

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUIZA MANUELA ALVES BRAGA CARDOSO

DETERMINAÇÃO DE FITOQUÍMICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM
EXTRATOS DE FOLHAS DE *Eugenia brasiliensis*

PATOS DE MINAS - MG
OUTUBRO DE 2020

LUIZA MANUELA ALVES BRAGA CARDOSO

**DETERMINAÇÃO DE FITOQUÍMICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM
EXTRATOS DE FOLHAS DE *Eugenia brasiliensis***

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra

PATOS DE MINAS - MG

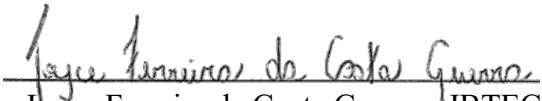
OUTUBRO DE 2020

LUIZA MANUELA ALVES BRAGA CARDOSO

**Determinação de fitoquímicos e capacidade antioxidante em extratos de folhas de
*Eugenia brasiliensis***

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra - IBTEC - UFU
Presidente


Dra. Terezinha Aparecida Teixeira - IBTEC- UFU
Membro


Dra. Mayara Medeiros de Freitas Carvalho – Instituto de Ciências da Saúde – UNEC
Membro

Patos de Minas - MG, 1 de outubro de 2020

AGRADECIMENTO

A Deus, pela dádiva da vida, por estar comigo em todos os momentos de angústia, tristeza, medo, solidão, mas também nos momentos de alegria, felicidade e principalmente superação.

A mim mesma, por não ter desistido, por ter conseguido superar minhas expectativas, por ter conseguido passar por cada dificuldade tirando o maior proveito possível, por ter conseguido chegar a essa etapa final.

A minha mãe, que com toda dificuldade de me criar sozinha, nunca desistiu de me dar um futuro melhor, sempre lutou para que eu tivesse a melhor educação possível, pois só assim eu poderia ter um futuro profissional de excelência.

A minha avó e meu avô, que me mostrou o quanto o estudo é importante na vida do ser humano, que somente com ele conseguimos fazer boas escolhas, e me mostraram que mesmo nas horas mais difíceis não devemos deixar de acreditar em si mesma.

A minha tia Andréia e meus primos Igor e Isabela, que me guiaram com carinho e toda ajuda necessária para que eu pudesse completar esta etapa final, me mostrando que nunca estarei sozinha.

A minha eterna babá Tereza, minha segunda mãe, que desde pequena me ensinou a lutar pelos meus objetivos, me ensinou a ser uma mulher determinada, e sempre acreditou no meu futuro profissional.

Aos meus companheiros de vida Jhoe e Malu, por me proporcionar momentos de alegrias, me dando todo carinho possível.

Aos meus amigos de Brasilândia, Giulia, Julia, Rafaela e Marcus, que nunca descreditaram de mim, nunca duvidaram do meu potencial e sempre esteve comigo nos momentos de choros, medos e inseguranças, me dando forças, conselhos e coragem para continuar.

Aos meus amigos de Uberlândia, Natielly, Sara, Jéssica, Allyne e Isabella, que me fizeram enxergar um futuro diferente, que mesmo com dificuldades, conseguiria chegar ao meu objetivo, e nunca me deixaram sozinha durante esta trajetória.

Aos colegas que fiz durante minha graduação, Higor Donizete, Andressa, Caroline e Thais, por terem compartilhado comigo momentos de dificuldades, medos, inseguranças, mas também de alegrias e comemorações.

A minha psicóloga Thais Lemos, por ter me acompanhado durante minha evolução psicológica, por ter me ensinado a lidar com minhas crises de ansiedade, me ensinando que tudo dará certo se for feito com dedicação e disciplina.

A professora Dra. Cristina Ribas Fürstenau, por ter me aceitado em sua equipe, me dando a primeira chance de iniciar meu crescimento profissional, na qual, agradeço a Bruna Juber, Fernanda Cardoso e Leonardo Oliveira por toda ajuda e ensinamentos dada durante esta etapa.

A professora Dra. Joyce Guerra, por ter me aceito em sua equipe, por todo aprendizado, toda paciência, todo ensinamento que me foi passado. Sem dúvidas esse foi o período em que mais evolui profissionalmente e intelectualmente, se hoje sou uma mulher mais capacitada para ser uma futura biotecnologista, isso se deve a você, você é uma das mulheres que me espelho.

Aos meus colegas de bancada, Bruno, Vinicius e Luiz Felipe, por todo ensinamento, paciência e por poder sanar minhas dúvidas durante a execução deste trabalho.

As professoras Dra. Terezinha Aparecida Teixeira e Dra. Mayara Medeiros de Freitas Carvalho, por ter aceitado a participar da banca de defesa do trabalho de conclusão de curso.

Agradeço a todos os técnicos e professores do Instituto de Biotecnologia por todos esses anos de ensinamentos e comprometimento.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

RESUMO

A Mata Atlântica abrange uma área de aproximadamente 13% do território brasileiro, abrigando plantas nativas que são conhecidas pela medicina tradicional por apresentarem substâncias com propriedades terapêuticas. Portanto, este estudo objetivou determinar a concentração de polifenóis, flavonoides e a capacidade antioxidante dos extratos aquoso e hidroalcoólico de folhas de *Eugenia brasiliensis*, espécie nativa da Mata Atlântica. O conteúdo de polifenóis e flavonoides foi determinado por métodos colorimétricos e a capacidade antioxidante *in vitro* foi avaliada através da inibição dos radicais ABTS, DPPH• e ORAC. O extrato aquoso foi obtido por infusão das folhas secas e trituradas em água na proporção de 1:10 a 72°C por 10 minutos. O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração das folhas secas e trituradas na solução de etanol 70% por 24 horas. O extrato aquoso de grumixama apresentou maior concentração de polifenóis ($342,00 \pm 33,67 \text{ mg/g}$) e flavonoides ($8,45 \pm 1,50 \text{ mg/g}$), que o extrato hidroalcoólico ($20,55 \pm 1,90 \text{ mg/g}$, $2,42 \pm 0,07 \text{ mg/g}$). Em relação à atividade antioxidante, através da inibição do radical DPPH•, o extrato aquoso apresentou IC_{50} de $117,2 \pm 5,582 \text{ } \mu\text{g/ml}$, enquanto que o extrato hidroalcoólico apresentou IC_{50} de $184,9 \pm 3,209 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Já para o radical ABTS, o extrato aquoso apresentou IC_{50} $36,78 \pm 0,7084 \text{ } \mu\text{g/ml}$ e o extrato hidroalcoólico apresentou IC_{50} $30,18 \pm 1,443 \text{ } \mu\text{g/ml}$. O método ORAC mostrou que o extrato aquoso apresentou $3836,235 \pm 234,475 \text{ } \mu\text{m ET/g}$ e o extrato hidroalcoólico apresentou $1341,729 \pm 308,873 \text{ } \mu\text{mol ET/g}$. Os resultados obtidos mostraram que os extratos são fontes naturais valiosas de compostos bioativos, com alta atividade antioxidante, podendo modular a resposta oxidativa, fornecendo subsídio para futuros estudos de bioprospecção.

Palavras-chave: Antioxidantes. *Eugenia brasiliensis*. Polifenóis. Flavonoides. Mata Atlântica.

