UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ‘ELISEU MACIEL’
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Tese

Extração e caracterização de compostos fitoquímicos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira)

Lucíola Bagatini

Pelotas, 2021.

Lucíola Bagatini

Extração e caracterização de compostos fitoquímicos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira)

Documento apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel' da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientação: Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Pelotas, 2021

B144 Bagatini, Lucíola.
Extração e caracterização de compostos fitoquímicos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira.Lucíola Bagatini. - 2021.
168 p.: il.;

Orientador: Cesar Valmor Rombaldi.
Inclui bibliografias.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2021.

1. Plantas frutíferas nativas. 2. Genética vegetal. 3. Química vegetal I. Bagatini, Lucíola. II. Rombaldi, Cesar Valmor. III. Universidade Federal de Pelotas. IV. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. V. Título.

CDD.581.192

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Marilene dos Santos Franceschi CRB-14/812

Lucíola Bagatini

Extração e caracterização de compostos fitoquímicos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira)

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel' da Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 10 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

.....

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi (UFPel - FAEM/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos)

.....

Prof. Dr. Alexander Junges (URI- Erechim/ Departamento de Engenharia de Alimentos)

.....

Profa. Dra. Vanessa Galli (UFPel - FAEM/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos)

.....

Profa. Dra. Aniela Pinto Kempka (UDESC/ Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química)

.....

Profa. Dra. Jessica Fernanda Hoffmann (Universidade do Vale do Rio dos Sinos)

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Universidade do Estado de Santa Catariana por, entre outras, me conceder a oportunidade de qualificação profissional.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, por possibilitar a realização de experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPEL pelos ensinamentos e pela troca de experiências.

Meu agradecimento muito especial ao orientador, professor César Valmor Rombaldi, pela orientação, paciência, pelo seu exemplo profissional e por todos os ensinamentos.

Ao professor Alexander Junges e professora Eunice Valduga pela orientação e acolhida.

À professora Francieli Moro Stefanello, Jessica Fernanda Hoffmann e Juliane de Souza Cardoso pela colaboração e parceria no trabalho.

Aos colegas de laboratório da URI, Natália, Bruno e Renan pela colaboração no trabalho.

Aos meus colegas do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina pelo apoio e incentivo.

Às colegas e amigas Aniela e Liziane pelo apoio, incentivo constante e amizade.

À Giovana pela parceria de trabalho e pela amizade.

Ao Rodrigo Franzon da Embrapa Clima Temperado pelas amostras concedidas.

À ADV Sementes de Chapecó por ter, gentilmente, cedido o espaço para realização de experimentos.

Ao João Paulo e Helena pela paciência e por compreenderem cada uma das minhas ausências.

A todos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

BAGATINI, Lucíola. **Extração e caracterização de compostos fitoquímicos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira).** 2021. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

O Brasil possui a maior diversidade e variabilidade genética vegetal do planeta, destacando-se a diversidade de plantas frutíferas nativas como é o caso da família *Myrtaceae*. A maioria dessas plantas apresenta potencial para domesticação, com perspectivas para uso nas indústrias alimentícia e/ou farmacêutica. Os frutos de algumas espécies como a guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora*) tem sido amplamente estudados, especialmente quanto as suas atividades biológicas, ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. No entanto, poucos são os estudos realizados com fins de explorar as atividades biológicas das folhas destas espécies. É conhecido que o método de obtenção dos extratos interfere na sua composição e qualidade e a extração com líquido pressurizado (PLE), apresenta algumas vantagens com relação a outros métodos, como rapidez, menor consumo de solventes e alto rendimento, sendo uma alternativa para extração e fracionamento de produtos naturais. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi a obtenção de extratos por diferentes métodos (PLE e infusão aquosa (AI)), identificar e quantificar os compostos, e estudar a atividade antioxidante, antimicrobiana e alelopática das folhas de pitangueira e guabirobeira. As folhas dessas espécies foram coletadas nos pomares da Embrapa Clima Temperado em Pelotas, RS, foram secas em estufa com circulação de ar (72 h a 40 ºC) e moídas em um moinho de facas (30 mesh). Posteriormente foram submetidas ao processo de extração por líquido pressurizado utilizando-se os seguintes solventes: água destilada (PLE-W), etanol (PLE-E) e a mistura (1:1) de água destilada e etanol (PLE-W:E). Os extratos e a infusão aquosa das folhas foram submetidas a análises de compostos por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) análise por LC-MS. Os extratos das folhas de pitangueira foram avaliados quanto a atividade antioxidante através do ensaio com leveduras e em ensaios *in vitro* de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) além da avaliação da atividade antimicrobiana e alelopática. Os extratos de folhas de guabirobeira foram avaliados quanto a atividade antioxidante através do ensaio com leveduras e em ensaios *in vitro* de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) e atividade antimicrobiana (Agar Difusion Disc e CIM mg mL^{-1}). Quanto aos extratos de folhas de pitangueira observou-se que o extrato PLE-W:E foi o que apresentou a maior concentração de ácido fenólico e taninos, enquanto o PLE-E apresentou maior concentração de flavonoides. Todos os extratos proporcionaram ação antioxidante de proteção na sobrevivência células para *Saccharomyces cerevisiae*. Apenas os extratos obtidos por PLE apresentaram atividade protetora das células de cérebro de rato utilizando TBARS. Para ROS os extratos obtidos por AI e PLE, em todas as concentrações testadas, apresentaram efeito protetor nas células, assim como, atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, e atividade alelopática para sementes de alface. As folhas da guabirobeira apresentaram diversos compostos fitoquímicos, dos quais os flavonóides foram os mais abundantes e o PLE-W:E foi o extrato que apresentou maior

concentração total destes compostos. PLE-W apresentou maior concentração dos ácidos fenólicos e taninos. Todos os extratos obtidos com PLE apresentaram atividade protetora das células de cérebro de rato utilizando TBARS e atividade antimicrobiana, no entanto, AI não teve ação. Com ROS, os extratos PLE e AI apresentaram efeito protetor nas células de cérebro de rato e PLE-W:E na concentração 100 µg mL^{-1}, foi o mais promissor apresentando ação superior ao padrão ácido ascórbico (AA). PLE-W:E apresentou maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As folhas de pitangueira e guabirobeira são uma fonte potencial de compostos bioativos, no entanto, mais estudos são necessários, para explorar as propriedades protetoras *in vitro* e *in vivo* dos extratos, especialmente testes de citotoxicidade.

Palavras-chaves: Espécies nativas; *Myrtaceae;* extração com líquido pressurizado; compostos fitoquímicos; antioxidante; antimicrobiana; alelopático

ABSTRACT

BAGATINI, Lucíola. **Extraction and characterization of phytochemical compounds from leaves of *Campomanesia xanthocarpa* (guabirobeira) and *Eugenia uniflora* (pitangueira).** 2021. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

Brazil has the greatest plant diversity and genetic variability on the planet, highlighting the diversity of native fruit plants such as the *Myrtaceae* family. Most of these plants have potential for domestication, with prospects for use in the food and / or pharmaceutical industries. The fruits of some species such as guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) and pitangueira (*Eugenia uniflora*) have been widely studied, especially regarding their biological activities, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory action. However, few studies have been carried out to explore the leaf contents of these species. It is known that the method of obtaining the extracts interferes in its composition and quality and the extraction with pressurized liquid (PLE), presents some advantages over other methods, such as speed, less solvent consumption and high yield, being an alternative for extraction and fractionation of natural products. In this sense, the objective of this work was to obtain extracts by different methods (PLE and AI), to identify and quantify the compounds, and to study the antioxidant, antimicrobial and allelopathic activity of the leaves of pitangueira and guabirobeira. The leaves of these species were collected in the orchards of Embrapa Clima Temperado in Pelotas, RS, were dried in an oven with air circulation (72 h at 40 ºC) and ground in a knife mill (30 mesh). Subsequently, they were submitted to a pressurized liquid extraction process (pressure of 1500 psi, temperature 50 ° C, 15 g of sample, solvent discharge flow of 2 mL per minute, with static extraction of 30 minutes). For the extractions, the following solvents were used: distilled water (PLE-W), ethanol (PLE-E) and the mixture (1:1) of distilled water and ethanol (PLE-W: E). Afterwards, the extracts were dried by oven (vacuum 50 °C) and lyophilization. The extracts and the aqueous infusion of the leaves (1:50 m/v of dried leaves and ground in water 80 ±1 ° C for 10 min) were subjected to compound analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) LC-MS analysis. The extracts of the leaves of pitangueira were evaluated for antioxidant activity through the assay with yeasts and in in vitro assays of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) and reactive oxygen species (ROS) in addition to the evaluation of the antimicrobial activity (Agar Difusion Disc and MIC mg mL^{-1}) and allelopathic. The extracts of guabirobeira leaves were evaluated for antioxidant activity through the assay with yeasts and in in vitro tests of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) and reactive oxygen species (ROS) and antimicrobial activity (Agar Difusion Disc and MIC mg mL^{-1}). As for extracts of pitangueira leaves, it was observed that PLE-W: E extract had the highest concentration of phenolic acid and tannins, while PLE-E had the highest concentration of flavonoids. All extracts provided antioxidant protective action on cell survival for Saccharomyces cerevisiae. Only extracts obtained by PLE showed protective activity of rat brain cells using TBARS. For ROS, the extracts obtained by AI and PLE, in all concentrations tested, showed a protective effect on the cells, as well as antibacterial activity against Gram-positive bacteria, and allelopathic activity for lettuce seeds. The leaves of guabirobeira presented several phytochemicals, of which flavonoids were the most abundant and PLE-W: E was the extract that presented the highest total concentration of these compounds. PLE-W

showed a higher concentration of phenolic acids and tannins. All extracts obtained with PLE showed protective activity of rat brain cells using TBARS and antimicrobial activity, however, AI had no action. With ROS, the extracts PLE and AI showed a protective effect on rat brain cells and PLE-W:E in the concentration 100 µg mL^{-1}, it was the most promising, presenting an action superior to the AA standard. PLE-W: E showed greater antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Pitangueira and guabirobeira leaves are a potential source of bioactive compounds, however, further studies are needed to explore the protective properties in vitro and in vivo of the extracts, especially cytotoxicity tests.

Keywords: Native species; *Myrtaceae;* extraction with pressurized liquid; phytochemical compounds; antioxidant; antimicrobial; allelopathic

Lista de Figuras

Figura 1. Folhas e Frutas de Pitangueira.....21
Figura 1. Folhas e Frutas de Guabirobeira.....23
Figura 3. Gráfico esquematizado de Tempo e Rendimento de um processo de extração..... 30
Figura 4. Etapas de desenvolvimento do trabalho..... 45
Figura 5. Diagrama esquemático da unidade de extração com liquido pressurizado 47
Figura 6. Unidade PLE - URI..... 48
Figura 7. Folhas secas e moídas. 58
Figura 8. Frasco para recolhimento da amostra no processo de extração por PLE. 58
Figura 9. Placa de análise microbiológica das amostras. 64
Figura 10. Placas usadas para análise do potencial alelopático dos extratos 65

Lista de tabelas

Tabela 1- Delineamento experimental do estudo I.....46

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA	Ácido Ascórbico
ABTS	2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AI	Infusão aquosa
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Poder antioxidante de redução do íon férrico
H_2O	Água
HPLC	High Performance Liquid Chromatography-High Resolution
IC	Controle induzido
LPS	Lipopolissacarídeo
m/z	Razão da massa pela carga
MS	Espectrômetro de massas
MS^n	Perfil de fragmentação do composto
NO	Óxido nítrico
Nº	Número
ORAC	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
PCA	Análise de componentes principais
PLE	Extração por Líquido Pressurizado
PLE-E	Extração com líquido pressurizado usando Etanol como solvente
PLE-W	Extração com líquido pressurizado usando água como solvente
PLE-W:E	Extração com líquido pressurizado usando Etanol e água como solventes
PLS-DA	Análise discriminante por quadrados mínimos parciais
Q	Quadrupolo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TEBARS	Ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TOF	Tempo de voo
TR	Tempo de retenção
$UFC.mL^{-1}$	Unidade formadora de colônia por Ml
URI	Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
µM	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. HIPÓTESES.....17
2.1 Na etapa da pesquisa descritiva 17
2.2 Na etapa de pesquisa experimental 17
3. OBJETIVOS 18
3.1 Objetivo geral 18
3.2 Objetivos específicos 18
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
4.1 Espécies Nativas.....19
4.1.1 Pitanga 19
4.1.2 Guabiroba.....21
4.2 Compostos Fitoquímicos 23
4.4. Extração de Compostos Bioativos.....26
4.4.1 Extração por Líquido Pressurizado 27
4.4.2 Cinética de Extração 29
4.4.3 Infusão.....31
4.5 Atividade Alelopática 32
5. PROJETO DE PEQUISA.....34
6. RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO 57
7. ARTIGO 1: Caracterização de compostos fenólicos de extratos de folhas de *Eugenia uniflora* e suas atividades antioxidante, antibacteriana e alelopática. 68
8. ARTIGO 2: Composição fitoquímica, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos da folha de Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*).....115
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS 144
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 147

1. INTRODUÇÃO

Extratos de plantas como fontes de compostos bioativos é um tema que tem despertado o interesse científico atual. Diversos estudos têm sido desenvolvidos nessa área, visando, especialmente, otimizar os processos de extração (RODRIGUES et al., 2020; KIM & LIM, 2020), investigar a presença dos compostos e o putativo potencial bioativo (ZANDONÁ et al., 2020, DE LIMA et al., 2020; GIOMBELLI et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020), bem como os potenciais benefícios à saúde (SOBEH et al, 2020; MEIRA et al., 2020) e/ou a aplicação em tecnologia de alimentos (LORENZO et al., 2018).

O Brasil caracteriza-se como um dos principais centros de diversidade e variabilidade genética vegetal do planeta (ARAUJO et al., 2019; REISSIG & ROMBALDI, 2017), representada por plantas nativas que têm sido cada vez mais apreciadas e estudadas (HOFFMANN et al., 2018; PEREIRA et al., 2018(a)), especialmente por apresentarem compostos de interesse nutricional, funcional e tecnológico. Toda essa diversidade vegetal se distribui nos biomas Pampa, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônico (REISSIG & ROMBALDI, 2017, PEREIRA et al., 2012). De modo geral, o bioma mais pautado e reconhecido internacionalmente, é o Amazônico (PEREIRA et al., 2012), no entanto as particulares características de cada um têm sua importância e relevância científica e muitas espécies têm despertado o interesse científico e tecnológico nos cenários nacional e internacional (LAZARINI et al., 2020; SOBEH et al., 2020; CASTRO et al., 2020).

No caso específico dessa pesquisa, o foco está em espécies presentes em vários desses biomas, mas mais concentradas no Bioma Pampa. Está-se tratando de espécies da família Myrtaceae, representada por 43 espécies (BRACK et al, 2020). A maioria dessas plantas apresenta potencial para domesticação, com perspectivas para uso nas indústrias alimentícia e/ou farmacêutica (DACOREGGIO, MORONI, KEMPKA, 2019; DE LIMA et al., 2020; MEIRA et al., 2020; ZANDONÁ et al., 2020). A seguir, faz-se um breve descritivo dessas espécies.

A Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*), pertencente à família botânica da Myrtaceae, é uma árvore nativa do sul do Brasil (PEREIRA et al., 2015), seus frutos têm poucas sementes e possuem sabor cítrico, às vezes pungente. Extratos obtidos das folhas de guabirobeira são ricos em compostos fenólicos (SANT'ANNA et al., 2017; KATAOKA & CARDOSO, 2013) e são usadas empiricamente por seu efeito potencial na redução de níveis de colesterol no sangue (KLAFKE et al., 2016; VIECILI *et al*., 2014). Ademais, destacam-se, também, as atividades antioxidante e antibacteriana (PEREIRA et al., 2018(b); KLAFKE et al. 2016; CZAIKOSKI et al., 2015) desses extratos, redução de processos inflamatórios (VIECILI et al., 2014), perda de peso (DICKEL et al., 2007), potencial antidiabético (VINAGRE et al., 2010; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012), tratamento de úlceras gástricas (MARKMAN, BACCHI E KATO, 2004) e efeito antiplaquetário (OTERO et al*.,* 2017).

A pitangueira, também pertencente à família botânica Myrtaceae, ocorre em todo o território nacional. A polpa dos frutos é rica em cálcio, fósforo e compostos potencialmente bioativos como as antocianinas, flavonoides e carotenoides (MASSARIOLI et al*.,* 2013; MOURA et al*.,* 2011). Os extratos obtidos a partir das folhas de pitangueira apresentam em sua composição, antocianinas, flavonoides, taninos e compostos fenólicos (LORENZONI et al., 2013; FIUSA et al., 2008) e apresentam diversas ações biológicas como, por exemplo, ação antimicrobiana (MENDONÇA et al., 2016; LORENZO et a*l*., 2018), atividade antioxidante (SCHUMACHER et al., 2015; LORENZO et al., 2018; VINHOLES et al., 2017), anti-inflamatória (SCHUMACHER et al., 2015; SOARES et al., 2014) e efeito anti-hiperglicêmico (CARDOSO et al., 2017; SOBEH et al, 2020).

Sabe-se que a forma de obtenção dos extratos determina a composição, qualidade e funcionalidade, já que interfere nos compostos extraídos e na concentração (MARTINEZ-CORREA et al., 2011). Nessa perspectiva, a extração com líquido pressurizado (PLE), técnica baseada na utilização de solventes líquidos em temperatura e pressão elevadas, tem demonstrado boa eficiência e confiabilidade quando comparadas com as técnicas tradicionais (CARABIAS-MARTÍNEZ et al*.*, 2005; MUSTAFA E TURNER, 2011; WIJNGAARD et al*.*, 2012; JUSOH et al*.,* 2019), uma vez que as condições de extração permitem um aumento da solubilidade e das propriedades de transferência de massa (MUSTAFA & TURNER, 2011; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; NASTIC et al., 2018 (a)). Essa é considerada uma tecnologia

mais ecológica, em comparação com as técnicas convencionais, já que se caracteriza por ser uma extração com maior rapidez, menor consumo de solvente e menor produção de resíduos tóxicos e poluentes (ANDRADE et al, 2017; MUSTAFA & TURNER, 2011). Ademais, a extração com líquido pressurizado (PLE) tem se destacado como mais adequada para a extração de compostos fenólicos (KOÇAK & PAZIR, 2018).

Desse modo, objetivou-se com este trabalho, prospectar os compostos químicos presentes nas folhas guabirobeira e pitangueira, utilizando-se PLE como método de extração, tanto para o conhecimento dessas espécies nativas, como para verificar o potencial bioativo e proposição de aplicação em alimentos, fármacos entre outros.

Trata-se de uma pesquisa descritiva e experimental. Ela tem a característica descritiva por buscar descrever o perfil fitoquímico dos extratos. Em seguida, assume a característica experimental, ao comparar os métodos de extração e, a partir do conhecimento das respectivas concentrações de compostos fitoquímicos, propor possíveis respostas biológicas.

2. HIPÓTESES

2.1 Na etapa da pesquisa descritiva

Trata-se de uma pesquisa tipicamente com a característica descritiva e de bioprospecção. Nesse caso, a emissão de hipótese não é pertinente, tendo em vista que não se tem, a priori, uma potencial explicação para um fenômeno, tampouco se tem elementos científicos para antecipar um provável resultado, seja no que tange à composição, seja em relação a potenciais propriedades, se não aquelas de conhecimento empírico-popular.

2.2 Na etapa de pesquisa experimental

Quando testaram-se as condições de extração e de estudo das principais respostas, as hipóteses eram:

a) Se espera que o uso de PLE, com a associação dos solventes água e etanol, se espera uma maior diversidade e concentração de compostos fitoquímicos; e,
b) pela diversidade de compostos fitoquímicos polares nos extratos obtidos por PLE, se espera obter respostas biológicas de interesse em alimentos e numa perspectiva de saúde.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter extratos por diferentes métodos, identificar e quantificar os compostos, e estudar a atividade antioxidante, antimicrobiana e alelopática das folhas de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e pitangueira (*Eugenia uniflora*).

3.2 Objetivos específicos

1) Obter extratos a partir de folhas guabirobeira e pitangueira, através dos métodos de extração por PLE e por infusão em água;
2) caracterizar os extratos obtidos por PLE e infusão aquosa através da análise dos compostos fitoquímicos;
3) avaliar a atividade antioxidante, alelopática e antimicrobiana dos extratos; e,
4) prospectar, a partir da composição dos extratos, possibilidades de aplicação dos mesmos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Espécies Nativas

O Brasil é conhecido por ter a maior diversidade e variabilidade genética vegetal no planeta. Em estudo realizado por Brack et al, (2020) sobre espécies nativas do Rio Grande do Sul, foram encontradas 213 espécies consideradas frutíferas, englobando 48 famílias e 102 gêneros e, dentre as famílias com maior número de espécies, destaca-se a Myrtaceae com 43 espécies. Muitas dessas espécies frutíferas têm potencial de domesticação e / ou utilização desde o consumo direto (frutas frescas) ou processadas até a utilização de extratos vegetais na indústria cosmética, farmacêutica e nutricional (ARAÚJO *et al*., 2019; CARDOSO et al., 2018; MEDINA et al., 2011; REISSIG & ROMBALDI, 2017).

4.1.1 Pitanga

A pitangueira (*Eugenia uniflora*) pertence à família Myrtaceae e é encontrada desde o Brasil Central até o norte da Argentina. Apresenta-se como uma árvore de copa estreita, de tronco liso de cor pardo-clara, cuja altura pode atingir entre 4 a 5 m, podendo, raramente, alcançar 8 a 12 m. As folhas são descritas como simples, cartáceas, com comprimento de 3 a 7 cm. Os frutos são do tipo drupa, globosos e sulcados, de cor vermelha, amarela ou preta, com polpa carnosa de sabor equilibrado entre doce e ácido, contendo 1 a 2 sementes (Figura 1). Podem ser consumidos *in natura* ou utilizados para o processamento, principalmente para o preparo de polpas e sucos (FRANZON, 2013).

A polpa dos frutos é rica em cálcio, fósforo (MOURA et al*,* 2011) e compostos potencialmente bioativos como compostos fenólicos, antocianinas, flavonóis e carotenóides (BASTOS 2019; GARMUS, 2014; LORENZONI, et al., 2013; MOURA et al, 2011), apresentando capacidade antioxidante (BAGUETI et al., 2011, LIMA, MELO & LIMA, 2002), e potencial efeito anti-hiperglicêmico, anti-hiperlipidêmico, efeito tipo antidepressivo (OLIVEIRA et al., 2017) e anti-inflamatório (SOARES et al, 2014).

As folhas da pitangueira, assim como relatado para as folhas de guabirobeira, são utilizadas na medicina popular sendo relatados efeitos como ação hipotensora,

anti - diarreica, diurética, antigotosa e hipoglicemiante (BASTOS, 2019; AURICCHIO & BACCHI, 2003). Os extratos obtidos a partir das folhas de pitangueira apresentam em sua composição, antocianinas, flavonoides, taninos e compostos fenólicos, (LORENZONI et al., 2013; FIUSA et al., 2008), dos quais os majoritários são o kaempferol e a quercetina (SOBEH et al., 2020; MASSARIOLI et al., 2013). No entanto, a forma de obtenção dos extratos interfere na sua composição e, consequentemente, na sua funcionalidade (MARTINEZ-CORREA et al., 2011).

Figura 1. Folhas e Frutas de Pitangueira (*Eugenia uniflora*)
Fonte: Foto de Julcéia Camillo em BEZERRA et al., 2020.

Os extratos da folha de pitangueira apresentam ação antimicrobiana (MENDONÇA et al., 2016; LORENZO et al., 2018; COUTINHO et al, 2010), contra bactérias patogênicas destacando-se cepas de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli e Pseudomonas sp* (MENDONÇA et al., 2016), apresentando potencial de aplicação em produtos alimentícios (LORENZO et al., 2018). Estudos também relatam outras atividades biológicas, como, por exemplo, a atividade antioxidante (KADE et al., 2008; SCHUMACHER et al., 2015; LORENZO et al., 2018; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; VINHOLES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2015), anti-inflamatória (SCHUMACHER et al., 2015; SOARES et al., 2014), efeito anti-hiperglicêmico (OLIVEIRA et al., 2017; CARDOSO et al., 2017; SOBEH et al., 2020) e possível terapia adjuvante para doenças renais (MEIRA et al., 2020). Além dos

extratos, o óleo essencial extraído das folhas também tem demonstrado diversas atividades como ação antioxidante (DA COSTA et al., 2020; VICTORIA et al., 2012), antimicrobiana (VICTORIA et al., 2012) e antidepressiva (VICTORIA et al., 2013; DA COSTA et al., 2020).

Sabe-se que as propriedades biológicas atribuídas a essas espécies dependem da composição dos extratos, o que, por sua vez, está relacionado com fatores atribuídos à própria espécie, ao ambiente e ao método e parâmetros utilizados na extração. Por esse motivo esse trabalho busca investigar potencialidades dos extratos obtidos das folhas dessas plantas com método usando elevada pressão de solvente e comparado com a infusão que é um método tradicional de uso.

4.1.2 Guabiroba

A guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O.Berg) é uma espécie nativa do sul do Brasil pertencente a família Myrtaceae (PEREIRA et al., 2015). Pode ser encontrada em diversos estados do Brasil, desde Minas Gerais, se estendendo para São Paulo, Mato Grosso do sul chegando ao Rio grande do Sul (LORENZI, 1992). Sendo observada também na Argentina, Bolívia e Paraguai (TODA FRUTA, 2020).

É uma árvore de pequeno a médio porte com 5 a 8 metros de altura com período de frutificação ocorrendo de setembro a dezembro, podendo se estender até fevereiro. Apesar da pouca exploração industrial e comercial dessa planta, seus frutos que possuem poucas sementes, sabor cítrico e são bastante consumidos pelas comunidades locais (Figura 2) (TODA FRUTA, 2020).

Figura 2. Folhas e Frutas de Guabirobeira.
Fonte: Frutíferas, 2020

Alguns estudos investigam potencial tecnológico do fruto (BARBIERIA, 2018; SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2012) no entanto, a maioria das pesquisas apontam para investigação dos compostos com ação biológica, já que os frutos são ricos em compostos fenólicos e flavonóides (PEREIRA et al., 2018(b); LIMA et al., 2016; CZAIKOSKI et al., 2015; ALVES et al., 2013), destacando-se o ácido gálico, epicatequina, ácido elágico, ferúlico, e ácido p-cumárico (PEREIRA, et al., 2015), além de saponinas e taninos (MARKMAN, BACCHI E KATO, 2004). Haja vista a composição desses frutos, destacam-se suas ações biológicas, como, por exemplo, a ação antioxidante e ação antibacteriana (PEREIRA et al., 2018(b); LIMA et al, 2016; PEREIRA et al., 2015; CZAIKOSKI et al., 2015; ALVES et al., 2013).

Além dos frutos, outras partes da planta vêm ganhando interesse, como é o caso do óleo essencial das sementes de guabiroba, rico em terpenóides e flavonoides, demonstrando atividade antimicrobiana e antioxidante (CAPELETO et al., 2016). Ademais, o uso das folhas de guabirobeira é bem difundido na medicina popular e há relatos de uso terapêutico (OTERO et al., 2017). Extratos obtidos a partir das folhas têm se destacado por apresentarem uma série de compostos como fenóis, flavonóides e taninos, (KATAOKA & CARDOSO, 2013; SOARES DA SILVA, 2016; SANT'ANNA et al., 2017).

Na infusão aquosa a presença de compostos como ácido clorogênico, ácido gálico e quercetina é destacada (SANT'ANNA et al., 2017), no entanto, de forma geral,

os extratos hidroetanólicos parecem apresentar teores maiores de fenóis e flavonóides quando comparados a infusão (KATAOKA & CARDOSO, 2013). A presença desses compostos atribui algumas características aos extratos, como a atividade antioxidante e antibacteriana (KLAFKE et al.,2016; PEREIRA et al., 2018 (b)), assim como efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (SOARES DA SILVA, 2016) e é relatada ausência de toxicidade (SOARES DA SILVA, 2016; MARKMAN, BACCHI E KATO, 2004).

As folhas de guabirobeira são usadas empiricamente por seu efeito potencial na redução de níveis de colesterol no sangue (VIECILI et al., 2014). Estudo desenvolvido por Klafke et al, (2016) utilizando pacientes com diferentes níveis de colesterol obteve resultados que demonstraram uma diminuição significativa nos níveis de colesterol total e LDL, confirmando uso popular dessa planta para essa finalidade. Além de seu efeito no nível de colesterol também reduz o estresse oxidativo (KLAFKE *et al*., 2016) e processos inflamatórios em indivíduos hipercolesterolêmicos (VIECILI *et al*., 2014). Seu uso é também associado a perda de peso e por seu efeito no controle de outras condições associadas à obesidade, como a hiperlipidemia (DICKEL et al., 2007) além do potencial antidiabético (VINAGRE et al., 2010; TROJAN-RODRIGUES et a*l*., 2012), tratamento de úlceras gástricas (MARKMAN, BACCHI E KATO, 2004) e efeito antiplaquetário (OTERO et al., 2017).

4.2 Compostos Fitoquímicos

Durante o crescimento e desenvolvimento, as plantas produzem uma ampla gama de metabólitos. Um grupo é comumente classificado como o dos metabólitos primários: aqueles que estão diretamente envolvidos nos processos fisiológicos basais das plantas, como carboidratos, proteínas e lipídios; outro, como metabólitos secundários ou especializados, conhecidos como fitoquímicos, que frequentemente desempenham papéis importantes na plasticidade de plantas (GÜRBÜZ et al., 2018).

Embora as funções desses compostos não sejam ainda totalmente compreendidas, estão relacionadas aos processos de interação entre a planta e os organismos vivos circundantes contribuindo no processo de adaptação e resistência dessas plantas ao meio ambiente (MAZID, KHAN & MOHAMMAD, 2011,

HARTMANN, 2007). De modo geral, apresentam função de proteção contra predadores e patógenos microbianos e também estão envolvidos em defesa contra estresse abiótico (por exemplo, exposição a UV-B, falta d´água, variações de temperatura, salinindade, outros) e comunicação das plantas com outros organismos (SCHÄFER & WINK, 2009). Os metabólitos secundários, geralmente são categorizados como fenólicos, terpenóides, alcalóides contendo nitrogênio e compostos contendo enxofre (MAZID, KHAN & MOHAMMAD, 2011, LIU. 2004).

O grupo dos compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem um ou mais grupos hidroxila diretamente ligados a um anel aromático. Esses compostos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização e estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídios) e proteínas (BRAVO, 1998). São classificados de acordo com o número de anéis aromáticos e destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (LIU, 2004).

Os flavonóides são compostos fenólicos cuja estrutura química consiste em dois anéis aromáticos ligados por 3 carbonos que, geralmente, estão em um anel heterocíclico oxigenado. Diferenças na estrutura do anel heterocíclico classifica-os como flavonóis (ex. quercetina, kaempferol e mirecetina), flavonas (ex. luteolina e apigenina), flavonóis catequinas (ex. catequinas, epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina e galato de epigalocatequina), flavanonas (ex. naringenina), antocianidinas, e isoflavonóides (MARTINS et al., 2011; LIU, 2004). Esses compostos têm sido relatados como inibidores da peroxidação lipídica (HAMINIUK *et al*., 2012; HOLLMAN & KATAN, 1999) e apresentam propriedades anti-inflamatórias e antivirais.

Os ácidos fenólicos são classificados como ácidos hidroxibenzóicos (incluem os ácidos p-hidroxibenzoico, protocatechuic, vanílico, siríngico e gálico) e, ácidos hidroxicinâmicos que incluem p-cumárico, caféico, ferúlico (encontrados com frequência nos alimentos sob a forma de ésteres simples) e sinápico (SOARES, 2002; BRAVO, 1998). Caracterizam-se por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (BRAVO, 1998). Esses compostos, em geral, em geral, derivados de ácidos hidrocinâmicos, devido à capacidade de estabilizar radicais livres, possuem maior atividade antioxidante quando comparados aos derivados de ácidos hidroxibenzoicos (BRAVO et al., 1998; MARTINS et al., 2011).

Os taninos apresentam-se normalmente na forma de polímeros; são compostos de alto peso molecular, e podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. Os taninos classificam-se em dois grupos: taninos hidrolisáveis que contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliídrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e taninos condensados: polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina. As ligninas são polímeros rígidos e sua hidrólise libera derivados dos ácidos benzóico e cinâmico (SOARES, 2002).

O interesse recente nos compostos fenólicos tem ganhado destaque devido a suas ações como antioxidantes (HAMINIUK et al., 2012; SOARES 2002), antimicrobiano (HE et al., 2014; CUSHNIE & LAMB 2011; MARTINI; KATERERE; ELOFF, 2004) e suas implicações na prevenção de algumas doenças associadas ao estresse oxidativo (HAMINIUK et al, 2012), como por exemplo propriedades anti câncer (ROLEIRA et al, 2015; LIU, 2004) e doenças cardiovasculares (STRACK & DE SOUZA, 2011).

Quanto ao mecanismo de ação antioxidante, os compostos fenólicos atuam como interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI et al., 1992). Esse mecanismo de ação dos antioxidantes, além de reduzir a oxidação lipídica dos tecidos conservando a qualidade dos alimentos, quando ingeridos, também atuam na redução de doenças (HAMINIUK et al*.,* 2012).

A ação antimicrobiana de alguns compostos fenólicos tem sido relatada em alguns estudos. A inibição de *Staphylococcus aureus* pode ocorrer através da ação da mirecitina na atividade da topoisomerase, enzima responsável por conservar a energia de ruptura da ligação fosfodiéster do DNA para realizar a replicação do microrganismo (CONSTANTINOU et al., 1995), e a inibição da helicase, enzima que atua na quebra de ligações de hidrogênio, essencial para a replicação do DNA e sobrevivência bacteriana (HUANG et al., 2015). A atividade antibacteriana do ácido gálico e ácido clorogênico também é conhecida. Estudo de Liu *et al.* (2017), mostraram o ácido gálico com ação inibidora da expressão do gene responsável pela produção de adesão de polissacarídeo intercelular (PIA) responsável pela formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* (LIU, et al., 2017). O ácido clorogênico demostra atividade antibacteriana, inibindo a formação de biofilme, capacidade de enxame e fatores de

virulência, incluindo atividade de protease, atividade de elastase e produção de ramnolipídeo da *Pseudomonas aeruginosa*, (WANG et al., 2019).

A principal fonte de fenólicos na dieta são frutas e vegetais, e o aumento do consumo regular desse tipo de alimento é frequentemente associado a benefícios para a saúde, principalmente aqueles relacionados com efeitos anticâncer (ROLEIRA et al, 2015; LIU, 2004). São compostos que pertencem à categoria de espécies reativas de oxigênio (ROS) o que impede a transformação de células normais em células cancerosas (CHANDER, 2018). Ademais esses compostos contribuem em várias atividades celulares como a apoptose, adesão, migração, proliferação ou diferenciação celular (AMIN et al., 2009). As antocianinas, catequinas e quercetinas são relacionadas a tratamento das doenças cardiovasculares pela redução da pressão arterial e dano oxidativo (STRACK & DE SOUZA, 2012).

Tendo em vista essas características dos compostos fitoquímicos, diversos estudos recentes têm buscado extratos obtidos de plantas como fontes de compostos fenólicos e buscado investigar o potencial e bioatividade dos mesmos (SOBEH et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020; GIOMBELLI et al., 2020; KIM & LIM, 2020; CVETANOVIĆ et al., 2018; NASTIC et al., 2018 (b); LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2018; LORENZO et al., 2018; VINHOLES et al., 2017; MENDONÇA et al., 2016; SOARES DA SILVA, 2016; SCHUMACHER et al., 2015; SANTOS et al., 2015; AMMAR et al, 2014). Nesse sentido que esse estudo busca também conhecer as características e potencialidades dos extratos obtidos das folhas de pitangueira e guabirobeira através da extração com líquido pressurizado.

4.4. Extração de Compostos Bioativos

Os processos de extração são utilizados com o objetivo de separar algumas substâncias a partir de suas matrizes que podem ser sólidas, semi sólidas ou líquidas (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005). Um dos objetivos é a recuperação de compostos fitoquímicos de interesse como, por exemplo, os polifenóis, corantes, esteroides, aromatizantes e compostos farmacologicamente ativos (KIM & LIM, 2020; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005) e de grande interesse na atualidade. A composição, qualidade e rendimento de um extrato são influenciados diretamente pelo tipo de solvente, qualidade e origem do material e pela técnica de extração

empregada, que deve ser definida em função da família de compostos a ser extraída e o objetivo da extração: qualitativo ou quantitativo (MUSTAFA E TURNER, 2011).

Algumas técnicas usadas para a obtenção de extratos de plantas necessitam grandes quantidades de solventes orgânicos, que além de serem poluentes, exigem a separação desses compostos do extrato obtido. Além disso, muitos desses processos são geralmente mais demorados e/ou utilizam faixas de temperaturas mais elevadas podendo levar à degradação dos compostos de interesse durante a extração (PESSOA et al., 2015, CASTRO & CAPOTE, 2010).

Na tentativa de superar essas limitações, algumas técnicas de extração e recuperação de compostos bioativos tem se destacado nos últimos anos, principalmente pelo menor consumo e resíduos de solventes tóxicos e poluentes (ANDRADE et al, 2017). Técnicas utilizando solventes com faixa de pressão mais elevada têm sido estudadas recentemente e vem se destacando pela sua eficiência e confiabilidade quando comparadas com as técnicas tradicionais. Entre elas, a extração com fluido supercrítico (SFE) e a extração com líquido pressurizado (PLE), que demonstram ter boa eficiência (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; MUSTAFA E TURNER, 2011; WIJNGAARD et al., 2012; JUSOH et al., 2019). Ademais, a extração de líquido pressurizado (PLE) tem se destacado como mais adequada para a extração de compostos fenólicos (KOÇAK & PAZIR, 2018), sendo uma tecnologia mais ecológica em comparação com as técnicas convencionais, especialmente quando utiliza água como solvente (MUSTAFA, & TURNER, 2011).

4.4.1 Extração por Líquido Pressurizado

O processo de extração por líquido pressurizado (PLE) é uma técnica que se baseia na utilização de solventes líquidos em faixas de temperatura e pressão que ampliam, dessa forma a eficiência da extração, uma vez que essas condições aumentam a solubilidade e as propriedades de transferência de massa (MUSTAFA, & TURNER, 2011; CARABIAS-MARTÍNEZ et al.,2005; NASTIC et al., 2018 (a)).

O processo de extração de substâncias a partir de uma matriz sólida requer algumas etapas básicas. Inicialmente ocorre a absorção do solvente pela matriz causando o inchamento da estrutura e a dilatação das membranas celulares e dos canais intercelulares. Esse processo reduz a resistência à transferência de massa. O composto é dessorvido e então difundido pela parte orgânica da matriz, alcançando a interface matriz-fluido, difundindo-se através da fase de extração. A partir desse ponto

a extração é afetada pela convecção. A etapa final do processo de extração é a coleta dos compostos removidos com o solvente (LOU, JANSSEN E CRAMERS, 1997; PAWLISZYN, 2003).

O preparo da amostra empregada na extração, fundamental para a eficiência do processo, envolve etapas de secagem, uma vez que a umidade pode interferir, especialmente quando se utilizam solventes não polares, além disso, as etapas de trituração e peneiramento que contribuem consideravelmente para a redução do tamanho das partículas, o que facilita a difusão dos compostos da amostra para o solvente (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

Além das características e tamanho das partículas da amostra, outros fatores como a natureza e fluxo de solvente, bem como a relação de solvente/soluto, temperatura e tempo de extração demonstraram influenciar na eficiência da extração de compostos bioativos (DE OLIVEIRA et al., 2018; MACHADO et al., 2014; JAQUES et al, 2008), uma vez que interferem nos parâmetros fundamentais como a taxa de transferência de massa e o equilíbrio da concentração entre o interior do vegetal e meio extrativo (MUSTAFA, & TURNER, 2011).

O aumento da temperatura favorece o rompimento das interações, causadas pelas forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo-dipolo, entre os analitos e a matriz vegetal, o que resulta numa diminuição da energia de ativação necessária para o processo de dessorção. Ademais, elevadas temperaturas reduzem a viscosidade e a tensão superficial dos solventes, permitindo maior penetração do fluido no interior da matriz, bem como a dissolução mais rápida dos solutos aumentando a taxa de transferência de massa (MUSTAFA E TURNER, 2011, MARKOM et al, 2007). Nos processos por PLE as temperaturas usadas variam de temperatura ambiente a 200°C (MUSTAFA & TURNER, 2011).

Maiores rendimentos de extração são relatados quando temperaturas mais elevadas são aplicadas ao processo (KO, CHEIGH E CHUNG, 2014; LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2018; JOKI´C et al., 2018; NASTIC, et al., 2018 (a); DE OLIVEIRA et al., 2018), no entanto temperaturas muito elevadas podem ocasionar a perda de compostos bioativos sensíveis (ESSIEN, YOUNG & BAROUTIAN, 2020; KO, NAM & CHUNG, 2020; KO, CHEIGH E CHUNG, 2014; LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2018), e a extração de compostos não desejáveis (JOKI´C et al., 2018).

A eficiência também é alcançada com a seleção do solvente correto e otimização das condições de processo. A escolha do solvente deve considerar, além da eficácia da extração dos compostos (GIACOMETTI et al., 2018), o impacto ambiental negativo que pode ocasionar o uso de solventes orgânicos, dependendo do tipo e quantidade utilizados. Nos processos com líquido pressurizado, a quantidade de solvente necessária é muito inferior quando comparado aos processos convencionais, o que atende aos critérios para ser considerada adequada como “tecnologia de extração ecológica” (ESSIEN, YOUNG & BAROUTIAN, 2020, AZMIR et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; PERES et al., 2006).

Nessa perspectiva, a utilização de água e etanol como solventes, que é a proposta do presente trabalho, é propícia, uma vez que esses são solventes GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros). A polaridade do líquido extrator e uma temperatura de extração aumentada podem melhorar a solubilidade de compostos orgânicos e facilitar a sua liberação da matriz de plantas (JAQUES et al, 2008).

A água é considerada um dos solventes mais importantes da natureza. A aplicação de Pressão e temperaturas elevadas resulta em mudanças nas propriedades físico-químicas de água, aumentando sua eficiência como solvente. Ocorre a redução da viscosidade em função da menor constante dielétrica da água. Isso resulta em uma diminuição da tensão superficial e, consequentemente, maior difusividade da água no soluto (PLAZA & TURNER, 2017; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; HERRERO et al., 2013). A redução na constante dielétrica da água possibilita que seja usada para extrair compostos de média ou baixa polaridade (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005).

Portanto a extração com fluido em estado subcrítico apresenta algumas vantagens consideráveis sobre outras técnicas de separação uma vez que compostos termolábeis podem ser separados a temperaturas mais baixas, pode se utilizar solventes GRAS o que possibilita o uso dos extratos em alimentos, medicamentos, etc. Também, apresenta menor necessidade energética quando comparada a outras técnicas e possibilita uma extração mais rápida devido à baixa viscosidade e alta difusividade do solvente.

4.4.2 Cinética de Extração

O estudo dos parâmetros cinéticos do processo ou da cinética de extração, possibilita melhor compreensão do processo de extração e os mecanismos

fenomenológicos presentes. Avalia-se a variação da obtenção de extrato com o tempo em termos de rendimento global que é a quantidade de material que pode ser extraído de uma matriz em determinada condição de temperatura e pressão. Esse rendimento é expresso como a razão entre a massa de extrato e a massa de matéria-prima. O gráfico esquematizado na Figura 3 mostra o comportamento típico de um processo de extração com fluido supercrítico.

