRO, VERSION 2023B. ORIGINLAB CORPORATION, NORTHAMPTON, MA, USA. [S. l.: s. n.], [s. d.].

PANDEY, Kanti Bhooshan; RIZVI, Syed Ibrahim. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009.

PANDITHAVIDANA, Dinesh R.; HEWAGE, Kushani S. K. Antioxidant Potential of Novel Designed Phenolic Derivatives: Computational Insights. **Chemistry & Chemical Technology**, v. 14, n. 4, p. 448–454, 2020.

PARR, Robert G.; SZENTPÁLY, László v.; LIU, Shubin. Electrophilicity Index. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 9, p. 1922–1924, 1999.

PERIN, Ellen Cristina *et al.* Mineral content and antioxidant compounds in strawberry fruit submitted to drought stress. **Food Science and Technology**, v. 39, n. suppl 1, p. 245–254, 2019.

PIZZINO, Gabriele *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

PRIETO, Pilar; PINEDA, Manuel; AGUILAR, Miguel. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–341, 1999.

PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

RAMALHO, Ruver Rodrigues Feitosa *et al.* Variability of polyphenols and volatiles during fruit development of three pitanga (*Eugenia uniflora* L.) biotypes. **Food Research International**, v. 119, p. 850–858, 2019.

RATTMANN, Yanna D. *et al.* Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

REIS, Mauro *et al.* A theoretical study of phenolic compounds with antioxidant properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 440–446, 2007.

REZA NAZIFI, S. Mohamad *et al.* Antioxidant properties of *Aloe vera* components: a DFT theoretical evaluation. **Free Radical Research**, v. 53, n. 8, p. 922–931, 2019.

SABER, Fatema R. *et al.* Family Myrtaceae: The treasure hidden in the complex/diverse composition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–19, 2023.

SAMY, Mamdouh *et al.* Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, v. 7, p. 37–47, 2014.

SANTOS, Rosa M. *et al.* Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 581–586, 2011.

SCHUMACHER, Nayara *et al.* Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). **Antioxidants**, v. 4, n. 4, p. 662–680, 2015.

SILVA, Mauro *et al.* Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of Cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using Paper Spray Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

SIMÕES, Cláudia M O *et al.* **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, Anju *et al.* Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1583, 2019.

SOBEH, Mansour *et al.* A Polyphenol-Rich Fraction from *Eugenia uniflora* Exhibits Antioxidant and Hepatoprotective Activities In Vivo. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 5, p. 84, 2020a.

SOBEH, Mansour *et al.* Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 240, p. 111939, 2019a.

SOBRAL DE SOUZA, Celestina Elba *et al.* LC–MS characterization, anti-kinetoplastide and cytotoxic activities of natural products from *Eugenia jambolana* Lam. and *Eugenia uniflora*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 9, p. 836–841, 2017.

SONG, Yaru *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activities of jujubes (*Ziziphus jujuba* Mill.): effect of blackening process on different cultivars. **International Journal of Food Properties**, v. 25, n. 1, p. 1576–1590, 2022.

SOUZA, Patricia *et al.* TANINOS E FLAVONOIDES DAS FLORES DE *Eugenia uniflora* (MYRTACEAE). **Química Nova**, 2022.

SU, Xin-Zhuan; MILLER, Louis H. The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 11, p. 1175–1179, 2015.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VEKIC, Jelena *et al.* Oxidative Stress, Atherogenic Dyslipidemia, and Cardiovascular Risk. **Biomedicines**, v. 11, n. 11, p. 2897, 2023.

VLACHODIMITROPOULOU, Evangelia; SHARP, Paul A.; NAFTALIN, Richard J. Quercetin–iron chelates are transported via glucose transporters. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 8, p. 934–944, 2011.

WEYERSTAHL, P. *et al.* Volatile Constituents of *Eugenia uniflora* Leaf Oil. **Planta Medica**, v. 54, n. 06, p. 546–549, 1988.

WILLIAMS, Robert J.; SPENCER, Jeremy P.E.; RICE-EVANS, Catherine. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838–849, 2004.

XIAO, Jianbo. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 1874–1905, 2017.

ZUO, L. *et al.* Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. **Acta Physiologica**, v. 214, n. 3, p. 329–348, 2015.