ABSTRACT

*The Atlantic Forest covers an area of approximately 13% of the Brazilian territory, housing native plants that are known for traditional medicine for presenting substances with therapeutic properties. Therefore, this study aimed to determine the concentration of polyphenols, flavonoids and the antioxidant capacity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of leaves of *Eugenia brasiliensis*, a species native to the Atlantic Forest. The content of polyphenols and flavonoids was determined by colorimetric methods and the antioxidant capacity in vitro was assessed by inhibiting the radicals ABTS, DPPH • and ORAC. The aqueous extract was obtained by infusing the dried leaves and crushed in water in the proportion of 1:10 to 72 ° C for 10 minutes. The hydroalcoholic extract was obtained by macerating the dried leaves and crushed them in a 70% ethanol solution for 24 hours. The aqueous extract of *grumixama* showed a higher concentration of polyphenols ($342.00 \pm 33.67 \text{ mg / g}$) and flavonoids ($8.45 \pm 1.50 \text{ mg / g}$) than the hydroalcoholic extract ($20.55 \pm 1.90 \text{ mg / g}$, $2.42 \pm 0.07 \text{ mg / g}$). Regarding the antioxidant activity, through the inhibition of the DPPH radical •, the aqueous extract showed an IC₅₀ of $117.2 \pm 5.582 \text{ } \mu\text{g / ml}$, while the hydroalcoholic extract showed an IC₅₀ of $184.9 \pm 3.209 \text{ } \mu\text{g / ml}$. As for the ABTS radical, the aqueous extract showed an IC₅₀ of $36.78 \pm 0.7084 \text{ } \mu\text{g / ml}$ and the hydroalcoholic extract showed an IC₅₀ of $30.18 \pm 1.443 \text{ } \mu\text{g / ml}$. The ORAC method showed that the aqueous extract showed $3836.235 \pm 234.475 \text{ } \mu\text{m ET / g}$ and the hydroalcoholic extract showed $1341.729 \pm 308.873 \text{ } \mu\text{mol ET / g}$. The results obtained showed that the extracts are valuable natural sources of bioactive compounds, with high antioxidant activity, being able to modulate the oxidative response, providing support for future bioprospecting studies.*

*Keywords: Antioxidants. *Eugenia brasiliensis*. Polyphenols. Flavonoids. Atlantic forest.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH: [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)]

ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ALA: Ácido alfa-lipoico

AUC: Área Líquida sob a Curva

BNDES: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

B-PE: B-ficoeritrina

CAT: Catalase

CoQ10: Coenzima Q10

Da: Dalton

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DPPH•: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DPPH-H: 2,2-difenilpicril-hidrazila

EA: Extrato Aquoso

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EH: Extrato hidroalcoólico

EQ: Equivalentes de quercetina

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ET: Equivalente de TROLOX

g: Grama

GPX: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HO•: Radical hidroxil

HOCl: Ácido Hipocloroso

HRP: *Horseradish peroxidase*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC₅₀: 50% de inibição do radical

K₂SO₄: Persulfato de potássio

mL: Mililitro

mg: Miligrama

MG: Minas Gerais

nm: Nanômetros

O₂^{•-}: Ânion superóxido

ORAC: *Oxygen radical absorbance capacity*

PBS: Tampão fosfato-salino

PDA: Subprograma Projetos Demonstrativos

pH: Potencial Hidrogeniônico

RO[•]: Alcoxila

ROO[•]: Peroxila

R-PE: R-ficoeritrina

SOD: Superóxido Dismutase

TROLOX: 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

UNESCO: Organização das Nações Unidas para a Educação a Ciência e a Cultura

UV: Radiação Ultravioleta

µg/ml: Micrograma por mililitro

µM: Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delimitação dos Biomas Brasileiros.....	13
Figura 2- Grumixama, <i>Eugenia brasiliensis</i>	16
Figura 3- Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações.....	18
Figura 4- Estrutura básica dos flavonoides.....	19
Figura 5- Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra o radical DPPH•	21
Figura 6- Estabilização do radical ABTS+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	22
Figura 7- Reação do radical AAPH durante o ensaio ORAC.....	23
Figura 8- Concentrações de polifenóis totais em equivalentes de ácido gálico (EAG) dos extratos aquosos (EA) e hidroalcoólico (EH) de <i>Eugenia brasiliensis</i>	28
Figura 9- Concentrações de flavonoides totais em equivalentes de quercetina (EQ) dos extratos aquosos (EA) e hidroalcoólico (EH) de <i>Eugenia brasiliensis</i>	30
Figura 10- Inibição do radical DPPH•.....	31
Figura 11- Inibição do radical ABTS	32
Figura 12- Sequestro do radical peroxil-Método ORAC pelo EA das folhas de grumixama.....	34
Figura 13- Sequestro do radical peroxil-Método ORAC pelo EH das folhas de grumixama...	35
Figura 14- Sequestro do radical peroxil-Método ORAC pelo TROLOX.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Mata Atlântica.....	13
1.2 Grumixama (<i>Eugenia brasiliensis</i>).....	15
1.3 Fitoquímicos	17
1.3.1 Metabólitos primários e secundários.....	17
1.3.4 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	19
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Coleta, identificação e obtenção dos materiais vegetais.....	24
3.2 Preparo das folhas e secagem	25
3.3 Preparo dos extratos aquoso e hidroalcoólico.....	25
3.4 Determinação de compostos fenólicos totais.....	25
3.5 Determinação de flavonoides.....	26
3.6 Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra o radical DPPH•.....	26
3.7 Determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra o radical ABTS	26
3.8 Determinação da capacidade antioxidante através do método Sequestro do radical peroxil-Método ORAC	26
3.9 Análise Estatística.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Determinação de polifenóis totais.....	27
4.2 Determinação de flavonoides.....	30
4.3 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra o radical DPPH•.....	31
4.4 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra o radical ABTS	32
4.5 Determinação da capacidade antioxidante através do método Sequestro do radical peroxil-Método ORAC	33
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido mundialmente pela alta diversidade biológica de sua flora, sendo considerado o principal centro de diversidade genética para espécies de plantas do mundo, que residem em seus diversos biomas.

A Mata Atlântica brasileira engloba uma das biodiversidades mais ricas do mundo, abrangendo alto número de plantas que são amplamente conhecidas pela medicina tradicional e cultura popular. A avaliação do possível potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e ligninas, tem sido objeto de inúmeros estudos.

As plantas possuem a capacidade de produzir componentes orgânicos classificados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão relacionados aos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução do vegetal atuando como precursores dos metabólitos secundários, chamados de produtos naturais. Os metabólitos secundários, estão relacionados aos mecanismos que proporcionam a adequação do organismo ao meio em que está inserido, produzindo compostos funcionais que atuam como antioxidantes, protegendo o organismo contra doenças (FERRERA et al., 2016).