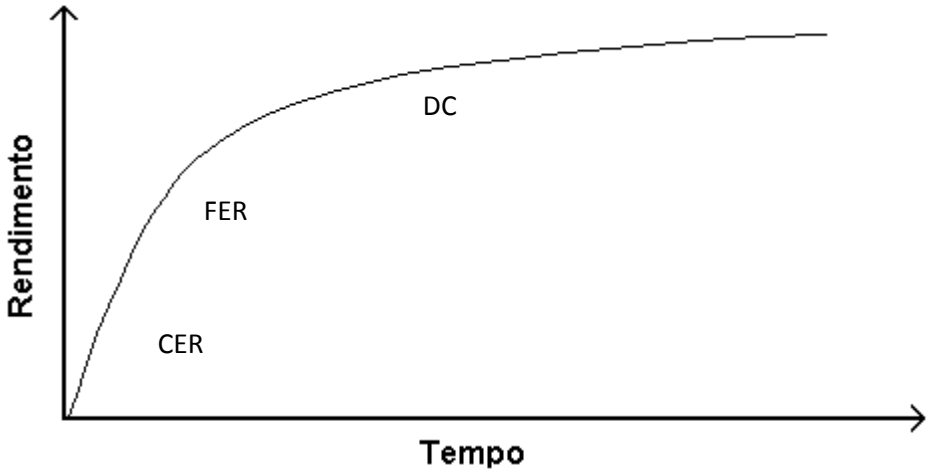

Figura 1. Gráfico esquematizado de Tempo e Rendimento de um processo de extração.
CER – constant extraction rate (taxa de extração constante), FER – falling extraction rate (taxa de extração decrescente) e DC – diffusion controlled (difusão controlada).

Essa curva de extração pode ser dividida em 3 diferentes regiões ou etapas conforme descrito por Braga (2005):

a) Etapa de taxa de extração constante (CER – constant extraction rate): nessa etapa predomina a transferência de massa por convecção (escoamento do solvente) predomina. Nesta etapa ocorre a extração do soluto que recobre a superfície externa das partículas e também daqueles que foram liberados através do rompimento das paredes celulares no pré-tratamento (moagem).

b) Etapa de taxa de extração decrescente (FER – falling extraction rate): nessa fase a taxa de transferência de massa decresce rapidamente tendo em vista que há redução da área e passa a ocorrer o processo de transferência de massa por difusão. Nessa etapa tanto os processos de difusão quanto de convecção passam a ser

importantes na extração já que a resistência à transferência de massa encontra-se em ambas as fases.

c) Etapa controlada pela difusão (DC – diffusion controlled): nessa etapa a taxa de extração é determinada apenas pela difusão do solvente para o interior das partículas sólidas.

4.4.3 Infusão

A infusão é um processo conhecido por envolver a imersão de material vegetal em água ou água fervente por um determinado período de tempo, e posteriormente filtrado. Esse processo permite a extração de seus compostos fitoquímicos, aromáticos e sabores. Os Fitoquímicos podem ser categorizados em metabólitos (monossacáridos, dissacáridos, ácidos orgânicos e aminoácidos), metabólitos secundários (fenólicos e óleos essenciais e biopolímeros) e biopolímeros (proteínas, lipídios e polissacarídeos) (THIAGARAJAH et al., 2019).

O chá (*Camellia sinensis*) e o mate (*Ilex paraguariensis*) estão entre as bebidas mais populares e amplamente consumidas no mundo. São usadas normalmente a infusão ou decocção aquosa de suas folhas e os benefícios atribuídos ao consumo destas bebidas, possivelmente, estejam associados aos compostos polares que podem ser extraídos em condições aquosas (SANTOS et al., 2018). Dentre eles destacam-se o alto teor de compostos fenólicos, por exemplo, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas e catequinas, bem como compostos e antioxidantes como os carotenoides (provitamina A), tocotrienóis e tocoferóis (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C) o que atribui atividade antioxidante e antiproliferativa (SANTOS et al., 2018).

Dentre as atividades biológicas proporcionadas pela erva mate, uma das principais e mais conhecidas é a atividade antioxidante, a qual possui a propriedade de combater os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (SANTOS et al., 2018; RIACHI & DE MARIA, 2017). Ademais, são normalmente usadas pela função diurética e estimulante (RIACHI & DE MARIA, 2017), além da ação antimicrobiana (SANTOS et al., 2018).

Por ser a infusão uma técnica amplamente utilizada, inclusive popularmente, foi também usada nesse trabalho como comparativo a técnica de PLE.

4.5 Atividade Alelopática

A atividade alelopática é um mecanismo natural da planta, através do qual produz substâncias que, quando liberadas no ambiente, podem interferir no desenvolvimento da vegetação próxima (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; SOUZA FILHO et al., 2009; RODRIGUES et al., 1999). Esses compostos são, essencialmente, metabólitos secundários, denominados aleloquímicos, produzidos pelas plantas e capazes de interferir no crescimento, desenvolvimento e até germinação das sementes de outras espécies vegetais (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; RODRIGUES et al., 1999). Eles podem ser liberados na atmosfera ou no solo por exsudação radicular, lixiviação, volatilização e decomposição dos resíduos da planta (RIZVI; RIZVI, 1992 apud SILVA, 2012)

A produção desses compostos pode variar em quantidade e qualidade dependendo da espécie, do local de ocorrência ou ciclo de cultivo (FERREIRA & ÁQUILA, 2000). Fatores como a temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, intensidade luminosa, características do solo etc., regulam a produção dos compostos (MACÍAS et al., 2007). Outros fatores como radiação ultravioleta, doenças e ataques de insetos também influenciam e modificam diretamente a taxa de produção desses compostos (FORMAGIO et al., 2010).

O modo de ação dos aleloquímicos pode ser classificado em ação direta e indireta. As propriedades do solo são classificadas como ações indiretas enquanto as ações diretas estão relacionadas a ligação do composto nas membranas da planta receptora, interferindo diretamente no seu metabolismo (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

Entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos estão os terpenos, alcalóides, compostos fenólicos, esteróides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (MALHEIROS & PERES, 2001). O efeito deles sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta demonstram manifestações secundárias decorrentes dos efeitos a nível molecular e celular inicialmente (FERREIRA & ÁQUILA, 2000).

A presença desses compostos pode levar à redução e/ou inibição no processo germinativo das sementes e interferir no desenvolvimento e crescimento radicular e da parte aérea da planta (IMATOMI et al., 2012). A germinação é menos sensível à

presença dos aleloquímicos, quando comparada ao crescimento da radícula que pode desenvolver algumas anormalidades como a necrose, um dos sintomas mais comuns que afeta o crescimento das raízes (FERREIRA & ÁQUILA, 2000; BOIAGO et al., 2018). Já a parte aérea da planta demostra ter menor sensibilidade à presença desses compostos do que a raiz (GATI et al., 2008).

As características alelopáticas, encontradas em algumas plantas, podem ser usadas como controle natural de ervas daninhas. Além do mais, em função do seu potencial bioativo podem ser usadas na produção de herbicidas naturais e inseticidas (SILVA, 2012). Diversos estudos têm demonstrado a atividade alelopática em extratos obtidos a partir de folhas de plantas (PELEGRINI & CRUZ-SILVA et al., 2012; IMATOMI et al., 2015; DACOREGGIO et al., 2019; SOUZA FILHO et al., 2009; RIZZI et al., 2016; BOIAGO et al., 2018;). Alguns fatores relacionados a obtenção dos extratos podem interferir na ação como época de coleta das folhas (DACOREGGIO et al., 2019; PELEGRINI & CRUZ-SILVA, 2012), forma de preparo e concentração dos extratos (PELEGRINI & CRUZ-SILVA, 2012). Dentre as espécies estudadas, os extratos de folhas de *Myrtaceae* mostram potencial alelopático sobre a germinação de sementes e sobre o desenvolvimento e crescimento das plântulas de diferentes espécies (IMATOMI et al., 2015; DACOREGGIO et al., 2019, CHAPLA & CAMPOS, 2010), demonstrando potencial para isolamento de compostos ativos e uso na produção de herbicidas naturais (IMATOMI et al., 2015).

É nesse contexto que esse trabalho se insere, numa perspectiva de avaliar potencialidades dos extratos das folhas de guabirobeira e pitangueira obtidos por PLE e infusão, uma vez que estas espécies nativas demonstram possibilidades de cultivo e de novas pesquisas de exploração das suas potencialidades, especialmente com relação aos compostos fitoquímicos com conhecida ação biológica.

5. PROJETO DE PEQUISA

Folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum*), butiazeiro (*Butia odorata*), guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e de pitangueira (*Eugenia uniflora*): prospecção de propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias

Lucíola Bagatini

Orientação: Dr. César Valmor Rombaldi

Pelotas, 2021

RESUMO

BAGATINI, Lucíola. **Folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum*), butiazeiro (*Butia odorata*), guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e de pitangueira (*Eugenia uniflora*): prospecção de propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias.** 2021. Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O Brasil caracteriza-se como um dos principais centros de diversidade de plantas frutíferas e, atualmente, as espécies nativas têm sido cada vez mais apreciadas e estudadas, principalmente por apresentarem compostos de interesse nutricional e tecnológico. Os frutos de algumas espécies como o araçazeiro *(Psidium cattleianum*), o butiazeiro (*Butia odorata*), a guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora*) possuem potencial para exploração, e muitos estudos têm destacado suas características como ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e antiproliferativa. No entanto poucos são os estudos realizados com fins de explorar as atividades biológicas das folhas destas espécies. Portanto o presente trabalho tem como objetivo a prospecção da atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória das folhas destas espécies. Tendo em vista que a composição e qualidade dos extratos de plantas dependem dos procedimentos de extração utilizados, o tipo de solvente, qualidade e origem do material, neste trabalho busca-se utilizar a técnica de líquido pressurizado (PLE), que é uma alternativa para extração e fracionamento de produtos naturais já que, permite uma extração mais rápida, reduz o consumo de solventes (tecnologia “verde”) apresentando alto índice de rendimento. Além disso, serão utilizados também extratos obtidos por infusão das folhas. Este trabalho está dividido em três estudos. O primeiro estudo, consiste na obtenção dos extratos por líquido pressurizado e infusão aquosa e caracterização. No segundo estudo, a partir da composição química, os extratos com maior abundância de compostos fenólicos serão avaliados quanto seu potencial bioativo (antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório). O terceiro estudo consiste na aplicação do(s) extrato(s) definido(s) a partir da caracterização química.

Palavras-chaves: Espécies nativas; extração subcrítica; compostos fenólicos; potencial bioativo.

5.1 Introdução

O Brasil caracteriza-se como um dos principais centros de diversidade de plantas frutíferas cujos frutos podem ser utilizados na alimentação, demonstrando potencial para exploração na agricultura, e nas indústrias alimentícia e farmacêutica (DENARDIN et al., 2015; MEDINA et al., 2011). As espécies nativas têm despertado

interesse, uma vez que atualmente apresentam compostos de interesse nutricional e tecnológico.

Extratos de plantas e óleos essenciais, ricos em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonóides, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenos (MEDINA, 2011), têm sido usados há muito tempo em função de seus benefícios a saúde. Alguns exemplos são a ação antisséptica, antioxidante, e anti-inflamatória (AMORATI et al, 2013), o que tem despertado o interesse científico atual.

Muitos estudos têm sido realizados demonstrando o potencial de frutos de árvores nativas de clima temperado (BESKOW et al., 2014; HOFFMANN et al., 2018; PEREIRA et al., 2018 (a)), porém, as potencialidades das folhas de araçazeiro (Psidium cattleianum), butiazeiro (Butia odorata), guabirobeira (Campomanesia xanthocarpa) e pitangueira (Eugenia uniflora) ainda carecem de maior exploração.

O Araçá (*Psidium cattleyanum Sabine*) uma espécie nativa brasileira, pertence à família das mirtáceas, que se destacam por produzirem frutos pequenos, encontradas desde o Amazonas até a região Sul do Brasil. (SANTOS et al., 2007; MEDINA et al., 2011). Seus frutos são particularmente ricos em minerais, possuem elevado teor de compostos fenólicos tais como epicatequina e ácido gálico e também quantidades significativas de licopeno, betacaroteno e vitamina C. Muitos estudos têm destacado algumas características desta espécie como atividade antioxidante dos frutos (CORRÊA et al, 2011, DENARDIN et al, 2015) e extratos das folhas (ALVARENGA et al, 2013) assim como, propriedades antimicrobianas dos frutos (MEDINA et al., 2011) e também das folhas (SOLIMAN et al., 2016, BRIGUENTI et al, 2008).

A Guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*) é uma árvore nativa do sul do Brasil, pertencente à família botânica da Myrtaceae (PEREIRA et al., 2015). As frutas têm poucas sementes e possui sabor cítrico. Além do consumo e utilização das frutas frescas, alguns estudos apresentados na literatura relatam efeitos benéficos da utilização dos extratos das folhas e das frutas na prevenção da ulceração gástrica, atuação no colesterol e diabetes mellitus. Extratos obtidos por hidrodestilação e maceração apresentam atividade antioxidante e antibacteriana (CZAIKOSKI, et al., 2015). Os principais compostos fenólicos presentes na fruta de guabiroba são

epicatequina, ácido gálico, ácido ellagico, ferulico, e ácido p-coumarico (PEREIRA, et al., 2015).

O butiá é considerado um fruto nativo da América do Sul com predomínio da espécie Butia odorata na região Sul do Brasil (HOFFMANN et al., 2014; BESKOW, 2012). Esse fruto é rico em compostos bioativos, como os compostos fenólicos, a vitamina C e os carotenoides (BESKOW et al., 2015). Alguns estudos sobre a fruta destacam a ação Antihiperglicêmica, antioxidante (VINHOLES et al, 2017), assim como a investigação de citotoxicidade, ação antimicrobiana (PERALTA, 2017). Além da fruta também destaca-se capacidade antioxidante e antimicrobiana da semente (CRUZ et al, 2017) e efeitos antioxidantes, atividades anti-inflamatórias do extrato das folhas (AMMAR et al, 2014).

A pitangueira ocorre em todo o território nacional. A polpa dos frutos é rica em cálcio, fósforo e compostos potencialmente bioativos como as antocianinas, flavonoides e carotenoides (MOURA et al., 2011). Os compostos fenólicos majoritários na pitanga são o campferol e a quercetina, que apresentam elevada capacidade antioxidante (MASSARIOLI et al., 2013). Em suco de pitanga, dois compostos presentes o caracterizam como potencial anti-inflamatório, sendo a antocianina cianidina-3-glicosídeo (antocianina) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (composto volátil) (SOARES et al, 2014). As folhas da pitangueira apresentam ação hipotensora, antidiarréica, antigotosa e hipoglicemiante, por isso são muito utilizados na medicina popular (AURICCHIO; BACCHI, 2003).

A composição e qualidade dos extratos de plantas dependem dos procedimentos de extração utilizados, o tipo de solvente, qualidade e origem do material. Alguns métodos podem degradar compostos em função da exposição a temperaturas elevadas e o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos (PESSOA et al, 2015).

Algumas técnicas para obtenção de extratos de plantas exigem grandes quantidades de solventes orgânicos, que além de serem poluentes exigem a separação destes compostos do extrato obtido. Além disso, em função de serem geralmente demorados podem levar à degradação dos compostos de interesse durante a extração (PESSOA et al, 2015).

A utilização de extração com líquido pressurizado (PLE) é uma alternativa para produtos naturais, tendo em vista que permite uma extração mais rápida, com menor consumo de solventes (tecnologia “verde”) e apresentando alto índice de rendimento. Esta técnica utiliza solventes em altas pressões, onde pode permanecer em estado líquido (denominado subcrítico), mesmo quando levado à temperaturas muito acima de seus pontos de ebulição. Assim, PLE pode operar a altas temperaturas, onde a solubilidade dos compostos alvo e cinética de dessorção da matriz são otimizados (PERES et al, 2006). A utilização de água e etanol como solventes é propício, uma vez que estes são solventes GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros). As propriedades dos analitos, a composição química da amostra, o tamanho de partícula da amostra, temperatura e pressão e a escolha do solvente podem afetar a eficiência da extração (JAQUES et al, 2008).

Diante do exposto percebemos que estudos para elucidar os compostos químicos presentes nas folhas de araçazeiro, butiazeiro, guabirobeira e pitangueira são relevantes tanto para o conhecimento destas espécies nativas, como para verificar o potencial de aplicação para alimentos, fármacos entre outros.

5.2 Hipótese

5.2.1 Na etapa da pesquisa descritiva

Trata-se de uma pesquisa tipicamente com a característica descritiva e de bioprospecção. Nesse caso, a emissão de hipótese não é pertinente, tendo em vista que não se tem, a priori, uma potencial explicação para um fenômeno, tampouco se tem elementos científicos para antecipar um provável resultado, seja no que tange à composição, seja em relação a potenciais propriedades, se não aquelas de conhecimento empírico-popular.

5.2.2 Na etapa de pesquisa experimental

Testando-se as condições de extração e de estudo das principais respostas, as hipóteses são:

c) o uso de PLE, com a associação dos solventes água e etanol gera maior diversidade e concentração de compostos fitoquímicos; e,
d) pela diversidade de compostos fitoquímicos polares, se espera obter respostas biológicas de interesse em alimentos e numa perspectiva de saúde.

5.3. Objetivos

5.3.1 Objetivo geral

Prospectar a atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória das folhas de araçazeiro *(Psidium cattleianum*), butiazeiro (*Butia odorata*), guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e pitangueira (*Eugenia uniflora*).

5.3.2 Objetivos específicos

1) Obter extratos a partir de folhas de araçazeiro, butiazeiro, guabirobeira e pitangueira, através dos métodos de extração por PLE e por infusão em água;
2) caracterizar os extratos obtidos por PLE e infusão aquosa através da análise dos compostos fitoquímicos;
3) avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos extratos;
4) prospectar, a partir da composição dos extratos, possibilidades de aplicação dos mesmos.

5.4 Metas

1) Obtenção de extratos das folhas de cada uma dessas espécies em 3 diferente solventes e avaliação das suas características químicas (12 extratos);
2) Selecionar o método de extração e o material vegetal com maior potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano e aplicação tecnológica de no mínimo um extrato selecionado;
3) Publicação de no mínimo um artigo em periódicos Qualis A na área de Ciências de Alimentos.

5.5 Revisão Bibliográfica

5.5.1 Espécies nativas

5.5.1.1 Guabirobeira

A Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) é uma árvore nativa do sul do Brasil, podendo também ser encontrada em vários estados brasileiros, com maior concentração no Estado de Goiás pertencente à família botânica da Myrtaceae. É uma Árvore de pequeno a médio porte tendo de 5 a 8 metros de altura (PEREIRA et al., 2015, TODA FRUTA, 2019) e seu florescimento ocorre de agosto a novembro, e a frutificação, de setembro a dezembro, podendo estender-se até fevereiro (ALVES et al., 2013). Suas folhas são simples, opostas, ovalado-oblongas, raramente arredondadas. Medem de 3,5 a 8 cm de comprimento por 2,5 a 4,5 cm de largura e são fortemente aromáticas quando maceradas (RASEIRA et al., 2004)

O fruto da gabirobeira caracteriza-se por ser um fruto arredondado, de coloração amarelo-esverdeada do tipo baga globosa, casca fina e polpa carnosa, comestíveis e bem aceitos sensorialmente (ALVES et al., 2013, TODA FRUTA, 2019). As frutas têm poucas sementes e possui sabor cítrico, alto teor de compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides (ALVES et al., 2013, PEREIRA et al., 2012). Os principais compostos fenólicos presentes na fruta de guabiroba são epicatequina, ácido gálico, ácido ellagico, ferulico, e ácido p-cumarico (PEREIRA et al., 2015).

Alguns estudos realizados com a Guabiroba abordam caracterização da polpa (ALVES et al., 2013; LIMA et al., 2016), propriedades biológicas como atividade antioxidante e antimicrobiana (PEREIRA et al., 2018(b); PEREIRA 2015), determinação de compostos fenólicos nas frutas (ALVES et al., 2013) e sementes (CAPELETO et al., 2016). Ademais, relatam-se efeitos benéficos da utilização dos extratos das folhas e das frutas na prevenção da ulceração gástrica, atuação no colesterol e diabetes mellitus (CZAIKOSKI et al., 2015), assim como propriedade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos das folhas (FERREIRA et al., 2013).

*5.5.1.2 Pitanga (*Eugenia *spp)*

A pitangueira (*Eugenia uniflora L*.) pertence à família *Myrtaceae* e também é conhecida como cereja do Brasil. Encontra-se amplamente distribuída ao longo das diversas regiões do Brasil e em outros países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Uruguai (DENARDIN et al., 2015, RAZEIRA et al, 2004, TODA FRUTA, 2019).

É uma árvore com 2 a 15 m de altura, com copa arredondada, o fruto é do tipo baga, globoso, com 7 a 10 sulcos, no sentido longitudinal, e pesa entre 3 e 5g. Possui sabor bem aceito, equilibrado entre doce e ácido. Devido à sazonalidade e alta perecibilidade, são bastante utilizados no processamento, principalmente para o preparo de polpas e sucos, além de e também para sorvetes, picolés, doces, licores e fermentados (FRANZON, 2013, TODA FRUTA, 2019).

Os frutos de pitanga são ricos em metabólitos secundários entre eles os compostos fenólicos como antocianinas e flavonóides, os carotenoides e ácido L-ascórbico (LIMA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2014; PEREIRA et al., 2012, VERGARA, et al., 2016). Diversos estudos já demonstraram seus potenciais efeitos biológicos, como os efeitos antioxidante (BAGETI et al., 2011; PEREIRA et al., 2012; VINHOLES et al., 2017), anti-inflamatório (SOARES et al., 2014), antihiperglicemico (VINHOLES et al., 2017), antiproliferativo e antimicrobiológico (SILVEIRA et al., 2014) efeito em células hepáticas (DENARDI et al., 2016) de extratos de frutos.

Alguns estudos ainda indicam que extratos da folha da pitangueira pode ser uma fonte de nutracêuticos com anti-Trypanosoma, alternativa para combater doenças infecciosas como a doença de Chagas (SANTOS et al., 2013), além de efeitos antimicrobianos (MENDONÇA et al., 2016). Além disso, constatamos estudo relativos à toxicidade in vitro (SANTOS et al., 2013, SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987), investigação dos efeitos do método de extração sobre as propriedades antioxidantes (MARTINEZ-CORREA et al., 2011), demonstrando a importância de novos estudos.

5.5.2 Extrações

5.5.2.1 Extração por Líquido Pressurizado

A composição e qualidade dos extratos de plantas dependem dos procedimentos de extração utilizados, o tipo de solvente, qualidade e origem do material.

Algumas técnicas de extração e recuperação de compostos bioativos tem se destacado nos últimos anos, principalmente pelo menor consumo e resíduos de solventes tóxicos e poluentes. Dentre elas podemos destacar a utilização de ultra-som, líquido pressurizado e extração com fluidos supercríticos. (ANDRAD et al., 2017). Além disso, estas técnicas utilizando solventes com pressão mais elevada têm sido estudadas recentemente destacando sua boa eficiência e confiabilidade quando comparadas com as técnicas tradicionais.

O processo de extração liquido pressurizado (PLE) que também é conhecido na literatura como extração de fluido pressurizado (PFE), extração pressurizada de solvente quente (PHSE) ou extração acelerada de solvente (ASE) é uma técnica que se baseia na utilização de solventes pressurizados em altas temperaturas (sempre abaixo de seus pontos críticos), sob condições nas quais os solventes são mantidos no estado líquido durante o processo de extração (MUSTAFA & TURNER, 2011; CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; CARABIAS et al., 2005). Assim, PLE pode operar a altas temperaturas, onde a solubilidade dos compostos alvo e cinética de dessorção da matriz são otimizados (PERES et al, 2006).

Para a obtenção de extratos de plantas, algumas técnicas exigem grandes quantidades de solventes orgânicos, que além de serem poluentes exigem a separação destes compostos do extrato obtido. Além disso, em função de serem geralmente demorados e/ou utilizarem temperaturas elevadas podem levar à degradação dos compostos de interesse durante a extração (PESSOA et al, 2015).

A utilização da extração com líquido pressurizado (ELP) é uma alternativa produtos naturais já que permite uma extração com maior rapidez e rendimento, e menor consumo de solventes (tecnologia “verde”) (PERES et al., 2006).

Alguns parâmetros que influenciam o desempenho na extração por PLE são o tamanho da amostra e composição; a natureza, volume e fluxo do solvente; temperatura, tempo de extração, número de ciclos e pressão (JAQUES et al, 2008; MACHADO et al., 2014).

O elevado desempenho nos processos de extração pode ser atribuído a fatores como a maior solubilidade e maior taxa de difusão dos analitos no solvente a maior temperatura, assim como a redução da interação do soluto na matriz. Uma das vantagens deste processo é que permite que os solventes permaneçam líquidos mesmo com o uso de temperaturas mais elevadas e até acima de seu ponto de ebulição. Na PLE os parâmetros do processo podem ser ajustados visando a seletividade de um determinado grupo de compostos (CARABIAS-MARTÍNEZ et al.,2005).

Fatores como o tipo de solvente, temperatura e tempo de extração, tempo de extração, relação de solvente para soluto e tamanho de partícula da amostra demonstraram influência na eficiência da extração. Alguns estudos relatam uma relação positiva do aumento de temperatura com relação ao rendimento da extração, porém o uso de temperaturas mais elevadas também foi relacionado a perda de compostos sensíveis, como por exemplo, os flavonóis (KO, CHEIGH E CHUNG, 2014).

O aumento da temperatura favorece o rompimento das interações, causadas pelas forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo-dipolo, entre os analitos e a matriz vegetal, o que resulta numa diminuindo da energia de ativação necessária para o processo de dessorção. Não obstante, elevadas temperaturas reduzem a viscosidade e da tensão superficial dos solventes, permitindo maior penetração do fluido no interior da matriz, bem como a dissolução mais rápida dos solutos aumentando a taxa de transferência de massa (MUSTAFA E TURNER, 2011, MAKROM et al., 2007)

A água também é utilizada como solvente no seu ponto crítico, onde se mantem em estado líquido. A utilização de água e etanol como solventes é propicio, uma vez que estes são solventes GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros). A polaridade do líquido extrator e uma temperatura de extração aumentada podem melhorar a solubilidade de compostos orgânicos e facilitar a sua liberação das matrizes de plantas (JAQUES et al., 2008).

Extração com fluido subcrítico apresenta, portanto, algumas características que se mostram vantajosas quando comparadas a outras técnicas de extração. Um exemplo é a utilização de solventes GRAS, possibilitando seu uso em alimentos e medicamento, assim como o uso de baixas temperaturas, onde compostos termolábeis podem ser separados.

5.6 Material e Métodos

A pesquisa dessa tese será desenvolvida em três fases principais: 1) Obtenção e caracterização dos extratos; 2) Avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos extratos; 3) Prospecção das atividades e Aplicações (Figura4).

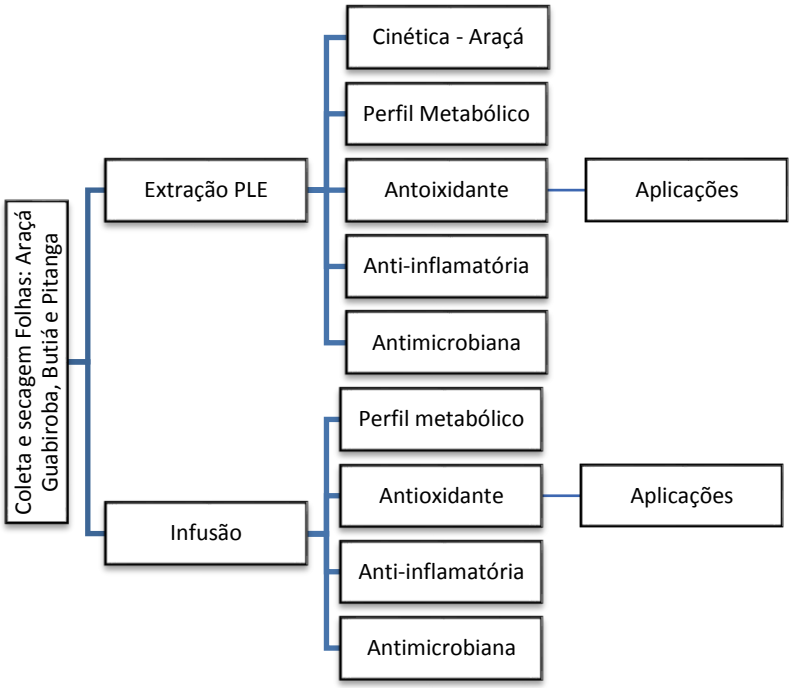

Figura 2. Etapas de desenvolvimento do trabalho

5.6.1 Estudo I: Obtenção e caracterização química dos extratos

5.6.1.1 Material vegetal

As folhas de araçazeiro, butiazeiro, guabirobeira e pitangueira serão coletadas nos pomares da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil (31 ° 42 'S, 52 ° 24' W, Altitude: 57m). Os genótipos selecionados a partir do potencial para ser lançado como cultivar. O trabalho está cadastrado no Sisgen com o número: A8703BA.

Os materiais vegetais serão secos em estufa com circulação de ar (Ethink Tecnhnology®), por 72 h a 40ºC, posteriormente, moídos em um moinho de facas (Marconi M48) com peneira de 30 mesh, resultando partículas de aproximadamente 0,595-0,600 mm. O material foliar seco e moído será armazenado em sacos plásticos envoltos em papel alumínio a -20 ºC.

5.6.1.2 Delineamento experimental

Os tratamentos realizados para o estudo I estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Delineamento experimental do estudo I

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Matéria-prima	Método de extração	
1 2 3 ... 13 14 15 16	Folha de araçazeiro Folha de butiazeiro Folha de guabirobeira Folha de pitangueira	PLE H_20 PLE EtOH:H_20 PLE EtOH Infusão aquosa	Perfil metabólico por LC-MS/MS Compostos fenólicos totais e individuais (Espectrofotometria e LC-MS/MS) Flavonoides totais e individuais (Espectrofotometria e LC-MS/MS) Atividade antioxidante antimicrobiana e anti-inflamatória dos extratos

5.6.1.3 Obtenção dos extratos por Líquido Pressurizado (PLE)

Unidade de Extração

O processo de extração será realizado no Laboratório de Termodinâmica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), em Erechim-RS. A figura 5 apresenta o diagrama esquemático de extração por líquido pressurizado e a figura 6 o equipamento utilizado neste trabalho.

O equipamento é composto por: uma bomba de HPLC (LabAlliance, USA), que opera com vazões na faixa de 0,01 – 10,0 mL/min; duas válvulas de bloqueio (VB), responsáveis por controlar a entrada ou a passagem de fluido; um manômetro; uma válvula micrométrica (VM), que se trata de uma válvula de regulagem de fluxo, mas que é usada para o controle e manutenção da pressão atrás da regulagem da vazão do solvente; um indicador e controlador de temperatura (CT); uma célula de extração de aço-inox de 100 mL contendo filtro metálico na saída da célula; uma “camisa” de aquecimento elétrico, utilizada para revestir a célula de extração (CE) e, assim, mantê-la na temperatura de extração até que a pressão requerida fosse atingida; e um recipiente de coleta. Todas as ligações dentro do sistema são feitas de tubos de aço inoxidável (1/16 "e 1/8"). A Figura 6 mostra a fotografia da unidade PLE utilizada.

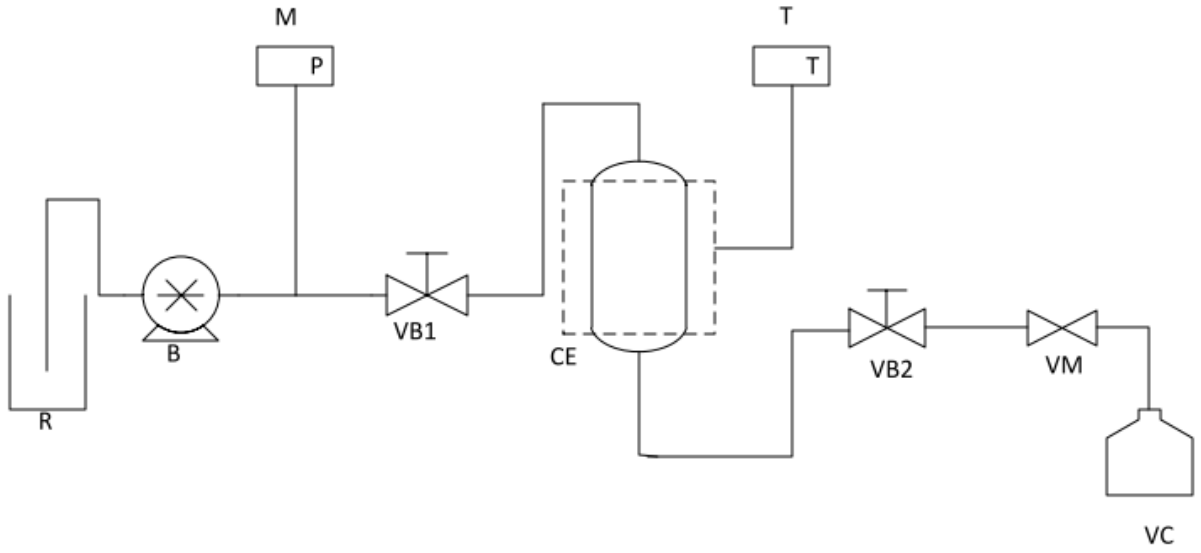

Figura 3. Diagrama esquemático da unidade de extração com liquido pressurizado (PLE). R - Recipiente (solvente); B - Bomba de solvente; M - Manômetro; VB1 - Válvula de bloqueio 1; CE -Célula de extração revestida com manta de aquecimento; VB2 - Válvula de bloqueio 2; VM –Válvula micrométrica; T – Controlador e indicador de temperatura; VC – Vaso de coleta.
Fonte: adaptado de MACHADO, 2014.

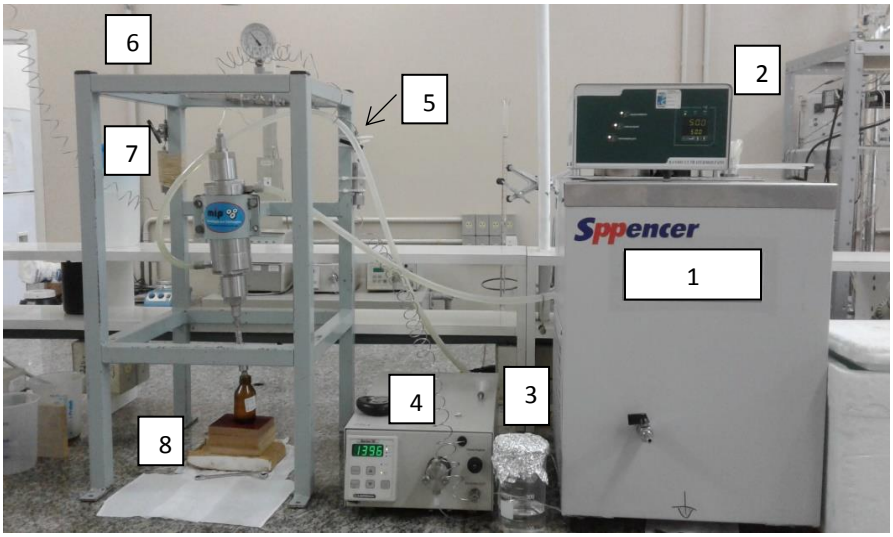

Figura 4. Unidade PLE - URI. 1- Banho termostático com circulação; 2- Controle de Temperatura; 3- Reservatório de solvente; 4- Bomba; 5- Válvula de Bloqueio; 6- Manômetro; 7- Célula de extração; 8- Coletor do extrato.

Condições de extração

As folhas secas de araçazeiro, butiazeiro, guabirobeira e pitangueira serão submetidas a processo de extração por líquido pressurizado.

Os procedimentos de extração basearem-se num estudo realizado por Jaques et al., (2008), com modificações. Os parâmetros da extração utilizados serão: pressão de 1500 *psi*, temperatura 50°C, 15 g de amostra, vazão de descarga de solvente de 2 mL por minuto, com extração estática de 30 minutos.

Os solventes (em condições subcríticas) utilizados no processo de extração serão: água destilada, etanol (PA 95% Dinâmica) e a mistura (1:1) de água destilada e etanol (PA 95% Dinâmica).

Para os estudos da cinética de extração das folhas de araçazeiro serão construídas curvas globais de extração, expressando rendimento global de extração acumulado X0 (%) em função do tempo de extração (min). Durante o processo de PLE, serão coletadas amostras de extratos em frascos previamente pesados e em intervalos de tempos pré-determinados (1, 3, 5, 9, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 120 e 180). O rendimento calculado da seguinte forma:

$$X0 = \frac{massa\ do\ extrato\ (g)}{massa\ do\ resíduo\ (g)}\ x\ 100. \quad (1)$$

Com base nos resultados do rendimento será definido o tempo padrão de extração para todas as espécies estudadas.

Após a extração por líquido pressurizado, os solventes serão removidos: os extratos obtidos com água liofilizados (Liobras, L101). Os extratos obtidos com etanol e água, primeiramente, secos em estufa a vácuo (modelo Quimis Q819V2), com temperatura de 50ºC até peso constante, com intuito de remover o etanol, e posteriormente liofilizados. Os extratos obtidos com etanol serão submetidos a secagem em estufa a vácuo (modelo Quimis Q819V2), na temperatura de 50 ºC até peso constante. As amostras armazenadas em ultra freezer (-60ºC).

5.6.1.4 Infusão

A infusão será preparada numa proporção de 1:50 m/v, (folhas secas e moídas), conforme descrito em 6.1.1. A temperatura da água utilizada será de 80 ± 1 ° C por 10 min (SANTOS et al., 2018).

5.6.1.5 Caracterização química dos extratos

A etapa de caracterização química dos extratos foi desenvolvida pela doutoranda do PPGCTA Giovana Paula Zandoná.

5.6.1.5.1 Perfil metabólico

Preparo da amostra, instrumentação, condições analíticas e análise de dados

Para análise do perfil metabólico por LC-ESI-qTOF-MS, os extratos serão pesados 100 mg de amostra e ressuspendidos em 1 mL de solução contendo 90% de água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico grau HPLC e 10% de acetonitrila acidificada 0,1 % de ácido fórmico, as quais serão homogeneizadas por 1 min em vórtex e, posteriormente, centrifugadas por 1 min, 4 ºC, 2.655 *G* (Centrifuge 5420 R, eppendorf®), as mesmas serão diluídas para obter a concentração de 30 mg mL^{-1} e filtradas em filtro de seringa de nylon de 0,22 µm para posterior injeção. Aos extratos

serão adicionados reserpina como padrão interno, na concentração final de 2 ug mL^{-1}.

Após o preparo do extrato, 10 µL da amostra diluída serão injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação cromatográfica será utilizada a pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Cogent Bidentate C18 – 2.2 µm 120 A – 100mm x 2,1mm. As fases móveis foram: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B). Para separação será utilizado gradiente de eluição de: 0 - 2 min, 10 % B; 2 - 15 min, 10 – 75 % B; 15 - 18 min, 90 % B; 18 - 21 min 90 % B; 21 - 23 min, 10% B, 23 - 30 min, 10% B. O fluxo foi de 0,2 mL min^{-1} e a temperatura da coluna mantida a 40ºC.

O espectrômetro de massas será operado nos modos de ionização ESI negativo e positivo com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200, com voltagem capilar em 3.5 kV, pressão do gás de nebulização (N_2) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min^{-1}, temperatura da fonte de 180°C, colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento é calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo a faixa de aquisição de *m/z* 50 até 1200. Experimentos automáticos de MS/MS serão realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue: *m/z* 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão.

Os dados de MS e MS/MS serão processados por meio do *software Data analysis* 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para o processamento dos dados utilizar-se-a o *software Profile Analysis* 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), gerando a matriz dos dados que contém a lista dos íons detectados com o tempo de retenção (TR) e a intensidade de cada *feature* detectado. Para explorar o conjunto de dados serão realizadas análises multivariadas pela análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) e identificação putativa dos principais compostos discriminantes que será realizada através da comparação dos valores da massa exata e perfil de fragmentação MS^n em comparação com os dados da biblioteca do equipamento e bases de dados disponíveis online como FoodB (http://foodb.ca/) e Metlin (https://metlin.scripps.edu).

5.6.1.5.2 Identificação e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides individuais

A identificação e quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides individuais é realizada por cromatográfia líquida (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha), conforme descrito no item do perfil metabólico. Os compostos fenólicos serão caracterizados pelo espectro de UV/Vis (210-800 nm) e massa exata, padrões de fragmentação MS^n em comparação com os dados da biblioteca do equipamento, bases de dados (padrões, Metlin, MassBank, KeggCompound, ChemSpider) e em comparação com padrão comercial. A quantificação dos ácidos fenólicos e flavonoides será realizada através de curva de calibração externa (39 a 5000 ng mL^{-1}) com padrões de ácido gálico, ácido 4-Hidroxibenzoico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido elágico, ácido ferulico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, miricetina, luteolina, quercetina e kaempferol. Os resultados expressos em µg g^{-1} de cada composto.

5.6.1.5.3 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais serão determinados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1998), com modificações realizadas por Mazzutti et al., (2018). Será preparada uma solução na concentração de 10 mg mL^{-1}, em que uma alíquota de 10 µL de extrato e 600 µL de água destilada e misturados em 50 µL de reagente não-diluído de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EUA). Após 1 min, foi adicionado 150 µL de Na_2CO_3 a 20% (p / v) e o volume completado até 1 mL com água. As amostras são incubadas por 2 horas a 25 °C no escuro. A absorbância será medida a 760 nm em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices®). O conteúdo fenólico expresso em mg g^{-1} de ácido gálico (GAE) através de curva padrão de ácido gálico, as análises serão feitas em triplicata.

5.6.1.5.4 Flavonoides totais

Os flavonoides totais serão determinados segundo Zhishen; Mengcheng; Jianming, (1999), com modificações. A partir do extrato preparado para os compostos fenólicos, foi adicionado 120 µL de água destilada, 30 µL do extrato preparado para a análise de compostos fenólicos totais, 9 µL de nitrito de sódio 5% (m/v) e aguardado por 5 minutos. Após é adicionado 9 µL de cloreto de alumínio 20% (m/v) e novamente esperar por 6 minutos. Posteriormente, é acrescentado 30 µL de NaOH 1 mol/L e 72 µL de água destilada. A leitura da abosbância é realizada em espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices®) a 510 nm. A quantificação será realizada a partir da curva padrão de catequina e os resultados expressos em mg 100 g^{-1} de (+)-catequina.

5.6.2 Estudo II: Avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos extratos

5.6.2.1 Atividade antioxidante

5.6.2.1.1 Em leveduras

A atividade antioxidante em levedura será desenvolvida com base no trabalho desenvolvido por Medina et al., (2011). Primeiramente, será realizado ensaios preliminares para que as concentrações dos extratos não sejam citotóxicas para células. A atividade antioxidante nas leveduras será realizada utilizando células eucarióticas de *Saccharomyces cerevisiae*, em que suspensões celulares contendo $2x10^6$ células de levedura/mL serão tratados com os extratos e incubados durante 1 h a 28°C, sob agitação constante no escuro. As células serão estressadas com 50 mM solução de peróxido de hidrogênio durante 1 h a 28°C. Após a incubação, as colônias serão contadas e o número total de colônias observadas na placa de controle (células não tratadas) será definido como 100% de sobrevivência celular.

5.6.2.1.2 ORAC

O método ORAC (Capacidade de absorção do radical de oxigênio), será realizado de acordo com o método por Dávalos; Gómez-Cordovés; Bartolomé, (2004). Para a reação, os extratos serão misturados com a solução tampão fosfato 75 mM (pH 7,0), num volume final de 200 µL. Após alíquotas de 20 µL da amostra diluída e 120 µL de fluoresceína (70 nM) serão colocadas, em triplicata, em uma microplaca de fundo plano transparente de 96 poços. A mistura será incubada a 37 °C por 15 min (Spectramax 190, Molecular Devices®). Seguido da adição de 60 µL do radical peroxil (AAPH [2'2'azobis (2-amidinopropano), na concentração de 32 mM. A leitura será realizada a cada minuto por 80 minutos. Os resultados serão expressos a partir de curva de padrão (3 a 40 µM g^{-1}) equivalente de Trolox µM g^{-1} .

5.6.2.1.3 FRAP

O método FRAP (Poder antioxidante de redução do íon férrico), será realizado conforme metodologia descrita por Rufino et al., (2006). A partir da obtenção do extrato, será transferido uma alíquota de 90 µL de cada diluição do mesmo em tubos de ensaio, em ambiente escuro e será acrescentado 270 µL de água destilada. Posteriormente, será misturado com 2.700 µL do regeante FRAP, homogeneizado em agitador e mantido em banho-maria a 37ºC, por 30 minutos. Após a leitura será realizada em espectrofotômetro a 595 nm (Spectramax 190, Molecular Devices®). Os resultados serão expressos a partir da curva de padrão de sulfato ferroso em µM g^{-1}.

5.6.2.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos será determinada utilizando o método de Espectro de Ação por Disco de Difusão em Ágar, a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrito por Ostrosky et al. (2008).

Inicialmente as culturas Gram negativas e Gran positivas serão recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 36ºC overnight. Após, as culturas

serão padronizadas até a concentração de 0,5 da escala Mc Farland, correspondente a 108 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL-1) e diluídas em água peptonada de caseína até a concentração de 105 UFC.mL-1. As culturas serão inoculadas através de swabs em placas. Em seguida serão adicionados, em cada placa, três discos de papel de filtro estéril com 6 mm de diâmetro. Sobre os discos de papel serão adicionados 15 µL dos extratos. O solvente utilizado na preparação do extrato será usado como controle negativo. As placas serão incubadas.

Os diâmetros dos halos de inibição serão medidos com o auxílio de um paquímetro e o resultado expresso em milímetros (mm). Quanto maior o halo de inibição, maior a atividade antimicrobiana do extrato contra o micro-organismo testado. Todos os ensaios serão realizados em triplicata.

Os extratos que apresentarem atividade antimicrobiana no teste de Disco de Difusão em Ágar, serão submetidas à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada uma das espécies bacterianas, sendo que CIM será considerada a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento bacteriano após o período de incubação (OSTROSKY et al., 2008).

Essa avaliação será realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do DEAQ- UDESC.

*5.6.2.3 Atividade anti-inflamatória (*in vitro*)*

Para avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro*, será investigado o efeito dos extratos sobre a produção de óxido nítrico (NO), sobre as células ativadas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), as quais são pertinentes a condição inflamatória, associado a doenças cardiovasculares e sobre a interleucina (IL-1) que será realizado em culturas celulares da linhagem de macrófagos estimuladas por LPS (lipopolissacarídeo) e INF-γ 9 (Interferon gama). A viabilidade celular será determinada pelo ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio), o qual consiste em um ensaio colorimétrico para avaliar o potencial citotóxico (GREEN et al., 1982; MACIEL et al., 2002).

5.6.3 Estudo III: Aplicação dos extratos em produtos

O estudo III será realizado a partir dos resultados obtidos nos estudos anteriores com relação, principalmente, a constituição e propriedades dos extratos.

Alguns exemplos de estudos que podem embasar a pesquisa para possíveis aplicações são, por exemplo, estudos sobre micro encapsulamento de extratos para posterior aplicação (CHANG, et al,. 2010), aerogel para o desenvolvimento de embalagens ativas e inteligentes, com intuito de retardar processos de oxidação e deterioração microbiana em alimentos (CHEN; HO, 1995; OLIVEIRA et al., 2019).

Diante disso, após a análise de dados do estudo I e II será realizado uma aplicação dos extratos, com a proposta de elaborar de nanocápsulas para aplicação em embalagem ativa.

Outra aplicação estudada será a avaliação de possível efeito alelopático de alguns extratos.

5.6.3.1 Atividade alelopática

O potencial alelopático dos extratos foliares será avaliado conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), com modificações. Serão utilizadas sementes de alface (Lactuca sativa cv. Grandsrapids), obtidas comercialmente (Chapecó, Santa Catarina, Brasil). Para o teste serão semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), 25 sementes com 4 repetições biológicas por tratamento. Na base de cada Placa de Petri, coloca-se papel filtro umedecido com uma quantidade de extratos equivalentes a três vezes a massa de papel seco. Posteriormente, as placas são levadas para câmara de germinação a 25 ºC, com luz branca constante por 5 dias, quando então, são quantificadas as sementes germinadas e a medida das raízes e parte áera da plântula.

5.5.4 Análise estatística

O delineamento experimental será inteiramente casualizado, organizado em esquema fatorial entre quatro materiais vegetal (folha de araçazeiro, butiazeiro, guabirobeira e pitangueira e três solventes de extração (H_2O, EtOH:H_2O e EtOH). Os

dados serão submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando significativo comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o *software SAS* (Versão 8.0).

Para o perfil metabólico, com intuito explorar o conjunto de dados e visualizar as diferenças entre as amostras, será realizada a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA), o qual gera uma pontuação para a importância das variáveis (VIP *score*). Essas análises serão realizadas pelo software MetaboAnalyst 3.0.

6. RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

O objetivo do presente trabalho foi produzir extratos das folhas de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e pitangueira (*Eugenia uniflora*), por diferentes métodos, identificar e quantificar os compostos, e estudar a atividade antioxidante, antimicrobiana, alelopática e anti-inflamatória.

Com o desenvolvimento do trabalho esperava-se verificar se a extração por PLE, bem como o uso dos diferentes solventes poderiam exercer influência nas características químicas, bem como nas potencialidades e características biológicas dos extratos, quando comparados com a infusão, um método comum e popular do uso das folhas. Além disso, buscava-se gerar conhecimento científico e tecnológico a respeito das espécies estudadas.

Para a execução, o projeto foi dividido nas seguintes etapas:

I: obtenção e caracterização dos extratos;

II: avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos extratos; e,

III: prospecção de aplicação dos extratos.

Esse trabalho foi desenvolvido como projeto em consórcio com a participação da doutoranda Giovana Paula Zandoná. Nesse sentido, cada um dos procedimentos e análises foi realizado por uma das participantes do projeto, constando nos documentos da tese de ambas as participantes. Buscou-se compartilhar as formações e habilidades das pessoas e das instituições envolvidas (UFPEL, UDESC e URI).

6.1 Desenvolvimento do projeto

6.1.1 Etapa I: Obtenção e caracterização dos extratos.

Obtenção dos extratos por PLE

Para obtenção dos extratos, utilizaram-se folhas de guabirobeira e pitangueira coletadas nos pomares da Embrapa Clima Temperado em Pelotas, RS, em acessos listados no Sisgen com o número: A8703BA. As folhas foram secas em estufa com

circulação de ar (Ethink Tecnhnology®), por 72 h a 40ºC, e, posteriormente, moídas em um moinho de facas (Marconi M48), com peneira de 30 mesh, seco e moído foi então armazenado em sacos plásticos envoltos em papel alumínio a -20 ºC (Figura7).

Figura 5. Folhas secas e moídas.

O processo de extração por PLE foi realizado junto ao Laboratório de Termodinâmica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), em Erechim-RS, sob a supervisão do professor Alexander Junges e baseado em estudo realizado por Jaques et al., (2008), com modificações.

Figura 6. Frasco para recolhimento da amostra no processo de extração por PLE.

Os parâmetros utilizados no processo foram: pressão de 1500 *psi*, temperatura 50°C, 15 g de amostra, vazão de descarga de solvente de 2 mL por minuto, com

extração estática de 30 minutos. Para as extrações utilizaram-se os seguintes solventes: água destilada, etanol (PA 95% Dinâmica) e a mistura (1:1 v/v) de água destilada e etanol (PA 95% Dinâmica).

Primeiramente, desenvolveu-se um estudo da cinética da extração utilizando-se folhas de araçazeiro para, a partir dele, determinar-se o tempo de extração para todas as espécies estudadas. A cinética fez a relação entre a massa total de extrato acumulada (g) que foi determinada pela quantidade de extrato seco total nos pontos: 1, 3, 5, 9, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 120 e 180 minutos de extração e pelo tempo de extração.

Conforme pode ser visualizado em Zandona, et al. (2020) (artigo publicado referente a esse estudo), em 60 minutos de extração obteve-se em média 60% da massa total do extrato. Além disso, 60 minutos de extração resultam em economia de energia de 65% em comparação com 180 minutos, e a composição qualitativa é a mesma. Por esse motivo, esse tempo foi selecionado para as extrações. Todos os extratos passaram por processo de secagem para remoção dos solventes para, dessa forma, minimizar a influência destes no seu comportamento.

Os extratos obtidos com água foram liofilizados (Liobras, L101), já os extratos obtidos com etanol e água, primeiramente foram secos em estufa a vácuo (modelo Quimis Q819V2), com temperatura de 50ºC até peso constante, com intuito de remover o etanol, e posteriormente liofilizados para remoção da água. Os extratos obtidos com etanol foram submetidos à secagem em estufa a vácuo (modelo Quimis Q819V2), na temperatura de 50 ºC até peso constante. Todas as amostras foram armazenadas em ultra freezer (-60ºC).

Infusão

Com o intuito de comparação, foram também elaborados extratos através de infusão, que foi preparada numa proporção de 1:50 m/v de folhas secas e moídas em água 80 ± 1 ° C por 10 min (SANTOS et al., 2018). Após a obtenção dos extratos iniciou-se a etapa de caracterização através da análise dos compostos fitoquímicos. Esta etapa foi realizada pela doutoranda Giovana Zandoná no Laboratório de Cromatografia e espectrometria de massas – LaCEM/ UFPEL. A metodologia utilizada é descrita a seguir.

Análise de compostos fitoquímicos

Cem mg de extrato seco de cada condição de extração (AI, PLE-W, PLE-W: E, PLE-E) foram independentemente ressuspensos em 1 mL de uma solução contendo 90% de água acidificada (0,1% de ácido fórmico) e 10% de acetonitrila acidificada (0,1% de ácido fórmico). A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e centrifugada a 2,655 g (Centrifuge 5420 R, Eppendorf®) por 1 min a 4 ºC. Antes da injeção, os extratos foram diluídos com água acidificada/acetonitrila 9:1 para 30 mg mL^{-1} (utilizando a solução de água/acetonitrila descrita anteriormente) e filtrados através de um filtro de seringa de náilon 0,22 µm para posterior injeção. Reserpina (2 µg mL^{-1}) foi adicionada a cada amostra como um padrão interno. 10 µL da amostra diluída foram injetados (três injeções para cada extrato) em cromatografia líquida de alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplada a um espectrômetro de massa ultrarrápido de tempo de vôo quadrupolo (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação cromatográfica foram utilizadas uma pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e uma coluna Cogent Bidentate C18 (2,2 µm 120 A - 100 mm x 2,1 mm) (MicroSolv Technology Corporation, Leland NC, EUA). As fases móveis foram: água acidificada com ácido fórmico 0,1% (eluente A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1% (eluente B). Para a separação, o gradiente de eluição foi: 0 - 2 min, 10% B; 2 - 15 min, 10 - 75% B; 15 - 18 min, 90% B; 18-21 min 90% B; 21 - 23 min, 10% B, 23 - 25 min, 10% B. A taxa de fluxo foi de 0,2 mL min-1 e a temperatura da coluna foi de 40ºC. As amostras foram executadas no modo de ionização negativa e o intervalo de varredura m/z foi de m/z 50 a 1200. A voltagem capilar foi ajustada em 3,5 kV, gás nebulizador (N2) pressão 2 bar, fluxo de gás de bainha 8 L min^{-1}, temperatura da fonte de íons 180 °C, colisão RF 150 Vpp; transferir 70 ms e armazenamento pré-pulso de 5 ms. O equipamento foi calibrado com solução de formiato de sódio (10 mM). Experimentos automáticos de MS / MS foram executados usando as seguintes energias de colisão: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV. O nitrogênio foi usado como gás de colisão.

Os dados de MS e MS / MS foram processados usando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A anotação do composto foi realizada por comparação com dados de MS de alta resolução, razão de isótopos e comparação de fragmentos de íons detectados com padrões de referência e bancos de dados online FooDB Versão 1.0 (https://foodb.ca/) e Metlin ™ (https: // metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage) e dados da biblioteca de

equipamentos. Quando boas correspondências foram obtidas, uma tentativa de anotação foi relatada, bem como o nível de confiança da identificação (ou seja, compostos identificados, compostos supostamente identificados pela classe, compostos identificados supostamente e compostos desconhecidos) sugeridos pela Metabolites Standards Initiative (SUMNER et al., 2007).

Para análise quantitativa, uma curva de calibração para cada padrão comercial fenólico disponível (ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido singárico, ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido ferúlico, (+) - catequina , miricetina, luteolina, quercetina e caempferol) (0,039 a 10 µg mL^{-1}). Os resultados foram expressos em µg g^{-1} como média ± erro padrão de três repetições. Para os compostos fenólicos para os quais não havia padrão comercial disponível, a quantificação foi realizada usando a área de compostos e os resultados expressos como média ± erro padrão de três repetições.

6.1.2 Estudo II: Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana *dos extratos.*

Nessa segunda fase dos estudos buscou-se avaliar o potencial dos extratos frente a diferentes atividades biológicas. As análises antioxidantes ROS e TBARS foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, enquanto os ensaios com leveduras foram realizados no Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS. Segue a descrição das metodologias utilizadas nas análises.

Atividade antioxidante - Modelo de cérebro de rato

Ratos *Wistar* machos (trinta e cinco com 35 dias) foram mantidos em temperatura, umidade e iluminação constantes, com ração e água *ad libitum.* Todo protocolo experimental foi previamente aceito pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição (CEEA 5747-2015) e foi realizado com o Guia do NIH para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Os ratos foram sacrificados por decapitação e os cérebros foram dissecados (imediatamente após o sacrifício) e homogeneizados em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7,4) contendo KCl (140 mM, 1:10, p/v). Os homogenatos foram centrifugados a 800 g por 10 min a 4 ° C e o sobrenadante foi usado para medições bioquímicas. Dez microlitros de peróxido de

hidrogênio (5 mM) e 5 µL de sulfato ferroso (20 µM) foram adicionados a 225 µL de homogenatos cerebrais para induzir dano oxidativo. 10 microlitros de diferentes concentrações de extratos de folhas de araçazeiro (AI, PLE-W, PLE-E e PLE-W: E nas concentrações finais de 25, 50, 100, 250 µg mL^{-1}) foram adicionados à mistura e incubados por 1 h a 37 °C. O ácido ascórbico (AA) a 100 µM foi usado como um antioxidante padrão. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) foram então medidas em homogenatos de tecido. A peroxidação lipídica foi medida com base nos níveis de TBARS relatados como proteína ŋmol TBARS mg^{-1} (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990). A formação de ROS foi determinada com base na oxidação do diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína (DCFH-DA) a diclorofluoresceína fluorescente (DCF) e expressa como uma porcentagem do controle (ALI, LEBEL, & BONDY, 1992). O conteúdo de proteína foi determinado usando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976) para estimar os marcadores oxidativos. Esse teste foi conduzido com o auxílio da equipe da Professora Francieli Moro Stefanello, do CCQFA da Ufpel.

Ensaio de levedura

A atividade antioxidante também foi determinada usando células eucarióticas da levedura Saccharomyces cerevisiae XV 185-14C (MATa, ade 2-1, arg 4-17, his 1-7, lys 1-1, trp 1-1, trp 5-48, hom 3-10) (MEDINA et al., 2011). Um estoque desta cepa foi mantido em meio sólido de levedura-batata-dextrose (YPD), é o meio geral usado para cultivar levedura, contendo extrato de levedura (1% p/v), glicose (2% p/v), peptona (2 % p/v) e ágar (2%, p/v). As células foram então transferidas para um caldo (a mesma composição de meio sólido sem ágar) e colocadas em um agitador orbital a 28 ° C e 160 rpm. Suspensões celulares contendo 2 x 106 células de levedura/mL foram então tratadas com extratos de folhas (AI, PLE-W, PLE: WE e PLE-E) diluídos a 25, 50, 100, 250 e 500 µg mL^{-1} (extrato: água) e incubado por 1 h a 28 °C sob agitação constante no escuro. As células foram então centrifugadas (2.000 g a 28 °C durante 5 min) e lavadas com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) (duas vezes). As células foram então submetidas a estresse com solução de peróxido de hidrogênio 50 mM por 1 h a 28 ºC. As amostras foram então diluídas com solução de cloreto de sódio (0,9% p/v), semeadas em meio de cultura YPD completo e incubadas a 28 ºC por 48 h. Após a incubação, as colônias foram contadas e o número total de colônias observadas nas células não tratadas foi definido como 100% de

sobrevivência celular. As células de controle foram tratadas com meio de cultura sem tratamento com peróxido de hidrogênio (C), controle com meio de cultura e com tratamento com peróxido de hidrogênio (IC) e ácido ascórbico (AA) a 100 µg mL^{-1}, quercetina (Q) a 100 µg mL^{-1}, e kaempferol (K) a 100 µg mL^{-1} foram utilizados como padrões.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi investigada em parceria com a professora Liziane Schittler Moroni, no laboratório de microbiologia da Universidade Estadual de Santa Catarina, UDESC, Pinhalzinho, SC. Segue a descrição do método utilizado.

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos foi utilizado o método Agar Diffusion Disc Action Spectrum e determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos (OSTROSKY et al., 2008). Os testes antibacterianos foram realizados com cepas bacterianas escolhidas em função sua importância na ciência e segurança alimentar e pelas características estruturais (Gram-negativas e Gram-positivas). Foram testadas: Staphylococcus aureus Gram-positivo ATCC 25923 e Listeria monocytogenes Scott A e Pseudomonas aeruginosa Gram-negativa ATCC 9027, Escherichia coli ATCC 25922, Salmonella Enteritidis ATCC13076 e Shigella flexeri ATCC 1202.

As culturas bacterianas foram incubadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 36ºC por 18 h. A concentração de células bacterianas foi padronizada para 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a 108 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} e diluída em água peptonada até a concentração de 105 UFC mL^{-1}. As culturas foram inoculadas por swab de placa e, em seguida, três discos estéreis de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram adicionados a cada placa e cobertos com 10 µL dos extratos das folhas diluídos em água destilada (1 $mgmL^{-1}$). O diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano foi medido e o resultado expresso em milímetros (mm) após 48 h de incubação.

Os extratos com atividade antimicrobiana no teste do Agar Difusion Disc, promovendo um halo de inibição de crescimento maior que 10 mm, foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM mg mL^{-1}) contra cada espécie

bacteriana. CIM foi estabelecido como a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento bacteriano após o período de incubação (Figura 9).

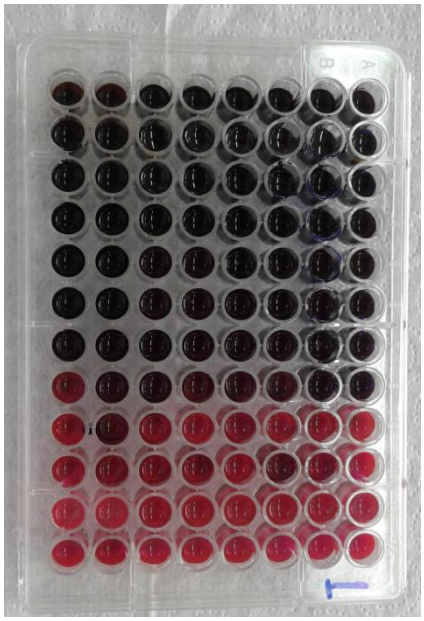

Figura 7. Placa de análise microbiológica das amostras.

6.1.3 Etapa III: Prospectar aplicações dos extratos.

Com o intuito de prospectar possíveis aplicações dos extratos, foi realizado um teste para avaliar o potencial alelopático dos extratos das folhas de pitangueira. Abaixo a metodologia utilizada neste teste.

O potencial alelopático dos extratos foliares das folhas de pitangueira foi avaliado conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com modificações. Foram realizados testes de germinação e comprimento das raízes de alface (*Lactuca sativa* cv. *Grandsrapids*), obtidas comercialmente (Chapecó, Santa Catarina, Brasil). Para o teste de germinação foram semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), 25 sementes com 4 repetições biológicas por tratamento. Na base de cada Placa de Petri, colocou-se papel filtro umedecido com uma quantidade de extratos equivalentes a três vezes a massa de papel seco. Posteriormente, as placas foram levadas para câmara de germinação a 25ºC, com luz branca constante por 5 dias, quando se quantificaram as sementes germinadas, sendo essas aquelas que apresentaram protrusão da radícula, expressando os resultados em percentual de germinação (Figura 10). O tratamento controle foi realizado substituindo os extratos por água destilada. Foram realizados doze testes utilizando extratos obtidos com

diferentes solventes (AI, PLE-W, PLE-W:E, PLE-E) em 3 concentrações (1, 5 e 10 mg mL^{-1}). Cinco dias após a germinação, mensurou-se o comprimento da radícula e da parte aérea de cada plântula, com os resultados expressos em cm.

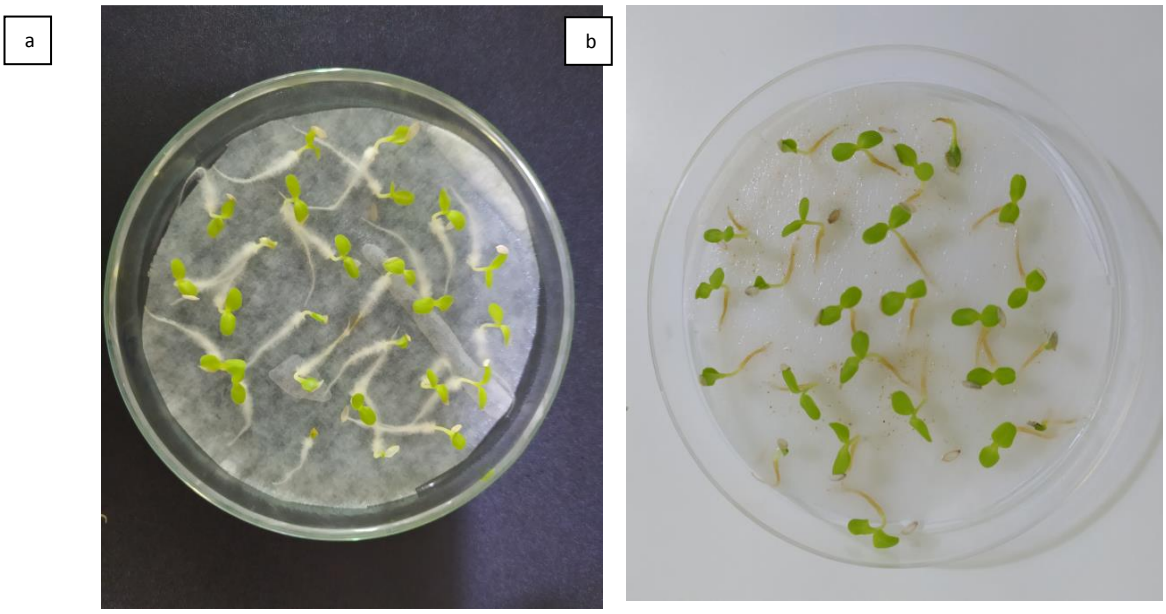

Figura 8. Placas usadas para análise do potencial alelopático dos extratos das folhas de pitangueira a) Testemunha, b) aplicação de extrato de folhas de pitangueira 1%).

6.2 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados nos seguintes artigos:

1. Zandoná, G. P., Bagatini, L., Woloszyn, N., Cardoso, J. de S., Moroni, L. S., Stefanello, F. M., Junges, A., Rombaldi, C. V. **Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (*Psidium cattleianum*) leaf: putatives antioxidant and antimicrobial properties.** Food Research International ,Volume 137, November 2020, 109573.

Concluiu-se, com esse trabalho, que as folhas do Araçazeiro contêm uma ampla gama de compostos, principalmente flavonóides (mais abundantes), ácidos fenólicos, taninos e outros. Todos os extratos geram extratos ricos em compostos fitoquímicos e que as extrações PLE-W e PLE-W:

E proporcionam alta diversidade de compostos, conferindo alta atividade antioxidante in vitro e antibacteriana.

2. **Caracterização de compostos fenólicos de extratos de folhas de *Eugenia uniflora* e suas atividades antioxidante, antibacteriana e alelopática.** Lucíola Bagatini, Giovana Paula Zandoná, Jessica Fernanda Hoffmann, Liziane Schittler Moroni, Alexander Junges, Aniela Pinto Kempka, Cesar Valmor Rombaldi.

   Com a realização deste trabalho concluiu-se que os extratos de folhas de pitangueira obtidos por AI em PLE exibiram substancial capacidade antioxidante para proteção de leveduras em baixas concentrações do extrato, ação antibacteriana, e atividade alelopática.

3. **Composição fitoquímica, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos da folha de Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*).** Lucíola Bagatini[a], Giovana Paula Zandoná[a], Liziane Schittler Moroni[c], Alexander Junges[b], Aniela Pinto Kempka, Cesar Valmor Rombaldi[a*]

   Com este trabalho concluiu-se que os extratos de folhas da guabirobeira obtidos por AI e PLE apresentam ampla diversidade e concentração de compostos fitoquímicos, principalmente da classe dos flavonoides. O PLE-W:E destacou-se na atividade antimicrobiana e potencial atividade antioxidante uma vez que apresentou a maior concentração de flavonoides.

Colaboradores dos artigos

- Giovana Paula Zandoná e Lucíola Bagatini: Doutorandas que participaram da concepção e execução do projeto.
- Natália Woloszyn: Mestranda da URI, colaborou na obtenção dos extratos por PLE.
- Franciele Stefanello e Juliana Cardoso: Colaboraram nas análises de atividade antioxidante.
- Liziane Schittler Moroni: Docente da UDESC, orientação para testes de atividade antimicrobiana dos extratos.

- Alexander Junges: Docente URI, orientação na obtenção dos extratos por PLE
- Jessica Fernanda Hoffmann: Análise estatística dos dados da avaliação de compostos fitoquímicos.
- Aniela Pinto Kempka: Análise estatística
- César Valmor Rombaldi: Orientador deste projeto de doutoramento.

7. ARTIGO 1: Caracterização de compostos fenólicos de extratos de folhas de *Eugenia uniflora* e suas atividades antioxidante, antibacteriana e alelopática.

Lucíola Bagatini[a,d], Giovana Paula Zandoná[a], Jessica Fernanda Hoffmann[a,b], Juliane de Souza Cardoso[c], Liziane Schittler Moroni[d], Alexander Junges[e], Aniela Pinto Kempka[d], Francieli Moro Stefanello[c], Cesar Valmor Rombaldi[a*]

[a]Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s / n, Pelotas, RS, Brasil, 96010-900. Caixa Postal 354 +55 (53) 3275.7284. giovana.zandona@hotmail.com; luciola.bagatini@udesc.br

[b] Mestrado Profissional em Nutrição e Alimentos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde - itt Nutrifor, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Av. Unisinos, 950, CEP 93022-750, São Leopoldo, RS, Brasil. jessicahoffmann@unisinos.br

[c] Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s / n, Pelotas, RS, Brasil, 96010-900. Caixa Postal 354. fmstefanello@gmail.com, ju.souza591@gmail.com

[d]Universidade catarinense, BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha, Pinhalzinho, SC, Brasil, 89870-000. liziane.schittler@udesc.br

[e] Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e as Missões, Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 - Fátima, Erechim, RS, Brasil, 99709-910. junges@uricer.edu.br

* Autor para correspondência: cesarvrf@ufpel.edu.br; +55 (53) 32757284 x 215

Manuscrito elaborado conforme normas do periódico Food Research International

ISSN 0963-9969.

Qualis 2020: A1

Fator de impacto: 4.972

RESUMO

O Brasil é um país com enorme diversidade e variabilidade genética vegetal e algumas espécies têm despertado interesse da comunidade científica. Dentre essas espécies destaca-se a *Eugenia uniflora L*, conhecida como pitangueira, cujos frutos apresentam relevantes compostos, com diversas atividades biológicas que podem ser exploradas. As folhas da pitangueira são utilizadas na medicina popular por apresentarem diversos efeitos benéficos na saúde. O método de obtenção dos extratos das folhas interfere na sua composição e qualidade. A extração com líquido pressurizado (PLE), apresenta algumas vantagens com relação a outros métodos, como por exemplo a rapidez, menor consumo de solventes e alto rendimento, sendo uma alternativa para extração e fracionamento de produtos naturais. Neste contexto, objetivou- se com esse trabalho a obtenção de extratos das folhas de pitangueira por meio de infusão aquosa (Al) e por líquido pressurizado com água (PLE-W), etanol (PLE-E) e combinação da relação água: etanol 1:1 (PLE-W:E). Nos extratos foram avaliados os compostos fitoquímicos presentes através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, atividade antioxidante frente a leveduras e em células cerebrais de ratos (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS e espécies reativas de oxigênio - ROS), atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e atividade alelopática em sementes de alface. Com base nos resultados obtidos, observa-se que PLE-W:E apresentou maior concentração de ácidos fenólicos e taninos. Quanto a atividade antibacteriana o Al, PLE-W e PLE-W:E apresentaram ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Referente a atividade antioxidante tanto os extratos obtidos por PLE quanto Al exibiram substancial atividade antioxidante em ensaios *in vitro* de TBARS e ROS com células de cérebro de ratos e sistemas modelo de levedura além de atividade alelopática para sementes de alface. Assim, as folhas de pitangueira podem ser exploradas como uma fonte promissora de compostos bioativos.

Palavras-chave: Pitangueira; Myrtaceae; extração de líquido pressurizado; compostos fitoquímicos; antioxidante; antimicrobiano; Atividade alelopática.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por ter uma das maiores diversidade e variabilidade genética vegetal do planeta (ARAUJO et al., 2019; REISSIG & ROMBALDI, 2017). Com exceção das espécies já popularizadas, como é o caso do guaraná, açaí, acerola, pequi, cupuaçu, feijoa, por exemplo, a maioria das espécies vinha tendo interesse praticamente local ou regional, inclusive pela comunidade científica (DE LIMA et al., 2020; PEREIRA et al., 2018, VINHOLES et al., 2017). No entanto, isso mudou. Mesmo sendo espécies dos biomas brasileiros, o interesse científico e tecnológico se expandiu para o cenário internacional (LINDEN et al., 2020; LAZARINI et al., 2020; SOBEH et al., 2020; CASTRO et al., 2020; BRIGHENTI et al., 2020; KADE et al., 2008; SOLIMAN et al., 2016; ZANDONÁ et al., 2020). É o caso de espécies da família Myrtaceae, que vêm sendo cada vez mais estudadas, principalmente por apresentarem compostos de interesse nutricional e tecnológico, com perspectivas de utilização nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (DACOREGGIO, MORONI, KEMPK, 2019; DE LIMA et al., 2020; REISSIG & ROMBALDI, 2017; MEIRA et al., 2020; ZANDONÁ et al., 2020). Esta família possui aproximadamente 23 gêneros e 1000 espécies no Brasil (BASTOS et al., 2019). Nessa diversidade de espécies, muitas ainda não são cultivadas comercialmente (REISSIG & ROMBALDI, 2017), enquanto outras já estão sendo caracterizadas em bancos de acessos genéticos, como é o caso da espécie *Eugenia uniflora L*, conhecida como pitangueira (LAZARINI et al., 2016), como cultivar lançada no mercado (“Tropicana”). Vários acessos estão em estudo e apresentam potencial agronômico para se deslocarem para a escala de produção (MEIRA et al., 2020; SOBEH et al., 2020; CASTRO et al., 2020; FRANZON, 2013). Na maioria dos casos, o interesse está na qualidade dos frutos, sejam eles frescos ou processados (CHAVES et al., 2013), mas outras partes das plantas podem ser fontes relevantes de compostos bioativos, como folhas e sementes (MEIRA et al., 2020; SOBEH et al., 2020; MENDONÇA, 2016, VICTORIA et al., 2012, GARMUS et al., 2014).

As folhas de pitangueira são utilizadas na medicina popular, principalmente por seus efeitos diuréticos, anti-reumáticos, anti-febris, antiinflamatórios e como agente terapêutico para doenças estomacais e digestivas (WEYERSTAHL et al., 1988). Além disso, as infusões de folhas são usadas como contribuintes para a ação hipotensiva, renal e hepatoprotetora, antidiarreica, antigota e hipoglicêmica (MEIRA et al., 2020;

SOBEH et al., 2020; AURICCHIO & BACCHI, 2003). As folhas de pitangueira no Brasil também fazem parte da Farmacopéia Brasileira, sendo considerada uma planta medicinal, por conter taninos, flavonóides e óleos voláteis (BRASIL, 2019). No entanto, o perfil dos compostos fitoquímicos ainda não foi descrito na sua totalidade.

Extratos obtidos de folhas, sementes e polpa de pitanga demonstram efeitos antioxidantes (KADE et al., 2008; SCHUMACHER et al., 2015; LORENZO et al., 2018; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; VINHOLES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2015), anti-inflamatório (SCHUMACHER et al., 2015; SOARES et al., 2014), antimicrobiano (MENDONÇA et al., 2016; SANTOS et al., 2015; LORENZO et al., 2018), efeito anti-hiperglicêmico (OLIVEIRA et al., 2017; CARDOSO et al., 2017), antiproliferativo (DENARDIN et al., 2014; GOMES et al., 2020) e como possível adjuvante em terapia para doenças renais (MEIRA et al., 2020) ou hepáticas (SOBEH et al., 2020). Além disso, o óleo essencial extraído das folhas tem atividade antioxidante e antimicrobiana (VICTORIA et al., 2012) e propriedades antidepressivas (VICTORIA et al., 2013; DA COSTA et al., 2020). Mesmo com esses avanços, é difícil reproduzir e comparar os resultados entre as obras, visto que dois fatores relevantes não são consensuais: 1) cada obra utiliza um tipo de acesso de pitangueira, e sabe-se da grande variabilidade genética e fitoquímica dentro das espécies; e, 2) os métodos e condições de obtenção dos extratos ou óleos essenciais variam entre os trabalhos realizados. Essas duas variáveis afetam os perfis fitoquímicos, objeto de estudo neste trabalho.

Os compostos fitoquímicos naturais estão em alta demanda para aplicação como nutracêuticos, biofarmacêuticos e aditivos alimentares (VICTORIA et al., 2012). Dentre os compostos fitoquímicos, as classes de interesse são os compostos fenólicos, carotenóides, tocoferóis, ácido L-ascórbico, óleos essenciais, ésteres, alcalóides e glucosinolatos (REISSIG & ROMBALDI, 2017). No entanto, o método de extração desses compostos é uma das etapas principais, pois afeta a diversidade e a quantidade de compostos (BENTLEY et al., 2020). Além disso, em um viés da química verde, no qual há uma preocupação constante com a redução do uso e com o descarte de solventes perigosos (BENTLEY et al., 2020), o uso de solventes como água e/ou etanol são atitudes relevantes. Portanto, a extração de compostos através da infusão aquosa é um dos métodos amplamente utilizados e resulta em extratos ricos em polifenóis com propriedades antioxidantes (AZEVEDO et al., 2019). O uso da extração

líquida pressurizada (PLE), intensifica a extração de compostos polares, por meio do uso de alta pressão, mantendo o solvente no estado líquido (SANTOS et al., 2015).

Em geral, plantas com alta plasticidade possuem um metabolismo secundário complexo especializado na síntese e acúmulo de ampla diversidade fitoquímica (VIGHI et al., 2019). Essa riqueza fitoquímica que confere à pitangueira tolerância a estressores abióticos como variações de temperatura, vento, falta d'água, excesso de salinidade, excesso ou falta de radiação solar, entre outros, pode interessar à alimentação e à saúde humana. Também foi demonstrado que a complexidade fitoquímica das plantas atua como meio de intercomunicação e defesa, como é o caso da alelopatia (BASILE et al., 2000). Essa propriedade pode proporcionar vantagens competitivas por meio da inibição de plantas concorrentes (KATO-NOGUCHI et al., 2013), e estudos demonstram o efeito alelopático de extratos de folhas de plantas, por meio da atividade inibitória na germinação semestral e/ou crescimento de várias espécies (BASILE al., 2000; DACOREGGIO, MORONI, KEMPKA, 2019; KATO-NOGUCHI et al., 2013).

Considerando os avanços já obtidos com estudos de folhas de pitangueira, que apontam para uma concentração relativamente elevada de compostos fenólicos obtidos por extratos aquosos, hidroalcoólicos (metanol ou etanol) ou por acetona (VICTORIA, et al., 2012; MEIRA et al., 2020; MARTINEZ-CORREA, et al., 2011), uma hipótese é que com a utilização de um método de extração mais eficiente, como o PLE, é possível obter um extrato enriquecido nestes compostos e, com isso, com maior potencial antioxidante, antibacteriano e alelopático. Assim, esta pesquisa foi realizada em duas etapas: 1) descritiva, com a identificação dos compostos fenólicos em cada extrato; e, 2) experimental, comparando os extratos e avaliando as propriedades funcionais putativas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das folhas de pitangueira

As folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) foram coletadas (entre 8h e 10h da manhã da primeira semana de dezembro de 2018) na Embrapa Clima Temperado, Estação de Pesquisa, em Pelotas, RS, Brasil, (31 ° 42 'S, 52 ° 24 'W, Altitude: 57m).

O genótipo utilizado neste estudo foi Pit 106, e o estudo está registrado (# A8703BA) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (Sisgen) de acordo com a regulamentação federal brasileira. O material vegetal foi seco em estufa de secagem com ar forçado (Ethink Tecnhnology®) por 72 h à 40ºC, moído em moinho de facas (Marconi M48), e peneirado em peneira 30 mesh, resultando em partículas com aproximadamente 0,595-0,600 milímetros. O material foliar seco e moído foi armazenado em sacos plásticos embrulhados em papel alumínio a -20 ºC ± 2 ºC, protegidos da luz.

2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos com líquidos pressurizados (PLE) foram obtidos das folhas secas submetidas à extração com água (PLE-W), etanol (PLE-E) e água e etanol (1:1 v/v) (PLE-W: E). Os parâmetros utilizados no processo de extração foram pressão a 1500 psi, temperatura 50 ° C, 15 g de amostra e vazão de descarga de solvente de 2 mL s^{-1}, por 1 hora de extração (ZANDONÁ et al., 2020). Após a extração do PLE, os extratos de PLE-W: E e PLE-E foram secos em estufa a vácuo (modelo Quimis Q819V2), a 50ºC até massa constante. Todos os extratos foram posteriormente liofilizados e armazenados em frascos âmbar (a -60ºC). A infusão aquosa (IA) foi preparada na proporção de 1:50 m/v, (folhas secas e moídas com 13% de umidade) com água a 80 ± 1 ° C por 10 min (SANTOS et al., 2018; ZANDONÁ et al., 2020).

2.3 Análise do perfil fitoquímico por LC-MS

2.3.1 Preparação de amostra

O preparo da amostra foi realizado de acordo com Zandoná et al. (2020). Resumidamente: 100 mg de cada extrato seco obtido por AI, PLE-W, PLE-W: E e PLE-E foram ressuspensos em 1 mL de uma solução contendo 90% de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e 10% de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Depois foi agitado em vórtice por 1 min e centrifugado a 2,655 g (Centrifuge 5420 R, Eppendorf®) por 1 min a 4 ºC, e os extratos foram diluídos com 9: 1 água acidificada/acetonitrila a 30 mg mL^{-1} (usando a água/acetonitrila previamente descrita) e filtrada através de um filtro de seringa de nylon de 0,22 µm

para injeção subsequente. Reserpina (2 µg mL^{-1}) foi adicionada a cada amostra como um padrão interno. Foram injetados 10 µL da amostra diluída (três injeções para cada extrato).

2.3.2 Análise LC-MS

Para a análise dos compostos, os extratos foram injetados em cromatografia líquida de alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplada a um espectrômetro de massa quadrupolo-tempo de vôo (Impact HD, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Os parâmetros de separação cromatográfica e espectrometria de massa foram realizados de acordo com Hoffmann et al. (2016), Corporation, Leland NC, EUA.

2.3.3 Tentativa de identificação

Para a identificação dos compostos, o MS e o MS/MS foram processados no software Data Analysis 4.0 (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Os compostos foram identificados ou provisoriamente identificados com dados de MS de alta resolução, razão de isótopos e comparação de fragmentos de íons detectados com padrões de referência e bancos de dados online FooDB Versão 1.0 (https://foodb.ca/) e Metlin™ (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage) e dados da biblioteca de equipamentos. Uma tentativa de anotação foi relatada, bem como o nível de confiança da identificação: compostos identificados, putativamente identificados pela classe, compostos identificados putativamente.

2.3.4 Quantificação

A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração externa (0,039 a 10 µg mL^{-1}) com padrões comerciais de cada composto fenólico (ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido siringico, ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido ferúlico, (+) - catequina, miricetina, quercetina e kaempferol). Para os compostos fenólicos para os quais não havia padrão comercial, a quantificação foi realizada por meio da curva de calibração de outro composto do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em µg g^{-1} como média ± erro padrão de três repetições.

2.4 Atividade antioxidante por ensaio de levedura

A atividade antioxidante por ensaio de levedura também foi determinada usando células eucarióticas (levedura *Saccharomyces cerevisiae* XV 185-14C, MATa, ade 2-1, arg 4-17, his 1-7, lys 1-1, trp 1-1, trp 5- 48, hom 3-10) (Medina et al., 2011). A *Saccharomyces cerevisiae* foi mantida em meio sólido de levedura-batata-dextrose (YPD), contendo extrato de levedura (1% p/v), glicose (2% p/v), peptona (2% p/v) e ágar (2%, w/v). As células foram transferidas para um caldo e colocadas em um agitador orbital a 28 ° C e 160 rpm. As suspensões de *S. cerevisiae* (2 x 10^6 células de levedura mL^{-1}) foram tratadas com AI, PLE-W, PLE-W: E e PLE-E diluídos a 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 e 250 µg mL^{-1} (extrato: água destilada) e incubados por 1 h a 28 °C sob agitação constante no escuro. As células foram então centrifugadas (2.000 g a 28 °C durante 5 min) e lavadas com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) (duas vezes). Na sequência foram submetidas a estresse com solução de peróxido de hidrogênio 50 mM por 1 h a 28 ºC. As amostras foram então diluídas com solução de cloreto de sódio (0,9% p/v), semeadas em meio de cultura YPD completo e incubadas a 28 ºC por 48 h. Após a incubação, as colônias foram contadas e o número total de colônias observadas nas células não tratadas foi definido como 100% de sobrevivência celular. As células de controle foram tratadas com meio de cultura sem tratamento com peróxido de hidrogênio (C), controle com meio de cultura e com tratamento com peróxido de hidrogênio (IC) e ácido ascórbico (AA) a 100 µg mL^{-1}, quercetina (Q) a 100 µg mL^{-1} e kaempferol (K) a 100 µg mL^{-1} foram utilizados como padrões.

2.4.1 Modelo de cérebro de rato

Ratos *Wistar* machos (trinta e cinco com 35 dias de idade) foram mantidos em temperatura, umidade e iluminação constantes, com ração e água *ad libitum*. Todo protocolo experimental foi previamente aceito pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição (CEEA 5747-2015) e foi realizado com o Guia do NIH para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

Os ratos foram sacrificados por decapitação e os cérebros foram dissecados (imediatamente após o sacrifício) e homogeneizados em tampão fosfato de sódio (20

mM, pH 7,4) contendo KCl (140 mM, 1:10, p/v). Os homogenatos foram centrifugados a 800 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi usado para medições bioquímicas. Dez microlitros de peróxido de hidrogênio (5 mM) e 5 µL de sulfato ferroso (20 µM) foram adicionados a 225 µL de homogenatos cerebrais para induzir dano oxidativo. 10 microlitros de diferentes concentrações de extratos de folhas de pitangueira (AI, PLE-W, PLE-E e PLE-W: E nas concentrações finais de 25, 50, 100, 250 µg mL^{-1}) foram adicionados à mistura e incubados por 1 h a 37 °C. O ácido ascórbico (AA) a 100 µM foi usado como um antioxidante padrão. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) foram então medidas em homogenatos de tecido. A peroxidação lipídica foi medida com base nos níveis de TBARS relatados como proteína ŋmol TBARS mg^{-1} (Esterbauer & Cheeseman, 1990). A formação de ROS foi determinada com base na oxidação do diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína (DCFH-DA) a diclorofluoresceína fluorescente (DCF) e expressa como uma porcentagem do controle (Ali, Lebel, & Bondy, 1992). O conteúdo de proteína foi determinado usando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976) para estimar os marcadores oxidativos.