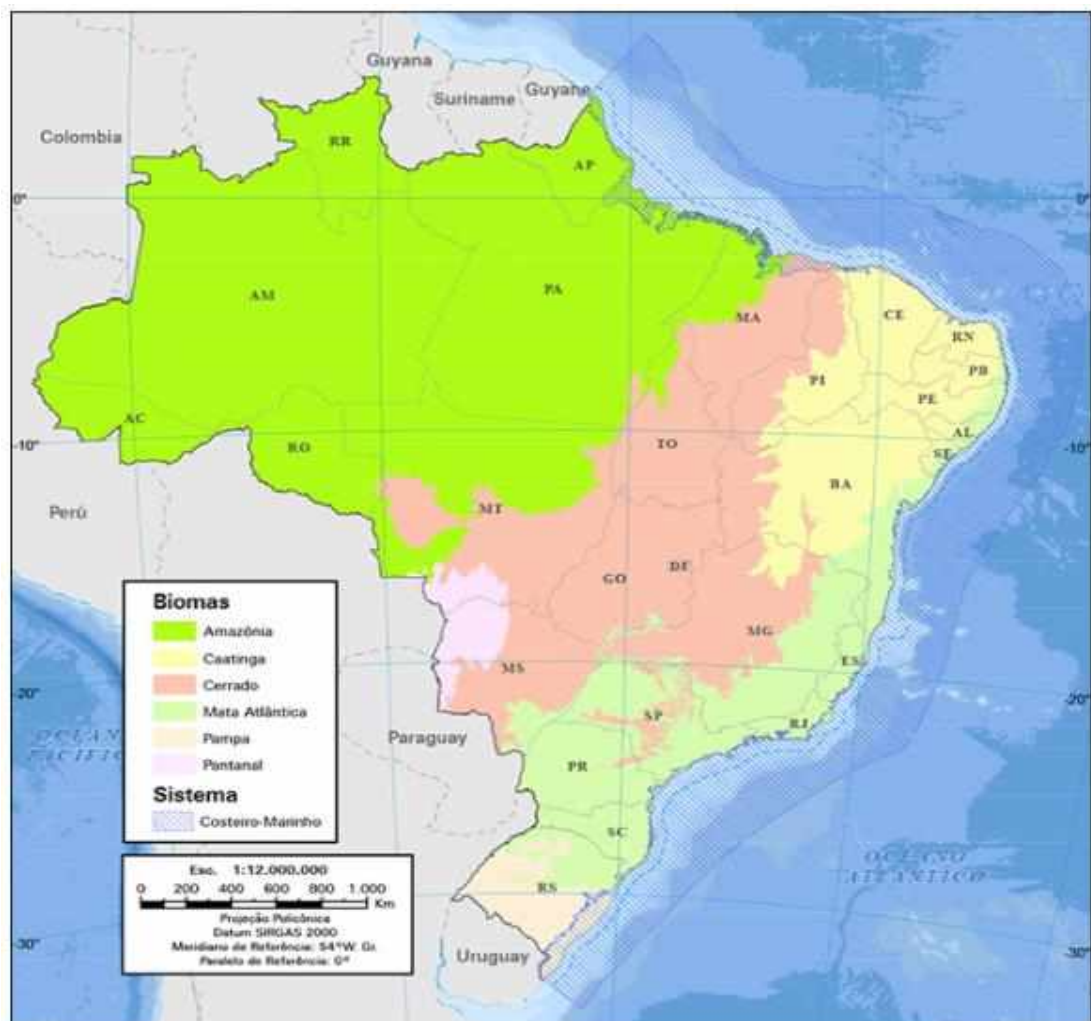
Nativa da Mata Atlântica, *Eugenia brasiliensis*, pertencente à família Myrtaceae, conhecida popularmente como grumixama, é encontrada em mata pluvial no território do sul da Bahia até Santa Catarina. Possuindo uma variação de altura de 5 a 10 metros, a grumixama obtém seus frutos durante o período de novembro a dezembro sendo conhecidos popularmente por grumixaba (HORTO BOTÂNICO, 2020). Sua madeira é usada em trabalhos de marcenaria e carpintaria, sua casca é usada como xarope expectorante e a ingestão do fruto é considerada curativa para inflamações bucais e de garganta, devido a presença de vitaminas, antioxidantes, ácidos triterpênicos, que são responsáveis pelas ações anti-inflamatórias (JIE, 1995), antineoplásica (TOKUDA et al., 1986), antiviral (PAVLOVA et al., 2003) antimicrobiana (FRIGHETTO et al., 2005) antiparasitária (LEITE et al., 2001), hepatoprotetora (BINDUJA et al., 1996), entre outras. Suas folhas são utilizadas na medicina popular, na forma de chá, para tratamento de doenças como artrite, reumatismo e diabetes (QUEIROZ et al., 2015), porém estudos científicos que comprovam tais propriedades são escassos.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é o terceiro maior bioma brasileiro, ultrapassado apenas pelo Cerrado e pela Amazônia (figura 1). Responsável por 13% do território brasileiro, com cerca de 1,110,182 Km² (IBGE, 2020). Passando pelo litoral brasileiro do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, ela abrange áreas de 17 estados, sendo considerada umas das florestas mais abundantes em diversidade de espécies (RIBEIRO; WENDLING, 2014). Abrigando mais de 20 mil espécies de plantas, sendo 8 mil endêmicas, a Mata Atlântica é considerada a floresta mais rica em diversidade de árvores (APREMAVI, 2020).

Figura 1- Delimitação dos Biomas Brasileiros



Fonte: IBGE, 2020.

Historicamente, quando os portugueses chegaram ao Brasil, observaram pela primeira vez o ambiente que chamamos de Mata Atlântica. Seu nome se dá devido à proximidade do oceano atlântico, caracterizado por montes arredondados e grandes arvoredos (LINHARES; GEWANDSZNAJDER, 1998). Sendo a primeira floresta a receber iniciativas de colonização, dela saiu a primeira riqueza a ser explorada pelos colonizadores, o Pau-Brasil. Desde então, vários ciclos de exploração se desenvolveram no seu domínio, o que levou à perda quase total das florestas originais (CAMPANILI; SCHAFFER, 2010).

A Mata Atlântica é o segundo ecossistema mais ameaçado de extinção do mundo, atrás apenas das florestas da ilha de Madagascar na costa da África (APREMAVI, 2020). Considerada pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) como um dos biomas brasileiros prioritários para conservação (EMBRAPA, 2020).

Com o alto índice de devastação da Mata Atlântica, em 2009, houve uma iniciativa de promoção da recuperação de 425 hectares da floresta em áreas de preservação permanente ciliares, de propriedades privadas dos estados de São Paulo e do Paraná, com o apoio financeiro do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) (“Iniciativa BNDES Mata Atlântica”, 2020). Já em 2010, o governo lançou editais para projetos com o intuito de preservação da floresta. O Subprograma Projetos Demonstrativos (PDA) do Ministério do Meio Ambiente, selecionou projetos que tinham como objetivo promover aprendizagens sobre a viabilidade de novos modelos de preservação, conservação, utilização racional dos recursos naturais e recuperação das formações florestais e ecossistemas associados que integram a Mata Atlântica (CAMINHA, 2010). Com o incentivo de preservação do Meio Ambiente, o desmatamento na Mata Atlântica diminuiu 9% entre 2017 e 2018 em relação ao período anterior e alcançou a menor taxa registrada na série histórica, que começa em 1985 (BRAGANÇA, 2019).

Presente em diversas regiões do Brasil, a Mata Atlântica apresenta diferentes ecossistemas, com variações de fauna e flora, vegetação, solo, relevo e características climáticas (LINHARES; GEWANDSZNAJDER, 1998). Mas apresentando elementos comuns em todas as regiões como as plantas endêmicas.

A Mata Atlântica, possui clima com ampla variabilidade, devido sua extensão da costa brasileira, o qual, possui aspectos que incluem características dos biomas com os quais faz limite, sendo eles, Pampa, Cerrado e Caatinga. Caracteriza-se pela ocorrência de dupla variação climática sendo uma tropical, com intensas chuvas de verão, seguidas de estiagens acentuadas e outra subtropical, sem período seco característico, mas com seca fisiológica, que é provocada pelo frio de inverno, com temperatura média inferior a 15°C (EMBRAPA, 2020).

O solo da Mata Atlântica é considerado raso, úmido e possui pouca incidência de luz solar, pois a maior parte de luminosidade é absorvida pelas folhas das árvores mais altas. É considerado originalmente solo pobre, mas que possui alta fertilidade devido a uma camada com restos de vegetação, como folhas, caules e cascas de frutos que cobrem a superfície do solo (LINHARES; GEWANDSZNAJDER, 1998).

Além dos aspectos ambientais, a Mata Atlântica possui grande importância social. Abrigando grande diversidade cultural, constituída por povos indígenas, como os Guaranis, e culturas tradicionais não-indígenas como o caiçara, o quilombola, o roceiro e o caboclo ribeirinho, que juntos, fazem parte do patrimônio histórico e cultural brasileiro, e detêm um conhecimento tradicional de sua biodiversidade (APREMAVI, 2020).

Muitas espécies vegetais encontradas nesse bioma, são consideradas plantas medicinais, já utilizadas com esta finalidade pelos índios antes da colonização (VIEIRA; SOUSA; LEMOS, 2015). Dentre as espécies de plantas medicinais, as mais utilizadas são: *Sorocea bonplandii* (Espinheira santa), *Casearia sylvestris* (Guaçatonga), *Senna (Cassia) multiuga* (Sene (caquera), *Cecropia sp* (Embaúba), *Bauhinia sp* (Pata-de-vaca), *Cupania oblongifolia* (Covatã), *Jacaranda sp* (Carobinha), *Piper umbellata* (Pariparoba), *Vernonia sp* (Assa-peixe), *Baccharis trimera* (Carqueja), *Ageratum conizoides* (Erva-de-são-jão), *Verbena jamaicensis* (Gervão) (BORN, 1998).

“Plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade.” ANVISA, (2020). Elas são comumente utilizadas pela população mundial, para tratamento de diabetes, hipercolesterolemia, arteriosclerose, dores estomacais, hipertermia, asma, bronquite, gripe, entre outras. Sendo as principais formas de utilização das plantas são os chás ou infusão das folhas (SESA, 2015).

1.2 Grumixama (*Eugenia brasiliensis*)

A família Myrtaceae, apresenta mais de 145 gêneros, e mais de 3650 espécies, sendo a *Eugenia* um dos seus maiores gêneros, e suas espécies encontram-se dispersas nos trópicos e subtropicais (DONATO; MORRETES, 2007).

Devido a esse grande número de espécies nativas no Brasil, a grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam.) (Figura 2), nativa da Mata Atlântica, apresenta folhas simples de 8 a 12 cm de comprimento e 5 a 6 cm de largura (ROJAS-RODRÍGUEZ; TORRES-CÓRDOBA, 2018) geralmente opostas, com margens inteiras, de coloração verde (BARROSO et al., 1984),

comumente conhecida como grumixameira, cereja brasileira, grumixaba, grumixama, cumbixaba e ibaporoti pertencente à família Myrtaceae (“HORTO BOTÂNICO”, 2020).

Figura 2– Grumixama, *Eugenia brasiliensis*



Fonte: <https://apremavi.org.br/grumixama-a-surpresa-de-natal-da-mata-atlantica/> ;
<http://chaves.rcpol.org.br/profile/specimen/eco/eco:pt-BR:FFCLRP-USP:PALIFFCLRP:PALIFFCLRP%20290>

E. brasiliensis é uma espécie que apresenta casca e folhas aromáticas, sendo suas folhas utilizadas na medicina popular como adstringentes, antirreumáticas e diuréticas (PENA, M. 1974; SANTOS, 2015). A análise fitoquímica realizada por MAGINA, (2008), em extratos hidroalcoólico de folhas de *Eugenia brasiliensis*, 70% a 60°C, permitiu a caracterização das seguintes classes de compostos: fenóis, taninos hidrolisáveis, taninos condensados, antocianinas e antocianidinas, chalconas e auronas, flavonas e flavonóis, xantonas, catequinas, esteróides livres, triterpenos livres, saponinas, flavononóis e resinas.

No Brasil, houve aumento de seu interesse comercial devido às suas características sensoriais e seus benefícios à saúde associadas, em parte, à presença de compostos fenólicos (FLORES et al., 2012).

1.3 Fitoquímicos

1.3.1 Metabólitos primários e secundários

O metabolismo, é definido como o conjunto de reações químicas que ocorrem nas células, sendo indispensáveis para a degradação e síntese de compostos químicos fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do organismo animal e vegetal (ALMEIDA, 2017).

Metabólitos primários são designados por todos os processos que desempenham funções essenciais nos vegetais, tais como, fotossíntese, respiração e transporte de solutos (SIMÕES et al., 2003). Segundo ALMEIDA, (2017) os metabólitos primários são caracterizados por exercerem uma função metabólica direta, serem compostos essenciais como intermediários nas vias catabólicas e anabólicas das plantas, quimicamente incluírem-se nas classes dos hidratos de carbono, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos ou clorofilas.

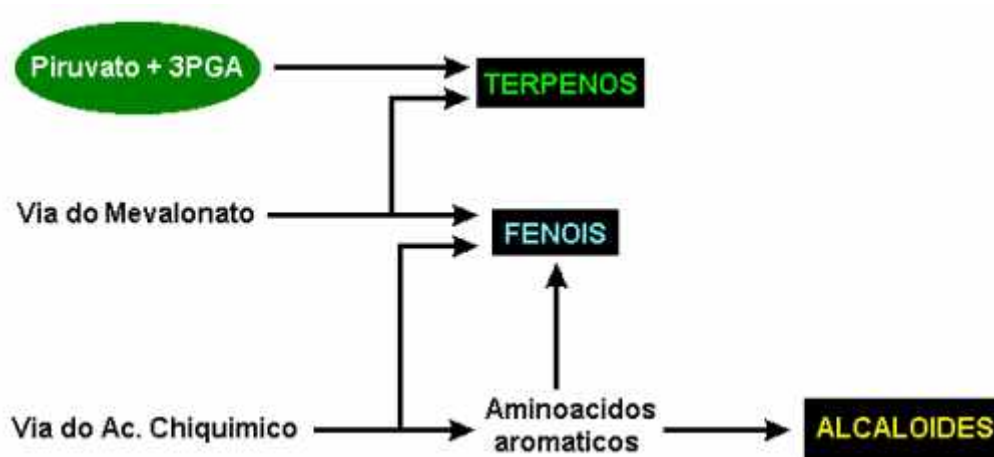
De acordo com, KABERA, (2014) os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, enquanto os metabólitos secundários, aparentemente não possuem relação com o crescimento e desenvolvimento da planta. Contudo, é de grande importância realçar que os metabólitos primários são os grandes precursores dos metabólitos secundários.

Os metabólitos secundários têm origem no processo de conversão da energia luminosa em energia química e desempenham funções primordiais a elas, como funções estruturais nos tecidos de sustentação ou proteção, participando em estratégias de defesas contra ataques de herbívoros e de agentes patogênicos, agentes protetores contra condições climáticas desfavoráveis, como, temperaturas extremas, déficit hídrico, radiação ultravioleta (UV) e oxidação das biomoléculas (DAVID; NEVES, 2015), permitindo assim que a planta responda aos diferentes fatores ambientais, físicos e biológicos (FUMAGALI et al., 2008). Além disso, estudos revelam que os metabólitos secundários, podem ser utilizados também como medicamentos, aromatizantes ou corantes (RAMOS, 2014).

Os metabólitos secundários tem sido cada vez mais utilizados com o objetivo de tratar ou prevenir doenças, (PETROVSKA, 2012). Inúmeros estudos demonstram a utilização desses compostos em aplicações farmacêuticas (MAFFEI; GERTSCH; APPENDINO, 2011). O descobrimento e a utilização de novas técnicas analíticas, como, cromatografia, eletroforese, técnicas de isótopos e enzimologia, permitiu a determinação de suas estruturas químicas e esclarecimento das vias biosintéticas (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Os metabólitos secundários são subdivididos em três classes principais, sendo elas, terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos (Figura 3). Os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2020).

Figura 3– Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações.



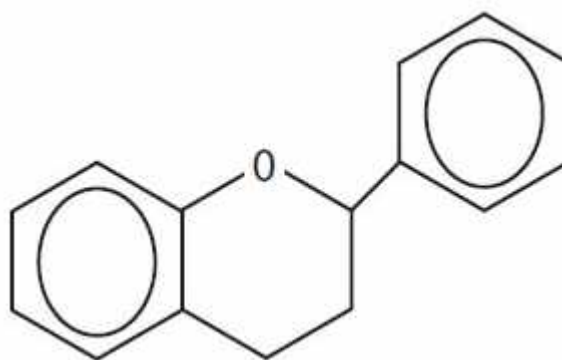
Fonte: (PERES, 2020)

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, foram descritos pela primeira vez por Bate-Smith e Swain em 1962 e apresentam peso molecular entre 500 a 3000 dalton (Da) (CHEYNIER, 2012). Possuem estrutura que varia de uma simples molécula fenólica a polímeros complexos (VAQUERO; ALBERTO; DE NADRA, 2007). Apresentam pelo menos um anel aromático, ao qual se encontra ligado um ou mais grupos hidroxila (PESSOA et al., 1971). A maioria destes compostos ocorrem naturalmente conjugados a mono ou oligossacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos, podendo também ocorrer como derivados funcionais, como ésteres ou metil ésteres (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Suas funções se devem a ação antioxidante através de diversos mecanismos, entre eles incluem-se a sua capacidade para a remoção de radicais livres e a inibição da formação de espécies reativas durante o curso normal do metabolismo, prevenindo a ocorrência de danos em lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, o que evita a ocorrência de morte celular (ZHANG et al., 2008).