2.5 Atividade antibacteriana

Os extratos de folhas de pitangueira foram avaliados quanto à capacidade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes Scott A*, *Enterococcus faecalis* FAIR (E77), *Enterococcus faecium* FAIR (E178) e Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Shiguella flexeri* ATCC 1202. Além de suas características estruturais, essas cepas bacterianas foram selecionadas devido à sua importância na ciência e segurança alimentar.

Para os testes foram utilizadas soluções dos extratos na concentração de 1 mg mL^{-1}, preparadas a partir dos extratos secos (PLE-W, PLE-W: E e PLE-E) e água destilada. O AI foi preparado, em igual concentração, a partir das folhas secas e moídas.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada usando o método Agar Diffusion Disc Action Spectrum e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrita por Ostrosky et al. (2008).

O etanol utilizado na extração dos compostos não foi testado quanto à atividade antimicrobiana (controle negativo), pois foi removido na preparação dos extratos.

2.5.1 Difusão de disco

As culturas de bactérias foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 36 ºC por 18 h. Após esse procedimento, as culturas foram padronizadas até a concentração de 0,5 na escala de Mc Farland, que corresponde a 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL^{-1}), e posteriormente diluídas em água peptonada para uma concentração de 10^5 UFC mL^{-1}

As culturas foram inoculadas por esfregaços em placas onde três discos de papel de filtro estéril de 6 mm de diâmetro foram adicionados a cada placa e 10 µL das soluções de extrato foram adicionados aos discos de papel. Os diâmetros dos halos foram medidos e o resultado expresso em milímetros (mm).

2.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), para cada uma das espécies bacterianas, foi determinada para os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de Disco de Difusão de Ágar, com aqueles com halo de diâmetro maior que 10 mm.

CIM foi considerada a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento bacteriano após o período de incubação.

2.6 Atividade alelopática

O potencial alelopático dos extratos das folhas de pitangueira foi avaliado conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com modificações. Foram realizados testes de germinação e comprimento de raízes de alface (*Lactuca sativa* cv. Grandsrapids), obtidas comercialmente (Chapecó, Santa Catarina, Brasil). Para o teste de germinação, 25 sementes com 4 repetições biológicas por tratamento foram semeadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Na base de cada placa de Petri, foi colocado papel filtro umedecido com quantidade de extratos equivalente a três vezes a massa do papel seco. Posteriormente, as placas

foram levadas à câmara de germinação a 25ºC, com luz branca constante por 5 dias, quando foram quantificadas as sementes germinadas, aquelas que apresentavam protrusão da radícula, expressando os resultados em porcentagem de germinação. O tratamento controle foi realizado substituindo os extratos por água destilada. Doze testes foram realizados utilizando extratos obtidos com diferentes solventes (AI, PLE-W, PLE-W: E, PLE-E) em três concentrações (1, 5 e 10 mg mL^{-1}). Cinco dias após a germinação, foi medido o comprimento da raiz e da parte aérea de cada muda, com os resultados expressos em cm.

2.7 Projeto Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições biológicas e três repetições analíticas. Cada réplica biológica é representada por amostras de folhas, submetidas a quatro condições de extração. Esta condição foi repetida três vezes. A análise estatística dos resultados experimentais (perfil fitoquímico e atividade antibacteriana) foi testada por ANOVA one-way e teste post hoc de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ considerado uma diferença significativa na análise pelo software SAS (versão 8.0). A atividade alelopática foi testada por ANOVA one-way e teste post hoc de Dunnett, com $p \leq 0,05$ considerado uma diferença significativa na análise, software SAS (versão 8.0). Todos os tratamentos e análises foram realizados em triplicata. A análise de correlação entre ácidos fenólicos, flavonóides e taninos com atividade antibacteriana foi realizada utilizando o software SAS (versão 8.0). Os diagramas de Venn foram construídos com dados de perfil fitoquímico usando Venny 1.0 (OLIVEROS, 2015).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização de compostos químicos de extratos de folhas de pitangueira

Os compostos fenólicos foram identificados provisoriamente pela análise de massas exatas, espectros de MS/MS e fórmulas moleculares por HPLC-ESI-MS / MS. Dentre todos os extratos, 54 compostos foram identificados putativamente (Tabela 1): 42 estavam presentes no AI, 48 no PLE-W, 50 no PLE: W-E e 49 no PLE-E. Doze eram ácidos hidroxibenzóicos (7 compostos) e ácidos hidroxicinâmicos (5 compostos);

treze eram flavonóides da classe dos flavonóides (2 compostos), flavanonas (1 composto), flavonas (1 composto) e flavonóis (9 compostos); sete eram taninos hidrolisáveis e vinte e dois foram classificados como outros compostos (Tabela 1).

A partir dos diagramas de Venn (Figura 1), observou-se que 39 (72,2%) dos compostos identificados putativamente são comuns a todos os extratos, e 6 (11,1%) são comuns aos extratos obtidos por extração de PLE. De maneira geral, é demonstrado que a extração por PLE resulta em maior diversidade de compostos fitoquímicos. Porém, uma diversidade maior era esperada, principalmente devido à associação de pressão, água e etanol, parcialmente confirmada. Aqui, 27,8% dos compostos foram detectados diferencialmente entre os extratos (Tabela 1). Por exemplo, o kaempferol foi identificado exclusivamente no extrato de PLE-W; ácido daurico exclusivamente em extrato de AI; Ácido 4-hidroxibenzóico exclusivamente em PLE-W: E; e pico número 49 (Fragransol A ou Fragransina C1) exclusivamente em extrato de PLE-E.

Os picos números 36 (**miricetina), 42 (**quercetina), 44 (*4-desacetilneosolaniol ou 15-desacetilneosolaniol), 51 (isoleptospermona, ou [4] -Gingerol, ou [4] -Isogingerol), 52 (*Ácido Pyngenic C b), 54 (*Ácido Pygenic B b) foram compostos identificados apenas em extratos obtidos por PLE (PLE-W, PLE-W: E e PLE-E). Existem três compostos exclusivamente em PLE-W: E e PLE-E: picos número 12 (*Sanguiin H1, ou Heterophylliin A, ou Tercatain, ou Tellimagrandin I), 17 (Granatina A ou Casuariin), e 30 (ácido siríngico) (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1. Compostos fenólicos presentes nos extratos das folhas de pitangueira obtidos por infusão e extração com líquido pressurizado

Número de pico	Rt (min)	Classe	Descrição do composto	Fórmula química	$[M-H]^-$ medido	Fragmentos	mSigma	Ocorrência			
								AI	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
Ácidos Fenólicos											
3	1,9	Ácidos hidroxibenzoicos	* Ácido daucico	$C_7H_8O_7$	203,0195	-	40,9	+	-	-	-
7	2,3	Ácidos hidroxibenzoicos	**Ácido gálico	$C_7H_6O_5$	169,0138	125,0241 (100)	17,2	+	+	+	+
13	3,8	Ácidos hidroxibenzoicos	* Ácido gálico 4-O- (6-galoilglucósido); 1,6-di-O-Galoilglicose	$C_{20}H_{20}O_{14}$	483,0777	-	65,3	+	+	+	+
15	5,0	Ácidos hidroxibenzoicos	** ácido 4-hidroxibenzoico	$C_7H_6O_3$	137,0235	-	2,6	-	-	+	-
16	5,1	Ácidos hidroxicinâmicos	** ácido clorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$	353,0865	-	36,5	+	+	+	+
18	5,6	Ácidos hidroxibenzoicos	** ácido vanílico	$C_8H_8O_4$	167,0345	-	18,4	+	+	-	-
19	5,7	Ácidos hidroxicinâmicos	* Ácido trans-p-cumárico 4- [apiosil- (1-> 2) -glucosídeo]	$C_{20}H_{26}O_{12}$	457,1347	163,0394 (100) 119,0493 (31,3)	5,0	+	+	+	+
23	6,5	Ácidos hidroxicinâmicos	** ácido clorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$	353,0871	-	29,4	+	+	+	+
25	6,8	Ácidos hidroxicinâmicos	* Ácido 4-p-coumaroilquínico; Ácido 3-p-coumaroilquínico; ácido p-coumaroilquínico	$C_{16}H_{18}O_8$	337,0919	-	48,6	+	+	+	+
30	7,5	Ácidos hidroxibenzoicos	** ácido seríngico	$C_9H_{10}O_5$	197,0452	198,0531	21,5	-	-	+	+
31	7,6	Ácidos hidroxicinâmicos	** ácido p-cumárico	$C_9H_8O_3$	163,0399	164,0478	7,3	+	+	+	+

32	7,6	Ácidos hidroxibenzoicos	**Ácido elágico	$C_{14}H_6O_8$	300,9984	-	23,3	+	+	+	+
		Ácidos hidroxibenzoicos	* Ácido daucico								
Flavonoides											
9	2,6	Flavanols	* Gallocatechin; Epigalocatequina	$C_{15}H_{14}O_7$	305,0660	-	53,9	+	+	+	+
10	3,4	Flavanones	* Isosakuranetin	$C_{12}H_{14}O_8$	285,0609	-	38,6	+	+	+	+
14	4,6	Flavanols	** (+) - Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	289,0715	-	24,5	+	+	+	+
27	7,2	Flavonóis	* Miricetina 3-glucosídeo	$C_{21}H_{20}O_{13}$	479,0829	316,0221 (100) 317,0270 (15,3)	67,5	+	+	+	+
29	7,4	Flavonóis	* Miricetina 3-arabinósido; Miricetina 3-arabinofuranosídeo	$C_{20}H_{18}O_{12}$	449,0731	-	62,1	+	+	+	+
33	7,6	Flavonóis	* Miricetrina	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0889	316,0225 (100) 317,0280 (19,2)	47,5	+	+	+	+
34	7,9	Flavonóis	* Quercetina 3-arabinósido; Quercetina 3-xilosídeo	$C_{20}H_{18}O_{11}$	433,0773	-	100,6	+	+	+	+
35	8,0	Flavones	* Luteolina 7-O-glucosídeo	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447,0930	300,0267 (100) 301,0338 (61,5) 151,0022 (2,9)	27,6	+	+	+	+
36	8,2	Flavonóis	** Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	317,0279	-	17,7	-	+	+	+
37	8,3	Flavonóis	* Quercetina 7- (6 '' - acetilglucósido); Quercetina 3- (2-galoilglucosídeo)	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615,0995	317,0301 (100)	8,2	+	+	+	+
39	8,6	Flavonóis	* 2 '' - Galloylastragalin	$C_{28}H_{24}O_{15}$	599,1038	-	77,3	+	+	+	+
42	9,2	Flavonóis	** Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	301,0346	-	5,4	-	+	+	+
47	9,9	Flavonóis	** Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	285,0396	-	10,0	-	+	-	-
Taninos											
5	2,1	Taninos hidrolisáveis	*** Taninos (taninos hidrolisáveis)	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633,0736	300,9982 (100) 275,0189 (38,6)	13,9	+	+	+	+

						249,0393 (31,7) 633,0733 (13,0)					
8	2,5	Taninos hidrolisáveis	*** Taninos (taninos hidrolisáveis)	$C_{34}H_{26}O_{23}$	801,0790	633,0729 (100) 300,9976 (67,3) 614,0529 (48,3)	98,8	+	+	+	+
11	3,4	Taninos hidrolisáveis	*** Taninos (taninos hidrolisáveis)	$C_{34}H_{24}O_{22}$	783,0688	765,0573 (100) 300,9977 (66,5) 169,0127 (43,8) 273,0027 (40,7) 275,0183 (38,8)	38,9	+	+	+	+
12	3,7	Taninos hidrolisáveis	* Sanguiin H1; Heterofilina A; Tercatain; Tellimagrandin I	$C_{34}H_{26}O_{22}$	785,0838	-	77,4	-	-	+	+
17	5,5	Taninos hidrolisáveis	* Granatin A; Casuariin	$C_{34}H_{24}O_{22}$	783,0682	-	53,1	-	-	+	+
20	6,0	Taninos hidrolisáveis	* Tellimagrandin I; Sanguiin H1	$C_{34}H_{26}O_{22}$	785,0845	-	100,2	+	+	+	+
24	6,7	Taninos hidrolisáveis	* Dilactona do ácido sanguissórbico; Dilactona de ácido valoneico	$C_{21}H_{10}O_{13}$	469,0051	-	18,1	+	+	+	+
Outros compostos											
1	1,8	Ácido orgânico	* Ácido málico	$C_4H_6O_5$	133,0144	115,0043 (100)	12,3	+	+	+	+
2	1,9	Ácido benzóico	* 1-O-Galoilfrutose; Galato de 4-glucosil; 3-glucosídeo de ácido gálico	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331,0667	-	38,5	+	+	+	+
4	2,0	Ácido quinico	* Ácido quinico	$C_7H_{12}O_6$	191,0562	191,0564 (100)	15,5	+	+	+	+
6	2,1	Ácido quinico	* Theogallin	$C_{14}H_{16}O_{10}$	343,0670	-	47,3	+	+	+	+
21	6,4	Glicosídeos de acil graxo	* 1-Hexanol arabinosilglucosídeo	$C_{17}H_{32}O_{10}$	395,1916	-	62,4	+	+	+	+
22	6,5	Glicosídeos de acil graxo	* 2- [4- (3-Hidroxipropil) -2-metoxifenoxi] -1,3-propanodiol 1-xilosídeo; Glicósido de ácido 11-hidroxiasmónico; Glicosídeo de ácido 7-epi-12-hidroxiasmônico	$C_{18}H_{28}O_9$	387,1660	-	57,2	+	+	+	+
26	6,9	Glicosídeos de acil graxo	* Bernenin; 2-Succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-carboxilato	$C_{14}H_{16}O_9$	327,0716	-	21,6	+	+	+	-

28	7,3	Compostos O-glicosil	* Icariside D1; Primeverosídeo de feniletil; Álcool benzílico beta-D-rutinósido	$C_{19}H_{28}O_{10}$	415,1612	-	39,5	+	+	+	+
38	8,5	Estilbeno glicosídeos ou flavonóides metilados	* Rhapontin; 2 ', 4', 6'-Trihidroxididrocalcona 4'-glucosídeo	$C_{21}H_{24}O_9$	419,1347	257,0809 (100) 121,0285 (39,5) 153,0546 (32,6) 111,0441 (14,5) 213,0909 (12,1)	78,3	+	+	+	+
40	8,7	Quassinóides	* Glaucarubina	$C_{25}H_{26}O_{10}$	495,2227	-	61,8	+	+	+	+
41	8,9	Diterpenóides	* Bacatina III; Xylocarpus A	$C_{31}H_{38}O_{11}$	585,2343	-	85,2	+	+	+	+
43	9,4	Ácidos esteróides	* Crispolide; Vulgarolide	$C_{15}H_{20}O_5$	279,1226	-	38,6	+	+	+	+
44	9,5	Sesquiterpenóides	* 4-desacetilneosolaniol; 15-desacetilneosolaniol	$C_{17}H_{24}O_7$	339,1437	-	38,0	-	+	+	+
45	9,6	Lactonas terpênicas ou benzofuranos	Tatridin B; Umbelifolida	$C_{15}H_{20}O_4$	263,1284	219,1384 (100) 163,0754 (30,3) 190,0995 (29,3) 125,0231 (31,0)	47,1	+	+	+	+
46	9,7	Ácidos lineólicos e derivados	* (9R, 10S, 12Z) -9,10-Diidroxi-8-oxo-12-octadecenóico ácido	$C_{18}H_{32}O5$	327,2173	211,1329 (100) 171,1015 (64,7) 229,1435 (47,6) 327,2165 (27,3)	67,6	+	+	+	+
48	10,1	Ácidos graxos de cadeia longa	* Ácido corchorifatty F	$C_{18}H_{34}O_5$	329,2329	-	48,7	+	+	+	+
49	10,1	7,7'-epoxilignanos	* 9,12,13-TriHOME; 9,10,13-TriHOME; Ácido pinélico	$C_{21}H_{26}O_6$	373,1652	-	67,6	-	-	-	+
50	10,3	Tetrahidrofuranos ou cetoácidos de cadeia média e derivados	* Fragransol A; Fragransin C1	$C_{12}H_{22}O_3$	213,1486	-	26,7	+	+	+	+
51	10,5	Metoxifenóis ou Eudesmanolidos	* 4-Acetoxi-2-hexiltetra-hidrofurano; Ácido 3-oxododecanoico	$C_{15}H_{22}O_4$	265,1437	-	44,8	-	+	+	+
52	10,8	Prenol lipídios (triterpenóides)	* Isoleptospermone; [4] -Gingerol; [4] -Isogingerol	$C_{30}H_{48}O_6$	503,3379	-	16,4	-	+	+	+

53	11,0	Gama butirolactonas	* Ácido Pyngenic C b	$C_{17}H_{22}O_5$	305,1392	-	49,3	+	+	+	+
54	11,6		* Proazuleno; Naematolona	$C_{30}H_{48}O_5$	487,3429		25,6	-	+	+	+

Número de Pico = os compostos foram ordenados pelo tempo de retenção; RT: tempo de retenção (minutos); mSigma = mSigma, ajuste entre o padrão isotópico medido e teórico (quanto menor o valor de mSigma, melhor a correspondência isotópica); * compostos putativamente identificados (pelo nome do omposto); ** compostos identificados (por padrão de composto); *** putativamente identificado por classe; + presente; - ausente.

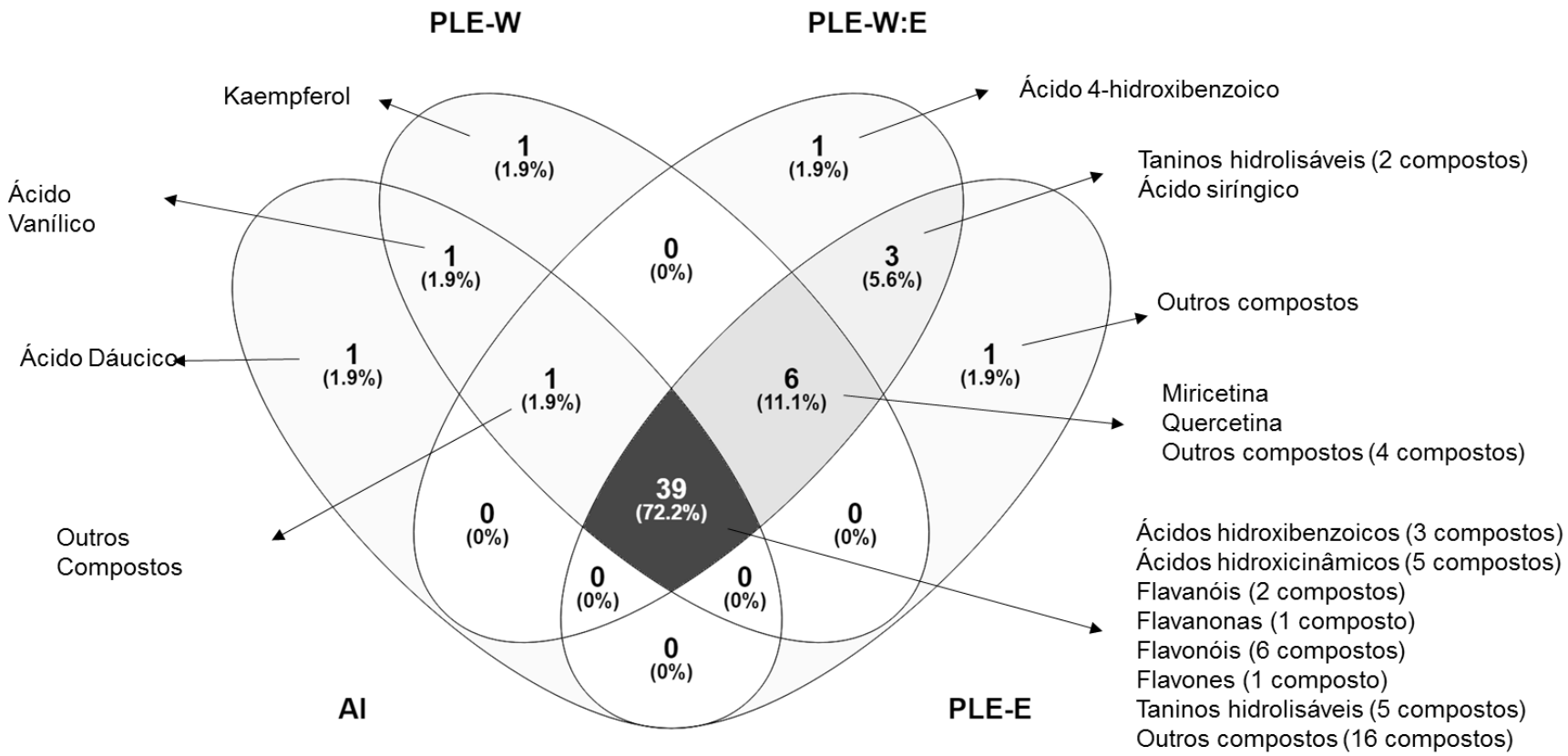

Figura 1. Diagrama de Venn dos compostos putativamente identifcados de extratos de folhas de pitangueira. AI: infusão aquosa, PLE-W: extração por líquido pressurizado com água; PLE-W:E: extração por líquido pressurizado com água e etanol; PLE-E: extração por líquido pressurizado com etanol

3.2 Quantificação de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos dos extratos de folhas de pitangueira

Com base na análise dos ácidos fenólicos e flavonoides por LC-MS / MS, pode-se observar que, dependendo do solvente utilizado, houve diferença na concentração dos compostos. Em geral, os ácidos fenólicos detectados em maior concentração foram o ácido gálico, o ácido siríngico, o ácido clorogênico e o ácido trans-*p*-cumárico 4- [apiosil- (1-> 2) -glucosídeo] (Tabela 2). Para o ácido gálico, a maior concentração esteve presente no PLE-E (410,37 µg g^{-1}) e no PLE-W:E (345,58 µg g^{-1}); para o ácido siríngico a maior concentração foi no PLE-W (258,58 µg g^{-1}), seguido do PLE-E (194,36 µg g^{-1}) e PLE-W: E (191,12 µg g^{-1}); para o ácido clorogênico e ácido trans-*p*-cumárico 4- [apiosil- (1-> 2) -glucosídeo] a maior concentração foi encontrada para PLE-W (258,58 e 154,48 µg g^{-1}, respectivamente). Por outro lado, em concentrações mais baixas foram detectados o ácido vanílico (20,78 µg g^{-1} em PLE-W a 0,04 µg g^{-1} em AI), ácido *p*-cumárico (5,59 µg g^{-1} em PLE-W: E a 0,12 µg g^{-1} em AI) e o ácido elágico (32,62 µg g^{-1} em PLE-W: E a 0,22 µg g^{-1} em AI) (Tabela 2).

Para os flavonoides, o composto identificado putativamente como Quercetina 7- (6 "- acetilglucosídeo) ou Quercetina 3-(2-galoilglucosídeo) foi encontrado em maior concentração nos extratos obtidos com PLE (265,15 µg g^{-1} no PLE- E, seguido de PLE-W e PLE-W:E (235,90 e 243,35 µg g^{-1}, respectivamente) (Tabela 2). O segundo flavonoide encontrado em maior concentração foi a miricetrina no PLE-W (195,15 µg g^{-1}), seguido por PLE-E (175,99 µg g^{-1}) e PLE-W:E (147,88 µg g^{-1}. O terceiro composto encontrado em maior concentração foi o Luteolina 7-*O*-glucosídeo (identificado putativamente) no PLE- W (139,82 µg g^{-1}). Os compostos identificados putativamente com Galocatequina ou Epigalocatequina, Isosacuranetina, Miricetina 3-glucosídeo, 2 " - Galoilastragalina também foram encontrados em concentrações mais elevadas no PLE-E (88,80, 63,98, 46,18, 38,12 µg g^{-1}, respectivamente) (Tabela 2).

Dentre os flavonoides, a catequina foi o composto encontrado em maior concentração, com destaque para o extrato obtido pelo PLE-W (35,66 µg g^{-1}), seguido pelo PLE-E (24,57 µg g^{-1}). Para a miricetina e quercetina, as maiores concentrações foram no PLE-E (16,71 e 4,90 µg g^{-1}, respectivamente), e o Kaempferol foi detectado apenas no PLE-W (1,97 µg g^{-1}) (Tabela 2).

Para a classe de taninos, os compostos identificados putativamente pela classe, número 5 e 8 (Tabela 2), foram encontrados em concentrações mais elevadas

(número 5: 316,37 µg g^{-1} no PLE-W: E e 313,06 µg g^{-1} no PLE-E, e o número 8: 113,06 µg g^{-1} em PLE-W:E e PLE-E, respectivamente). Os compostos identificados putativamente por dilactona de ácido sanguisórbico ou dilactona de ácido valoneico e Tellimagrandina I apresentaram 127,72 e 112,52 µg g^{-1} em PLE-W:E, respectivamente.

Os resultados indicam que, para os ácidos fenólicos, o PLE-W:E foi o extrato que apresentou a maior quantidade total dessa classe de compostos (1.034,37 µg g^{-1}), seguido pelo PLE-E (876,34 µg g^{-1}) e PLE -W (566,45 µg g^{-1}), e o AI foi o método que extraiu a menor quantidade desses compostos (7,98 µg g^{-1}). Para os flavonoides, o extrato com maior concentração total de compostos foi o PLE-E (895,02 µg g^{-1}), seguido pelo PLE-W (845,67 µg g^{-1}) e PLE-W:E (651,27 µg g^{-1}), e AI extraiu a menor concentração de compostos (16,76 µg g^{-1}). Para os taninos, a mistura de solventes proporcionou maior concentração desta classe de compostos (PLE-W: E 853,58 µg g^{-1}), seguido de PLE-E (788,31 µg g^{-1}), PLE-W (402,82 µg g^{-1}) e a menor quantidade foi em AI (6,58 µg g^{-1}).

Tabela 2. Quantificação de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos de extratos de folhas de pitangueira obtidos por infusão e extração com líquido pressurizado

Compounds	Pitangueira leaf extracts							
	AI		PLE-W		PLE-W:E		PLE-E	
Ácidos Fenólicos (µg g^{-1})								
3 * ácido dáurico (1)	0,35 ± 0,00	a	nd		nd		nd	
7 ** ácido gálico ([1])	1,76 ± 0,01	d	38,57 ± 0,47	c	345,58 ± 5,57	b	410,37 ± 3,34	a
13 * ácido gálico 4-O- (6-galoilglucósido);	0,26 ± 0,00	d	36,89 ± 0,18	b	22,49 ± 0,23	c	39,36 ± 0,49	a
1,6-di-O-Galoilglicose	nd		nd		4,18± 0,02	a	nd	
1,6-digaloil-beta-D-glucopiranose	3,31 ± 0,01	d	258,58 ± 0,51	a	191,12 ± 0,51	c	194,36 ± 0,66	b
15 ** ácido 4-hidroxibenzoico (2)	0,04 ± 0,02	b	20,78 ± 1,41	a	nd		nd	
16 ** Ácido clorogênico (3)	1,19 ± 0,05	d	154,48 ± 1,64	a	88,39 ± 2,43	c	110,82 ± 0,99	a
18 ** ácido vanílico (4)	0,24 ± 0,00	d	19,02 ± 0,26	a	3,51 ± 0,27	c	7,59 ± 0,04	b
19 * ácido trans-p-cumárico 4- [apiosil- (1-> 2) -glucosídeo] (6)	0,49 ± 0,02	d	21,12 ± 0,12	a	15,90 ± 0,36	c	18,49 ± 0,43	b
23 * ácido clorogênico (3)	nd		4,01 ± 0,06	c	324,99 ±1,25	a	72,64 ± 0,42	b
25 * ácido 4-p-coumaroilquínico; Ácido 3-p-coumaroilquínico;	0,12 ± 0,00	c	5,14 ± 0,28	ab	5,59 ±0,02	a	4,64 ± 0,02	b
Ácido p-coumaroilquínico (6)	0,22 ± 0,00	d	7,86 ± 0,14	c	32,62 ± 0,01	a	18,07 ± 0,02	b
Total	7,98		566,45		1,034,37		876,34	
Flavonoides (µg g^{-1})								
9 * Galocatequina; Epigalocatequina (8)	0,73 ± 0,01	d	31,41 ± 0,27	b	8,78 ± 0,15	c	88,80 ± 0,83	a
10 * isosacuranetina (8)	0,77 ± 0,04	d	57,75 ± 1,26	b	45,46 ± 1,84	c	63,98 ± 1,22	a
14 ** (+) - Catequina (8)	0,35 ± 0,01	d	35,66 ± 0,11	a	4,11 ± 0,00	c	24,57 ± 0,15	b
27 * Miricetina 3-glucosídeo (9)	1,14 ± 0,02	d	40,59 ± 0,37	b	32,62 ± 0,27	c	46,18 ± 0,25	a
29 * Miricetina 3-arabinósido; Miricetina 3-arabinofuranosídeo (9)	0,75 ± 0,01	d	23,03 ± 0,28	b	19,24 ± 0,44	c	26,50 ± 0,23	a
33 * Miricetrina (9)	5,77 ± 0,10	d	195,15 ± 0,52	a	147,88 ± 0,56	c	175,99 ± 1,83	b
34 * Quercetina 3-arabinósido; Quercetina 3-xilosídeo (10)	0,50 ± 0,00	d	36,09 ± 0,39	a	22,14 ± 0,31	c	30,44 ± 0,35	b

35 * Luteolina 7-O-glucosídeo (10)	2,69 ± 0,04	d	139,82 ± 0,75	a	84,90 ± 0,83	c	113,68 ± 2,36	b
36 ** Miricetina (9)	nd		5,59 ± 0,01	c	11,14 ± 0,02	b	16,71 ± 0,03	a
37 * Quercetina 7- (6 '' - acetilglucósido); Quercetina 3- (2-galoilglucosídeo) (10)	3,78 ± 0,10	c	243,35 ± 0,91	b	235,90 ± 2,94	b	265,15 ± 1,25	a
39 * 2 '' - Galoilastragalin (10)	0,28 ± 0,01	c	33,35 ± 0,20	b	34,61 ± 0,62	b	38,12 ± 0,18	a
42 ** Quercetina (10)	nd		1,91 ± 0,01	c	4,49 ± 0,08	b	4,90 ± 0,06	a
47 ** Kaempferol (11)	nd		1,97 ± 0,00	a	nd		nd	
Total	16,76		845,67		651,27		895,02	
Taninos								
5 *** Taninos (taninos hidrolisáveis) (8)	4,20 ± 0,03	c	148,07 ± 2,61	b	316,37 ± 9,60	a	313,06 ± 16,45	a
8 *** Taninos (taninos hidrolisáveis) (8)	1,14 ± 0,02	c	113,06 ± 4,42	a	113,06 ± 4,42	a	92,08 ± 1,93	b
11 *** Taninos (taninos hidrolisáveis) (8)	nd		nd		86,21 ± 1,57	a	83,12 ± 1,75	a
12 * Sanguiin H1; Heterofilina A; Tercatain; Tellimagrandin I (8)	0,49 ± 0,00	d	73,20 ± 0,37	b	44,14 ± 0,47	c	78,20 ± 0,98	a
17 * Granatina A; Casuariin (8)	nd		nd		53,56 ± 0,35	a	32,92 ± 1,14	b
20 * Tellimagrandin I; Sanguiin H1 (8)	0,49 ± 0,01	d	52,32 ± 1,52	c	112,52 ± 2,88	a	103,50 ± 1,41	b
24 * dilactona do ácido sanguisórbico; Dilactona de ácido valoneico (8)	0,26 ± 0,00	d	16,17 ± 0,59	c	127,72 ± 2,17	a	85,43 ± 2,00	b
Total	6,58		402,82		853,58		788,31	

Valores expressos em µg g^{-1}; média ± erro padrão; nd: não detectado; médias seguidas pelas mesmas letras dentro de uma linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). AI: infusão aquosa, PLE-W: extração líquido pressurizado com água, PLE-W: E: extração líquido pressurizado com água e etanol, PLE-E: extração líquido pressurizado com etanol. * compostos identificados putativamente; ** compostos identificados por padrão de composto; *** compostos identificados putativamente por classe. Quantificação: µg ácido gálico (1) g^{-1}; µg ácido 4-hidroxibenzóico (2) g^{-1}; µg Ácido clorogênico (3) g^{-1}; µg Ácido vanílico (4) g^{-1}; µg Ácido sirínico g^{-1} (5); µg de ácido p-cumárico g^{-1} (6); µg de ácido elágico g^{-1} (7); µg (+) - Catequina g^{-1} (8); µg Miricetina g^{-1} (9); µg Quercetina g^{-1} (10); µg Kaempferol g^{-1} (11)

3.3 Atividade antioxidante de extratos de folhas de pitangueira (ensaio de levedura, TBARS e ROS)

Pelo teste antioxidante com leveduras, se verificou que a aplicação de agente oxidante (H_2O_2 50 mM) em células que foram cultivadas sem extratos, resultou na letalidade de 77% das células. Somente 23% das células se mantiveram viáveis após o tratamento com H_2O_2 50 mM (Figura 2.A, 2.B, 2.C e 2.D). Quando as leveduras foram cultivadas em presença de antioxidantes como ácido L-ascórbico, quercetina ou kaempferol, todos na concentração de 100 µg mL^{-1}, a sobrevivência média foi de 72%. Esse achado era esperado, já que se trata de leveduras sensíveis à oxidação e o cultivo das células em meio com presença de antioxidantes previne a mortalidade das leveduras. Em função desse resultado, passou-se a testar os extratos de folhas de pitangueira em concentrações variando de 25 µg mL^{-1} a 250 µg mL^{-1}.

Como resultados dos testes com os extratos na proteção das leveduras, de modo geral, se observou que todos protegeram as leveduras da ação do H_2O_2, e essa resposta foi concentração-dependente, dentro de certos limites, para cada extrato; na concentração de 100 µg mL^{-1} todos os extratos geraram uma proteção similar àquela proporcionada pelos antioxidantes ácido L-ascórbico, quercetina e kaempferol. Para o extrato AI as concentrações 125, 150, 175 e 200 µg mL^{-1} geraram proteção equivalente aos antioxidantes citados (Figura 2.A). Os demais extratos apresentaram maiores níveis de proteção em comparação aos padrões de AA, Q e K, em concentrações de 125, 150, 175 e 200 µg mL^{-1} para o PLE-W (Figura 2.B); 125, 150 e 175 µg mL^{-1} para o PLE-W:E (Figura 2.C), e 125, 150 e 175 µg mL^{-1} para o PLE-E (Figura 2.D), sendo que entre essas concentrações, em cada extrato, não apresentaram diferença significativa entre si. As concentrações abaixo de 75 µg mL^{-1} para o AI, 50 µg mL^{-1} para PLE-W, PLE-W:E e PLE-E, e acima de 225 µg mL^{-1} para AI e PLE-W, e de 250 µg mL^{-1} para PLE-W:E e PLE-E resultaram em menor proteção às leveduras.

Mais detalhadamente, todos os extratos, já na concentração de 25 µg mL^{-1} proporcionaram proteção das leveduras frente ao agente oxidante. Por exemplo, com o cultivo em presença dos extratos em média 50% das leveduras sobreviveram com essa concentração. Esse nível de sobrevivência subiu para 59%, com 50 µg mL^{-1}, para 67% com 75 µg mL^{-1}, para 84% com 100 µg mL^{-1}, e estabilizando-se em 125, 150 e 175 µg mL^{-1}, com aproximadamente 88% de células sobreviventes. Esse

comportamento foi similar em todos os extratos, apenas variando os valores de sobrevivência e os valores máximos. Nesse particular, os 76% máximos de sobrevivência com o extrato AI foi com concentração de 125 µg mL^{-1}, com o extrato PLE-W foi 98% na concentração 175 µg mL^{-1}, com o extrato PLE-W:E foi de 102% na concentração de 150 µg mL^{-1} e com o extrato PLE-E foi de 91% na concentração de 175 µg mL^{-1}. Por fim, se verificou que, a partir da concentração de 200 a 250 µg mL^{-1}, houve maior letalidade de células. Observa-se que para a concentração de 200 µg mL^{-1} teve 77% de sobrevivência celular, para 225 µg mL^{-1} teve 63% e para 250 µg mL^{-1} apresentou 52%, o que indica uma redução da sobrevivência da levedura nessas concentrações (Figura 2.A, 2.B, 2.C e 2.D).

Quando comparado cada extrato, na mesma concentração, observa-se que os extratos obtidos com PLE apresentaram melhores resultados para as concentrações de 125, 150 e 175 µg mL^{-1}, sendo que na concentração de 125 µg mL^{-1} o extrato PLE-W:E proporcionou maior sobrevivência celular para *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2.E).

Para TBARS observa-se que para o AI, a infusão em todas as concentrações testadas (25, 50, 100 e 250 µg mL^{-1}) não teve diferença significativa quando comparado com o IC, apenas padrão de ácido ascórbico apresentou efeito protetor as células ($p \geq 0.001$). Para o PLE-W quando comparado o IC com 25, 100 e 250 µg mL^{-1}, observa-se que o extrato nessas concentrações protegeu as células ($p \geq 0.001$), assim como para IC comparado a concentração de 50 µg mL^{-1} ($p \geq 0.01$). Todas as concentrações testadas tiveram efeito protetor. Quando comparado entre as concentrações, observa-se que não apresentam diferença significativa entre si, o que indica que pode ser utilizado a menor concentração testada (25 µg mL^{-1}). Para o PLE-W:E, apenas as concentrações de 50, 100 e 250 µg mL^{-1} foram eficientes ($p \geq 0.05$, $p \geq 0.01$ e $p \geq 0.001$, respectivamente). Quando comparado as entre as concentrações, não teve diferença significativa, ou seja, pode ser utilizada a concentração de 50 µg mL^{-1}. Para o PLE-E, todas as concentrações testadas (25, 50, 100 e 250 µg mL^{-1}) comparadas com o IC, tiveram atividade antioxidante ($p \geq 0.001$), sendo que, entre as concentrações do extrato não apresentaram diferença significativa, indicando que a concentração de 25 µg mL^{-1} é tão eficiente quando as concentrações mais altas.

Para ROS, todos os extratos (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E), em todas as concentrações testadas (25, 50, 100 e 250 µg mL^{-1}) quando comparados com o IC group apresentaram efeito protetor as células ($p \geq 0.001$). Para o AI, quando

comparado as concentrações, 250 µg mL^{-1} apresentou melhor resultado. Para o PLE-W, PLE-W:E e PLE-E as diferentes concentrações de extratos não apresentaram diferença significativa entre si, o que indica que em 25 µg mL^{-1} apresenta bons resultados para ROS.

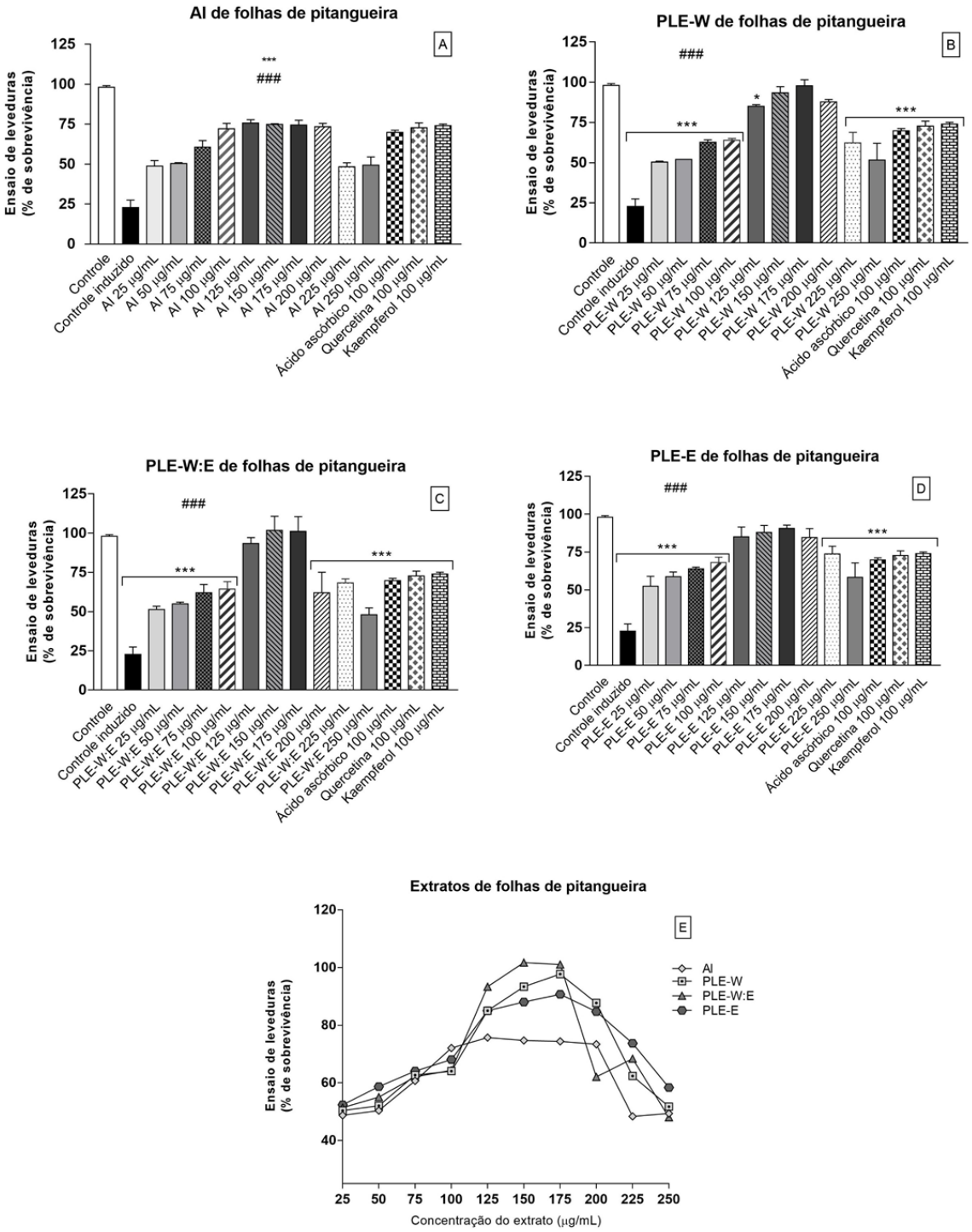

Figura 2. Atividade antioxidante dos extratos de folhas de pitangueira (ensaio de levedura da *S. cerevisiae*). A: para IA; B: para PLE-W; C: para PLE-W: E; D: Para PLE-E; E: ensaio de levedura para todos os extratos em cada concentração.

AI: infusão aquosa, PLE-W: extração líquido pressurizado com água, PLE-W: E: extração líquido pressurizado com água e etanol, PLE-E: extração líquido pressurizado com etanol. Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3) por by one-way ANOVA e Tukey *post hoc* test: *** p <0,001 em comparação ao grupo C (controle); ** p <0,01 em comparação ao grupo C. * p <0,05 em comparação ao grupo C. ### p <0,001 em comparação ao grupo IC (controle induzido). ## p <0,01 em comparação ao grupo IC. # p <0,05 em comparação ao grupo IC. AA: ácido ascórbico; Q: quercetina; K: kaempferol

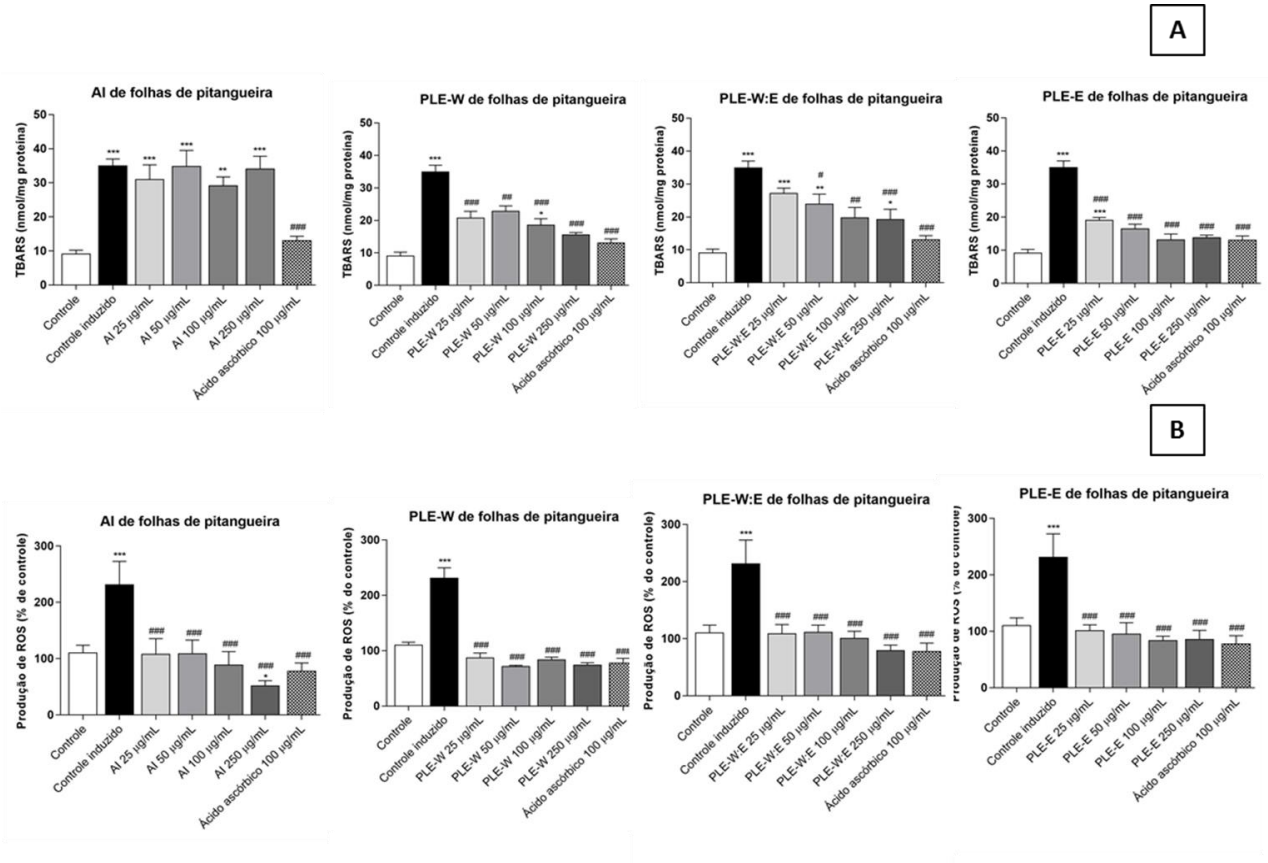

Figura 3. Atividade antioxidante dos extratos de folhas de pitangueira. A: TBARS, B: ROS. AI: infusão aquosa, PLE-W: extração líquido pressurizado com água, PLE-W: E: extração líquido pressurizado com água e etanol, PLE-E: extração líquido pressurizado com etanol. Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3) por one-way ANOVA e Tukey *post hoc* test: *** p <0,001 em comparação ao grupo C (controle); ** p <0,01 em comparação ao grupo C. * p <0,05 em comparação ao grupo C. ### p <0,001 em comparação ao grupo IC (controle induzido). ## p <0,01 em comparação ao grupo IC. # p <0,05 em comparação ao grupo IC. AA: ácido ascórbico; Q: quercetina; K: kaempferol

Tabela 3. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de pitangueira pelo Método de Difusão de Disco e Concentração Inibitória Mínima

		AI		**PLE-W**		**PLE-W:E**		**PLE-E**	
Cepa Bacteriana	Gram	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})
Staphylococcus aureus ATCC 25923	+	19,5 ± 0,7 a	12,5	20,5 ± 0,7 a	12,5	21,0 ± 1,4 a	6,25	≤ 10	nd
Listeria monocytogenes Scott A	+	≤ 10	nd	≤ 10	nd	14,0 ± 0,0	12,5	≤ 10	nd
Enterococcus faecalis FAIR (E77)	+	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd

Enterococcus faecium FAIR (E178)	+	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	-	13.0 ± 0.0	12.5	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd
Escherichia coli ATCC 25922	-	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd
Salmonella enteritidis ATCC13076	-	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd
Shigella flexeri ATCC 12022	-	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd

Nd: não detectado; médias seguidas pelas mesmas letras dentro de uma linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). AI: infusão aquosa, PLE-W: extração com líquido pressurizado com água, PLE-W: E: extração com líquido pressurizado com água e etanol, PLE-E: extração com líquido pressurizado com etanol; +: Gram-positivo; -: Gram-negativo.

Tabela 4. Estimativa de correlação de Pearson para ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e atividade antibacteriana

Número do pico	*Staphylococcus aureus* [1]	*Staphylococcus aureus*[2]	*Listeria monocytogenes* [1]	*Listeria monocytogenes* [2]	*Pseudomonas aeruginosa* [1]	*Pseudomonas aeruginosa* [2]
3	0,22	0,52	-0,33	-0,33	1,00*	1,00*
7	-0,59	-0,94*	0,46	0,46	-0,62	-0,62
13	-0,46	-0,52	-0,08	-0,08	-0,90	-0,90
15	0,41	-0,17	1,00*	1,00*	-0,33	-0,33
16	-0,09	-0,29	0,17	0,17	-0,95	-0,95*
18	0,35	0,52	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33
19	-0,14	-0,23	-0,003	-0,003	-0,90	-0,90
23	0,04	0,17	-0,33	-0,33	-0,59	-0,59
25	-0,22	-0,40	0,13	0,13	-0,97*	-0,97
30	0,21	-0,38	0,97*	0,97*	-0,43	-0,43
31	-0,08	-0,44	0,45	0,45	-0,98*	-0,98
32	-0,92	-0,61	0,85	0,85	-0,68	-0,68
9	-0,92	-0,78	-0,39	-0,39	-0,53	-0,53
10	-0,42	-0,57	0,08	0,08	-0,96*	-0,96*
14	-0,29	-0,09	-0,47	-0,47	-0,62	-0,62
27	-0,44	-0,59	0,08	0,08	-0,96*	-0,96*
29	-0,43	-0,60	0,10	0,10	-0,96*	-0,96*
33	-0,25	-0,43	0,12	0,12	-0,97*	-0,97*

34	-0,26	-0,35	-0,001	-0,006	-0,93	-0,93
35	-0,23	-0,33	-0,004	-0,004	-0,92	-0,92
36	-0,69	-0,94*	0,25	0,25	-0,77	-0,77
37	-0,31	-0,58	0,26	0,26	-0,99*	-0,99*
39	-0,32	-0,61	0,30	0,30	-0,99*	-0,99*
42	-0,50	-0,87	0,48	0,48	-0,81	-0,81
47	0,35	0,52	-0,33	-0,33	-0,33	-0,33
5	-0,42	-0,82	0,53	0,53	-0,85	-0,85
8	-0,03	-0,37	0,41	0,41	-0,98*	-0,98*
11	-0,47	-0,89	0,59	0,59	-0,57	-0,57
12	-0,46	-0,52	-0,09	-0,09	-0,90	-0,90
17	-0,19	-0,72	0,80	0,80	-0,54	-0,54
20	-0,36	-0,79	0,58	0,58	-0,85	-0,85
24	-0,21	-0,73	0,78	0,78	-0,63	-0,63
Stap[1]	1	0,81	0,41	0,41	0,22	0,22
Stap[2]		1	-0,17	-0,17	0,52	0,52
List[1]			1	1,00*	-0,33	-0,33
List[2]				1	0,33	0,33
Pseu[1]					1	1,00*
Pseu[2]						1

* Coeficientes de correlação linear de Pearson significativos a 5% de probabilidade de erro; Ordem do número de pico de acordo com o tempo de retenção da Tabela 1; Peak number 3: Daucic acid; 7: Gallic acid; 13: Gallic acid 4-*O*-(6-galloylglucoside); 15: 4-Hydroxybenzoic acid; 16: Chlorogenic acid; 18: Vanillic acid; 19:trans-*p*-Coumaric acid 4-[apiosyl-(1->2)-glucoside]; 23: Chlorogenic acid; 25: 4-*p*-Coumaroylquinic acid; 30: Syringic acid; 31: *p*-Coumaric acid; 32: Ellagic acid; 9: Gallocatechin or Epigallocatechin; 10: Isosakuranetin; 14: (+)-Catechin; 27: Myricetin 3-glucoside; 29: Myricetin 3-arabinoside; 33: Myricetrin; 34: Quercetin 3-arabinoside; 35: Luteolin 7-*O*-glucoside; 36: Myricetin; 37: Quercetin 7-(6''-acetylglucoside); 39: 2''-Galloylastragalin; 42: Quercetin; 47: Kaempferol, 5: Hydrolyzable tannins; 8: Hydrolyzable tannins; 11: Hydrolyzable tannins; 12: Sanguiin H1; 17: Granatin A; 20: Tellimagrandin I; 24: Sanguisorbic acid dilactone. *Staphylococcus aureus*[1] (halo de inibição: mm); *Staphylococcus aureus*[2] (CIM mg mL^{-1}); *Listeria monocytogenes*[1] (halo de inibição:mm); *Listeria monocytogenes* [2] (CIM mg mL^{-1}); *Pseudomonas aeruginosa* [1] (halo de inibição: mm); *Pseudomonas aeruginosa*[2] (CIM mg mL^{-1}).

3.4 Atividade antibacteriana de extratos de folhas de pitangueira

Para a atividade antibacteriana (Tabela 3) observa-se que das bactérias estudadas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positivo) foi o que sofreu a maior inibição quando foram aplicados extratos de PLE-W: CIM de 6,25 mg mL^{-1} seguido por PLE-W e AI com CIM de 12,50 mg mL^{-1}, respectivamente. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gram-negativa) e *Listeria monocytogenes* Scott A (Gram-positiva) também foram afetadas pela presença dos extratos. *Enterococcus faecium* FAIR (E178) (Gram-positivo), *Enterococcus faecalis* FAIR (E77) (Gram-positivo), *Escherichia co*li ATCC 25922 (Gram-negativo), *Shigella flexeri* ATCC 12022 (Gram-negativo) e *Salmonella enteritidis* ATCC13076 (Gram- negativa) não foram afetados pela presença dos extratos. Com exceção de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gram-negativa), os extratos de folhas de pitangueira demonstraram maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas.

A análise de correlação de Pearson foi realizada entre a concentração de ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes nos extratos de folhas de pitangueira e a CIM desses extratos frente aos microrganismos testados (Tabela 4). Houve uma correlação negativa significativa entre a concentração de ácido gálico (-0,94), compostos de miricetina (-0,94) com a CIM contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Houve também uma correlação negativa significativa entre a concentração de ácido clorogênico (-0,95), Isosakuranetin (-0,96), Miricetina 3-glucosídeo (-0,96 *), Miricetina 3-arabinosídeo (-0,96), Miricetrina (-0,97), Quercetina 7- (6 " -acetilglucosídeo) (-0,99), 2 " -Galoilastragalina (-0,99) e Taninos Hidrolisáveis (-0,98) com CIM contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, indicando que a atividade antimicrobiana é diretamente proporcional à concentração desses compostos nos extratos. Entre a concentração de ácido hidroxibenzóico (1,00) e ácido singárico (0,97) com CIM contra *Listeria monocytogenes* Scott A e ácido Daucic (1,00) com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, notou-se correlação positiva significativa, indicando que o aumento na concentração destes compostos reduz a atividade antimicrobiana.

3.5 Atividade alelopática

A germinação das sementes de alface foi reduzida apenas na presença de PLE-W nas concentrações de 5 e 10 mg mL^{-1} (Tabela 5 e Figura 4). Houve redução

do desenvolvimento radicular em todos os extratos e nas três concentrações testadas (1, 5 e 10 mg mL^{-1}), quando comparadas ao padrão, mostrando que a presença dos extratos influenciou no crescimento das raízes. Nas concentrações de 1 e 5 mg mL^{-1}, o extrato de PLE-E apresentou menor atividade alelopática, seguido de IA. O PLE-W e o PLE-W:E, por outro lado, tiveram comportamento semelhante e influenciaram mais na redução do tamanho da raiz, indicando maior ação alelopática. Porém, na concentração de 10 mg mL^{-1}, apenas o PLE-W: E teve maior ação alelopática, apresentando menor tamanho de raiz.

Em relação ao desenvolvimento da parte aérea, observou-se que nas concentrações de 1 e 5 mg mL^{-1}, todos os extratos apresentaram comportamento semelhante. No entanto, a 10 mg mL^{-1}, PLE-W e PLE-E mostraram maior atividade alelopática seguido por PLE-W: E. AI teve a menor influência.

Tabela 5. Atividade alelopática de extratos de folhas de pitangueira obtidos por infusão e extração com líquido pressurizado

	Germinação (%)			**Medida da Raiz (cm)**			**Medida parte aérea (cm)**		
Extratos	1 mg mL^{-1}	5 mg mL^{-1}	10 mg mL^{-1}	1 mg mL^{-1}	5 mg mL^{-1}	10 mg mL^{-1}	1 mg mL^{-1}	5 mg mL^{-1}	10 mg mL^{-1}
AI	100,00 aA	99,00 Aa	99,50 abA	0,98 bA	0,44 bB	0,35 abB	0,44 aC	0,60 aB*	0,77 aA
PLE-W	99,50 aA	96,00 bB*	94,00 cB*	0,33 cAB	0,28 cB	0,44 aA	0,47 aA	0,54 aA	0,39 cB
PLE-W:E	99,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	0,30 cA	0,32 cA	0,28 bA	0,45 aB	0,53 aA	0,53 bA
PLE-E	100,00 aA	100,00 aA	97,00 bB	1,13 aA	0,62 aB	0,42 aC	0,43 aB	0,55 aA	0,44 cB
Média		99,83			2,12			0,65	
CV		2,10			15,15			10,34	

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas em uma linha (concentrações) e letras minúsculas em uma coluna (extrato) não diferem no teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). As amostras identificadas com * diferem do padrão e ** não diferem do padrão no teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). As amostras identificadas com * diferem do padrão no teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

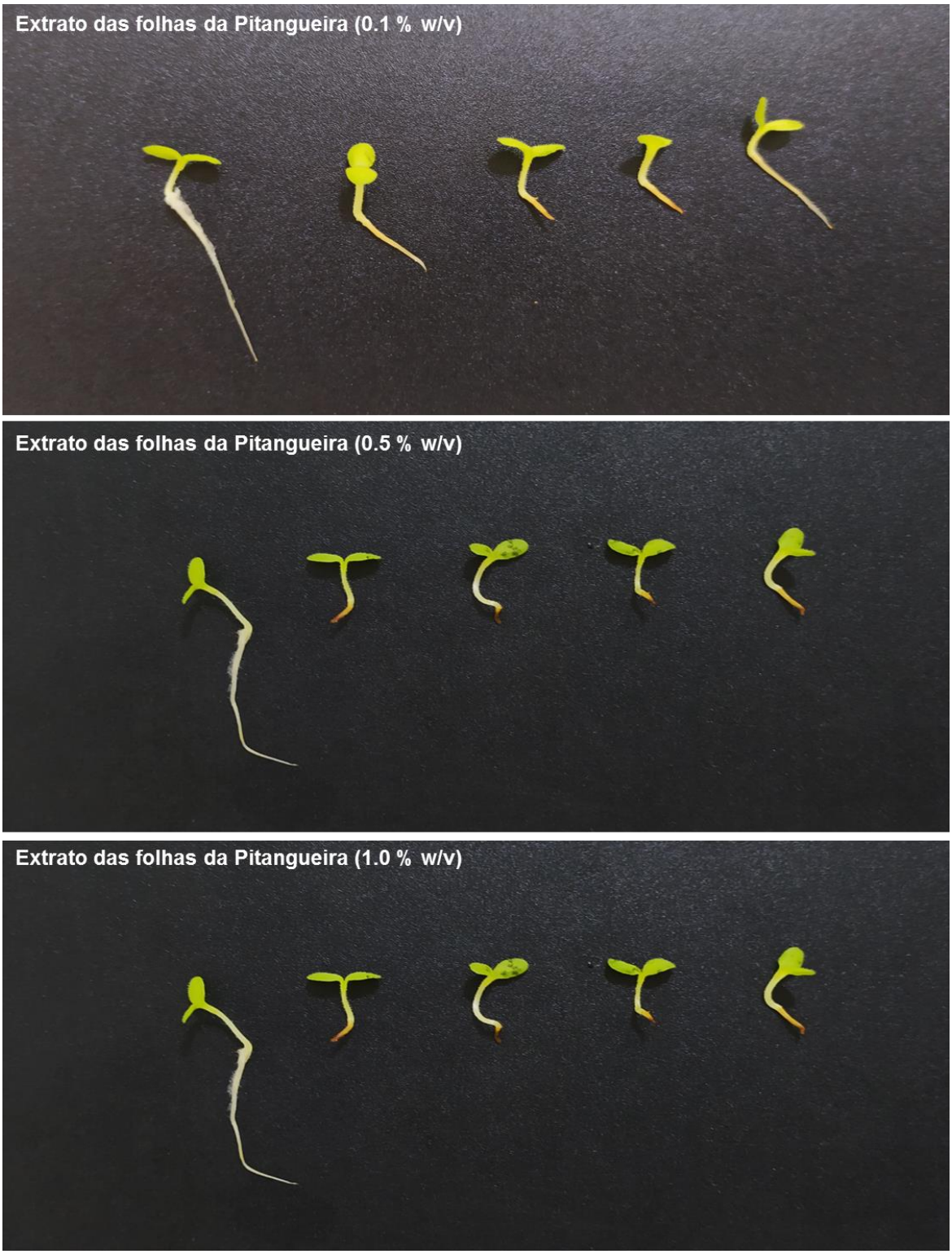

Figura 4. Atividade alelopática de extratos de folhas de pitangueira em alface; A) Aplicação de 1 mg mL^{-1} de extrato de folhas de pitangueira em alface; B) Aplicação dos extratos de folhas de pitangueira 5 mg mL^{-1} em alface; C) Aplicação dos extratos de folhas de pitangueira 10 mg mL^{-1} em alface. Controle: alface sem extrato de folhas de pitangueira. AI: infusão aquosa, PLE-W: extração com líquido pressurizado com água, PLE-W: E: extração com líquido pressurizado com água e etanol, PLE-E: extração líquido pressurizado com etanol

4. Discussão

4.1 Os extratos de folhas de pitangueira são ricos em ácidos fenólicos e flavonoides, e geraram atividade antioxidante para ensaio de leveduras, TBARS e ROS

Os compostos encontrados nesse trabalho corroboram estudos anteriores realizados com extratos de folhas de pitangueira, que mostram a presença de ácido gálico, ácido elágico, miricetina e quercetina (SOBEH et al., 2019; MEIRA et al., 2020). Outras espécies da família *Myrtaceae* também possuem ácidos fenólicos e flavonoides encontrados neste trabalho, sendo que nos frutos de araçá foram detectadas quantidades de 7,4 a 34,1 µg g^{-1} de ácido gálico, 53,8 µg g^{-1} de ácido vanílico, 6,4 a 27,2 µg g^{-1} de ácido elágico, 168,7 a 229,3 µg g^{-1} de catequina, e também foram encontradas miricetina, quercetina e derivados do ácido *p*-cumárico (MALLMANN et al., 2020). No entanto, usando a extração de PLE, a diversidade e a concentração de compostos foram aumentadas. O extrato que gerou a maior concentração de ácidos fenólicos foi o extrato PLE-W:E; esse comportamento foi semelhante ao observado em estudo anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, no qual a mistura entre água e etanol gerou maior extração de compostos fenólicos em extratos foliares de araçazeiro (ZANDONÁ et al., 2020). O estudo realizado por Venkatesan, Choi, & Kim (2019) mostra que misturas de solventes aquosos como água e etanol são mais eficazes para a extração de compostos fenólicos do que a extração com etanol 100% e extratos com 20 a 40% de etanol apresentaram maior potencial para eliminação de radicais livres do que os extratos obtidos com 60 a 100% de etanol (VENKATESAN, CHOI, & KIM, 2019).

Esses compostos presentes nas hortaliças, além de desempenharem papéis importantes na planta, por atuarem como protetores contra o estresse devido a diversos fatores como irradiação, ataque de patógenos e doenças, quando inseridos na dieta humana podem estar associados a benefícios à saúde dos consumidores, através dos possíveis efeitos proporcionados por sua atividade antioxidante (ROLEIRA et al, 2015; HAMINIUK et al., 2012). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é proporcionada por sua capacidade de reagir diretamente com os radicais livres e produzir espécies de radicais menos reativas ou terminar com as reações dos radicais livres, podendo também regenerar antioxidantes primários, doando seu átomo de hidrogênio ou elétron, desativando o oxigênio singlete, ou

sequestrando oxigênio tripleto, decompondo hidroperóxidos em espécies não radicais, íons metálicos quelantes responsáveis pela geração de radicais e absorção de radiação UV (VENKATESAN, CHOI, & KIM, 2019). Esperava-se que os extratos de folhas de pitangueira tivessem alta atividade antioxidante por meio da proteção da célula de levedura, pois a atividade antioxidante apresentou correlação com compostos fenólicos (MEDINA et al., 2011). Observa-se que todos os extratos foram capazes de proteger a levedura, sendo que o extrato PLE-W: E na concentração de 125 µg mL^{-1} apresentou melhor proteção celular (93% de sobrevivência) quando comparado ao PLE-W:E das folhas de araçazeiro, também da família *Myrtaceae*, maiores concentrações do extrato das folhas do araçazeiro (250 µg mL^{-1}) são necessárias para um maior efeito antioxidante da levedura (89% de sobrevivência) (ZANDONÁ et al., 2020).

Para todos os extratos de folhas de pitangueira, a partir da concentração de 225 µg mL^{-1}, houve redução da ação antioxidante e do efeito protetor das células de levedura. A causa exata não é demonstrada neste trabalho, mas provavelmente é o resultado da ação pró-oxidante de compostos bioativos. Outros estudos relataram que altas concentrações desses compostos podem resultar em atividade pró-oxidante sob certas condições (HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; CAO, SOFIC & PRIOR, 1997; PERAZZO, et al., 2014).

Todos os extratos, por terem alta atividade antioxidante, mostraram proteger as células eucarióticas, células do cérebro de ratos, reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo (TBARS e ROS). Para TBARS a concentração de 25 µg mL^{-1} (menor concentração testada) teve atividade de redução dos danos causados por espécies reativas para os extratos obtidos por PLE-W e PLE-E, e 50 µg mL^{-1} para PLE-W:E. Para ROS, uma concentração menor (25 µg mL^{-1}) de todos os extratos obtidos por PLE foi efetiva para proteger as células cerebrais de ratos. Para AI não teve efeito protetor como células cerebrais de ratos pelo método de TBARS, e para ROS foi necessário aplicar uma maior concentração de extrato para ter efeito antioxidante (250 µg mL^{-1}). Isso pode ser explicado em virtude que os extratos obtidos por PLE tem em média 98% a mais de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos do AI.

Quanto às propriedades dos extratos da folha de pitangueira, estudos têm demonstrado que eles possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antipirética e antidiabética (SOBEH et al., 2019), as quais estão relacionadas à presença de compostos fenólicos (SOBEH et al., 2019). Sobeh et al. (2019)

observaram que extratos metanólicos de folhas de pitangueira foram capazes de inibir a lise de hemácias, tendo atividade anti-inflamatória (1000 µg mL^{-1} do extrato foi capaz de inibir a lise de hemácias em 48%, enquanto a aspirina em 68%) (SOBEH et al., 2019). Atividade antinociceptiva também foi observada em extratos de folhas de pitangueira, quando administrados a ratos nas concentrações de 100 e 200 mg kg^{-1}, e apresentou ação antidiabética (SOBEH et al., 2019). Outros estudos mostram que os extratos hidroalcoólicos das folhas de pitangueira previnem problemas renais, aumento da oxidação e apoptose, tendo um efeito protetor que a caracteriza como possível candidato em terapias alternativas para doenças renais (MEIRA et al., 2020). Na medicina popular, as infusões aquosas de folhas de pitangueira, no século XV, eram utilizadas como diuréticos e também no tratamento da hipertensão, sendo tradicionalmente utilizadas para febre, inflamação, problemas intestinais e estomacais (CONSOLINI & SARABBIO, 2002; SOBEH et al., 2019).

4.2 Os extratos das folhas de pitangueira apresentam atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-positivas.

Os extratos de folhas de pitangueira (AI, PLE-W e PLE-W: E) apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, sendo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o que apresentou maior sensibilidade na presença dos extratos. Estudos realizados com óleo essencial (VICTÓRIA et al., 2012) e folhas de extrato de pitangueira (LORENZO et al., 2018) corroboram os resultados do presente trabalho, pois relatam também que *Staphylococcus aureu*s foi a bactéria mais sensível, apresentando os menores valores de CIM.

Geralmente as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis às substâncias antibióticas em plantas quando comparadas às bactérias Gram-negativas (DA SILVA DANNENBERG, et al., 2019). Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular é complexa, constituída por uma membrana composta por uma dupla camada de fosfolipídios ligada à membrana interna por lipopolissacarídeo, que promove uma barreira de permeabilidade, proporcionando maior resistência aos extratos naturais, enquanto os Gram-positivos possuem uma única camada composta principalmente por peptidoglicano que permite que as moléculas dos compostos presentes nos extratos naturais atuem mais facilmente na membrana celular microbiana (DA SILVA DANNENBERG, et al., 2019; SANTOS, et al., 2015).

Dentre os micro-organismos Gram positivos que não foram inibidos pelos extratos são bactérias do gênero *Enterococcus spp,* das espécies *Enterococcus faecalis* FAIR- E77 e *Enterococcus faecium* FAIR - E178 produtoras de bacteriocinas, chamadas de enterocinas (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; KLAN; FLINT; YU, 2010). As enterotoxinas são peptídeos sintetizados nos ribossomas dos enterococos com atividade antagonista contra outros micro-organismos. Quando ocorre a produção de bacteriocinas pelas células são exigidos quatro genes: o gene estrutural que codifica o pré-peptídeo (pré-bacteriocina); o gene responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o gene responsável pela produção de proteínas de transporte que externalizam a bacteriocina (denominado sistema de transporte ABC); e o gene que codifica uma proteína acessória, não pertencente ao sistema de transporte ABC, mas necessária para a excreção da bacteriocina. Os genes responsáveis pela imunidade da célula sintetizam uma proteína concomitantemente com a bacteriocina, pois trata-se de um mecanismo de proteção das cepas bacteriocinogênicas (ROSA; FRANCO, 2002) e este peptídeo poderia estar protegendo os enteterococos da ação dos extratos.

De acordo com nossos resultados, observamos uma variação na atividade antibacteriana em diferentes extratos de pitangueira. Isso pode ser explicado considerando que os compostos químicos, concentrações e sinergismos variam nos extratos das plantas, interferindo em suas ações biológicas (BENTLEY et al., 2020). Um dos fatores que podem influenciar é a concentração dos compostos presentes em cada extrato, havendo correlação negativa significativa entre a concentração de ácido gálico e miricetina com a CIM para a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabela 3), indicando que o aumento a concentração desses compostos reduziu a concentração de extrato necessária para causar a inibição do microrganismo. O mesmo é observado para a CIM de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 com ácido clorogênico, isosacuranetina, miricetina 3-glicosídeo, miricetina 3-arabinosídeo, miricetina, quercetina 7- (6 '' - acetilglucosídeo), 2 '' - Galoilastragalina e taninos hidrolisáveis. Esses resultados demonstram que a concentração desses compostos se correlaciona com a ação antibacteriana dos extratos das folhas de pitangueira contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa.*

De maneira geral, os resultados indicam que extratos das folhas de pitangueira demostram atividade antimicrobiana, especialmente contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, independentemente do método de extração.

4.3 Os extratos de folhas de pitangueira têm atividade alelopática contra alface.

Em relação à atividade alelopática, a germinação das sementes de alface não se alterou na maioria dos extratos. Ao comparar as concentrações com o controle, apenas o PLE-W nas concentrações 5 e 10 mg mL^{-1} gerou um menor percentual de germinação. Porém, reconhece-se que a germinação das sementes é menos sensível a substâncias alelopáticas quando comparada ao desenvolvimento radicular (BOIAGO et al., 2018), o que é observado no presente estudo, pois todos os extratos interferiram no crescimento radicular quando comparados ao controle. Da mesma forma, o desenvolvimento da parte aérea das plantas foi menos afetado do que o das raízes na presença dos extratos. Esses resultados estão de acordo com os observados por Boiago et al. (2018) e Gati et al. (2008) que constataram que as anormalidades parecem ser mais frequentes no crescimento das raízes, mais sensíveis à ação de substâncias alelopáticas, do que na parte aérea da planta.

Ao avaliar a ação dos extratos sobre o comprimento das raízes, esperava-se que, ao aplicar maiores concentrações do extrato ocorreria uma maior redução no comprimento das raízes, uma vez que o aumento na concentração pode aumentar a quantidade de substâncias alelopáticas presentes no extrato (BOIAGO et al., 2018). No entanto, apenas para o extrato PLE-E foi observado que o aumento na concentração do extrato tem um efeito decrescente no comprimento da raiz. Em relação aos extratos, ocorreram oscilações nas respostas inibitórias apresentadas, que foram observadas em outro estudo desenvolvido por Pelegrini & Cruz-Silva (2012) e podem estar relacionadas aos métodos de produção, que afetam a bioatividade e a concentração do metabólico secundário extraído.

Além do efeito no comprimento, constatou-se, qualitativamente, que as raízes sofreram um processo de endurecimento e escurecimento, menos evidente na menor concentração dos extratos (1 mg mL^{-1}) (Figura 4). Essa observação corrobora com alguns estudos recentes que apontam para a crescente relação entre a percepção de necrose e o aumento das concentrações de extratos de folhas de pitangueira (BOIAGO et al., 2018) e espécies da família Myrtaceae (IMATOMI et al., 2015). Segundo Ferreira & Aquila (2000), algumas substâncias com potencial aleloquímico podem induzir o aparecimento de alterações nas mudas, sendo que a necrose da raiz é um dos principais efeitos observados.

Esses efeitos dos extratos nas raízes podem estar relacionados aos mecanismos alelopáticos dos compostos fenólicos, como interferência na divisão celular e inibição do alongamento radicular, que podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Além disso, esses compostos podem causar aumento da permeabilidade da membrana, com consequente fluxo do conteúdo celular, levando ao crescimento lento ou morte do tecido (LI et al., 2010). Eles também podem influenciar a respiração e a fotossíntese das plantas, alterar a atividade e função de certas enzimas e reduzir ou inativar a atividade fisiológica dos hormônios vegetais (LI et al., 2010).

De maneira geral, os resultados indicam a presença de aleloquímicos em extratos de folhas de pitangueira, com capacidade de afetar o desenvolvimento das sementes de alface, demonstrando o potencial alelopático para as espécies testadas. Esse resultado pode ser devido à presença de ácidos fenólicos e flavonóides como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido p-hidroxibenzóico e (+) - Catequina que possuem atividade aleloquímica, inclusive em sementes de alface (Li et al., 2010). Todos os extratos geraram efeito alelopático e PLE-W e PLE-W: E se destacaram, visto que, na menor concentração aplicada, tiveram maior efeito no comprimento da raiz.

4.4 O extrato PLE-W: E apresentou maior concentração e diversidade de compostos fenólicos, mas nem sempre resultou em melhores respostas biológicas em todos os casos

Considerando que o extrato PLE-W: E se destacou quanto à concentração de ácidos fenólicos e compostos de taninos e diversidade de compostos, embora se observe o alto percentual de similaridade entre os quatro extratos (72,2%), era esperado que este extrato tivesse maior impacto nas ações antibacteriana, antioxidante e alelopática. Essa hipótese foi parcialmente confirmada. Para a atividade antioxidante contra leveduras, os extratos PLE-W, PLE-W: E e PLE-E nas concentrações de 125, 150 e 175 µg mL^{-1} tiveram o mesmo comportamento. Ao comparar cada concentração testada de cada extrato com os padrões conhecidos por terem atividade antioxidante (ácido ascórbico, quercetina e kaempferol), o extrato PLE-W: E na concentração de 125 µg mL^{-1} apresentou um efeito melhor do que os padrões utilizados, enquanto para PLE-W e extrato de PLE-E concentrações maiores

(150 µg mL^{-1}) são necessárias para um resultado melhor que os padrões. Enquanto para AI, nenhuma concentração foi melhor do que os padrões usados, embora AI também fornecesse proteção celular.

No entanto, as ações antibacterianas foram diversas, ou seja, o PLE-W: E teve ação inibitória contra dois microrganismos (*Staphylococcus aureus e Listeria monocytogenes*) da mesma forma que o AI (*Staphylococcus aureus* e Pseudomonas aeruginosa), porém, o PLE- W: E apresentou CIM inferior para Staphylococcus aureus (6,25 mg mL^{-1}). O PLE-W teve ação inibitória apenas contra um microrganismo (*Staphylococcus aureus*) enquanto o PLE-E não inibiu o crescimento microbiano. A causa exata dessas diversas respostas não foi esclarecida.

Com relação à ação alelopática avaliada em termos de redução do crescimento radicular, o menor efeito alelopático foi observado com PLE-E nas concentrações 1 e 5 mg mL^{-1} seguido de AI nas mesmas concentrações. Na concentração de 10 mg mL^{-1}, o PLE-W: E apresentou a menor ação alelopática quando comparado aos demais extratos. Quando a alelopatia é avaliada pela diminuição do crescimento de ar, os extratos PLE-W e PLE-E na concentração de 10 mg mL^{-1}, apresentaram maior atividade. De maneira geral, os extratos de PLE resultaram em maiores atividades alelopáticas, entretanto, o extrato com maior concentração e diversidade de compostos (PLE-W: E e PLE-E) nem sempre foi o mais eficiente. De qualquer forma, está sendo demonstrado que os extratos obtidos por PLE das folhas de pitangueira apresentam efeitos antimicrobianos, antioxidantes e alelopáticos.

5. Conclusão

O perfil dos metabólitos secundários fenólicos de extratos de folhas de *Eugenia uniflora* foi realizado utilizando HPLC-MS / MS observou-se que o extrato PLE-W:E apresentou maior concentração de ácido fenólico e compostos taninos, enquanto o PLE-E apresentou maior concentração de flavonoides. Os extratos de folhas de pitangueira obtidos por AI em PLE exibiram substancial atividade antioxidante para proteção de leveduras em baixas concentrações do extrato, antibacteriano, principalmente contra bactérias Gram-positivas, e atividade alelopática para sementes de alface. Mais estudos são necessários, para explorar as propriedades protetoras *in vitro* e *in vivo* dos extratos de folhas de pitangueira, principalmente testes de citotoxicidade são necessários para avaliar a segurança dos extratos.

6. REFERENCIAS:

ARAÚJO, F. F., NERI-NUMA, I. A., FARIAS, D. P., DA CUNHA, G. R. M. C., PASTORE, G. M. Wild Brazilian species of *Eugenia genera* (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes**. Food Research International,** v. 121, p. 57–72, 2019.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.1, p.55-61, 2003.

AZEVEDO, R. S.A.; TEIXEIRA, B.S.; SAUTHIER, M.C.S.; SANTANA, M.V.S.; DOS SANTOS, W.N.L., SANTANA, D. A. Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species Camellia sinensis. **Food Chemistry**, v. 273, p. 39–44, 2019.

BASILE, A., SORBO, S., GIORDANO, S., RICCIARDI, L., FERRARA, S., MONTESANO, D., COBIANCHI, R.C., M.L. VUOTTO, FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from Castanea sativa leaves**. Fitoterapia,** v. 71, p. 110-116, 2000.

BASTOS, R.G.; SALLES, B.C.C.; BINI, I.F.; CASTALDINI, L.P.; SILVA, L.C.D.; VILELA, A.A.; MICHELONI, A.L.C., G.M. DA SILVA, DA SILVA, P.H.C.; MAURE, A.K.; SANTOS, L.L., ROSA, C.P.; DA SILVA AMORIM, A.F., DA ROCHA, C.Q., VILEGAS, W.; DE ARAÚJO PAULA, F.B., DA SILVA, G.A., DA SILVA, M.A. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of Eugenia florida DC. (Myrtaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 317–332, 2019.

BENTLEY, J., OLSEN, E. K., MOORE, J. P., FARRANT, J. M. The phenolic profile extracted from the desiccation-tolerant medicinal shrub Myrothamnusflabellifolia using Natural Deep Eutectic Solvents variesaccording to the solvation conditions. **Phytochemistry**, v. 173, 112323, 2020.

BOIAGO, N. P., FORTES, A. M. T., PILATTI, D. M., & SILVA, P. S. S. DA. Allelopathic bioactivity of fresh and infused aqueous extracts of Brazilian cherry (Eugenia uniflora L.) on lettuce and maize. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, 40(1), 40972, 2018.

BRASIL. Pitangueira. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-**IPA**, 87p, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira: Plantas Medicinais. 6ª edição. Brasília, 2019.

BRIGHENTI, F. L., LUPPENS, S. B. I., DELBEM, A. C. B., DENG, D. M., HOOGENKAMP, M. A., GAETTI-JARDIM JR., E., … TEN CATE, J. M. Effect of Psidium cattleianum Leaf Extract on Streptococcus mutans Viability, Protein Expression and Acid Production. **Caries Research**, 42(2), 148–154, 2008.

CAO G, SOFIC E, PRIOR RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radic Biol Med**. 22(5):749-60, 1997.

CARDOSO, J. S. Et al. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruitextracts in an animal model of insulin resistance. Redox Report: **Communications in Free Radical Research**, 2017.

CASTRO, D.C., ROZYCKI, V., LATORRE, J. D. C., ALESSO, C. A., EXNER, E. DEL. J., PIAGENTINI A., PIROVANI, M.E. Variation of Eugenia uniflora L. fruit quality attributes in the south of the Argentine Gran Chaco. **Forests, Trees And Livelihoods** VOL. 29, NO. 2, 130–142, 2020.

CHAVES, M. A., BARRETO, I. M. A., REIS, R. C., & KADAM, D. M. Physicochemical and sensory properties of purple Brazilian cherry (Eugenia uniflora, L.) foams. International Journal of **Food Science & Technology**, 48(8), 1688–1697. doi:10.1111/ijfs.12139, 2013.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of Eugenia uniflora (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 81, p. 57–63, 2002.

CONSTANTINOU, A., MEHTA R., RUNYAN C., RAO K., VAUGHAN A., MOON R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**. 1995 Feb; 58(2):217-25.

DADI, P. K., AHMAD, M., AHMAD, Z. Inhibition of ATPase activity of Escherichia coli ATP synthase by polyphenols, **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 45, Issue 1, P. 72-79, 2009.

DA COSTA, J. S., BARROSO, A. S., MOURÃO, R. H. V., DA SILVA, J. K. R., MAIA, J. G. S., & FIGUEIREDO, P. L. B. Seasonal and Antioxidant Evaluation of Essential Oil from Eugenia uniflora L., Curzerene-Rich, Thermally Produced in Situ. **Biomolecules**, 10(2), 328, 2020.

DA SILVA DANNENBERG, G., FUNCK, G. D., DA SILVA, W. P., & FIORENTINI, Â. M. Essential oil from pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, 95, 115-120. 2019.

DACOREGGIO, M. V., MORONI, L. S., KEMPK, A. P. Antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities and surface disinfection of the extract of Psidiumcattleianumsabine leaves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101295, 2019.

DE LIMA, A. S., MAIA, D. V., HAUBERT, L., OLIVEIRA, T. L., FIORENTINI, Â. M., ROMBALDI, C. V., DA SILVA, W. P. Action mechanism of araçá (Psidiumcattleianum Sabine) hydroalcoholic extract against Staphylococcus aureus. **LWT -Food Science and Technology**, 119, 2020.

DENARDIN, C. C.; PARISI, M. M.; MARTINS, L. A. M.; TERRA, S. R.; BOROJEVIC, R.; VIZZOTTO, M.; PERRY, M. L. S.; EMANUELLI, T.; FÁTIMA T. C. R. GUMA, F. T. C. R. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (Eugenia uniflora L.) extract on activated hepatic stellate cells. **Cell biochemistry and function**, 2:16–23, 2014.

DINIZ-SILVA, H. T., MAGNANI S., DE SIQUEIRA, S., DE SOUZA, E.L., DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses *norA.* LWT - Food Science and Technology, **Volume 85, Part B, Pages 324-326, 2017**

FERREIRA, A. G. AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma Área Emergente da Ecofisiologia. **R. Bras.Fisiol.Veg**. 12 (Edição Especial):175-204, 2000.

FRANZON, RODRIGO CEZAR. Pitanga: fruta de sabor agradável e de usos diversos. Publicado em: 19/12/2013. Disponível em: https://www.portaldoagronegocio.com.br/artigo/pitanga-fruta-de-sabor-agradavel-e-de-usos-diversos-3579. Acesso em: 21 de março de 2020.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. DE. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

GARMUS, T. T., PAVIANI, L. C., QUEIROGA, C. L., MAGALHÃES, P. M., & CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO2, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, 86, 4–14, 2014.

GATTI, A. B.; LIMA, M. I. S.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic potential of Ocotea odorifera (Vell) Rohwer on the germination and growth of Lactuca sativa L. and Raphanus sativus L. **Allelopathy Journal**, v. 21, n. 1, p. 73-82, 2008.

GOMES, D. B.; ZANCHET, B.; SERPA, P. Z.; LOCATELI, G.; MIORANDO, D.; STEFFLER, A. M.; ZANATTA, M. E. C.; PREDEBON, A. J.; CARTERI, C. S.; LUTINSKI, J.; RUIZ, A. L. T. G.; SANTOS, M. F. C.; BARISON, A.; ROMAN JUNIOR, W. A. Chemical Analysis and in Vitro Antiproliferative Potential of Eugenia uniflora L. (Myrtaceae). **European Journal of Medicinal Plants**, 31(6): 34-44, 2020.

HEIM, K. E., TAGLIAFERRO A. R., BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13 572–584, 2020.

HOFFMANN, J. F. ET AL. Butia spp. (Arecaceae) LC-MS-based metabolomics for species and geographical origin discrimination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 523–532, 2017.

HUANG, Y-H., HUANG, C-C. CHEN C-C., YANG, K-JR., HUANG, C-Y. Inhibition of Staphylococcus aureus PriA Helicase by Flavonol Kaempferol. **Springer Science+Business** Media New York, 2015.

IMATOMI, M., NOVAES, P., MIRANDA, M. A. F. M., & GUALTIERI, S. C. J. Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 37(2), 241, 2015.

KADE, I. J., IBUKUN, E. O., NOGUEIRA, C. W., & DA ROCHA, J. B. T. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of Eugenia uniflora against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 60(4-5), 365–371, 2008.

KATO-NOGUCHI, H., TAKESHITA, S., KIMURA, F., OHNO, O., SUENAGA, K. A novel substance with allelopathic activity in *Ginkgo biloba*. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, 1595– 1599, 2013.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P.-L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-10, 2010.

LAZARINI, J. G., FRANCHIN, M., INFANTE, J., JONAS AUGUSTO RIZZATOPASCHOAL, J. A. R., FREIRES, I. A., ALENCAR, S. M. DE, ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory activity and polyphenolicprofile of the hydroalcoholic seed extract ofEugenia leitonii, an unexplored Braziliannative fruit. **Journal of Functional Foods**, 26, p. 249–257, 2016.