Os flavonoides, possuem estrutura básica formada por 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, possuindo em sua estrutura anéis aromáticos C6 -C3 - C6 (Figura 4). O esqueleto C15 dos flavonoides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6 -C3) e três unidades de acetato (C6). Contudo, os flavonoides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal (YOKOZAWA et al., 1998). São classificados em antocianinas, flavonas, flavonóis, auronas, caucanas, isoflavonas, flavononas, catequinas e dihidroflavonois, de acordo com o número, lugar e combinação dos grupamentos participantes da molécula (COOK, 1996).

Figura 4 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: (COOK, 1996)

Estudos prévios comprovam e determinam a ampla variedade de atividades biológicas dos flavonoides que incluem, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, efeito vasodilatador, ação hepatoprotetora e antiulcerogênica, bem como ações antimicrobianas e antivirais. Essas atividades biológicas foram observadas pela primeira vez em 1936 por Szent-Gyorgi (MATOS LOPES et al., 2018).

1.3.4 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

O oxigênio possui grande importância para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular (SILVA; GONÇALVES, 2010). Normalmente, metabólitos de oxigênio potencialmente tóxicos são gerados em pequenas quantidades pela transferência de um único elétron durante o metabolismo aeróbico (COMHAIR; ERZURUM, 2002), denominadas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

As ERO, são divididas em dois grupos, os radicalares: radical hidroxil ($\text{HO}\bullet$), ânion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}\bullet$) e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Embora,

apresentam funções fisiológicas primordiais ao organismo, como na produção de energia, fagocitose, comunicação e crescimento celular (PAROLIN; REASON, 2001), quando produzidas em excesso podem ocasionar danos irreversíveis em proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), fosfolípidios e membranas celulares, caracterizando um estado denominado estresse oxidativo.

O estresse oxidativo, definido como um alteração no balanço entre a produção de ERO, e a capacidade de ação dos antioxidantes, está relacionado à perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, mutações, lise e morte celular (ZOPPI et al., 2003) e é considerado um fator chave na patogênese de diversas doenças, tais como, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e cirrose hepática (TONG et al., 2015).

Antioxidantes são átomos ou moléculas capazes de neutralizar reações indesejadas causadas pelo oxigênio (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996). De acordo com Halliwell (2000), “antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. O sistema de defesa antioxidante enzimático endógeno é um dos meios de remoção de ERO formadas durante o metabolismo intracelular (YU, 1994). A exemplo de antioxidantes enzimáticos temos a superóxido dismutase (SOD) que converte o ânion superóxido em H_2O_2 , que por vez é neutralizado pela ação da catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPX) (FINKEL; HOLBROOK, 2000b). Antioxidantes não enzimáticos incluem o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonoides (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

1.3.4.1 Métodos de determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

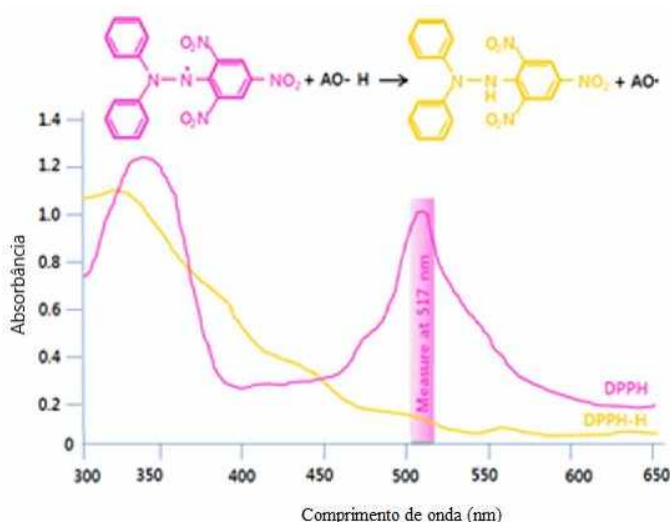
Existem diversos métodos utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de substâncias biologicamente ativas, isoladas de produtos naturais ou obtidas de fontes sintéticas. Tais métodos podem auxiliar na escolha de espécies de plantas para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação e condições ambientais, comprovando a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas, ressaltando a importância de uma dieta rica em vegetais. (ALVES et al., 2010).

Para uma avaliação precisa da atividade antioxidante de uma determinada amostra, é necessário saber quais são os tipos de radicais gerados e a solubilidade da substância analisada. Substâncias polares são mais efetivas em grandes quantidades de óleo pois podem se acumular na interface ar óleo ou em micelas reversas dentro deste, onde as reações de oxidação lipídica

ocorrem com maior frequência devido à alta concentração de oxigênio. Entretanto, antioxidantes apolares são mais efetivos em emulsões pois são retidos nas gotículas de óleo e acumulados na interface óleo-água, onde ocorre a interação entre os hidroperóxidos das gotículas e substâncias pró-oxidantes da fase aquosa como, por exemplo, os metais de transição (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Um dos métodos mais utilizados para verificar a capacidade antioxidante, consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•). A molécula de DPPH• é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula (ALVES et al., 2010). Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (MOLYNEUX, 2004). Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazila (DPPH-H) (Figura 5), de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância.

Figura 5- Capacidade antioxidante *in vitro* contra o radical DPPH•

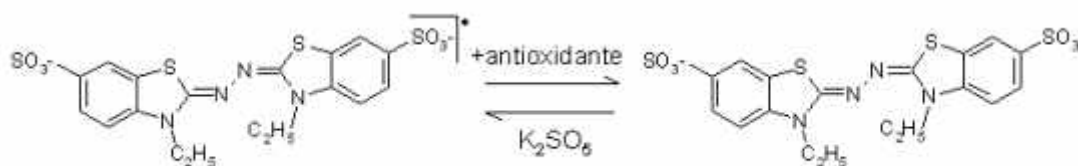


Fonte: Adaptado de (PÉREZ; AGUILAR, 2013)

O método para avaliação da atividade antioxidante, tanto em amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis, ocorre através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), o qual pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 6) (RUFINO et al., 2007). Nesta reação, a estabilização do radical ABTS ocorre através da reação de oxidação entre o sal de persulfato de potássio (K₂SO₅) com a solução aquosa de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), dessa forma, a

atividade antioxidante das amostras são analisadas mediante o descoramento da solução do radical ABTS⁺, e monitoradas por espectrometria em comprimento de onda de 734 nm (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004). Este método foi descrito pela primeira vez por Re et al. (1999) e modificado por Kuskoski et al. (2004). O ABTS é um composto cromóforo quimicamente estável, apresenta alta solubilidade em água e um máximo de absorbância a 414 nm, e de medidas secundárias de absorbância a 645, 734 e 815 nm, podendo ser medida através da sua descoloração, baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS⁺ (TIVERON, 2010). Ocorre um consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância.