LAZARINI, J. G., FRANCHIN, M., SOARES, J. C., NANI, B. D., MASSARIOLI, A. P., DE ALENCAR, S. M., & ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory and antioxidant potential, in vivo toxicity, and polyphenolic composition of Eugenia selloi B.D.Jacks. (pitangatuba), a Brazilian native fruit. **PLOS ONE**, 15(6), 2020.

LEYVA-JIMÉNEZ F.J., LOZANO-SÁNCHEZ, J., BORRÁS-LINARES, I, ARRÁEZ-ROMÁN, D.A.,. SEGURA-CARRETERO A. Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from Lippia citriodora leaves. **Food Research International**, Volume 109, Pages 213-222, 2018.

LI, Z-H., WANG, Q.,RUAN, X., PAN, C-D, & JIANG, D-A. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LINDEN, M., BRINCKMANN, C., FEUEREISEN, M.M., REVIEW, SCHIEBER, A., Effects of structural differences on the antibacterial activity of biflavonoids from fruits of the Brazilian peppertree (Schinus terebinthifolius Raddi), **Food Research International**. Volume 133, 109134, 2020.

LIU, M., WU, X., LI J., LIU, L., ZHANG R., SHAO, D., DU X., The specific anti-biofilm effect of gallic acid on Staphylococcus aureus by regulating the expression of the ica operon. **Food Control** 73 - 613 e 618, 2017.

LORENZO, J. M., VARGAS, F. C., STROZZI, I., PATEIRO, M., FURTADO, M. M., SANT'ANA, A. S., … DO AMARAL SOBRAL, P. J. Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. **Food Research International,** 114, 47–54, 2018.

MALLMANN, L.P.; TISCHER, B.; VIZZOTTO, M., ELISEU RODRIGUES, E.; MANFROI, V. Comprehensive identification and quantification of unexploited phenolic compounds from red and yellow araçá (Psidium cattleianum Sabine) by LC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 131, 108978, 2020.

MARTINEZ-CORREA, H. A., MAGALHÃES, P. M., QUEIROGA, C. L., PEIXOTO, C. A., OLIVEIRA, A. L., & CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, 55(3), 998–1006, 2011.

MEIRA, E.F., OLIVEIRA, N.D., MARIANI, N.P., PORTO, M.L., SEVERI, J.A., SIMAN, F.D.M., MEYRELLES, S.S., VASQUEZ, E.C., GAVA, A.L. Eugenia uniflora (pitanga) leaf extract prevents the progression of experimental acute kidney injury**. Journal of Functional Foods,** v. 66, 2020.

MENDONÇA, A. T., CARVALHO, A. R., FERREIRA, A. C., RESENDE JÚNIOR, M. C. A utilização dos extratos hidroalcoólico e alcoólico de eugenia uniflora l. Como agente antibacteriano. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v**. 14, n. 1, p. 826-833, jan./jul. 2016.

NASTIC, N., BORRAS-LINARES, I., LOZANO-S´ANCHEZ, J. ˇSVARC-GAJIC, J.J., SEGURA-CARRETERO, A. Optimization of the extraction of phytochemicals from black mulberry (*Morus nigra* L.) leaves, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, V. 68, 25, Pages 282-292, 2018.

OLIVEIRA, A. L., DESTANDAU, E., FOUGÈRE, L., & LAFOSSE, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (Eugenia uniflora L.). **Food Chemistry,** 145, 522–529, 2014.

OLIVEIRA, P. S., CHAVES, V. C., BONA, N. P., SOARES, M. S. P., CARDOSO, J. DE S., VASCONCELLOS, F. A., … STEFANELLO, F. M. (2017). Eugenia uniflora fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 92, 935–941, 2017.

OLIVEROS, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html. Acess: 15/09/2020.

OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., & FREITAS, B. R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** 18 (2) 301-307, 2008.

PELEGRINI, L.L.; CRUZ-SILVA, C.T.A. * Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de Coleus barbatus (A.) Benth. sobre a germinação e o desenvolvimento de Lactuca sativa. **Rev. Bras. Pl. Med.,** Botucatu, v.14, n.2, p.376-382, 2012.

PERAZZO KKNCL, CONCEIÇÃO ACDV, SANTOS JCPD, ASSIS DDJ, SOUZA CO, et al. Properties and Antioxidant Action of Actives Cassava Starch Films Incorporated with Green Tea and Palm Oil Extracts. **PLoS ONE** 9(9): e 105199, 2014.

PEREIRA, E. S.; VINHOLES, J.; FRANZON, R.C.; DALMAZO, G.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. Psidium cattleianum fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry,** v. 258, p. 95-103, 2018.

REISSIG, G. N.; ROMBALDI, C. V. Brazilian native fruits: from a plurality of examples and bioactive compounds to the most divere potentialities. In: Bioactive Compounds: Sources, Properties and Applications. [s.l: s.n.]. (2017).

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde**, 1, 9-15, 2002.

SANTOS, D. N., DE SOUZA, L. L., DE OLIVEIRA, C. A. F., SILVA, E. R., & OLIVEIRA, A. L. DE. Arginase inhibition, antibacterial and antioxidant activities of Pitanga seed (Eugenia uniflora L.) extracts from sustainable technologies of high pressure extraction. **Food Bioscience**, 12, 93–99, 2015.

SANTOS, J. S. ET AL. Optimized Camellia sinensis var. sinensis, Ilex paraguariensis, and Aspalathuslinearis blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, v. 254, p. 348–358, 2018.

SCHUMACHER, N., COLOMEU, T., DE FIGUEIREDO, D., CARVALHO, V., CAZARIN, C., PRADO, M., … ZOLLNER, R. 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, 4(4), 662–680, 2015.

SOARES, D. J. **Efeitos antioxidante e antiinflamatório da polpa de pitanga roxa (Eugenia uniflora L.) sobre células bucais humanas, aplicando experimentos in vitro e ex vivo**. 2014. 98 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará...

SOBEH, M.; EL-RAEY, M.; REZQ, S.; ABDELFATTAH, M.A.O.; PETRUK, G.; OSMAN, S.; EL-SHAZLY, A. M.; EL-BESHBISHY, H.A.; MAHMOUD, M.F.; WINK, M. 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, 111939, 2019.

SOBEH, M., HAMZA, M.S., ASHOUR, M.L., ELKHATIEB, M., EL RAEY, M. A., ABDEL-NAIM, A.B., WINK, M. A Polyphenol-Rich Fraction from Eugenia uniflora Exhibits Antioxidant and Hepatoprotective Activities In Vivo. **Pharmaceuticals** 2020, 13, 84.

SOLIMAN, F. M. ET AL. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of Psidiumguajava L. and Psidiumcattleianum Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 54, n. 2, p. 219–225, 2016.

VENKATESAN, T., CHOI, Y-W, &KIM, Y-K. Impact of Different Extraction Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Potential of Pinus densiflora Bark Extract. **BioMed Research International,** p. 0-14, 2019.

VICTORIA, F. N., DE SIQUEIRA BRAHM, A., SAVEGNAGO, L., & LENARDÃO, E. J. Involvement of serotoninergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect

of E. uniflora L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, 544, 105–109, 2013.

VICTORIA, F. N., LENARDÃO, E. J., SAVEGNAGO, L., PERIN, G., JACOB, R. G., ALVES, D., DA SILVA, W. P., DA MOTTA, A. DE S., NASCENTE, P. DA S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668-2674, 2012.

VIGHI, I.L., CRIZEL, R. L., PERIN, E. C., ROMBALDI, C. V., GALLI, V. Crosstalk During Fruit Ripening and Stress Response Among Abscisic Acid, Calcium-Dependent Protein Kinase and Phenylpropanoid. **Critical Reviews In Plant Sciences**, 38 (2), 99-116., 2019.

VINHOLES, J., LEMOS, G., LIA BARBIERI, R., FRANZON, R. C., & VIZZOTTO, M. In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food Bioscience**, 19, 92–100, 2017.

WEYERSTAHL, P., MARSCHALL-WEYERSTAHL, H., CHRISTIANSEN, C., OGUNTIMEIN, O., ADEOYE, A.O. Volatile constituents of Eugenia uniflora leaf oil. **Planta Med**. 54, 546–549, 1988.

WANG, H., CHU, W., YE, C., GAETA, B., TAO, H., WANG, M., QIU, Z. Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa by regulating quorum sensing. Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol.103(2), pp.903-915, 2019.**

ZANDONÁ, G. P., BAGATINI, L., WOLOSZYN, N., CARDOSO, J. DE S., MORONI, L. S., STEFANELLO, F. M., JUNGES, A., ROMBALDI, C. V. Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (*Psidium cattleianum*) leaf: putatives antioxidant and antimicrobial properties. Food Research International, **Volume 137, 109573, 2020.**

8. ARTIGO 2: Composição fitoquímica, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos da folha de Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*)

Lucíola Bagatini[a], Giovana Paula Zandoná[a], Liziane Schittler Moroni[c], Alexander Junges[b], Aniela Pinto Kempka[c], Cesar Valmor Rombaldi[a*]

[a]Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s / n, Pelotas, RS, Brasil, 96010-900. Caixa Postal 354 +55 (53) 3275.7284. giovana.zandona@hotmail.com; luciola.bagatini@udesc.br
[b]Universidade Regional do Alto Uruguai e as Missões, Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 - Fátima, Erechim, RS, Brasil, 99709-910. junges@uricer.edu.br
[c]Universidade do Estado de Santa Catarina, BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha, Pinhalzinho, SC, Brasil, 89870-000. liziane.schittler@udesc.br
* Autor para correspondência: cesarvrf@ufpel.edu.br; +55 (53) 32757284 x 215

Manuscrito elaborado conforme normas do periódico Food Research International

ISSN 0963-9969.

Qualis 2020: A1

Fator de impacto: 4.972

Resumo

As folhas de guabirobeira apresentam importantes compostos fenólicos e flavonoides, os quais são compostos bioativos com conhecida atividade antioxidante, antibacteriana anti-inflamatória e antinociceptiva. A extração com líquido pressurizado (PLE), é uma alternativa para extração e fracionamento de produtos naturais, uma vez que apresenta algumas vantagens com relação a outros métodos. Como por exemplo podemos citar o menor consumo, e consequente descarte, de solventes, além de apresentar alto rendimento e maior rapidez. Com isso, objetivou-se com esse trabalho a obtenção de extratos das folhas de guabirobeira por meio de infusão aquosa (Al) e por líquido pressurizado com água (PLE-W), etanol (PLE-E) e combinação da relação água: etanol 1:1 (PLE-W:E), identificar seus compostos químicos, através de cromatográfica líquida acoplada a espectrometria de massas, estudar a atividade antioxidante em células cerebrais de ratos (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS e espécies reativas de oxigênio - ROS) e atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que os quatro extratos apresentaram grande quantidade de compostos fitoquímicos, sendo que, entre eles o extrato PLE-W:E apresentou maior concentração de flavonoides, demonstrando significativa atividade antioxidante em ensaios *in vitro* de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de cérebro de ratos, também apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Com isso, pode-se concluir que extratos de folhas de guabirobeira podem ser explorados como uma fonte promissora de compostos bioativos.

Palavras-chave: Guabirobeira; Myrtaceae; extração com líquido pressurizado; compostos fitoquímicos; antioxidante; antimicrobiano.

1. INTRODUÇÃO

A guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) é uma espécie nativa do Sul do Brasil, pertencente à família botânica *Myrtaceae* (PEREIRA *et al*., 2015), que pode ser encontrada em diversos estados brasileiros como Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (LORENZi, 1992). O fruto produzido por essa espécie é popularmente conhecido como “guavirova” ou “guabiroba”, os quais possuem poucas sementes, sabor ácido-doce, com coloração atraente, e têm sido recentemente estudados como matéria-prima não só pela indústria alimentícia, mas também para aplicações farmacológicas, haja vista suas ações biológicas, como alto potencial antioxidante e ação antibacteriana (PEREIRA et al., 2018; LIMA et al, 2016; PEREIRA et al., 2015; CZAIKOSKI et al., 2015; ALVES et al. 2013). Estas ações são atribuídas a presença de compostos fenólicos e flavonóides (PEREIRA et al., 2018;

LIMA et al., 2016; CZAIKOSKI et al., 2015; ALVES et al., 2013), especialmente epicatequina, ácido gálico, ácido elágico, ferúlico, e ácido *p*-cumárico (PEREIRA et al., 2015).

Ainda que a composição e propriedades do fruto da guabiroba tenham sido estudadas, as folhas também são uma fonte de investigação de fitoquímicos importantes como compostos fenólicos, flavonoides e taninos (KATAOKA & CARDOSO, 2013; SOARES DA SILVA, 2016; SANT'ANNA et al., 2017). Estudos recentes apontam algumas características aos extratos das folhas de guabirobeira como, por exemplo, a atividade antioxidante e antibacteriana (KLAFKE et al., 2016; PEREIRA et al., 2018), assim como efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos (SOARES DA SILVA, 2016) e é relatada também ausência de toxicidade dos mesmos (SOARES DA SILVA, 2016; MARKMAN, BACCHI & KATO, 2004). Outros estudos indicam que o uso das folhas de guabirobeira tem efeito potencial na redução níveis de colesterol no sangue (KLAFKE et al, 2016; VIECILI et al., 2014) e processos inflamatórios em indivíduos hipercolesterolêmicos (VIECILI et al., 2014). Além disso seu uso é associado a perda de peso (DICKEL et al., 2007), ao efeito antidiabético (VINAGRE et al., 2010; Trojan-Rodrigues et al., 2012), antiplaquetário (OTERO et al., 2017) e utilizado na medicina popular no tratamento de úlceras gástricas (MARKMAN, BACCHI & KATO, 2004).

Um fator que influencia diretamente na qualidade dos extratos de folhas de plantas é o método de extração, o qual interfere no rendimento, composição química dos extratos. Alguns métodos, além de levar a um baixo índice de extração pode causar a degradação de compostos bioativos de interesse (PESSOA et al, 2015). Nessa perspectiva, tem se buscado, nos últimos anos, alternativas para superar essas limitações nos processos utilizando solventes com pressão mais elevada, como, por exemplo, a extração com líquido pressurizado (PLE). A PLE vem se destacando pela sua eficiência e confiabilidade quando comparadas com as técnicas tradicionais (MUSTAFA & TURNER, 2011; WIJNGAARD et al., 2012; JUSOH et al., 2019). Além disso, possibilita o uso de solventes 'geralmente reconhecidos como seguros' (GRAS), como etanol e água, os quais foram utilizados nesse trabalho.

A partir de relatos de pesquisadores sobre a riqueza de compostos fitoquímicos com atividades biológicas, objetivou-se, com esse estudo, avaliar a composição química de extratos de folhas de guabirobeira obtidos por dois métodos de extração (PLE, e por infusão aquosa), e suas propriedades antioxidantes e antibacteriana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das folhas de guabirobeira

As folhas de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) foram coletadas nos pomares da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, (coordenadas: latitude 31° 42' S, longitude 52° 24' O, Altitude: 57m), no mês de dezembro. O genótipo foi selecionado a partir do potencial para ser lançado como cultivar. O trabalho está cadastrado no Sisgen com o código: A8703BA, atendendo às normativas do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar (Ethink Tecnhnology®), por 72 h a 40ºC, e, posteriormente, foi moído em moinho de facas (Marconi M48) com peneira de 30 mesh, resultando partículas de aproximadamente 0,595-0,600 mm. O material foi armazenado em freezer com temperatura de -20 ºC ± 2 ºC em embalagens plásticas, protegido da luz.

2.2 Obtenção dos extratos

A infusão aquosa (AI) foi preparada na proporção de 1:50 m/v, (folhas secas e moídas com 12% de umidade: água), com temperatura da água de 80 ± 1°C por 10 min, baseado no trabalho desenvolvido por Santos et al. (2018). Para a extração por líquido pressurizado (PLE), as folhas secas foram submetidas à extração com água (PLE-W), etanol (PLE-E) e água e etanol (1:1 v/v) (PLE-W:E). Os parâmetros da extração foram definidos com base no trabalho desenvolvido por Zandoná et al., (2020). Foram usados pressão de 1500 *psi*, temperatura 50°C, 15 g de amostra e vazão de descarga de solvente de 2mL s^{-1}, por 1 hora de extração. Após a extração, os extratos de PLE-W: E e PLE-E foram secos em estufa a vácuo (modelo Quimis Q819V2), a 50ºC até peso constante. Todos os extratos foram posteriormente liofilizados e armazenados em frascos âmbar (a -60ºC).

2.3 Análise do perfil fitoquímico

Preparo da amostra, instrumentação, condições analíticas e análise de dados

Para análise do perfil fitoquímico por LC-ESI-QTOF-MS, 100 mg de extrato seco de cada condição de extração foram ressuspendidos em 1 mL de solução contendo 90% de água acidificada com 0.1 % de ácido fórmico grau HPLC e 10% de acetonitrila acidificada 0.1 % de ácido fórmico. A solução foi homogeneizada por 1 min em vórtex e centrifugada por 1 min, 4 ºC, 2.655*G* (Centrifuge 5420 R, eppendorf®). O sobrenadante foi diluído para obter a concentração de 30 mg mL^{-1} e filtrado em filtro de seringa de nylon de 0.22 µm para posterior injeção. Aos extratos foram adicionados reserpina como padrão interno, na concentração final de 2 ug mL^{-1}.

Após o preparo do extrato, 10 µL da amostra diluída foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada a pré-coluna C18 (2.0 x 4 mm) e coluna Cogent Bidentate C18 – 2.2 µm 120 A – 100 mm x 2.1mm. As fases móveis foram: água acidificada com 0.1% de ácido fórmico (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0.1% de ácido fórmico (eluente B). Para separação foi utilizado gradiente de eluição de: 0 - 2 min, 10 % B; 2 - 15 min, 10 – 75 % B; 15 - 18 min, 90 % B; 18 - 21 min 90 % B; 21 - 23 min, 10% B, 23 - 25 min, 10% B. O fluxo foi de 0.2 mL min^{-1} e a temperatura da coluna foi mantida a 40ºC.

O espectrômetro de massas foi operado nos modos de ionização ESI negativo e positivo com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de m/z 50 a 1200, com voltagem capilar em 3.5 kV, pressão do gás de nebulização (N_2) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min^{-1}, temperatura da fonte de 180°C, colisão de RF de 150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10 mM, cobrindo a faixa de aquisição de *m/z* 50 até 1200. Experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue: *m/z* 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV, usando nitrogênio como gás de colisão.

Os dados de MS e MS/MS foram processados por meio do *software Data analysis* 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), avaliando a massa exata e perfil de fragmentação MS^n em comparação com os dados da biblioteca do equipamento e bases de dados disponíveis online como FoodB (http://foodb.ca/) e Metlin (https://metlin.scripps.edu) e padrões comerciais de compostos fenólicos (ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido siríngico,

ácido *p*-cumárico, ácido elágico, (+)-catequina, miricetina, quercetina e kaempferol) e expressos em µg g^{-1} de cada composto.

2.4 Atividade Antioxidante

2.4.1 Modelo de cérebro de rato

Ratos *Wistar* machos (trinta e cinco com 35 dias de idade) foram mantidos em temperatura, umidade e iluminação constantes, com ração e água ad libitum. Todo protocolo experimental foi previamente aceito pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição (CEEA 5747-2015) e foi realizado com o Guia do NIH para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

Os ratos foram sacrificados por decapitação e os cérebros foram dissecados (imediatamente após o sacrifício) e homogeneizados em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7,4) contendo KCl (140 mM, 1:10, p/v). Os homogenatos foram centrifugados a 800 g por 10 min a 4 ° C e o sobrenadante foi usado para medições bioquímicas. Dez microlitros de peróxido de hidrogênio (5 mM) e 5 µL de sulfato ferroso (20 µM) foram adicionados a 225 µL de homogenatos cerebrais para induzir dano oxidativo. 10 microlitros de diferentes concentrações de extratos de folhas de guabirobeira (AI, PLE-W, PLE-E e PLE-W: E nas concentrações finais de 25, 50, 100, 250 µg mL-1) foram adicionados à mistura e incubados por 1 h a 37 ° C. O ácido ascórbico (AA) a 100 µM foi usado como um antioxidante padrão. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) foram então medidas em homogenatos de tecido. A peroxidação lipídica foi medida com base nos níveis de TBARS relatados como proteína ŋmol TBARS mg-1 (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990). A formação de ROS foi determinada com base na oxidação do diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína (DCFH-DA) a diclorofluoresceína fluorescente (DCF) e expressa como uma porcentagem do controle (ALI, LEBEL, & BONDY, 1992). O conteúdo de proteína foi determinado usando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976) para estimar os marcadores oxidativos.

2.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada utilizando o método de Espectro de Ação por Disco de Difusão em Ágar e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrito por Ostrosky et al. (2008). Os testes foram feitos utilizando as bactérias *Gram-positivas Staphylococcus aureus* ATCC 25923*, Listeria monocytogenes* Scott A*, Enterococcus faecalis* FAIR (E77)*, Enterococcus faecium* FAIR (E178) *e* as Gram-negativas *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 9027*, Escherichia coli* ATCC 25922*, Salmonella Enteritidis* ATCC13076 e *Shiguella flexeri* ATCC 1202*.*

Para os testes foram utilizadas soluções dos extratos na concentração de 1 mg mL^{-1}, preparadas a partir dos extratos secos (PLE-W, PLE-W:E e PLE-E) e água destilada. O AI foi preparado, em igual concentração, a partir das folhas secas e moídas. O etanol utilizado na extração dos compostos não foi testado quanto à atividade antimicrobiana (controle negativo), pois foi removido na preparação dos extratos.

2.5.1 Difusão em Disco

Inicialmente, as culturas das bactérias foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 36 ºC por 18 h. Após, as culturas foram padronizadas até a concentração de 0,5 da escala Mc Farland, correspondente a 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro ($UFC.mL^{-1}$) e diluídas em água peptonada até a concentração de 10^5 $UFC.mL^{-1}$. Com auxílio de *swab* as culturas foram inoculadas em placas contendo ágar e adicionados, em cada placa, de três discos de papel de filtro estéril com 6 mm de diâmetro. Sobre os discos de papel foram adicionados 10 µL dos extratos na concentração 1 mg mL^{-1}. Os diâmetros dos halos foram medidos e o resultado expresso em milímetros (mm).

2.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de Disco de Difusão em Ágar, apresentando diâmetro de halo maior que 10 mm foram submetidas à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para cada espécie

bacteriana. A CIM foi considerada a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento bacteriano após o período de incubação.

2.6 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados experimentais (compostos fenólicos e flavonoides e taninos) foi através de análise de variância (ANOVA *one-way*) e teste de média *post hoc* de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ considerado uma diferença significativa na análise, através do *software* SAS (Versão 8.0). Para a atividade alelopática foi testada por ANOVA *one-way* e teste *post hoc* de Dunnett, com $p \leq 0,05$ considerado representar uma diferença significativa na análise, software SAS (Versão 8.0). Todos os tratamentos e análises foram realizados em triplicata. A análise de correlação entre ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e atividade antibacteriana foi realizada utilizando o software SAS (versão 8.0).

3. RESULTADOS

3.1 Identificação e quantificação dos ácidos fenólicos, flavonoides e taninos dos extratos de folhas de guabirobeira

Os compostos fenólicos foram identificados pela análise de massas exatas, espectros de MS/MS e fórmulas moleculares por HPLC-ESI-MS/MS (Tabela 1). Entre todos os extratos foram identificados putativamente o total de 83 compostos (Tabela 1), sendo que 79 compostos presentes no AI, 74 no PLE-W, 78 no PLE-W:E e 76 no PLE-E. Dentre eles, 14 compostos são ácidos fenólicos, da classe do ácido hidroxibenzóico (4 compostos), do ácido hidroxicinâmico (7 compostos) e de fenólicos glicosilados (3 compostos); 28 compostos são flavonoides das classes flavanols (4), flavonols (9 compostos), flavones (7), flavonoides metilados (4), isoflavonoides (2), flavanones (2); 10 compostos são taninos hidrolisáveis, e 31 compostos são de outras classes de compostos (Tabela 1).

Com base no diagrama de Venn (Figura 1), observou-se que 83,1% dos compostos putativamente identificados, o que corresponde a 69 compostos, são comuns à todos aos quatro extratos, e entre os três extratos obtidos por PLE apenas apresenta um composto exclusivo desse método de extração (Pico número 36: Methyl

2-(2-methoxy-4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-3-benzofurancarboxylate ou Betagarin). Para o AI há 3 compostos (3,6% de todos os compostos presentes), que são exclusivos dessa amostra (pico número 41: *4'-*O*-(GlcA(1-2) GlcA) ou 4'-*O*-GlcA-7-*O*-GlcA Apigenin, pico número 60: *L*-Tryptophan ou (±)-Tryptophan ou *D*-Tryptophan). De modo geral, observa-se que o método de extração não resultou em grande diferença na quantidade de compostos presentes entre as amostras, pois 83,1% dos compostos são similares entre os quatro extratos e apenas 16,9% dos compostos foram detectados diferencialmente entre os extratos (Figura 1).

A partir da análise por LC-MS/MS, pode-se observar que, dependendo do solvente utilizado há diferença na concentração dos compostos. Para os ácidos fenólicos, os compostos encontrados em maiores concentrações foram o ácido elágico no PLE-W (301,69 µg g^{-1}), ácido clorogênico no PLE-W:E (167.19 µg g^{-1}), ácido síringico no PLE-W:E (172,39 µg g^{-1}), *Caffeic acid 3-glucoside ou Glucocaffeic acid no PLE-W (280,52 µg g^{-1}) e ácido gálico no PLE-W (61,29 µg g^{-1}). Em menores concentrações foram detectados **p*-Coumaroylquinic acid (37,34 µg g^{-1} no PLE-W a 1,51 µg g^{-1} no AI), ácido cafeico (11,35 µg g^{-1} no AI e 7,35 µg g^{-1} no PLE-W), ácido *p*-cumárico (7,96 µg g^{-1} no AI a 4,44 µg g^{-1} no PLE-W:E) (Tabela 2).

Para os flavonoides, classe à qual apresentou maior diversidade de compostos identificados, observa-se que o composto Farrerol apresentou maior concentração entre todos os flavonoides (969,29 µg g^{-1} no PLE-W:E), seguido do composto putativamente identificado como Epigallocatechin ou Gallocatechin (PLE-W 653,79 µg g^{-1}), também do composto pertencente a classe dos flavonoides metilados (303,76 µg g^{-1} no PLE-W:E), da (+)-Catequina (273,08 µg g^{-1} no PLE-E) e quercetrina (102,65 µg g^{-1} no PLE-E). Em menores concentrações também foram encontrados importantes flavonoides como quercetina, epicatequina, kaempferol e miricetina (Tabela 2).

Na classe dos taninos, os compostos número 51, 52, 43 e 46 putativamente identificados pela classe (Tabela 1), foram encontrados em maiores concentrações (número 51: 581,68 µg g^{-1} no PLE-W; número 52: 206,98 µg g^{-1} no PLE-W; número 43: 184,87 µg g^{-1} no PLE-E; número 46: 69.35 µg g^{-1} no PLE-E) (Tabela 2).

Os resultados indicaram que para a classe dos ácidos fenólicos, o PLE-W foi o extrato que apresentou maior quantidade dessa classe de compostos (1.141,00 µg g^{-1}), seguido do PLE-W:E (1.041,26µg g^{-1}) e PLE-E (833.52 µg g^{-1}) e, em menor concentração no AI (360.61 µg g^{-1}). Para os flavonoides, o extrato que apresentou maior concentração total dos compostos foi o PLE-W:E (2.312,88 µg g^{-1}), seguido do

PLE-E (1.332,96 µg g^{-1}), PLE-W (1.206,67 µg g^{-1}) e AI (137,66 µg g^{-1}). Para os taninos, o PLE-W apresentou maior concentração total dos compostos (930,80 µg g^{-1}), seguido do PLE-W:E (757,35 µg g^{-1}), PLE-E (516,90 µg g^{-1}), e em menor quantidade no AI (12,91 µg g^{-1}). De modo geral, observa-se que para o extrato de folhas de guabirobeira, a mistura de solventes extrair maior concentração de compostos.

Tabela 1. Compostos presentes nos extratos de folhas de guabirobeira

Número do pico	Rt (min)	Classe	Nome do composto	Fórmula química	$[M-H]^-$ Measured	Fragmentos	mSigma	Occurrence			
								AI	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
Ácidos fenólicos											
1	2,1	Ácidos hidroxibenzoicos	***Ácido gálico	$C_7H_6O_5$	169,0136		14,4	+	+	+	+
2	3,0	Ácidos hidroxicinâmicos	* Ácido clorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$	353,0879	191,0555 (100) 179,0343 (58,4) 135,0445 (36,0)	44,7	+	+	+	+
3	4,3	Ácidos hidroxicinâmicos	* ácido p-coumaroilquínico; Ácido 4-p-coumaroilquínico; ácido p-coumaroilquínico; Ácido 4-O-p-coumaroilquínico; Ácido 5-p-coumaroilquínico	$C_{16}H_{18}O_8$	337,0923		41,0	+	+	+	+
4	5,1	Ácidos hidroxicinâmicos	*** Ácido clorogênico	$C_{16}H_{18}O_9$	353,0874		45,6	+	+	+	+
5	6,3	Ácidos hidroxicinâmicos	*** Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$	179,0342		15,5	+	+	+	+
6	6,4	Ácidos hidroxibenzoicos	*** ácido 4-hidroxibenzoico	$C_7H_6O_3$	137,023		37,3	+	+	+	+
7	6,5	Ácidos hidroxicinâmicos	* 3-glucosídeo do ácido cafeico; Ácido glucocaféico	$C_{15}H_{18}O_9$	341,0911	341,0913 (100) 96,9597 (69,1)	47,0	+	+	+	+
8	7,2	Ácidos hidroxicinâmicos	***Ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$	193,0494		35,9	+	+	-	-
9	7,4	Ácidos hidroxicinâmicos	*** ácido p-cumárico	$C_9H_8O_3$	163,0338		18,6	+	+	+	+
10	7,5	Ácidos hidroxibenzoicos	***Ácido elágico	$C_{14}H_6O_8$	300,9986		35,3	+	+	+	+
11	7,5	Ácidos hidroxibenzoicos	*** ácido seríngico	$C_9H_{10}O_5$	197,0447		16,6	-	-	+	+
12	4,0	Glicosídeos fenólicos	* Glucuronídeo de ácido p-cumárico; Glucuronídeo de ácido O-cumárico	$C_{15}H_{16}O_9$	339,0713		36,8	+	+	+	+
13	4,3	Glicosídeos fenólicos	* 2-Hidroxibenzaldeído O- [xilosil- (1-> 6) -glucosídeo]	$C_{18}H_{24}O_{11}$	415,1241		57,1	+	+	+	+
14	2,0	Glicosídeos fenólicos	* Ácido diidroisoferúlico 3-glucuronídeo	$C_{16}H_{20}O_{10}$	371,0983		49,7	+	+	+	+
Flavonoides											
15	4,5	Flavanols	*** Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	289,0709		27,1	+	+	+	+
16	5,4	Flavanols	* Epigalocatequina; Galocatequina	$C_{15}H_{14}O_7$	305,0694		40,0	+	+	+	+
17	6,5	Flavanols	*** Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$	289,0711		6,1	+	+	+	+
18	7,4	Flavonóis	*** Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,146		12,6	+	+	+	+
19	7,5	Flavonóis	Quercetina 4'-glucuronídeo	$C_{21}H_{18}O_{13}$	477,0676	301,0352 (100)	34,8	+	+	+	+
20	7,8	Flavonóis	* Quercetina 3-alfa-D-galactosídeo; Quercetina 7-glucosídeo; Quercetina 4'-glucosídeo	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0875		91,1	+	+	+	+
21	7,9	Flavonóis	* Quercetrin; Luteolin-4'-O-glucosídeo; Kaempferol-3-O-glucosídeo; Kaempferol-7-O-glucosídeo; Luteolina 7-O-glucosídeo (Cynaroside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447,0933		57,1	+	+	+	+
22	8,0	Flavanols	* Epigalocatequina 3-p-cumarato	$C_{24}H_{20}O_9$	451,1025		48,8	+	+	+	+

23	8,1	Flavones	* 6 '' - Cafeoilhiperina; Quercetina 3-O-caffeyl-glucoside	$C_{30}H_{26}O_{15}$	625,1194		49,0	+	+	+	+
24	8,2	Flavonóis	* Kaempferol 3-alfa-D-arabinopiranosido; Luteolina 7-xilosido; Kaempferol 3-O-beta-D-xilofuranosido; Kaempferol 3-arabinosídeo	$C_{20}H_{18}O_{10}$	417,0819	-	69,2	+	+	+	+
25	8,3	Flavonóis	*** Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	317,0289		11,2	+	+	+	+
26	8,4	Flavones	* Sudachiin A	$C_{24}H_{26}O_{13}$	521,1302		65,1	+	+	+	+
27	8,5	Flavonóis	* Crioseriol 7-galactosídeo; Kaempferide 7-glucosídeo	$C_{22}H_{22}O_{11}$	461,1083	-	18,7	+	+	+	+
28	8,6	Flavones	* Quercetina 3- (3-p-coumaroilglucosídeo)	$C_{30}H_{26}O_{14}$	609,1251	-	78,7	+	+	+	+
29	8,8	Flavones	* 4 '' - Metil-6 '' - (3,4-di-hidroxi-E-cinamoil) isoorientina	$C_{31}H_{28}O_{14}$	623,1408		57,6	+	+	+	+
30	9,2	Flavonóis	*** Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	301,0348		43,7	-	+	+	+
31	9,4	Flavones	* Luteolina 7-O- (6 '' - O-malonil) -beta-D-diglucosídeo	$C_{37}H_{60}O_{12}$	695,4015		60,0	+	+	+	+
32	9,8	Flavonóis	*** Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	285,0395		16,7	+	+	+	+
33	10,0	Flavones	* 4 ', 5,6-Trimetilescutellarein 7-glucosídeo	$C_{24}H_{26}O_{11}$	489,1399	-	50,6	+	+	+	+
34	10,5	Flavonóides (flavonóides O-metilados)	* 5,3 ', 4'-Tri-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilenodioxiflavona; Wharangin	$C_{17}H_{12}O_8$	343,0456		57,4	+	+	+	+
35	11,7	Isoflavonóides	* 4 ', 7-Dihidroxi-2', 5-dimetoxiisoflavanona	$C_{17}H_{16}O_6$	315,0864		50,1	+	+	+	+
36	11,8	Flavonóides (flavonóides O-metilados)	* 2- (2-metoxi-4-hidroxifenil) -6-metoxi-3-benzofurancarboxilato de metilo; Betagarin	$C_{18}H_{32}O_5$	327,0869		23,2	-	+	+	+
37	11,9	Isoflavonóides	(±) -3 ', 7-Dihidroxi-2', 4'-dimetoxiisoflavano	$C_{17}H_{18}O_5$	301,1072		36,3	+	+	+	+
38	12,8	Flavonóides (flavonóides O-metilados)	* 2 ', 5,6-Trimetoxiflavona; 3 ', 5,6-Trimetoxiflavona; 4 ', 5,7-Trimetilapigenina	$C_{18}H_{16}O_5$	311,0921		39,9	+	+	+	+
39	12,9	Flavanones	* Sakuranetina; Isosakuranetin	$C_{16}H_{14}O_5$	285,0758		31,7	+	-	-	-
40	13,2	Flavonóides (flavonóides O-metilados)	** flavonóides O-metilados	$C_{17}H_{18}O_4$	285,1128	166,0266 (100) 285,1124 (35,9)	62,5	+	-	+	+
41	13,5	Flavones	* 4'-O- (GlcA (1-2) GlcA) Apigenina; 4'-O-GlcA-7-O-GlcA Apigenina	$C_{27}H_{26}O_{17}$	621,124		44,9	+	-	-	-
42	13,8	Flavanones	Farrerol	$C_{17}H_{16}O_5$	299,0921	299,0918 (100) 193,0134 (6,3) 167,0343 (5,9)	48,6	+	+	+	+
Taninos											
43	2,1	Taninos hidrolisáveis	** Taninos hidrolisáveis	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633,0737	300,9987 (100) 275,0193 (37,3) 249,0398 (23,4) 633,0730 (11,5) 302,0018 (8,2) 169,0139 (7,5)	19,6	+	+	+	+
44	2,4	Taninos hidrolisáveis	* Vitilagina; Punigluconina; Sanguiin H7	$C_{34}H_{26}O_{23}$	801,079		79,6	+	+	+	+

45	2,6	Taninos hidrolisáveis	** Taninos hidrolisáveis	$C_{34}H_{24}O_{22}$	783,0682	300,9983 (100) 275,0188 (27,7) 783,0182 (15,1)	36,9	+	+	+	+
46	3,7	Taninos hidrolisáveis	* Heterofilina A; Sanguiin H1; Tercatain; Tellimagrandin I	$C_{34}H_{26}O_{22}$	785,0842		76,8	+	-	+	+
47	4,3	Taninos hidrolisáveis	* 1,4,6-Trigaloil-beta-D-glucopiranose; 1,2,3-tri-O-Galoil-beta-D-glicose	$C_{27}H_{24}O_{18}$	635,0879		53,2	+	+	+	+
48	5,6	Taninos hidrolisáveis	* Granatina B	$C_{41}H_{28}O_{27}$	951,0736		65,4	+	+	+	+
49	6,1	Taninos hidrolisáveis	* Heterofilina A; Sanguiin H1; Tercatain; Tellimagrandin I	$C_{34}H_{26}O_{22}$	785,0837		82,6	+	+	+	+
50	6,6	Taninos hidrolisáveis	* Dilactona do ácido sanguissórbico; Dilactona de ácido valoneico	$C_{21}H_{10}O_{13}$	469,0046		38,5	+	+	+	+
51	7,1	Taninos hidrolisáveis	** Taninos hidrolisáveis	$C_{10}H_{6}O_{16}$	380,9574	300,9991	28,6	+	+	+	+
52	7,4	Taninos hidrolisáveis	** Taninos hidrolisáveis	$C_{11}H_{8}O_{16}$	394,971	315,0146 (100) 299,9908 (60,4)	16,2	+	+	+	+
Outros compostos											
53	1,5	Outros polifenóis (furanocumarinas)	* Xantotoxina; Bergapten; Sphondin	$C_{12}H_{7}O_{4}$	215,0331		49,9	+	+	+	+
54	1,6	Ácido quinico	(-) - ácido quinico	$C_{7}H_{12}O_{6}$	191,0561	111,0086 (100) 87,0086 (17,9) 191,0553 (10,4) 85,0293 (6,8) 112,0119 (6,0) 129,0189 (4,3)	22,3	+	+	+	+
55	1,6	Carboidratos e conjugados de carboidratos	** Carboidratos e conjugados de carboidratos	$C_{6}H_{12}O_{6}$	179,0556		22,1	+	+	+	+
56	1,7	Ácido orgânico	* Ácido málico	$C_{4}H_{6}O_{5}$	133,0139		12,3	+	+	+	+
57	1,8	Ácido orgânico	* Desidroascorbato; Ácido Cítrico; Citrato; Ácido isocítrico	$C_{6}H_{8}O_{7}$	191,0195		21,6	+	+	+	+
58	1,9	Pyrans	* Ácido quelidônico	$C_{7}H_{4}O_{6}$	182,9927		38,8	+	+	+	+
59	3,4		* Ácido 3'-metoxifukiico; Uralenneoside	$C_{12}H_{14}O_{8}$	285,0612		47,1	+	+	+	+
60	3,7		* L-triptofano; (±)-Tryptofano; D-triptofano	$C_{11}H_{12}N_{2}O_{2}$	203,0816		72	+	-	-	-
61	3,8	Diidrofuranos	* Ácido glucosiríngico; 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol glucuronídeo	$C_{15}H_{20}O_{10}$	359,0973		4,4	+	+	-	+
62	5,5		* 4-beta-D-glucosídeo 3'-Glucosilfloroacetofenona do ácido vanílico; Hidroxitirosol 3-O-beta-D-glucuronido; Glicose de vaniloil;	$C_{14}H_{18}O_{9}$	329,0903		43,4	+	+	+	+
63	6,2		* 4R, 5R, 6S-Trihidroxi-2-hidroximetil-2-ciclohexen-1-ona 6- (2-hidroxi-6-metilbenzoato)	$C_{15}H_{16}O_{7}$	307,085		48,4	+	+	+	+
64	7,8	Carboidratos e conjugados de carboidratos	* Sambacin	$C_{26}H_{36}O_{12}$	539,2119		48,3	+	+	+	+
65	8,4		* Diidrohidroxi-O-metilsterigmatocistina	$C_{19}H_{16}O_{7}$	355,0823		68,5	-	-	+	+
66	8,4	Naphthofurans	* Ácido isolimônico	$C_{26}H_{34}O_{10}$	505,2068		31,6	+	+	+	+
67	9,6	Ácidos graxos e conjugados	* Ácido undecanodioico; Butil butirilactato	$C_{11}H_{20}O_{4}$	215,128		6,6	+	+	+	+

68	9,7	Ácidos lineólicos e derivados	* Ácido (9R, 10S, 12Z) -9,10-di-hidroxi-8-oxo-12-octadecenóico; * Ácido corchorifatty F	$C_{18}H_{32}O_5$	327,2174	211,1331 (100) 171,1017 (67,3) 229,1439 (49,4) 327,2156 (24,4)	59,3	+	+	+	+
69	10,0		* 9,12,13-TriHOME; Ácido 5,8,12-trihidroxi-9-octadecenóico	$C_{18}H_{34}O_5$	329,2327		41,5	+	+	+	+
70	10,1		* Lignans; Edulone A	$C_{22}H_{22}O_8$	413,1234		53,1	-	-	+	-
71	10,2		* Osthenol; Demethylbatatasin IV	$C_{14}H_{14}O_3$	229,0861		15,7	+	-	+	+
72	10,2	Naphthofurans	* (3b, 6b, 8a, 12a) -8,12-Epoxi-7 (11) -eremofileno-6,8,12-trimetoxi-3-ol	$C_{18}H_{30}O_5$	325,2013		32,9	+	+	+	+
73	10,3	Triterpenóides	* Ácido Medicagênico	$C_{30}H_{46}O_6$	501,3213		35,3	+	+	+	+
74	10,3		* 4-Acetoxi-2-hexiltetra-hidrofurano; Ácido 3-oxododecanoico	$C_{12}H_{22}O_3$	213,1488		22,6	+	+	+	+
75	10,6	Prenol lipídios (triterpenóides)	* Ácido Pyngenic C b	$C_{30}H_{48}O_6$	503,3372		40,6	+	+	+	+
76	10,8		* Ácido 1,11-undecanodicarboxílico; Carbonato de metiletilenoglicol; (±) -1,4-diacetato de nonanodiol	$C_{13}H_{24}O_4$	243,1594		7,6	+	+	+	+
77	11,2	Prenol lipídios (triterpenóides)	* Ácido tórico; Ácido 2alfa, 3alfa, 19alfa-Triidroxiurs-12-en-28-óico; Ácido asiático	$C_{30}H_{48}O_5$	487,3428		6,3	+	+	+	+
78	11,4	Metoxibenzenos ou ácidos graxos	* 6-metilgingodiol; Ácido (11R, 12S, 13S) -Epoxi-hidroxioctadeca-cis-9-cis-15-dien-1-óico	$C_{18}H_{30}O_4$	309,2063		19,7	+	+	+	+
79	11,5	Outros polifenóis (hidroxifenilpropenos)	* [4] -Gingerol	$C_{15}H_{22}O_4$	265,1472		26	+	+	+	+
80	11,5	Outros polifenóis (hidroxifenilpropenos)	* (S) - [6] -Gingerol; Myrsinone	$C_{17}H_{26}O_4$	293,1749		12,6	+	+	+	-
81	12,0	Prenol lipídios (triterpenóides)	* Ácido Pigênico B b	$C_{20}H_{24}O_3$	311,1678		83,4	+	+	+	+
82	12,0		* 5-Hidroxi-7- (4-hidroxifenil) -1-fenil-3-heptanona; Auraptene	$C_{19}H_{22}O_3$	297,1521		23,9	+	+	+	-
83	12,3	Lípidos de prenol, ou cumarinas e derivados, ou isoflavonóides O-metilados	* 5C-aglicona; Marminal; Isovestitol	$C_{16}H_{16}O_4$	271,097		41,7	+	+	+	+

Número do pico: os compostos foram ordenados pelo tempo de retenção; RT: tempo de retenção (minutos); mSigma = mSigma, ajuste entre o padrão isotópico medido e teórico (quanto menor o valor de mSigma, melhor a correspondência isotópica); * compostos putativamente identificados (pelo nome do composto); ** compostos identificados (por padrão de composto); *** putativamente identificado por classe; + presente; - ausente.