Figura 6- Estabilização do radical ABTS⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

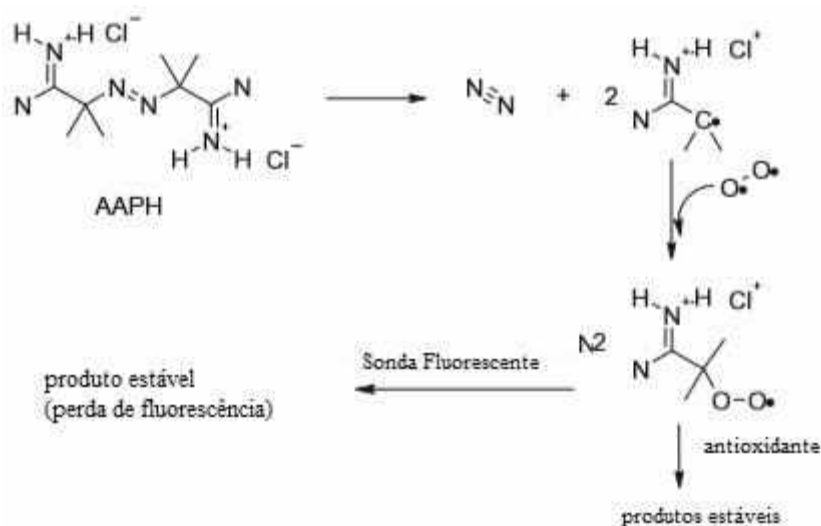


Fonte: (RUFINO et al., 2007)

Outro método amplamente utilizado para a detecção da capacidade antioxidante, é baseado no sequestro do radical peroxil – Método ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*). Este ensaio tem como objetivo, avaliar a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio (figura 7). O radical peroxil é um oxidante comumente encontrado em substratos biológicos. É menos reativo que o $\bullet\text{OH}$ possuindo um tempo de meia-vida de segundos a nano segundos (HALLIWELL et al., 1995). O método ORAC surgiu originalmente como um método que se baseia na propriedade fluorescente das proteínas B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (R-PE). Estas proteínas são usadas como indicador fluorescente e foram primeiramente isoladas de *Porphyridium cruentum* e algas vermelhas, no entanto, foram observadas que a β -ficoeritrina interagia com os compostos fenólicos levando a erros neste método. Estudos feitos por OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, (2001), desenvolveram e validaram uma modificação do ORAC usando a fluoresceína como composto fluorescente, que perde a fluorescência indicando reação com o radical peroxila. Contudo, a fluoresceína mostrou ter excelente estabilidade, redução dos custos deste experimento e não interage com antioxidantes. Neste ensaio o radical peroxil, gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com oxigênio, reage com o indicador fluorescente para formar um produto

não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 575 nm (B-PE) e 578 nm (R-PE) (GLAZER, 1988).

Figura 7- Reação do radical AAPH durante o ensaio ORAC



Fonte: Adaptado de (ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009)

O método para determinar sequestro do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) também é considerado relevante, embora o peróxido de hidrogênio não seja considerado um radical livre, ele está envolvido de forma direta ou indireta em diversas doenças. Em termos químicos, H_2O_2 é fracamente reativo, no entanto exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) (ALVES et al., 2010). O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ou é produzido por enzimas oxidases e pela oxidação de ácidos graxos. O H_2O_2 pode atuar como agente oxidante ou redutor leve, mas não oxida a maioria das moléculas orgânicas facilmente, incluindo lipídios, DNA e proteínas (com exceção de proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, a exemplo da glutathiona (GSH)). O efeito deletério do H_2O_2 vem de sua fácil conversão para um radical hidroxil, por exposição à luz ultravioleta (Equação 1) ou por interação com metais de transição como o ferro, através da reação conhecida como reação de Fenton (Equação 2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Neste método, ocorre a avaliação da capacidade de uma substância sequestrar o peróxido de hidrogênio empregando *Horseradish peroxidase* (HRP) que utiliza o H_2O_2 para oxidar a escopoletina. A escopoletina é uma cumarina conhecida por apresentar alta fluorescência, em um produto não fluorescente. Na presença de um antioxidante, a oxidação da escopoletina é inibida e o H_2O_2 pode ser monitorado por um espectrofluorímetro em 430 nm (CORBETT, 1989).



Equação 1. Conversão do peróxido de hidrogênio em radical hidroxil



Equação 2. Reação de Fenton

Outros métodos para determinação de capacidade antioxidante *in vitro* incluem, método da co-oxidação do Beta caroteno/ácido linoleico, sequestro do radical superóxido-xantina oxidase, técnicas eletroquímicas, entre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a concentração de fitoquímicos e capacidade antioxidante em extratos aquoso e hidroalcoólico de folhas da espécie *Eugenia brasiliensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações de polifenóis totais e de flavonoides;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos utilizando os métodos DPPH•, ABTS e sequestro do radical peroxil-Método ORAC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta, identificação e obtenção dos materiais vegetais

As amostras de grumixama foram coletadas na região de Ouro Preto MG (20°20'59.8"S 43°40'29.4"W). O cadastro de acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa científica,

para a espécie citada foi realizado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob o nº de cadastro A0EA1B7, atendendo os requisitos do Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, que regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre a regularização de atividade de acesso ao patrimônio genético.

3.2 Preparo das folhas e secagem

As folhas coletadas, foram lavadas em água contínua para a remoção das impurezas, logo após houve o processo de secagem a temperatura ambiente. Após este processo, as folhas foram colocadas em liofilizador por 48 horas, até que houvesse a total desidratação por sublimação. Em seguida, as folhas já desidratadas, foram colocadas em um moinho de facas para que ocorresse o processo de trituração, obtendo-se assim, a amostra utilizada para o preparo dos estratos aquoso e hidroalcoólico.

3.3 Preparo dos extratos aquoso e hidroalcoólico

A metodologia de extração das folhas utilizadas foi baseada nas informações de uso popular (infusão das folhas). O extrato aquoso foi obtido por infusão das folhas secas e trituradas em água na proporção de 1:10 em banho maria a 72°C sem agitação por 10 minutos e liofilizados posteriormente. O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração das folhas secas e trituradas na solução de etanol 70% por 24 horas, removendo o solvente em um rotaevaporador a 40°C e foi liofilizado posteriormente.

3.4 Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin– Ciocalteu como descrito por (GEORGÉ et al., 2005). Neste método o reagente de Folin-Ciocalteu, se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo compostos de coloração azul que absorvem no comprimento de onda de 760nm. Para construção da curva padrão foi utilizado solução de ácido gálico. Os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100g de extrato). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.5 Determinação de flavonoides

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado pelo método colorimétrico descrito por (HOSSAIN; RAHMAN, 2011). Este método se baseia no uso do cloreto de alumínio, uma vez que o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, foi possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos. A quercetina foi utilizada como flavonoide padrão para a construção da curva de calibração. Após, realizou-se a leitura da absorbância na faixa de 415nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3.6 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* contra o radical DPPH•

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada por método colorimétrico previamente descrito por Brand-Williams et al. (1995). Este método se baseia na transferência de elétrons para o radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) em solução de metanol. A atividade antioxidante foi determinada através da redução de absorbância do radical DPPH• a 515 nm e o percentual de inibição foi determinado de acordo com a seguinte equação, onde A indica absorbância:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} = \frac{(A \text{ controle } 515 - A \text{ amostra } 515)}{A \text{ controle } 515} \times 100$$

3.7 Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* contra o radical ABTS

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada também pelo método colorimétrico descrito por Re et al. (1999) e modificado por Kuskoski et al. (2004). Este método se baseia na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS⁺, sendo este cátion produzido a partir de um precursor o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico. A atividade antioxidante foi determinada através da redução de absorbância do radical ABTS a 734 nm.

3.8 Determinação da capacidade antioxidante através do método Sequestro do radical peroxil-Método ORAC

Os extratos foram avaliados pelo Método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), onde o radical peroxil gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido pelo decaimento espectrofotométrico da fluorescência no extrato. A capacidade antioxidante foi determinada pela adaptação de outras metodologias descritas na literatura (HUANG et al., 2002; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; SILVA et al., 2007).

Os valores do índice ORAC foram calculados pela Área Líquida Sob a Curva (AUC) do padrão e amostra. A curva padrão foi obtida ao traçar as concentrações de TROLOX contra a AUC líquida das concentrações dos extratos. Os valores de ORAC finais foram calculados usando a equação de regressão entre a concentração de TROLOX e a AUC líquida e foram expressas como equivalentes de TROLOX (μM) por grama de extrato.