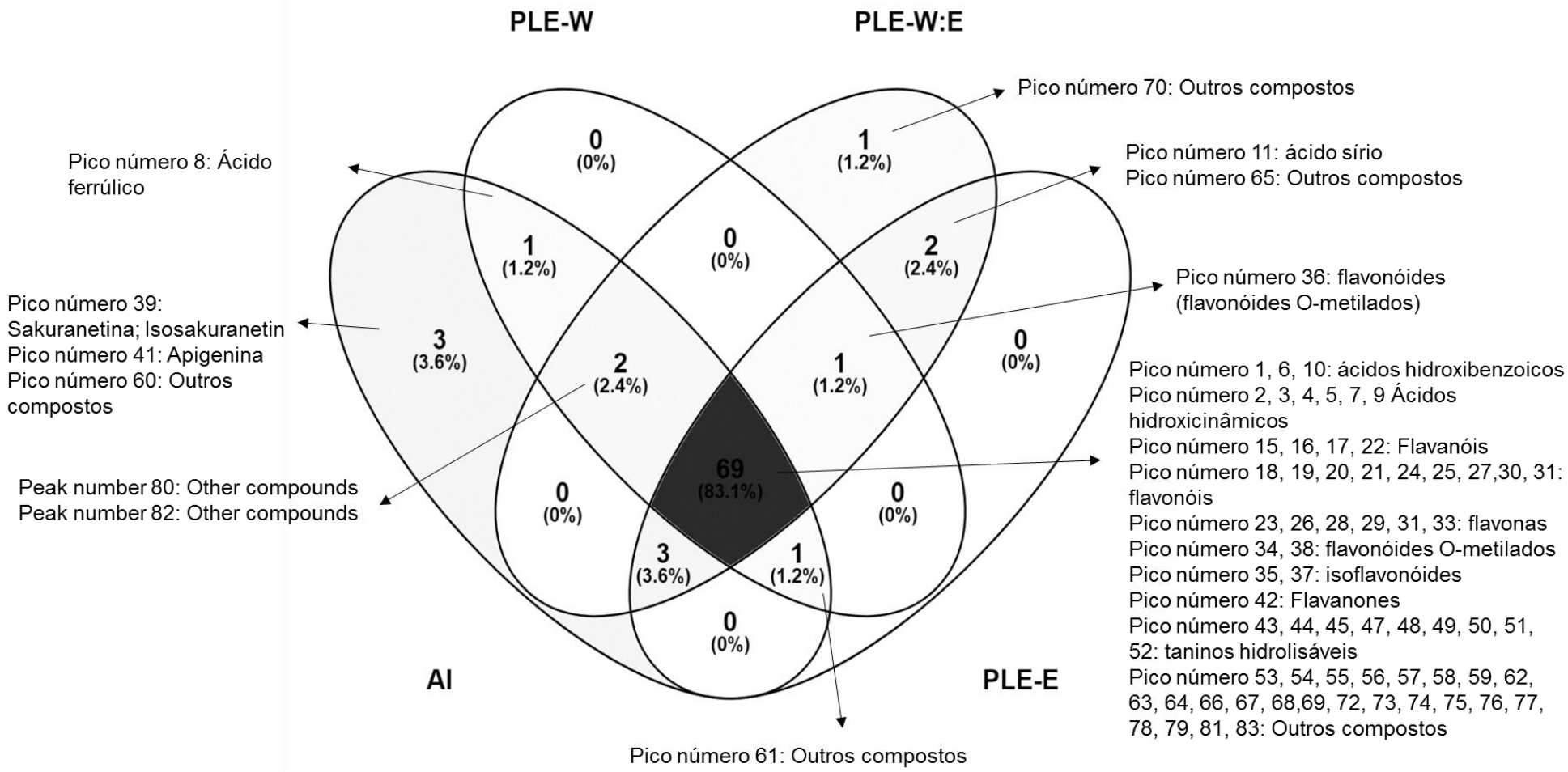

Figura 1. Diagrama de Venn dos compostos putativamente identificados de extratos de folhas de guabirobeira
AI: infusão aquosa, PLE-W: extração por líquido pressurizado com água, PLE-W:E: extração por líquido pressurizado com água e etanol, PLE-E: extração por líquido pressurizado com etanol

Tabela 2 – Quantificação dos ácidos fenólicos, flavonoides e taninos nos extratos de folhas de guabirobeira

	Compostos	Extratos de folhas de Guabirobeira							
		AI		PLE-W		PLE-W:E		PLE-E	
	Ácidos fenólicos (µg g^{-1})								
1	*** ácido gálico (1)	61,29 ± 0,45	b	14,40 ± 0,02	c	63,52 ± 0,40	a	62,39 ± 0,28	ab
2	*** Derivados do Ácido Clorogênico (2)	11,13 ± 0,14	d	193,17 ± 2,62	a	165,90 ± 0,63	b	151,21 ± 1,14	c
3	* ácido p-coumaroilquínico; Ácido 4-p-coumaroilquínico; ácido p-coumaroilquínico; Ácido 4-O-p-coumaroilquínico; Ácido 5-p-coumaroilquínico (3)	1,51 ± 0,01	d	37,34 ± 1,22	a	26,41 ± 0,17	b	21,14 ± 0,15	c
4	*** Ácido clorogênico (2)	161,75 ± 0,80	b	149,85 ± 0,56	c	167,19 ± 0,88	a	127,20 ± 0,47	d
5	*** Ácido cafeico (4)	11,35 ± 0,09	a	7,85 ± 0,08	b	nd		nd	
6	*** ácido 4-hidroxibenzoico (5)	8,90 ± 0,13	c	11,22 ± 0,10	b	12,86 ± 0,21	a	13,46 ± 0,07	a
7	* 3-glucosídeo do ácido cafeico; Ácido glucocaféico (4)	2,18 ± 0,02	d	280,52 ± 1,97	a	130,09 ± 2,63	c	149,85 ± 1,34	b
8	*** Ácido ferúlico (6)	5,21 ± 0,26	a	1,05 ± 0,02	b	nd		nd	
9	*** ácido p-cumárico (3)	7,96 ± 0,42	a	5,21 ± 0,02	b	4,44 ± 0,04	c	4,46 ± 0,06	c
10	*** Ácido elágico (7)	78,27 ± 1,01	c	301,69 ± 1,25	a	209,69 ± 0,31	b	72,14 ± 0,15	d
11	*** Ácido sirínico (8)	nd		nd		172,39 ± 0,54	a	67,92 ± 0,12	b
12	* Glucuronídeo de ácido p-cumárico; Glucuronídeo de ácido O-cumárico (3)	0,30 ± 0,00	c	13,30 ± 0,42	b	13,92 ± 0,21	b	19,49 ± 0,06	a
13	* 2-Hidroxibenzaldeído O- [xilosil- (1-> 6) -glucosídeo] (2)	0,09 ± 0,00	d	9,49 ± 0,29	b	7,29 ± 0,11	c	12,01 ± 0,33	a
14	* Ácido diidroisoferúlico 3-glucuronídeo (6)	10,67 ± 0,10	d	115,91 ± 0,28	b	67,56 ± 1,77	c	132,55 ± 1,21	a
Total		360,61		1,141,00		1,041,26		833,52	
	Flavonoides (µg g^{-1})								
15	*** (+) - Catequina (10)	51,20 ± 0,51	d	144,90 ± 1,12	b	117,70 ± 1,03	c	273,08 ± 1,61	a
16	* Epigalocatequina; Galocatequina (10)	8,41 ± 0,09	d	653,79 ± 5,92	a	366,62 ± 0,83	b	303,22 ± 1,75	c

17	*** Epicatequina (11)	28,49 ± 0,22	d	49,51 ± 0,19	b	30,06 ± 0,32	c	70,33 ± 0,22	a
18	*** Rutin (12)	0,93 ± 0,04	a	0,50 ± 0,01	c	0,32 ± 0,01	d	0,83 ± 0,01	b
19	Quercetina 4'-glucuronídeo (13)	4,13 ± 002	d	48,60 ± 0,07	a	29,24 ± 0,55	b	24,75 ± 0,12	c
20	* Quercetina 3-alfa-D-galactosídeo; Quercetina 7-glucosídeo; Quercetina 4'-glucosídeo (13)	1,48 ± 0,02	d	12,01 ± 0,29	c	39,78 ± 0,09	b	83,35 ± 1,37	a
21	* Quercetrin; Luteolin-4'-O-glucosídeo; Kaempferol-3-O-glucosídeo;	2,48 ± 0,02	d	24,57 ± 0,41	c	50,25 ± 0,47	b	102,65 ± 0,19	a
22	Kaempferol-7-O-glucosídeo; Luteolina 7-O-glucosídeo (Cynaroside) (13)	0,76 ± 0,02	d	14,61 ± 0,03	c	38,31 ± 0,22	b	58,62 ± 0,89	a
23	* Epigalocatequina 3-p-cumarato (11)	0,21 ± 0,01	d	2,35 ± 0,02	c	3,74 ± 0,01	b	4,40 ± 0,04	a
24	* 6 '' - Cafeoilhiperina; Quercetina 3-O-caffeyl-glucosídeo (13)	0,25 ± 0,00	d	5,13 ± 0,04	c	6,98 ± 0,04	b	13,17 ± 0,04	a
25	* Kaempferol 3-alfa-D-arabinopiranosido; Luteolina 7-xilosido; Kaempferol 3-O-beta-D-xilofuranosido; Kaempferol 3-arabinosídeo (14)	0,11 ± 0,00	c	4,20 ± 0,01	a	4,21 ± 0,01	a	4,15 ± 0,00	b
26	*** Miricetina (15)	0,43 ± 0,01	c	25,87 ± 0,75	a	9,54 ± 0,29	b	8,53 ± 0,25	b
27	* Sudachiin A (10)	0,35 ± 0,00	d	15,35 ± 0,17	b	12,37 ± 0,21	c	37,98 ± 0,17	a
28	* Crioseriol 7-galactosídeo; Kaempferide 7-glucosídeo (10)	0,53 ± 0,00	d	10,00 ± 0,36	c	16,38 ± 0,18	b	27,26 ± 0,04	a
29	* Quercetina 3- (3-p-coumaroilglucosídeo) (13)	0,16 ± 0,00	d	2,88 ± 0,03	c	3,60 ± 0,04	b	4,80 ± 0,01	a
30	* 4 '' - Metil-6 '' - (3,4-di-hidroxi-E-cinamoil) isoorientina (13)	Nd		59,23 ± 0,71	a	28,37 ± 0,09	c	44,24 ± 0,07	b
31	*** Quercetina (13)	0,05 ± 0,00	c	2,93 ± 0,02	b	4,86 ± 0,10	a	3,02 ± 0,01	b

Continuação dos flavonoides									
32	*** Kaempferol (14)	0,08 ± 0,00	d	13,30 ± 0,03	a	11,20 ± 0,01	b	10,05 ± 0,02	c
33	* 4 ', 5,6-Trimetilescutelarina 7-glucosídeo (13)	0,03 ± 0,00	d	8,01 ± 0,04	b	7,34 ± 0,07	c	13,51 ± 0,14	a
34	* 5,3 ', 4'-Tri-hidroxi-3-metoxi-6,7-metilenodioxiflavona; Wharangin (10)	1,09 ± 0,00	d	63,17 ± 1,02	a	53,28 ± 0,27	b	37,58 ± 0,28	c
35	* 4 ', 7-Dihidroxi-2', 5-dimetoxiisoflavanona (10)	0,39 ± 0,01	d	1,88 ± 0,03	b	9,46 ± 0,15	a	1,13 ± 0,01	c
36	* 2- (2-metoxi-4-hidroxifenil) -6-metoxi-3-benzofurancarboxilato de metilo; Betagarin (10)	nd		3,20 ± 0,02	c	12,80 ± 0,06	a	7,75 ± 0,11	b
37	(±) -3 ', 7-Dihidroxi-2', 4'-dimetoxiisoflavano (10)	6,81 ± 0,07	b	3,43 ± 0,03	c	13,59 ± 0,16	a	3,14 ± 0,01	c

38	* 2 ', 5,6-Trimetoxiflavona; 3 ', 5,6-Trimetoxiflavona; 4 ', 5,7-Trimetilapigenina (10)	2,86 ± 0,07	d	8,35 ± 0,23	c	169,83 ± 1,35	a	80,58 ± 0,49	b
39	* Sakuranetina; Isosacuranetina (10)	0,22 ± 0,01	a	nd		nd		nd	
40	** Flavonóides (flavonóides O-metilados) (10)	0,37 ± 0,01	c	nd		303,76 ± 1,07	a	9,28 ± 0,04	b
41	* 4'-O- (GlcA (1-2) GlcA) Apigenina; 4'-O-GlcA-7-O-GlcA Apigenina (10)	0,26 ± 0,01	a	nd		nd		nd	
42	Farrerol (10)	25,58 ± 0,18	c	28,90 ± 0,32	c	969,29 ± 4,36	a	105,56 ± 0,41	b
Total		137,66		1,206,67		2,312,88		1,332,96	
Taninos									
43	** Hydrolyzable tannins [7]	3,11 ± 0,02	d	47,61 ± 0,24	c	184,87 ± 0,57	a	176,56 ± 1,48	b
44	*Vitilagin; Punigluconin; Sanguiin H7 [7]	0,52 ± 0,00	c	4,26 ± 0,06	b	4,39 ± 0,04	b	5,02 ± 0,10	a
46	**Hydrolyzable tannins [7]	1,43 ± 0,01	c	34,57 ± 0,64	b	35,46 ± 0,25	b	69,35 ± 0,64	a
45	*Heterophylliin A; Sanguiin H1; Tercatain; Tellimagrandin I [7]	0,17 ± 0,00	c	nd		15,29 ± 0,10	a	4,45 ± 0,09	b
47	*1,4,6-Trigalloyl-beta-*D*-glucopyranose; 1,2,3-tri-*O*-Galloyl-beta-*D*-glucose [7]	0,22 ± 0,00	d	2,88 ± 0,01	c	11,72 ± 0,12	a	5,82 ± 0,04	b
48	*Granatin B [7]	0,33 ± 0,00	b	20,75 ± 2,40	a	1,37 ± 0,01	b	1,99 ± 0,05	b
49	*Heterophylliin A; Sanguiin H1; Tercatain; Tellimagrandin I [7]	0,24 ± 0,00	d	1,49 ± 0,02	c	24,86 ± 0,09	a	3,90 ± 0,04	b
50	*Sanguisorbic acid dilactone; Valoneic acid dilactone [7]	0,78 ± 0,01	d	30,58 ± 0,10	a	12,06 ± 0,03	c	25,69 ± 0,07	b
51	** Hydrolyzable tannins [7]	4,01 ± 0,05	d	581,68 ± 4,51	a	413,17 ± 1,52	b	188,65 ± 0,42	c
52	** Hydrolyzable tannins [7]	2,10 ± 0,00	d	206,98 ± 1,08	a	92,87 ± 1,91	b	35,47 ± 0,39	c
Total		12,91		930,80		757,35		516,90	

Valores expressos em µg g^{-1}; média ± erro padrão; nd: não detectado; seguidos pelas mesmas letras dentro de uma linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). AI: infusão aquosa; PLE-W: extração por líquido pressutizado com água, PLE-W:E: extração por líquido pressutizado com água e etanol, PLE-E: extração por líquido pressutizado com etanol; *compostos putativamente identificados; **compostos putativamente identificados por padrão; *** compostos putativamente identificados pela classe. Quantificação: µg ácido gálico (¹) g^{-1}; µg de ácido p-cumárico g^{-1} (2); µg Ácido clorogênico (3) g^{-1}; µg Ácido cafeico g^{-1} (4); µg ácido 4-hidroxibenzóico (5) g^{-1}; µg Ácido ferúlico g^{-1} (6); µg de ácido elágico g^{-1} (7); µg Ácido sirínico g^{-1} (8); µg (+) - Catequina g^{-1} (10); µg Epicatequina g^{-1} (11); µg Rutin g^{-1} (12); µg Quercetina g^{-1} (13); µg Kaempferol g^{-1} (14); µg miricetina g^{-1} (15).

3.2 Atividade antioxidante dos extratos obtidos por AI e PLE

Os extratos das folhas de guabirobeira foram avaliados com relação a sua atividade antioxidante através da determinação de peroxidação lipídica e a produção de ROS em amostras de células cérebro de rato.

Conforme os resultados (Figura 2A) todos os extratos obtidos com PLE reduziram o valor de TBARS. No entanto observa-se que para o AI em todas as concentrações testadas (25, 50, 100 e 250 µg mL^{-1}) não teve diferença significativa quando comparado com o IC e com padrão de ácido ascórbico.

Para PLE-W, quando comparado o IC, em todas as concentrações testadas, 25 e 250 µg mL^{-1} ($p \geq 0.001$), 50 µg mL^{-1}L ($p \geq 0.05$) e 100 µg mL^{-1} ($p \geq 0.05$), reduziram a formação de TBARS, ou seja, observa-se que o extrato nessas concentrações protegeu as células. No entanto quando comparadas com AA apenas a concentração 250 µg mL^{-1} demonstrou ação equivalente. Da mesma forma, para PLE-W:E todas as concentrações testadas, 25 µg mL^{-1} ($p \geq 0,05$), 50 µg mL^{-1} ($p \geq 0,01$), e 100 e 250 µg mL^{-1} ($p \geq 0,001$), protegeram as células do processo oxidativo. Quando comparadas com AA as concentrações 100 e 250 µg mL^{-1} apresentaram inibição equivalente aos valores apresentados pelo ácido ascórbico, o antioxidante padrão. Para o PLE-E as menores concentrações 25 ($p \geq 0,01$), e 50 µg mL^{-1} ($p \geq 0,001$)) apresentaram ação antioxidante.

No ensaio ROS (Figura 2B), assim como no ensaio TBARS, a oxidação foi induzida com tratamento IC e proteção AA, conforme evidenciado pelo aumento nos níveis de ROS. Todos os extratos testados apresentaram ação na prevenção de um aumento nos níveis de ROS. Para PLE-W, PLE-W:E e PLE-E todas as concentrações testadas apresentaram ação equivalente ao padrão AA.

Para o AI nas concentrações 25, 50, 100 e 250 µg mL^{-1} ($p \geq 0,01$) quando comparado com o IC, tiveram ação protetora sendo que quando comparadas com AA as concentrações 50, 100 e 250 µg mL^{-1} apresentaram ação equivalente a padrão. O melhor resultado foi obtido com o extrato PLE-W: E na concentração 100 µg mL^{-1} apresentando ação superior ao padrão AA.

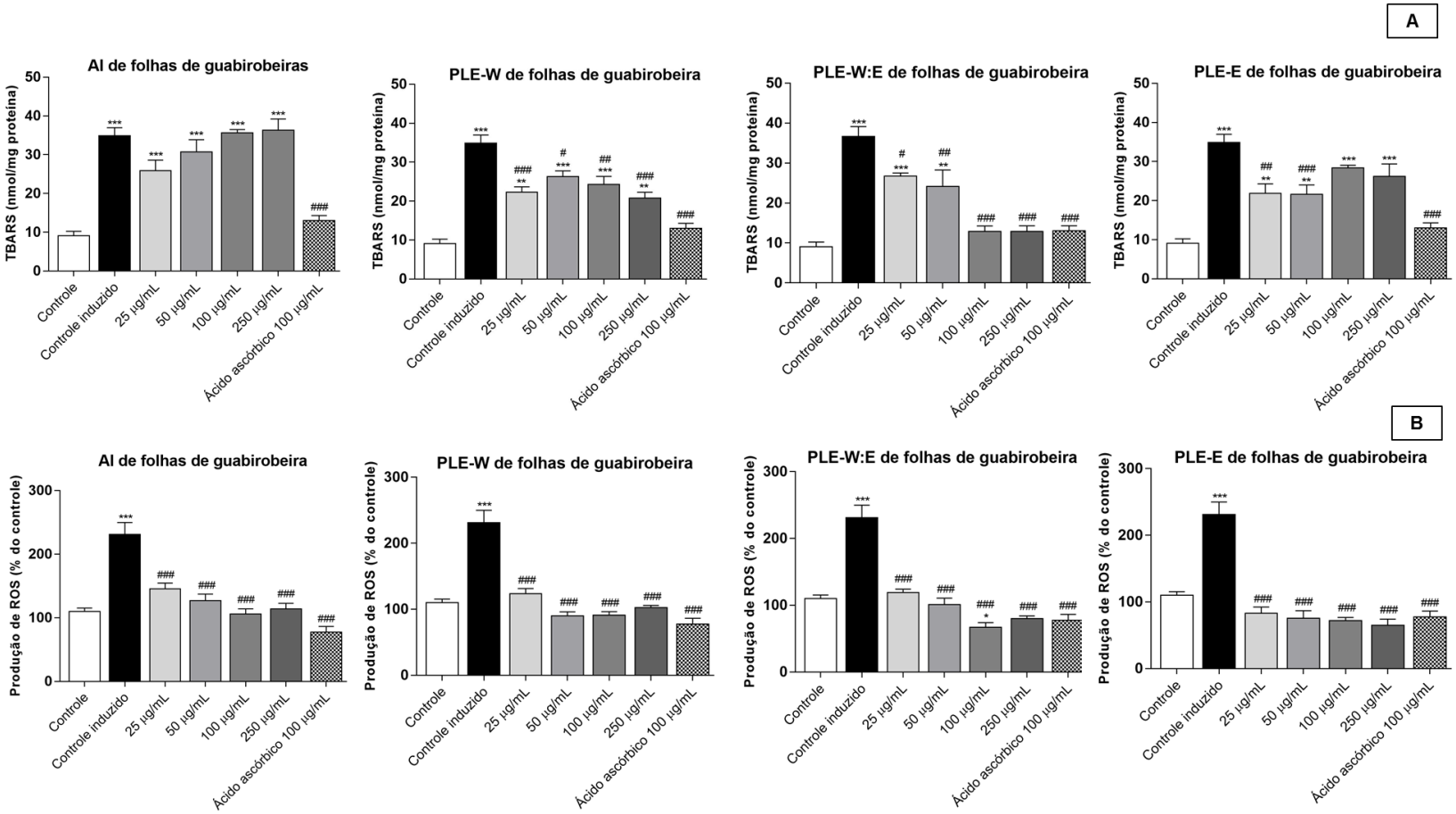

Figura 2. Atividade antioxidante de extratos de folhas de guabirobeira. A: TBARS e B: ROS
AI: infusão aquosa, PLE-W: extração com líquido pressurizado com água, PLE-W: E: extração com líquido pressurizado com água e etanol, PLE-E: extração com líquido pressurizado com etanol. Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3) por ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey: *** *p* <0,001 em comparação ao grupo C (controle); ** *p* <0,01 em comparação ao grupo C. * *p* <0,05 em comparação ao grupo C. ### *p* <0,001 em comparação ao grupo IC (controle induzido). ## *p* <0,01 em comparação ao grupo IC. # *p* <0,05 em comparação ao grupo IC. AA: ácido ascórbico; Q: quercetina; K: kaempferol

3.3 Atividade antibacteriana dos extratos obtidos por AI e PLE

Observa-se que o extrato PLE-W:E apresentou atividade antibacteriana contra o maior número de bactérias testadas. Já, os extratos PLE-W e PLE-E apresentaram atividade antimicrobiana apenas contra uma das bactérias testadas. O AI não apresentou atividade antibacteriana.

Dentre as bactérias estudadas, as mais sensíveis aos extratos foram *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 9027 (Gram-negativa, CIM 1.56 mg mL^{-1} em PLE-W:E), *Enterococcus faecium* FAIR (E178) (Gram-positiva, CIM1.56 mg mL^{-1} em PLE-W:E) *Enterococcus faecalis* FAIR (E77) (Gram-positiva, CIM1.56 mg mL^{-1} em PLE-W), seguidas por *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva, CIM 3.13 mg mL^{-1} em PLE-W:E) e *Listeria monocytogenes* Scott A (Gram-positiva, CIM 3.13 mg mL^{-1} em PLE-W:E). Por outro lado, nenhum dos extratos testados demonstraram ação inibitória contra *Escherichia coli* ATCC 25922 *e Salmonella Enteritidis* ATCC13076.

De maneira geral, os resultados indicam que extratos das folhas de pitangueira apresentam atividade antimicrobiana especialmente contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* FAIR (E77).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de extratos de folhas de guabirobeira pelo Método de Difusão em Disco e Concentração Inibitória Mínima

Cepa bacteriana		**AI**		**PLE-W**		**PLE-W:E**		**PLE-E**	
	Gram	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})	Halo de inibição (mm)	CIM (mg mL^{-1})
Staphylococcus aureus ATCC 25923	+	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	24,5 ± 0,7a	3,13	19,5 ± 0,7b	12,5
Listeria monocytogenes Scott A	+	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	20 ± 1,4a	3,13	≤ 10	Nd
Enterococcus faecalis FAIR (E77)	+	≤ 10	Nd	15 ± 1,4b	1,56	20 ± 1,4a	3,13	≤ 10	Nd
Enterococcus faecium FAIR (E178)	+	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	16 ± 1,4a	1,56	≤ 10	Nd
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	-	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	21 ± 0,0a	1,56	≤ 10	Nd
Shigella flexeri ATCC 12022	-	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	14 ± 0,0a	6,25	≤ 10	Nd
Escherichia coli ATCC 25922	-	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd
Salmonella Enteritidis ATCC13076	-	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd	≤ 10	Nd

Nd: não detectado; médias seguidas pelas mesmas letras dentro de uma linha não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,0$

4. DISCUSSÃO

4.1 Perfil metabólico e atividade antioxidante dos extratos de folhas de guabirobeira

Os extratos de folhas de guabirobeira apresentam diversidade e quantidade de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, os quais apresentam importantes funções nos vegetais, pois atuam como protetores a diversos fatores ambientais que são constantemente expostos, e quando inseridos na dieta humana apresentam efeitos antioxidantes (ROLEIRA et al, 2015; HAMINIUK et al., 2012). Os extratos obtidos por PLE apresentaram melhor potencial de extração, quando comparado com a infusão usualmente utilizada, devido a maior concentração total de compostos. Entre os compostos presentes, a classe dos flavonoides foi a mais numerosa. O extrato que gerou a maior concentração total de flavonoides foi o PLE-W:E, e esse resultado foi semelhante ao encontrado em extratos de folhas de araçazeiro (ZANDONÁ et al., 2020), em que a mistura entre água e etanol proporciona uma extração de maior concentração desses compostos (ZANDONÁ et al., 2020). Além de que misturas de solventes como água e etanol são consideradas com maior potencial de extração de compostos fenólicos do que quando utilizado 100% de etanol (VENKATESAN, CHOI, & KIM, 2019). Para os ácidos fenólicos e taninos o extrato PLE-W apresentou maior concentração dessas classes de compostos, indicando que esse método de extração com a água tem potencial de extração de compostos polares.

Os compostos encontrados nos extratos de folhas de guabirobeira corroboram com compostos encontrados em outras espécies da família das *Myrtaceae*, como o ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido elágico, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, miricetina e quercetina (MALLMANN et al., 2020; ZANDONÁ et al., 2020).

Os compostos fenólicos são conhecidos pela sua ação antioxidante que é relacionada a sua capacidade de doar átomos de hidrogênio e neutralizar os radicais livres, produzindo espécies menos reativas. São eficientes na prevenção da autoxidação, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI et al., 1992). Conforme resultados obtidos nesse estudo, observa-se que todos os extratos obtidos por PLE demonstram potencial ação antioxidante, através da proteção das células eucarióticas, células do cérebro de ratos, reduzindo

os danos causados pelo estresse oxidativo (TBARS e ROS). PLE-W:E destacou-se como o extrato mais promissor por ter apresentado inibição equivalente e superior aos valores apresentados pelo ácido ascórbico (antioxidante padrão).

Estudos sobre os extratos das folhas de guabirobeira tem demonstrado sua ação na redução do estresse oxidativo (KLAFKE et a*l*., 2016) e consequente redução da transformação de células normais em células cancerosas (CHANDER, 2018), processos inflamatórios (VIECILI et al., 2014), sendo usado no tratamento de úlceras gástricas (MARKMAN, BACCHI E KATO, 2004). Além disso é relatado potencial antidiabético (VINAGRE et al., 2010; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012), efeito antiplaquetário (OTERO et al., 2017) e redução do nível de colesterol (VIECILI et al., 2014).

4.2 Extratos de folhas de guabirobeira apresentam atividade antibacteriana

Os extratos obtidos por PLE, especialmente PLE-W:E, inibiram maior número de bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Este resultado era esperado, haja vista que a estrutura da parede celular das bactérias Gram positivas é mais simples do que Gram negativas, o que contribuiria para a permeabilidade dos compostos antimicrobianos presentes nos extratos. A parede celular das bactérias Gram-positivas apresenta uma única camada composta por peptidioglicano, ácidos tecóicos e ácidos lipotecóicos (DA SILVA DANNENBERG et al., 2019; JANSEN-ALVES et al., 2019). Já nas Gram-negativas, a parede celular é constituída por uma camada composta de pectidioglicano circundada por uma membrana externa que apresenta fospolipídios, lipolipolissacarídeos e proteínas (DA SILVA DANNENBERG et al., 2019; SANTOS et al., 2015), o que atribuiria maior resistência.

Observamos que o extrato PLE-W:E demostrou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Shigella flexeri* ATCC 12022, ambas bactérias Gram-negativas. Esse extrato foi o que apresentou os melhores resultados para a atividade antimicrobiana e, também foi o extrato que gerou a maior concentração total de flavonoides (especialmente flavonas e isoflavonóides), o que pode estar relacionado a esses resultados, uma vez que, esses compostos possuem reconhecida atividade antimicrobiana (DINIZ-SILVA et al., 2017; CONSTANTINOU et al., 1995; HUANG *et al*., 2015). Apesar do mecanismo de ação dos compostos fenólicos não ser totalmente elucidado, cita-se que a ação destes pode estar

relacionada a capacidade de inibir a produção de ácidos nucleicos e nas funções da membrana citoplasmática bem como interferir no metabolismo energético das células (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Observa-se que o PLE-W:E apresentou a maior concentração de alguns ácidos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido siríngico (Tabela 2). Esses compostos também possuem conhecida antibacteriana, como por exemplo, o ácido gálico que demonstrou ação inibitória contra *S. aureus* (*LIU* et al., 2017; GUTIÉRREZ-LARRAÍNZAR, et al., 2012), *Pseudomonas* (SORRENTINO *et al*., 2018), *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans* (SHAO *et al*., 2015), da mesma forma o ácido clorogênico contra *Pseudomonas aeruginosa*, inibindo a formação de biofilme (WANG et al., 2019). Os ácidos 4-Hidroxibenzoico (CHO et al., 1998) e siríngico (SHI et al., 2016) também são conhecidos por terem um amplo espectro antibacteriano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Os resultados indicam que PLE-W:E das folhas de guabirobeira apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

5. CONCLUSÃO

Os extratos de folhas da guabirobeira obtidos por AI e PLE apresentam ampla diversidade e concentração de compostos fitoquímicos, principalmente da classe dos flavonoides, a qual foi a mais abundante, como também de ácidos fenólicos, taninos e compostos pertencentes a outras classes químicas. PLE-W:E destacou-se por apresentar a maior concentração de flavonoides o que pode ter conferido significativa atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e potencial atividade antioxidante *in vitro* (TBARS, ROS), equivalente ao ácido ascórbico. Em contrapartida, são necessários estudos com testes *in vitro* e *in vivo* de citotoxicidade, para avaliar a eficiência e segurança dos extratos.

6. REFERÊNCIAS

ALI, S. F, LEBEL, C. P, & BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, 13, 637–648,1992.

ALVES, A. ALVES, M., S. O., FERNANDES, T. DE O., NAVES, R. V., NAVES, M. M.. V. Caracterização Física e Química, Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante da Polpa e Resíduo de Gabiroba **Rev. Bras. Frutic.,** Jaboticabal - SP, v. 35, n. 3, p. 837-844, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry,** 72, 248-254, 1976.

CZAIKOSKI, K. ET AL. Extraction of Campomanesia xanthocarpa fruit using supercritical CO2 and bioactivity assessments. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 79–85, 2015.

DA SILVA DANNENBERG, G., FUNCK, G. D., DA SILVA, W. P., & FIORENTINI, Â. M. Essential oil from pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control,** 95, 115-120, 2019.

DICKEL, M. L., RATES, S. M. K., & RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology,** 109(1), 60–71, 2007.

ESTERBAUER, H., & CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol,** 186, 407–421, 1990.

JANSEN-ALVES, C., MAIA, D. S., KRUMREICH, F. D., CRIZEL-CARDOSO, M. M., FIORAVANTE, J. B., DA SILVA, W. P., ... & ZAMBIAZI, R. C. Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. ***Food Hydrocolloids***, 87, 703-711, 2019.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZAR, M., RÚA, J., CARO, I., DE CASTRO, C., DE ARRIAGA, D., GARCÍA-ARMESTO, MR, & DEL VALLE, P. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de compostos fenólicos naturais contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes. **Food Control**, 26 (2), 555–563, 2012.

JUSOH, N. H. M., SUBKI, A., YEAP, S. K., YAP, K. C., & JAGANATH, I. B. Pressurized hot water extraction of hydrosable tannins from Phyllanthus tenellus Roxb. **BMC Chemistry**, 13(1), 134, 2019.

KATAOKA, V. M. F., & CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies Campomanesia

sessiliflora (O. Berg) Mattos e Campomanesia xanthocarpa O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 15(1), 121–129, 2013.

KLAFKE, J. Z., DA SILVA, M. A., PANIGAS, T. F., BELLI, K. C., DE OLIVEIRA, M. F., BARICHELLO, M. M., … VIECILI, P. R. N. Effects of Campomanesia xanthocarpa on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, 127(2), 299–305, 2010.

LIMA, J. S. S., CASTRO, J. M. C. SABINO, L. B. S., LIMA, A. C. S., TORRES, L. B. V. Physicochemicalproperties of gabiroba (campomanesia lineatifolia) and myrtle (blepharocalyx salicifolius) native to the mountainous region of ibiapaba–ce, **Brazil. Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 753 – 757, 2016.

LIU, M., WU, X., LI J., LIU, L., ZHANG R., SHAO, D., DU X., The specific anti-biofilm effect of gallic acid on Staphylococcus aureus by regulating the expression of the ica operon. **Food Control** 73 - 613 e 618, 2017.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 252 p.
MARKMAN, B. E. O., BACCHI, E. M., & KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of Campomanesia xanthocarpa. **Journal of Ethnopharmacology**, 94(1), 55–57, 2004.

MUSTAFA, A., & TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, V. 703(1), p. 8–18, 2011.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M. E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2. p. 301-307, 2008.

OTERO, J. S., HIRSCH, G. E., KLAFKE, J. Z., PORTO, F. G., DE ALMEIDA, A. S., NASCIMENTO, S., … VIECILI, P. R. N. Inhibitory effect of Campomanesia xanthocarpa in platelet aggregation: Comparison and synergism with acetylsalicylic acid. **Thrombosis Research**, 154, 42–49, 2017.

PEREIRA, M. C., HILL, L. E., ZAMBIAZI, R. C., MERTENS-TALCOTT, S., TALCOTT, S., & GOMES, C. L. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (Campomanesia xanthocarpa O. Berg) study. **LWT - Food Science and Technology**, 63(1), 100–107, 2015.

PEREIRA, M. C., OLIVEIRA, D. A., HILL, L. E., ZAMBIAZI, R. C., BORGES, C. D., VIZZOTTO, M., MERTENS-TALCOTT, S., TALCOTT, S. GOMES, C. L. Effect of nanoencapsulation using PLGA on antioxidant and antimicrobial activities of guabiroba fruit phenolic extract**. Food Chemistry**, 240, 396–404, 2018.

PESSOA, A. S., PODESTÁ, R., BLOCK, J. M., FRANCESCHI, E., DARIVA, C., & LANZA, M. Extraction of pequi (Caryocar coriaceum) pulp oil using subcritical propane:

Determination of process yield and fatty acid profile. **The Journal of Supercritical Fluids**, V.101, p. 95–103, 2015.

SANT'ANNA, L. S., MERLUGO, L., EHLE, C. S., LIMBERGER, J., FERNANDES, M. B., SANTOS, M. C., … MOREIRA, C. M. (2017). Chemical Composition and Hypotensive Effect of Campomanesia xanthocarpa. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 1–11, 2017.

SANTOS, D. N., DE SOUZA, L. L., DE OLIVEIRA, C. A. F., SILVA, E. R., & OLIVEIRA, A. L. DE. Arginase inhibition, antibacterial and antioxidant activities of Pitanga seed (Eugenia uniflora L.) extracts from sustainable technologies of high pressure extraction. **Food Bioscience**, 12, 93–99, 2015.

SANTOS, JS, DEOLINDO, CTP, HOFFMANN, JF, CHAVES, FC, DO PRADO-SILVA, L., SANT'ANA, AS,… Granato, D. Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, 254, 348–358, 2018.

SHAO, DONGYAN; LI, JING; LI, JI; TANG, RUIHUA; LIU, LIU; SHI, JUNLING; HUANG, QINGSHENG; YANG, HUI Inhibition of gallic acid in the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. **Journal of Food Science**, 80 (6), M1299 - M1305, 2015.

SHI, C., SUN, Y., ZHENG, Z., ZHANG, X., SONG, K., JIA, Z., … XIA, X. Antimicrobial activity of syringic acid against Cronobacter sakazakii and its effect on cell membrane. **Food Chemistry.** 197, 100-106, 2016.

SOARES DA SILVA, E. R., SALMAZZO, G.R., ARRIGO, J. DA S., OLIVEIRA, R.J., KASSUYA, C.A.L. AND CARDOSO, C. A. L. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of Campomanesia xanthocarpa Berg. **Inflammation,** Vol. 39, No. 4, 2016.

SORRENTINO E, SUCCI M, TIPALDI L, PANNELLA G, MAIURO L, STURCHIO M, COPPOLA R, TREMONTE P. Antimicrobial activity of gallic acid against food-related Pseudomonas strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. **Int J Food Microbiol.** 2; 266:183-189, 2018.

TROJAN-RODRIGUES, M., ALVES, T. L. S., SOARES, G. L. G., & RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 139(1), 155–163, 2012.

VIECILI, P. R. N., BORGES, D. O., KIRSTEN, K., MALHEIROS, J., VIECILI, E., MELO, R. D., … KLAFKE, J. Z. Effects of Campomanesia xanthocarpa on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis,** 234(1), 85–92, 2014.

VINAGRE, A. P. S., RÖNNAU, A. D´S R.O., PEREIRA. S.F., DA SILVEIRA, L. U., WIILLAND, E.F., SUYENAGA. E. S. Anti-diabetic effects of Campomanesia xanthocarpa (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 46, n. 2, 2010.

WANG, H., CHU, W., YE, C., GAETA, B., TAO, H., WANG, M., QIU, Z. Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa by regulating quorum sensing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol.103(2), pp.903-915, 2019.

WIJNGAARD, H., HOSSAIN, M. H., RAI, D.K., BRUNTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**. 46, 505–513, 2012.

ZANDONÁ, G. P., BAGATINI, L., WOLOSZYN, N., CARDOSO, J. DE S., MORONI, L. S., STEFANELLO, F. M., JUNGES, A., ROMBALDI, C. V. Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (Psidium cattleianum) leaf: putatives antioxidant and antimicrobial properties. **Food Research International**, Volume 137, 2020.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A temática de pesquisa desse projeto (com duas Teses em consórcio) trata da prospecção de propriedades biológicas em espécies nativas de biomas brasileiros, nesse caso específico, araçazeiro, pitangueira, guabirobeira e butiazeiro. Mais especificamente, o foco foi dado às folhas. A razão principal dessa escolha se deve ao fato de já haver um conhecimento empírico popular que aponta para possíveis propriedades dessas folhas na saúde das pessoas e em outros animais.

No contexto da temática, a questão múltipla da pesquisa foi: qual é a riqueza em compostos fitoquímicos polares; como o método de extração pode interferir no perfil de compostos fitoquímicos polares; quais as respostas biológicas esperadas a partir desses extratos?

Nessa Tese, a atenção está concentrada nos estudos com folhas de pitangueira e de guabirobeira. As respostas às perguntas formuladas são (de modo geral, com exceções):

1) tanto as folhas de pitangueira, quanto àquelas de guabirobeira são ricas em compostos fitoquímicos polares;
2) a extração por PLE resulta em maior concentração e diversidade de compostos do que a extração por AI; e,
3) de modo geral, todos os extratos apresentam putativas propriedades biológicas, havendo um destaque geral para o extrato PLE-W:E.

A seguir, detalham-se um pouco mais os achados

Para as folhas de pitangueira a extração por PLE resulta em maior diversidade e maior concentração de compostos fitoquímicos e o solvente utilizado interferiu na concentração dos compostos, sendo que a mistura de etanol e água (PLE-W:E) foi mais eficaz na extração de ácidos fenólicos e taninos, enquanto para a extração dos flavonóides o etanol como solvente (PLE-E) mostrou-se mais eficaz.

Todos os extratos proporcionaram ação antioxidante de proteção na sobrevivência células para *Saccharomyces cerevisiae* frente ao agente oxidante sendo que o nível de sobrevivência foi relativamente proporcional a concentração do extrato aplicado. Apenas os extratos obtidos por PLE apresentaram atividade

protetora das células de cérebro de rato utilizando TBARS, no entanto, para ROS os extratos de folhas de pitangueira obtidos por AI e PLE, em todas as concentrações testadas, apresentaram efeito protetor nas células, além de substancial atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-positivas, e atividade alelopática para sementes de alface.

Para as folhas de guabirobeira o método de extração não influenciou na quantidade de compostos presentes nos extratos, diferentemente do tipo de solvente utilizado, onde a mistura de solventes (PLE-W:E) extraiu maior concentração de compostos.

Todos os extratos obtidos com PLE apresentaram atividade protetora das células de cérebro de rato utilizando TBARS, no entanto, AI não teve ação. Os extratos obtidos por PLE e AI apresentaram efeito protetor nas células de cérebro de rato com ROS e PLE-W: E na concentração 100 µg mL^{-1} , foi o mais promissor apresentando ação superior ao padrão AA. Da mesma forma, PLE-W:E apresentou maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Assim, as folhas de pitangueira e guabirobeira podem ser consideradas como uma fonte promissora de compostos bioativos.

O desenvolvimento deste trabalho possibilitou ampliar o conhecimento acerca dessas espécies nativas estudadas, especialmente quanto à composição química e quanto às propriedades biológicas.

A extração com PLE demonstrou uma maior diversidade e concentração de compostos fitoquímicos quando comparada ao método por infusão, sendo que há dependência do solvente utilizado no processo, e, a sua influência é relativa a cada espécie estudada. Com relação às respostas biológicas testadas, nem sempre uma maior diversidade de compostos fitoquímicos foi proporcional a ação destes extratos, no entanto nossos resultados demonstraram putativas propriedades para uso em alimentos, alimentos funcionais, produtos nutracêuticos ou antimicrobianos, uma vez que demonstratam atividade antimicrobiana, antioxidante e alelópática.

Para isso há necessidade de novos estudos gerando novas perspectivas futuras de estudos como:

- Tentar identificar a ampla gama de compostos não identificados;

- Estudar os parâmetros relacionados à extração por PLE, a fim de otimizar o processo;
- Avaliação das propriedades protetoras *in vitro* e *in vivo* dos extratos obtidos por PLE e AI;
- Estudo de Citotoxicidade e mutagenicidade dos extratos obtidos por PLE e AI;
- Uma maior amplitude no conhecimento dos compostos químicos encontrados em cada extrato;
- Avaliar a variabilidade da composição química em função das condições de cultivo destas espécies;
- Ampliar os testes microbiológicos abrangendo um número maior de micro-organismos Gram-positivos e Gram–negativos;
- Ampliar a faixa de concentração dos extratos nos testes de atividade alelopática;
- Prospectar aplicações dos extratos em alimentos como antimicrobianos, antioxidantes.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. F, LEBEL, C. P, & BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, 13, 637–648, 1992.

ALVARENGA, F. Q. et al. Atividade antimicrobiana in vitro das folhas de araçá (Psidium cattleianum Sabine) contra micro-organismos da mucosa oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 3, p. 149–153, 2016.

ALVARENGA, F. Q. et al. In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of Psidium cattleianum Sabine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 280–284, 2013.

ALVES, A. ALVES, M., S. O., FERNANDES, T. de O., NAVES, R. V., NAVES, M. M.. V. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabiroba **Rev. Bras. Frutic**., Jaboticabal - SP, v. 35, n. 3, p. 837-844, 2013.

AMIN, A.R., O. KUCUK, F.R. KHURI AND SHIN D.M. Perspectives for cancer prevention with dietary compounds. **Journal of Clinical Oncology**. 27(16): 2712–2725, 2009.

AMMAR, N. M.; HEFNAWY. M.S.; AL-OKBI, S. Y.; MOHAMED, D.A.; EL-SAYED, N. K.; EL –ANSSARY, A. A.; MABRY, T. Phytochemical and biological studies of Butia capitata Becc. Leaves cultivated in Egypt. Asian Pacific **Journal of Tropical Biomedicine.** V. 4(6), P. 456-462, 2014.

ANDRADE, K. S.; TRIVELLIN, G.; FERREIRA, S.R.S. Piperine-rich extracts obtained by high pressure methods. J**. of Supercritical Fluids**, 2017.

ARAÚJO, F. F., NERI-NUMA, I. A., FARIAS, D. D. P., CUNHA, G. R. C., & PASTORE, G. M. Wild Brazilian species of Eugenia genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International,** 121, 57-72, 2019.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de Eugenia unifloraL. (pitanga): Revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** v.62, n.1, p.55-61, 2003.

AZEVEDO, R. S.A.; TEIXEIRA, B.S.; SAUTHIER, M.C.S.; SANTANA, M.V.S.; DOS SANTOS, W.N.L., SANTANA, D. A. Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species Camellia sinensis. **Food Chemistry**, v. 273, p. 39–44, 2019.

AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M., RAHMAN, M. M., SHARIF, K. M., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M. A., GHAFOOR, K., NORULAINI, N. A. N., OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p.426 – 36, 2013.

BAGETTI, M., FACCO, E.M.P; , Jaqueline PICCOLO1, HIRSCH, G. E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D., KOBORI, C. N.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (Eugenia uniflora L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** V 31. P 147-154, 2011.

BARBA, F.J., CHEMAT, F., BARBOSA-CÁNOVAS, G., JAMBRAK, A.R. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. **Food Research International** Volume 113, Pages 245-262, 2018.

BARBIERI, S. F., DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L., DE GODOY, R. C. B., DE AZEREDO, H. C. M., FRANCO, C. R. C., & SILVEIRA, J. L. M. Pulp and Jam of Gabiroba (Campomanesia xanthocarpa Berg): Characterization and Rheological Properties. **Food Chemistry**, 263, 292–299, 2018.

BASILE, A., SORBO, S., GIORDANO, S., RICCIARDI, L., FERRARA, S., MONTESANO, D., COBIANCHI, R.C., M.L. VUOTTO, FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from Castanea sativa leaves. **Fitoterapia**, v. 71, p. 110-116, 2000.

BASTOS, R.G.; SALLES, B.C.C.; BINI, I.F.; CASTALDINI, L.P.; SILVA, L.C.D.; VILELA, A.A.; MICHELONI, A.L.C., et al., Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of Eugenia florida DC. (Myrtaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 317–332, 2019.

BENTLEY, J., OLSEN, E. K., MOORE, J. P., FARRANT, J. M. The phenolic profile extracted from the desiccation-tolerant medicinal shrub Myrothamnusflabellifolia using Natural Deep Eutectic Solvents variesaccording to the solvation conditions. **Phytochemistry**, v. 173, 112323, 2020.

BESKOW, G. T. et al. Bioactive and yield potential of jelly palms (Butia odorata Barb. Rodr.). Food Chemistry, v. 172, n. April, p. 699–704, 2015.

BEZERRA et al., 2020. https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1106305/1/Pitanga.pdf

BOIAGO, N. P., FORTES, A. M. T., PILATTI, D. M., & SILVA, P. S. S. DA. Allelopathic bioactivity of fresh and infused aqueous extracts of Brazilian cherry (Eugenia uniflora L.) on lettuce and maize. Acta Scientiarum**. Biological Sciences**, 40(1), 2018.

BRACK. P., KÖHLER, M., CORRÊA, C.A., ARDISSONE, R.E., SOBRAL, M. E. G. & KINUPP, V.F. Native fruits of Rio Grande do Sul, Brazil: richness and potential as food. **Rodriguésia** 71: e 03102018, 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.

BRAGA, M. E. M., EHLERT, P.A.D., MING, L.C., MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction from Lippia alba: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. **J. of Supercritical Fluids,** 34 - 149–156, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Regras para Análise de Sementes**, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitário. **Farmacopeia Brasileira: Plantas Medicinais**. 6ª edição. Brasília, 2019.

BRASIL. **Pitangueira**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 2007.87p.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, Vol. 56, No. 11, 31 7-333, 1998.

BRIGHENTI, F. L., LUPPENS, S. B. I., DELBEM, A. C. B., DENG, D. M., HOOGENKAMP, M. A., GAETTI-JARDIM JR., E., … TEN CATE, J. M. Effect of Psidium cattleianum Leaf Extract on Streptococcus mutans Viability, Protein Expression and Acid Production. **Caries Research,** 42(2), 148–154, 2008.

CAO G, SOFIC E, PRIOR RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radic Biol Med**. 22(5):749-60,1997.

CAPELETTO, C., CONTERATO, G., SCAPINELLO, J., RODRIGUES, F. S., COPINI, M. S., KUHN, F., … OLIVEIRA, J. V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (Campomanesia xanthocarpa Berg) seed extracts obtained by supercritical CO2 and compressed n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids,** 110, 32–38, 2016.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1–2, p. 1–17, 2005.

CARDOSO, J. S., OLIVEIRA, P. S., BONA, N. P., VASCONCELOS, F. A., BALDISSARELLI, J., VIZZOTTO, M., SOARES, M. S. P., RAMOS, V. P., SPANEVELLO, R. M., LENCINA, C. L., TAVARES, R. G., STEFANELLO, F. M. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, 23 (1), 41-46, 2018.

CASTRO, D.C., ROZYCKI, V., LATORRE, J. D. C., ALESSO, C. A., EXNER, E. DEL. J., PIAGENTINI A., PIROVANI, M.E. Variation of Eugenia uniflora L. fruit quality attributes in the south of the Argentine Gran Chaco. **Forests, trees and livelihoods,** VOL. 29, NO. 2, 130–142, 2020.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 2010.

Chander, M. Anticancer Efficacy of Some Plant Phenolics - A Recent Scenario. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci** 7(10): 1746-1768, 2018.

CHAPLA, T. E., & CAMPOS, J. B. Allelopathic evidence in exotic guava (Psidium guajava L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53(6), 1359, 2010.

CHAVES, M. A., BARRETO, I. M. A., REIS, R. C., & KADAM, D. M. Physicochemical and sensory properties of purple Brazilian cherry (Eugenia uniflora, L.) foams. **International Journal of Food Science & Technology**, 48(8), 1688–1697, 2013.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of Eugenia uniflora (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 57–63, 2002.

CONSTANTINOU, A., MEHTA R., RUNYAN C., RAO K., VAUGHAN A., MOON R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**. 58(2):217-25, 1995.

CORRÊA, L. C.; SANTOS, C. A. F.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Antioxidant content in guava (Psidium guajava) and araçá (Psidium spp.) germplasm from different Brazilian regions. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, V. 9(3), p. 384–391, 2011.

COUTINHO, H. D.M., COSTA, J. G.M., SILVA, V. S. F., SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P., LIMA, E.O. Potentiation of Antibiotic Activity by Eugenia uniflora and Eugenia jambolanum. **J Med Food** 13 (4), 1024–1026, 2010.

CRUZ, P. N.; PEREIRA, T.C.S.; GUINDANI, C. OLIVEIRA, D. A.; ROSSI. M. J.; FER+A126REIRA, S. R.S. Antioxidant and antibacterial potential of butia (Butia catarinensis) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids.** V. 119, p. 229-237, 2017.

CUSHNIE, T.P.T, LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Volume 38, edição 2, agosto de 2011, páginas 99-107, 2011.

CVETANOVIĆ, A., ŠVARC-GAJIĆ, J., ZEKOVIĆ, Z., GAŠIĆ, U., TEŠIĆ, Ž., ZENGIN, G., … ĐUROVIĆ, S. Subcritical water extraction as a cutting edge technology for the extraction of bioactive compounds from chamomile: Influence of pressure on chemical composition and bioactivity of extracts. **Food Chemistry**, 266, 389–396, 2018.

CZAIKOSKI, K., MESOMO, M. C., KRÜGER, R. L., QUEIROGA, C. L., & CORAZZA, M. L. Extraction of Campomanesia xanthocarpa fruit using supercritical CO2 and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids,** 98, 79–85, 2015.

DA COSTA, J. S., BARROSO, A. S., MOURÃO, R. H. V., DA SILVA, J. K. R., MAIA, J. G. S., & FIGUEIREDO, P. L. B. Seasonal and Antioxidant Evaluation of Essential Oil from Eugenia uniflora L., Curzerene-Rich, Thermally Produced in Situ. **Biomolecules,** 10(2), 328, 2020.

DA SILVA DANNENBERG, G., FUNCK, G. D., DA SILVA, W. P., & FIORENTINI, Â. M. Essential oil from pink pepper (Schinus terebinthifolius Raddi): Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action. **Food Control**, 95, 115-120, 2019.

DACOREGGIO, M. V., MORONI, L. S., & KEMPKA, A. P. Antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities and surface disinfection of the extract of Psidium cattleianum sabine leaves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 21, 21, 101295, 2019.

DADI, P. K., AHMAD, M., AHMAD, Z. Inhibition of ATPase activity of Escherichia coli ATP synthase by polyphenols, **International Journal of Biological Macromolecules,** Volume 45, Issue 1, P. 72-79, 2009.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.

DE LIMA, A. S., MAIA, D. V., HAUBERT, L., OLIVEIRA, T. L., FIORENTINI, Â. M., ROMBALDI, C. V., DA SILVA, W. P. Action mechanism of araçá (Psidium cattleianum Sabine) hydroalcoholic extract against Staphylococcus aureus. **LWT - Food Science and Technology,** 119, 2020.

DE OLIVEIRA, N. A., CORNELIO-SANTIAGO, H.P., FUKUMASU, H., DE OLIVEIRA, A. L. Green coffee extracts rich in diterpenes e Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. **Journal of Food Engineering** 224, 148e155, 2018.

DENARDIN, C. C. et al. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 387–398, 2015.

DENARDIN, C. C., MARTINS, L. A. M., PARISI, M. M., VIEIRA, M. Q., TERRA, S. R., BARBÉ-TUANA, F. M.; BOROJEVIC, R. VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T.; GUMA, F.C.R. Autophagy induced by purple pitanga (Eugenia uniflora L.) extract triggered a cooperative effect on inducing the hepatic stellate cell death. Cell **Biology and Toxicology**, V. 33(2), p. 197–206, 2016.

DENARDIN, C. C.; PARISI, M. M.; MARTINS, L. A. M.; TERRA, S. R.; BOROJEVIC, R.; VIZZOTTO, M.; PERRY, M. L. S.; EMANUELLI, T.; FÁTIMA T. C. R. GUMA, F. T. C. R. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (Eugenia uniflora L.) extract on activated hepatic stellate cells. **Cell biochemistry and function**, 2:16–23, 2014.

DICKEL, M. L., RATES, S. M. K., & RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 109(1), 60–71, 2007.

DINIZ-SILVA, H. T., MAGNANI S., DE SIQUEIRA, S., DE SOUZA, E.L., DE SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in Staphylococcus aureus that overexpresses norA. LWT - **Food Science and Technology,** Volume 85, Part B, Pages 324-326, 2017.

ESSIEN, O.S., YOUNG, B., BAROUTIAN, B. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. **Trends in Food Science & Technology** 97, 156–169, 2020.

ESTERBAUER, H., & CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol, 186, 407–421, 1990.

FERREIRA, A. G. AQUILA, M. E. A. ALELOPATIA: UMA ÁREA EMERGENTE DA ECOFISIOLOGIA. **R. Bras.Fisiol.Veg.** 12(Edição Especial):175-204, 2000.

FERREIRA, L. C., GRABE-GUIMARÃES, A., DE PAULA, C. A., MICHEL, M. C. P., GUIMARÃES, R. G., REZENDE, S. A., SOUZAFILHO, J.D. SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Campomanesia adamantium. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 145(1), p.100–108, 2013.

FERREIRA, S. R. S., MEIRELES, M. A. A., & CABRAL, F. A. Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. **Journal of Food Engineering,** V. 20(2), p. 121–133, 1993.

FIUZA, T.S., REZENDE, M. H.,. SABÓIA-MORAIS, S M. T., BARA, M. T. F., TRESVENZOL, L. M. F., DE PAULA, J. R. Pharmacognostic characterization of the leaves of Eugenia uniflora L. (Myrtaceae). Vol. V (2), 01 - 11, **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol 5(2), 21-31, 2008.

FOODB (2019). LC-MS Search. Disponível em: <http://foodb.ca/compounds/FDB015291>. Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. DE. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N.A.H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **R. bras. Bioci.,** Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

FRANZON, R. C. et al. Araçás do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**, p. 1–47, 2009.

FRANZON, R. C. et al. Pitanga: fruta de sabor agradável e de usos diversos. Embrapa Cerrados, 2013. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/artigo/pitanga-fruta-de-sabor-agradavel-e-de-usos-diversos-3579. Acesso em março, 2020.

FRUTÍFERA. Acessível em: https://www.frutiferas.com.br/guabiroba

GARMUS, T. T., PAVIANI, L. C., QUEIROGA, C. L., MAGALHÃES, P. M., & CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO2, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, V. 86, p. 4–14, 2014.

GATTI, A. B.; LIMA, M. I. S.; PEREZ, S. C. J. G. A. Allelopathic potential of *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer on the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. **Allelopathy Journal**, v. 21, n. 1,p. 73-82, 2008.

GIACOMETTI, J. KOVAČEVIĆB, D. B. PUTNIK, P., GABRIĆ, D., BILUŠIĆ, T., KREŠIĆ, G., STULIĆ, V.,... Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. **Food Research International**, 2018.

GIOMBELLI, C. IWASSA, I.J., DA SILVA, C., BARROS, B. C. B. Valorization of peach palm by-product through subcritical water extraction of soluble sugars and phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, Volume 165, 1 November 2020.

GOMES, D. B.; ZANCHET, B.; SERPA, P. Z.; LOCATELI, G.; MIORANDO, D.; STEFFLER, A. M.; ZANATTA, M. E. C.; PREDEBON, A. J.; CARTERI, C. S.; LUTINSKI, J.; RUIZ, A. L. T. G.; SANTOS, M. F. C.; BARISON, A.; ROMAN JUNIOR, W. A. Chemical Analysis and in Vitro Antiproliferative Potential of Eugenia uniflora L. (Myrtaceae). **European Journal of Medicinal Plants**, 31(6): 34-44, 2020.

GÜRBÜZA, N., ULUIŞIKB, S., FRARYA, A., FRARYC, A., DOĞANLARA, S. Health benefits and bioactive compounds of eggplant. **Food Chemistry** 268 602–610, 2018.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZAR, M., RÚA, J., CARO, I., DE CASTRO, C., DE ARRIAGA, D., GARCÍA-ARMESTO, MR, & DEL VALLE, P. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de compostos fenólicos naturais contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes. **Food Control**, 26 (2), 555–563, 2012.

HAMINIUK, C.W.I., MACIEL, G.M., PLATA- OVIEDO, M.S.V. & PERALTA, R.M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, 2012.

HARTMANN T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry.** 68(22-24):2831-46, 2007.

HE, M., WU, T., PAN, S., XU, X. Antimicrobial mechanism of flavonoids against Escherichia coli ATCC25922 by model membrane study. **Applied Surface Science.** 305, 515–521, 2014.

HEIM, K. E., TAGLIAFERRO A. R., BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J**ournal of Nutritional Biochemistry**. 13, 572–584, 2002.

HERRERO, M. CASTRO-PUYANA, J.A. MENDIOLA, E. Ibanez, Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds, **TrAC-Trends Anal. Chem**. 43 67e83, 2013.

HOFFMANN, J. F. BARBIERI, R., ROMBALDI, C.V., CHAVES, F.C. Butia spp. (Arecaceae): An overview. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 122–131, 2014.

HOFFMANN, J. F. et al. Butia spp. (Arecaceae) LC-MS-based metabolomics for species and geographical origin discrimination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** V. 65 p. 523- 532, 2017.

HOFFMANN, J. F. et al. Flavan-3-ol, flavanone, flavone, flavonol, phenolic acid, and stilbene contents of four Butia species (Arecaceae). **Fruits,** v. 73, n. 2, 2018.

HOLLMAN, P. C. H. and KATAN, M. B.Dietary Flavonoids: Intake, Health E€ects and Bioavailability. Food and Chemical **Toxicology** 37, 937±942, 1999.

HUANG, Y-H., HUANG, C-C. CHEN C-C., YANG, K-JR., HUANG, C-Y. Inhibition of *Staphylococcus aureus* PriA Helicase by Flavonol Kaempferol. **The Protein Journal,** 34(3), 169–172, 2015.

IMATOM, M. NOVAES, P. GUALTIERI, S. C. J. Interspecifi c variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta bot. bras**. 27(1): 70-77. 2013.

IMATOMI, M., NOVAES, P., MIRANDA, M. A. F. M., & GUALTIERI, S. C. J. Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 37(2), 241, 2015.

JACQUES, R. A. et al. Pressurized liquid extraction of mate tea leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, n. 1, p. 70–76, 2008.

JANSEN-ALVES, C., MAIA, D. S., KRUMREICH, F. D., CRIZEL-CARDOSO, M. M., FIORAVANTE, J. B., DA SILVA, W. P., ... & Zambiazi, R. C. Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Food Hydrocolloids**, 87, 703-711, 2019.

JOKI´C, S. , GAGI´C, T. , KNEZ, Z., ŠUBARI´C, D. ŠKERGET, M. Separation of Active Compounds from Food by-Product (Cocoa Shell) Using Subcritical Water Extraction. **Molecules** 2018, 23, 1408.

JUSOH, N. H. M., SUBKI, A., YEAP, S. K., YAP, K. C., & JAGANATH, I. B. Pressurized hot water extraction of hydrosable tannins from Phyllanthus tenellus Roxb. **BMC Chemistry**, 13(1), 134, 2019.

KADE, I. J., IBUKUN, E. O., NOGUEIRA, C. W., & DA ROCHA, J. B. T. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of Eugenia uniflora against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 60(4-5), 365–371, 2008.

KATAOKA, V. M. F., & CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies Campomanesia sessiliflora (O. Berg) Mattos e Campomanesia xanthocarpa O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 15(1), 121–129, 2013.

KATO-NOGUCHI, H., TAKESHITA, S., KIMURA, F., OHNO, O., SUENAGA, K. A novel substance with allelopathic activity in Ginkgo biloba. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, 1595– 1599, 2013.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P.-L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-10, 2010.

KIM, D-S., LIM, S-B. Kinetic study of subcritical water extraction of flavonoids from citrus unshiu peel. **Separation and Purification Technology.** 250, 117259, 2020.

KLAFKE, J. Z., DA SILVA, M. A., PANIGAS, T. F., BELLI, K. C., DE OLIVEIRA, M. F., BARICHELLO, M. M., … VIECILI, P. R. N. Effects of Campomanesia xanthocarpa on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, 127(2), 299–305, 2010.

KO, M. J., CHEIGH, C. I. & CHUNG, M. S. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). **Food Chem.** 143, 147–155, 2014.

KO, M-J, NAM, H-H & CHUNG, M-S. Subcritical water extraction of bioactive compounds from Orostachys japonicus A. Berger (Crassulaceae). **Scientific Reports**, 10:10890, 2020.

KOÇAK, E. PAZIR, F. Effect of Extraction Methods on Bioactive Compounds of Plant Origin. Turkish Journal of Agriculture - **Food Science and Technology**, 6(6): 663-675, 2018.

LAZARINI, J. G., FRANCHIN, M., INFANTE, J., PASCHOAL, J. A. R., FREIRES, I. A., ALENCAR, S. M. DE, ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory activity and polyphenolicprofile of the hydroalcoholic seed extract of Eugenia leitonii, an unexplored Braziliannative fruit. **Journal of Functional Foods,** 26, p. 249–257, 2016.

LAZARINI, J. G., FRANCHIN, M., SOARES, J. C., NANI, B. D., MASSARIOLI, A. P., DE ALENCAR, S. M., ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory and antioxidant potential, in vivo toxicity, and polyphenolic composition of Eugenia selloi B.D.Jacks. (pitangatuba), a Brazilian native fruit. **PLOS ONE**, 15(6), 2020.

LEYVA-JIMÉNEZ F.J., LOZANO-SÁNCHEZ, J., BORRÁS-LINARES, I, ARRÁEZ-ROMÁN, D.A.,. SEGURA-CARRETERO A. Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from Lippia citriodora leaves. **Food Research International**, V. 109, 213-222, 2018.

LI, Z-H., WANG, Q.,RUAN, X., PAN, C-D, & JIANG, D-A. Phenolics and Plant Allelopathy. **Molecules**,v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LIMA, J. S. S., CASTRO, J. M. C. SABINO, L. B. S., LIMA, A. C. S., TORRES, L. B. V. Physicochemical properties of gabiroba (campomanesia lineatifolia) and myrtle (blepharocalyx salicifolius) native to the mountainous region of ibiapaba–ce, **Brazil. Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 753 – 757, 2016.

LIMA, V. L. A. G. DE, MÉLO, E. DE A., & LIMA, D. E. DA S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.447-450, 2002.

LINDEN, M., BRINCKMANN, C., FEUEREISEN, M.M., REVIEW, SCHIEBER, A., Effects of structural differences on the antibacterial activity of biflavonoids from fruits of the Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Food Research International.** Volume 133, 109134, 2020.

LIU, M., WU, X., LI J., LIU, L., ZHANG R., SHAO, D., DU X., The specific anti-biofilm effect of gallic acid on Staphylococcus aureus by regulating the expression of the ica operon. **Food Control** 73. 613 e 618, 2017.

LIU. R.H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. **J. Nutr**. 134: 3479S–3485S, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 252 p.

LORENZO, J. M., VARGAS, F. C., STROZZI, I., PATEIRO, M., FURTADO, M. M., SANT'ANA, A. S., … DO AMARAL SOBRAL, P. J. Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. **Food Research International**, 114, 47–54, 2018.

LORENZONI, L.S., GANDINI, S.M.S., DE SOUZA, T.S., SANTOS JUNIOR, A.C., ULISSES, A.F. Estudo Fitoquímico e Antibacteriano do Extrato Etanólico de Eugenia Uniflora L. (*Myrtaceae)*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2012796, 2013.

LOU, X.; JANSSEN, H.-G.; CRAMERS, C. A. Parameters affecting the accelerated solvente extraction of polymeric samples. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 8, p. 1598-1603, 1997.

MACHADO, A. P. F. **Extração extração de compostos bioativos do bagaço da amora-preta (rubus spp.) Utilizando líquidos pressurizados**. Tese de Doutorado, UNICAMP, 2014.

MACÍAS, F. A., MOLINILLO, J. M., VARELA, R. M., & GALINDO, J. C. Allelopathy—a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, 63(4), 327–348, 2007.

MALHEIROS, A.; PERES, M.T.L.P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal moderna. Chapecó: **Argos**, p. 505-6, 2001.

MALLMANN, L.P.; TISCHER, B.; VIZZOTTO, M., Eliseu Rodrigues, E.; Manfroi, V. Comprehensive identification and quantification of unexploited phenolic compounds from red and yellow araçá (Psidium cattleianum Sabine) by LC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 131, 108978, 2020.

MARKMAN, B. E. O., BACCHI, E. M., & KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of Campomanesia xanthocarpa. **Journal of Ethnopharmacology**, 94(1), 55–57, 2004.

MARKOM, M. HASAN, M., DAUD, W.R.W., SINGH, H., JAHIM, J.M. Extraction of hydrolysable tannins from Phyllanthus niruri Linn.: effects of solvents and extraction methods, **Separation and Purification Technology** 52 (3) 487–496, 2007.

MARTINEZ-CORREA, H. A., MAGALHÃES, P. M., QUEIROGA, C. L., PEIXOTO, C. A., OLIVEIRA, A. L., & CABRAL, F. A. Extracts from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, 55(3), 998–1006, 2011.

MARTINI, N.D., KATERERE, D.R.P., ELOFF, J.N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from Combretum erythrophyllum (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology** 93, 207–212, 2004.

MARTINS, S., MUSSATTO, S.I., MARTÍNEZ-AVILA, G., MONTAÑEZ-SAENZ, J., AGUILAR, C.N., TEIXEIRA, J.A., Bioactive phenolic compounds: Production and

extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances** 29, 365–373, 2011.

MASSARIOLI AP, OLDONI TLC, MORENO IAM, ROCHA AA, ALENCAR SM. Antioxidant activity of different pitanga (Eugenia uniflora L.) fruit fractions. **Journal of Food Agriculture and Environment** 11:1:288-293, 2013.

MAZID M., KHAN T. A., MOHAMMAD F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Review **Article Biology and Medicine**, 3 (2) Special Issue: 232-249, 2011.

MAZZUTTI, S. et al. Integrated green based processes using supercritical CO2 and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compouds from cocoa (Theobrama cacao) bean hulls. **The Journal of Supercritical Fluids**, Volume 135, Pages 52-59, 2018.

MEDINA, A. L., HAA+A17S, L. I. R., CHAVES, F. C., SALVADOR, M., ZAMBIAZI, R. C., DA SILVA, W. P., NORA, L., ROMBALDI, C. V. Araçá (Psidium cattleianum Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.

Meira, E.F., Oliveira, N.D., Mariani, N.P., Porto, M.L., Severi, J.A., Siman, F.D.M., Meyrelles, S.S., Vasquez, E.C., Gava, A.L. Eugenia uniflora (pitanga) leaf extract prevents the progression of experimental acute kidney injury. **Journal of Functional Foods,** v. 66, 2020.

MENDONÇA, A. T., CARVALHO, A. R., FERREIRA, A. C., RESENDE JÚNIOR, M. C. A utilização dos extratos hidroalcoólico e alcoólico de eugenia uniflora l. Como agente antibacteriano. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 1, p. 826-833, 2016.

MOON, J. Y., MOSADDIK, A., KIM, H., CHO, M., CHOI, H.-K., KIM, Y. S., & CHO, S. K. The chloroform fraction of guava (Psidium cattleianum sabine) leaf extract inhibits human gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. **Food Chemistry,** v. 125, n. 2, p. 369–375, 2011.

MOURA, G. C., FETTER, M. DA R., VIZZOTTO, M. ANTUNES, L. E. C. **Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante de Pitangas em Função de Diferentes Estádios de Maturação e Espaçamentos de Plantio** - Comunicado Técnico. ISSN 1516-8654. Pelotas, RS, 2011.

MUSTAFA, A., & TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, V. 703(1), p. 8–18, 2011.

NASTI´C, N., BORR´AS-LINARES, I., LOZANO-S´ANCHEZ, J. ˇSVARC-GAJI´C, J.J., SEGURA-CARRETERO, A. Optimization of the extraction of phytochemicals from black mulberry (Morus nigra L.) leaves, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, V. 68, 25, 282-292, 2018. **(a).**

NASTIĆ, N., ŠVARC-GAJIĆ, J., DELERUE-MATOS, C., MORAIS, S., BARROSO, M. F., MOREIRA, M.M. Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (Teucrium montanum L.), **The Journal of Supercritical Fluids,** 138, 200-206, 2018 **(b).**

NUNES, A. M. et al. Caracteres morfológicos e físico-químicos de butiazeiros (Butia capitata) na Região de Pelotas, Brasil. **Interciência,** v. 35, n. 7, p. 500–505, 2010.

OLIVEIRA, A. L. et al. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (Eugenia uniflora L.). **Food Chemistry,** v. 145, p. 522–529, 2014.

OLIVEIRA, J. P. DE et al. Development of food packaging bioactive aerogels through the valorization of Gelidium sesquipedale seaweed. **Food Hydrocolloids**, v. 89, n. October 2018, p. 337–350, 2019.

OLIVEIRA, N. A. DE et al. Green coffee extracts rich in diterpenes e Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solvent. **Journal of Food Engineering,** v. 224, p. 148–155, 2018.

OLIVEIRA, P. S., CHAVES, V. C., BONA, N. P., SOARES, M. S. P., CARDOSO, J. DE S., VASCONCELLOS, F. A., … STEFANELLO, F. M. Eugenia uniflora fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** 92, 935–941, 2017.

OLIVEROS, J.C. (2007-2015) Venny. **An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.** https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html. Acess: 15/09/2020.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M. E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.18, n.2. p. 301-307, 2008.

OTERO, J. S., HIRSCH, G. E., KLAFKE, J. Z., PORTO, F. G., DE ALMEIDA, A. S., NASCIMENTO, S., … VIECILI, P. R. N. Inhibitory effect of Campomanesia xanthocarpa in platelet aggregation: Comparison and synergism with acetylsalicylic acid. **Thrombosis Research**, 154, 42–49, 2017.

PAWLISZYN, J. Sample preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry** 75 (11) 2543–2558, 2003.

PELEGRINI, L.L.; CRUZ-SILVA, C.T.A.. Variação sazonal na alelopatia de extratos aquosos de Coleus barbatus (A.) Benth. sobre a germinação e o desenvolvimento de Lactuca sativa L. **Rev. Bras. Pl. Med.,** Botucatu, v.14, n.2, p.376-382, 2012.

PERALTA, S. L., DE CARVALHO, P. H. A., CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A., DE PEREIRA, C. M. P., CURY, J. A., PIVA, E., & LUND, R. G. Cytotoxicity, genotoxicity and antibiofilm activity on Streptococcus mutans of an experimental self-etching adhesive system containing natural Butia capitata oil. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, V. 78, p. 95–101, 2017.

PERAZZO, K. K. N. C. L., CONCEIÇÃO, A. C. DE V., SANTOS, J. C. P. DOS, ASSIS, D. DE J., SOUZA, C. O., & DRUZIAN, J. I. Properties and Antioxidant Action of Actives Cassava Starch Films Incorporated with Green Tea and Palm Oil Extracts. **PLoS ONE,** 9(9), e 105199, 2014.

PEREIRA, E. S.; VINHOLES, J.; FRANZON, R.C.; DALMAZO, G.; VIZZOTTO, M.; NORA, L. Psidium cattleianum fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry,** v. 258, p. 95-103, 2018 (a).

PEREIRA, M. C., HILL, L. E., ZAMBIAZI, R. C., MERTENS-TALCOTT, S., TALCOTT, S., & GOMES, C. L. Nanoencapsulation of hydrophobic phytochemicals using poly (dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial delivery applications: Guabiroba fruit (Campomanesia xanthocarpa O. Berg) study. LWT - **Food Science and Technology,** 63(1), 100–107, 2015.

PEREIRA, M. C., OLIVEIRA, D. A., HILL, L. E., ZAMBIAZI, R. C., BORGES, C. D., VIZZOTTO, M., MERTENS-TALCOTT, S., TALCOTT, S. GOMES, C. L. Effect of

nanoencapsulation using PLGA on antioxidant and antimicrobial activities of guabiroba fruit phenolic extract. **Food Chemistry**, 240, 396–404, 2018 (b).

PEREIRA, M. C., STEFFENS, R. S., JABLONSKI, A., HERTZ, P. F., DE O. RIOS, A., VIZZOTTO, M., & FLÔRES, S. H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** V. 60(12), P. 3061–3067, 2012.

PÉRES, V. F., SAFFIA, J., MELECCHI, M. I S., ABAD, F.C., JACQUES, R. DE A., MARTINEZ, M. M., OLIVEIRA, E. C., CARAMAO, E.B. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from Piper gaudichaudianum Kunth. **Journal of Chromatography** A, 1105, 115–118, 2006.

PESSOA, A. S., PODESTÁ, R., BLOCK, J. M., FRANCESCHI, E., DARIVA, C., & LANZA, M. Extraction of pequi (Caryocar coriaceum) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. **The Journal of Supercritical Fluids**, V.101, p. 95–103, 2015.

PESSOA, A. S., PODESTÁ, R., BLOCK, J. M., FRANCESCHI, E., DARIVA, C., & LANZA, M. Extraction of pequi (Caryocar coriaceum) pulp oil using subcritical propane: Determination of process yield and fatty acid profile. **The Journal of Supercritical Fluids,** V.101, p. 95–103, 2015.

PLAZA, M., TURNER, C. Pressurized Hot Water Extraction of Bioactives. TrAC **Trends in Analytical Chemistry.** Volume 71, 39-54, 2015.

RASEIRA, M. C. B., ANTUNES, L. E. C. TREVISAN, R. GONÇALVES, E. D. **Espécies Frutíferas Nativas do Sul do Brasil,** Documentos 129 EMBRAPA, https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/33526/1/documento-129.pdf.

REISSIG, G. N.; ROMBALDI, C. V. Brazilian native fruits: from a plurality of examples and bioactive compounds to the most divere potentialities. In: **Bioactive Compounds: Sources, Properties and Applications**. Nova Science 1 edição, capítulo 9, 2017, P. 433.

RIZZI, E.S.; PEREIRA, K. C. L.; ABREU, C. A. A.; SILVA, B. C. F. L.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, A.K.M.; MATIAS, R. Allelopathic potential and phytochemistry of cambarazinho (Vochysia Haenkeana (Spreng.) Mart.) leaves in the germination and development of lettuce and tomato**. Biosci. J**., Uberlândia, v. 32, n. 1, p. 98-107, 2016.

RODRIGUES, L. G. G., MAZZUTTI, S., SIDDIQUE, I., DA SILVA, M. VITALI, L., FERREIRA, S.R.S. Subcritical water extraction and microwave-assisted extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (Cnidoscolus aconitifolius Mill.), **The Journal of Supercritical Fluids,** Volume 165, 104976, 2020.

RODRIGUEZ, E. A. G. et al. Asuxual propagation of araçá (Psidium cattleianum Sabine) by leaf and young branches cuttings. **Revista árvore**, v. 40, p. 707–714, 2016.

ROLEIRA, F. M. F, TAVARES-DA-SILVA, E. J., VARELA, C. L., COSTA, S. C., SILVA, T., GARRIDO, J., BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, 183, 235-258, 2015.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde**, 1, 9-15, 2002.

RUFINO, M. DO S. M. et al. **Metodologia científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).** Embrapa Agroindústria Tropicava, Comunicado Técnico, v. 125, p. 3–6, 2006.

SANT'ANNA, L. S., MERLUGO, L., EHLE, C. S., LIMBERGER, J., FERNANDES, M. B., SANTOS, M. C., … MOREIRA, C. M. Chemical Composition and Hypotensive Effect of Campomanesia xanthocarpa. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–11, 2017.

SANTOS M.S., CORREIA C.H., PETKOWICZ C.L.O., CÂNDIDO L.M.B. Evaluation of the Technological Potential of Gabiroba [Campomanesia xanthocarpa Berg] Fruit. **Journal of Nutrition & Food Sciences**. 2:9, 2012.

SANTOS, D. N., DE SOUZA, L. L., DE OLIVEIRA, C. A. F., SILVA, E. R., & OLIVEIRA, A. L. DE. Arginase inhibition, antibacterial and antioxidant activities of Pitanga seed (Eugenia uniflora L.) extracts from sustainable technologies of high pressure extraction. **Food Bioscience,** 12, 93–99, 2015.

SANTOS, J. S., DEOLINDO, C. T. P., HOFFMANN, J. F., CHAVES, F. C., DO PRADO-SILVA, L., SANT'ANA, A. S., AZEVEDO, L.,GRANATO, D. Optimized Camellia sinensis var . sinensis , Ilex paraguariensis , and Aspalathus linearis blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry,** V. 254, p. 348–358, 2018.

SANTOS, M. DA SILVA, ET AL. "Quantification of the major bioactive phytochemicals in the gabiroba (Campomanesia xanthocarpa Berg) juice. **Acta Scientiarum. Technology,** vol. 35, no. 4, p. 783, 2013.

SCHÄFER, H., WINK , M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnology Journal**, Vol.4(12), pp.1684-1703, 2009.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., THEODULOZ, C., FRANCO, L., FERRO B, E., & DE ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on Eugenia uniflora leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 21(2), p. 183–186, 1987.

SCHUMACHER, N., COLOMEU, T., DE FIGUEIREDO, D., CARVALHO, V., CAZARIN, C., PRADO, M., … ZOLLNER, R. 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,** 4(4), 662–680, 2015.

SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of Psidium cattleianum Sabine. **Brazilian journal of biology**, v. 76, n. 1, p. 101–108, 2016.

SHAHIDI F, JANITHA PK, WANASUNDARA PD. Phenolic antioxidants. Crit Rev **Food Sci Nutr**. 32 (1): 67-103, 1992.

SHAO, DONGYAN; LI, JING; LI, JI; TANG, RUIHUA; LIU, LIU; SHI, JUNLING; HUANG, QINGSHENG; YANG, HUI. Inhibition of gallic acid in the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. **Journal of Food Science,** 80 (6), M1299 - M1305, 2015.

SHI, C., SUN, Y., ZHENG, Z., ZHANG, X., SONG, K., JIA, Z., … XIA, X. Antimicrobial activity of syringic acid against Cronobacter sakazakii and its effect on cell membrane. **Food Chemistry.** 197, 100-106, 2016.

SILVA P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Revista Biotemas**, 25 (3), 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1998.

SOARES DA SILVA, E. R., SALMAZZO, G.R., ARRIGO, J. DA S., OLIVEIRA, R.J., KASSUYA, C.A.L. AND CARDOSO, C. A. L. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of Campomanesia xanthocarpa Berg. **Inflammation,** Vol. 39, No. 4, 2016.

SOARES, D. J. **Efeitos antioxidante e antiinflamatório da polpa de pitanga roxa (Eugenia uniflora L.) sobre células bucais humanas, aplicando experimentos in vitro e ex vivo.** 2014. 98 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr**., Campinas, 15(1):71-81, 2002.

SOBEH, M., HAMZA, M.S., ASHOUR, M.L., ELKHATIEB, M., EL RAEY, M. A., ABDEL-NAIM, A.B., WINK, M. A. Polyphenol-Rich Fraction from Eugenia uniflora Exhibits Antioxidant and Hepatoprotective Activities In Vivo. **Pharmaceuticals** 13, 84, 2020.

SOBEH, M.; EL-RAEY, M.; REZQ, S.; ABDELFATTAH, M.A.O.; PETRUK, G.; OSMAN, S.; EL-SHAZLY, A. M.; EL-BESHBISHY, H.A.; MAHMOUD, M.F.; WINK, M. 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, 111939, 2019.

SOLIMAN, F. M. ET AL. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of Psidiumguajava L. and Psidiumcattleianum Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo University, v. 54, n. 2, p. 219–225, 2016.

SORRENTINO E, SUCCI M, TIPALDI L, PANNELLA G, MAIURO L, STURCHIO M, COPPOLA R, TREMONTE P. Antimicrobial activity of gallic acid against food-related Pseudomonas strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. **Int J Food Microbiol.** 2;266:183-189, 2017.

SOUZA FILHO, A. P. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, R. L. Análise comparativa do potencial alelopático de extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de folhas de cipó d’alho (Bignoniaceae). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 647-653, 2009.

STRACK, M.H., C.G. DE SOUZA. Antocianinas, catequinas e quercetina: evidências na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares. **Rev Bras Nutr Clin.** 27 (1): 43-50, 2012.

THIAGARAJAH, K., ONG, M.K., THE, L. K. LYE, H.S. Plants infused water as preferred healthy drinks. **The Science of Beverages**. Chapter 13, Volume 4: 2019, Pages 367-402.

TODA FRUTA. Acessível em: https://www.todafruta.com.br/. Acesso em março, 2020.

TROJAN-RODRIGUES, M., ALVES, T. L. S., SOARES, G. L. G., & RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 139(1), 155–163, 2012.

VENKATESAN, T., CHOI, Y-W, &KIM, Y-K. Impact of Different Extraction Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Potential of Pinus densiflora Bark Extract. **BioMed Research International**, p. 0-14, 2019.

VERGARA, L.P., DE SOUZA, V.R.D., CHIM, J.F., RODRIGUES, R. DA S., FRANZON, R.C. Compostos bioativos em polpa de pitanga vermelha. **ANAIS do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Gramado - RS, 2016.

VICTORIA, F. N., DE SIQUEIRA BRAHM, A., SAVEGNAGO, L., & LENARDÃO, E. J. Involvement of serotoninergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of E. uniflora L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, 544, 105–109, 2013.

VICTORIA, F. N., LENARDÃO, E. J., SAVEGNAGO, L., PERIN, G., JACOB, R. G., ALVES, D., DA SILVA, W. P., DA MOTTA, A. DE S., NASCENTE, P. DA S. Essential oil of the leaves of Eugenia unifloraL.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668-2674, 2012.

VIECILI, P. R. N., BORGES, D. O., KIRSTEN, K., MALHEIROS, J., VIECILI, E., MELO, R. D., … KLAFKE, J. Z. Effects of Campomanesia xanthocarpa on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, 234(1), 85–92, 2014.

VIGHI, I.L., CRIZEL, R. L., PERIN, E. C., ROMBALDI, C. V., GALLI, V. Crosstalk During Fruit Ripening and Stress Response Among Abscisic Acid, Calcium-Dependent Protein Kinase and Phenylpropanoid. **Critical Reviews In Plant Sciences,** 38 (2), 99-116, 2019.

VINAGRE, A. P. S., RÖNNAU, A. D´S R.O., PEREIRA. S.F., DA SILVEIRA, L. U., WIILLAND, E.F., SUYENAGA. E. S. Anti-diabetic effects of Campomanesia xanthocarpa (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 46, n. 2, 2010.

VINHOLES, J., LEMOS, G., LIA BARBIERI, R., FRANZON, R. C., & VIZZOTTO, M. In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. **Food Bioscience**, 19, 92–100, 2017.

WANG, H., CHU, W., YE, C., GAETA, B., TAO, H., WANG, M., QIU, Z. Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa by regulating quorum sensing. **Applied Microbiology and Biotechnology,** Vol.103(2), pp.903-915, 2019.

WEYERSTAHL, P., MARSCHALL-WEYERSTAHL, H., CHRISTIANSEN, C., OGUNTIMEIN, O., ADEOYE, A.O. Volatile constituents of Eugenia uniflora leaf oil. **Planta Med**. 54, 546–549, 1988.

WIJNGAARD, H., HOSSAIN, M. H., RAI, D.K., BRUNTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International** 46, 505–513, 2012.

ZANDONÁ, G. P., BAGATINI, L., WOLOSZYN, N., CARDOSO, J. DE S., MORONI, L. S., STEFANELLO, F. M., JUNGES, A., ROMBALDI, C. V. Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (Psidium cattleianum) leaf: putatives antioxidant and antimicrobial properties. **Food Research International,** Volume 137, 109573, 2020.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., & JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry,** V. 64(4), p. 555–559, 1999.