3.9 Análise Estatística

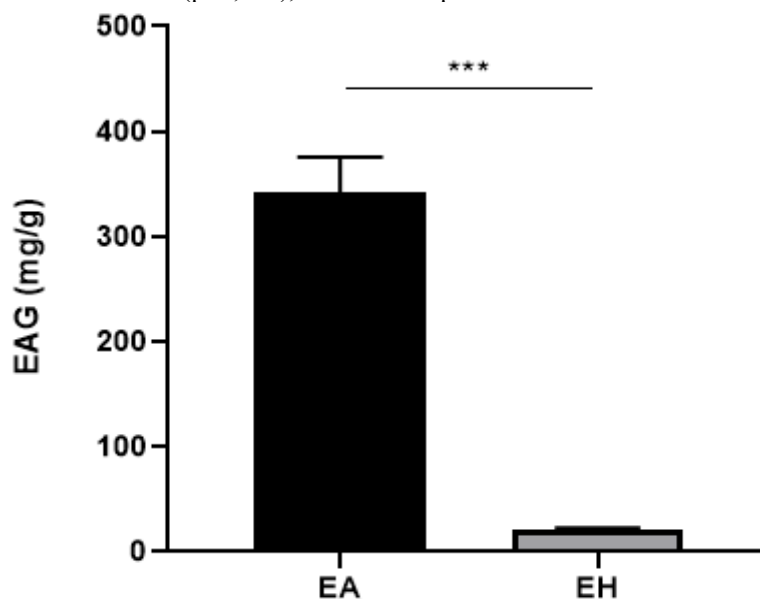
A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste-t de Student. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 8.0.1*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de polifenóis totais

Os resultados da determinação de polifenóis totais (figura 8) mostram que o extrato aquoso apresentou concentração aproximadamente 13 vezes maior ($342,00 \text{ mg/g} \pm 33,67$), que o extrato hidroalcoólico ($20,55 \text{ mg/g} \pm 1,90$).

Figura 8- Concentrações de polifenóis totais equivalentes de ácido gálico (EAG) dos extratos aquosos (EA) e hidroalcoólico (EH) de *Eugenia brasiliensis*. Os dados estão representados como média e desvio padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata. ***Os asteriscos representam diferenças significativas entre os dois extratos ($p < 0,001$), determinada pelo teste t de Student.



Os polifenóis em plantas podem ser encontrados como ácidos fenólicos, fenilpropanoides, cumarinas, flavonoides, taninos, entre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004). A determinação de polifenóis totais pode ser realizada por diversos métodos, porém o mais utilizado é o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (ROGINSKY; LISSI, 2005).

O Reagente de Folin-Ciocalteu, é formado por uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco, em que, o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI) (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), no entanto, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)_4]^{4-}$, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, este método possui algumas limitações, como, a possibilidade de haver interações com outros compostos, sendo o ácido ascórbico, proteínas e açúcares os principais interferentes (IKAWA et al., 2003).

FIGUEIRÔA et al., (2013), também utilizando o método de Folin-Ciocalteu, determinaram o teor de fenóis totais na fração aquosa de *Eugenia malaccensis*, obtendo concentração de $264 \pm 9,5 \text{ mg EAG/g}$. Conteúdo inferior ao extrato aquoso de *Eugenia brasiliensis*, ambas pertencentes à mesma família.

INFANTE et al., (2016), realizaram análises fitoquímicas em extratos hidroalcoólico (80% (v/v) obtidos em temperatura ambiente) de folhas, sementes e poupa de *Eugenia*

brasiliensis. Foi encontrado maior teor de fenóis nas folhas de grumixama $75,25 \pm 3,41$ mg EAG/g, valor superior ao extrato hidroalcoólico descrito neste trabalho, o que se justifica pelas folhas possuírem maiores interações com predadores.

Os resultados da análise fitoquímica realizado por MAGINA, (2008), em extrato hidroalcoólico 70% (v/v) de folhas de *Eugenia brasiliensis*, obtido pelo método de maceração a temperatura de 60°C, demonstraram a presença de fenóis, taninos hidrolisáveis e condensados, antocianinas, flavononóis, chalconas e auronas, flavonas e flavonóis, xantonas, catequinas, esteróides livres, triterpenos livres, saponinas e resinas.

DAMETTO; SILVA, (2014), extraíram 11 substâncias no extrato aquoso das folhas de *Eugenia brasiliensis*, em água em ebulição, sendo elas, ácido gálico, ácido cafeico, ácido quínico, [epi]catequina, [epi]galocatequina, ácido cafeoil-O-glicosídeo, quercetina-3-O-ramnosídeo, [epi]afzelequina-[epi]catequina, [epi]galocatequina-[epi]catequina e [epi]galocatequina-[epi]galocatequina.

GARCIA; BRUNETTI, (2016), demonstraram que o extrato aquoso da polpa de *Eugenia brasiliensis* realizado em banho ultrassônico, durante 20 min, a 40° C, apresentou maior concentração de polifenóis (25,145mg/g.), do que o extrato etanólico (16,400mg/g). A metodologia de Garcia e Brunetti, (2016), utilizada foi diferente em relação a utilizada neste estudo.

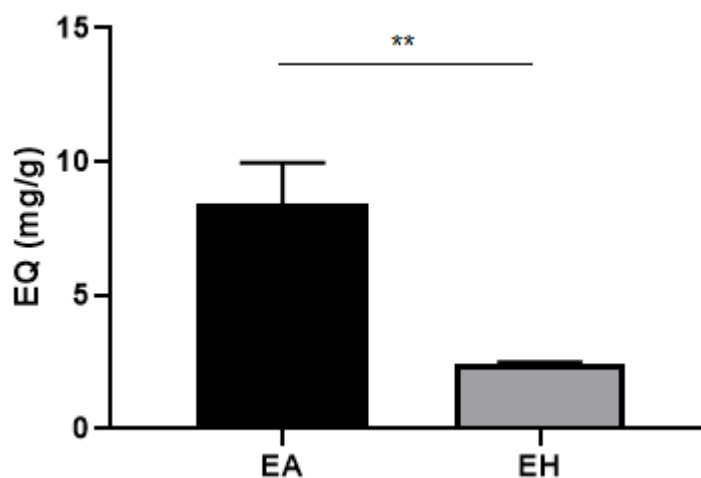
Os compostos fenólicos possuem grande importância dentro da medicina tradicional, devido à suas propriedades terapêuticas, como, ação antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. A atividade anti-inflamatória encontrada nos extratos desta espécie contribui para justificar o uso das folhas na forma de chá na medicina popular para o tratamento de artrite e reumatismo (DAMETTO; SILVA, 2014).

Há na literatura, estudos que comprovam que para melhor extração de polifenóis é trivial combinar a água com outros solventes orgânicos, como é o caso do extrato hidroalcoólico (PATHIRANA; FEREIDON; SHAHIDI, 2005). No entanto, na metodologia utilizada no presente trabalho, o extrato hidroalcoólico foi preparado em temperatura ambiente, enquanto o extrato aquoso foi preparado a 72°C. De acordo com a literatura, a temperatura é um dos fatores importantes na extração de compostos fenólicos. O calor pode tornar as paredes celulares permeáveis, aumentando a solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos e diminuindo a viscosidade dos solventes, facilitando dessa forma, a extração (BARBOSA; PAES; PEREIRA, 2014). Dessa forma, a maior temperatura de extração poderia justificar a diferença significativa nas concentrações de polifenóis entre os extratos aquoso e hidroalcoólico.

4.2 Determinação de flavonoides

Em relação aos flavonoides, o extrato aquoso apresentou maior concentração ($8,45 \text{ mg/g} \pm 1,50$) quando comparado ao extrato hidroalcoólico, ($2,42 \text{ mg/g} \pm 0,07$), conforme representado na figura 9.

Figura 9- Concentrações de flavonoides totais em equivalentes de quercetina (EQ) dos extratos aquosos (EA) e hidroalcoólico (EH) de *Eugenia brasiliensis*. Os dados estão representados como média e desvio padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata. **Os asteriscos representam diferenças significativas entre os dois extratos ($p < 0,01$), determinada pelo teste t de Student.



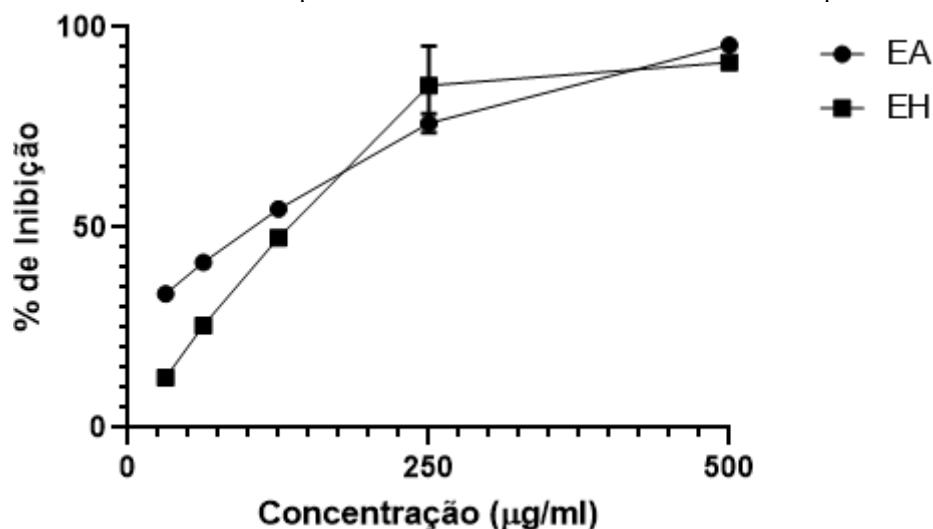
Entre os polifenóis, os flavonoides são os metabólitos secundários mais abundantes e podem ser divididas em sete grupos, sendo elas, flavonas, flavononas, flavonolois, isoflavonas, flavanois e antocianinas (SEBASTIAN et al., 2015 ; ZAMORA-ROS et al., 2014).

MAGINA et al., (2010) realizaram avaliação quantitativa do teor de flavonoides em três espécies de *Eugenia* e observaram que o extrato hidroalcoólico 70% (v/v) das folhas de *Eugenia brasiliensis*, obtido a temperatura ambiente, apresentou maior teor de flavonoides na fração acetato de etila ($54,1 \pm 0,1 \text{ mg de quercetina/g da amostra}$) em relação ao extrato bruto ($14,4 \pm 1,1 \text{ mg de quercetina/g da amostra}$), fração hexano ($35,2 \pm 1,5 \text{ mg de quercetina/g da amostra}$), fração diclorometano ($24,7 \pm 0,1 \text{ mg de quercetina/g da amostra}$), fração butanol ($12,4 \pm 0,2 \text{ mg de quercetina/g da amostra}$) e fração aquosa ($2,9 \pm 0,1 \text{ mg de quercetina/g da amostra}$). O teor de flavonoides encontrado foi maior nas frações das folhas, em relação às frações obtidas com o extrato dos caules. Este resultado era esperado, pois uma das principais funções deste grupo de compostos é proteger os vegetais contra os raios ultravioleta, como as folhas constituem as partes aéreas dos vegetais são, portanto, alvo mais fácil deste tipo de radiação, quando comparadas ao caule (SIMÕES et al., 2003).

4.3 Capacidade antioxidante *in vitro* contra o radical DPPH•

A avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH• demonstrou que ambos os extratos apresentaram alta atividade antioxidante. O extrato aquoso inibiu 95% do radical e o extrato hidroalcoólico 91% na concentração de 500 µg/ml, como mostrado abaixo (Figura 10). O extrato aquoso apresentou IC₅₀ (50% de inibição do radical) de $117,2 \pm 5,582$ µg/ml, significativamente menor ($p < 0,001$) que o extrato hidroalcoólico (IC₅₀ de $184,9 \pm 3,209$ µg/ml).

Figura 10- Inibição do radical DPPH•. Percentual de inibição do radical DPPH• pelos extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* nas concentrações de 31,25 a 500 µg/ml. Os dados estão expressos como média e desvio padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



Para interpretação deste ensaio, considera-se que a diminuição da absorbância em 515 nm e o aumento do aparecimento da coloração amarela em solução correspondem a um maior potencial antioxidante por parte da solução teste. Os resultados obtidos são expressos em IC₅₀, que significa a concentração de extrato, necessária para reduzir em 50 % a concentração de DPPH• em solução, neste caso, quanto menor a concentração necessária para alcançar a IC₅₀, melhor a capacidade sequestrante do radical livre por parte da amostra.

Estudo realizado por MAGINA, (2008), comparou a capacidade de inibição do radical DPPH• em extratos da folha e caule de *Eugenia brasiliensis*. A fração butanol das folhas apresentou maior capacidade antioxidante, com IC₅₀ = 6,2 µg/ml, do que a fração butanol do caule, com IC₅₀ = 15,06 µg/ml.

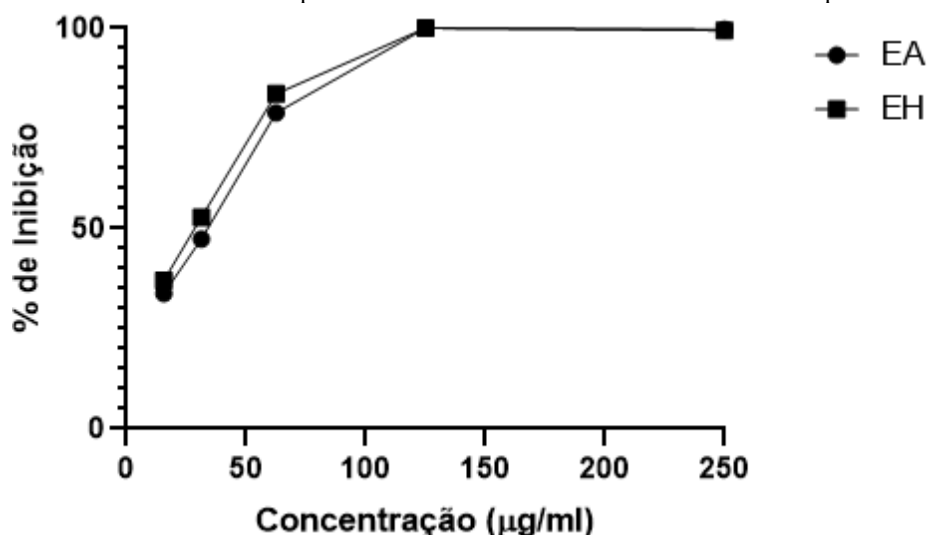
INFANTE et al., (2016), avaliaram a atividade antioxidante de algumas espécies nativas do Brasil, sendo todas do gênero *Eugenia*. Neste estudo, obtiveram extratos etanólico das espécies *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia involucrata*, *Eugenia myrcianthes* e *Eugenia leitoni*. O

extrato das folhas de *Eugenia myrcianthes* ($83.80 \pm 3,00\mu\text{g/ml}$), apresentou a maior atividade antioxidante, seguido *Eugenia leitoni* ($112.38 \pm 1,8\mu\text{g/ml}$), *Eugenia brasiliensis* ($140.33 \pm 3,7\mu\text{g/ml}$) e *Eugenia involucrata* ($191.50 \pm 0,3\mu\text{g/ml}$). Já o extrato da polpa de *Eugenia brasiliensis*, apresentou maior IC_{50} ($472.37 \pm 3,2\mu\text{g/ml}$) que as demais. E ainda, foi demonstrada uma forte correlação positiva entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico, sugerindo que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante do gênero *Eugenia*.

4.4 Capacidade antioxidante *in vitro* contra o radical ABTS

A atividade de inibição o radical ABTS, dos extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas *E. brasiliensis* está demonstrada na figura 11. É possível observar que ambos os extratos inibiram 100 % do radical, já na concentração de 125 $\mu\text{g/ml}$. O extrato aquoso apresentou IC_{50} de $36,78 \pm 0,7084\mu\text{g/ml}$, enquanto o extrato hidroalcoólico apresentou IC_{50} $30,18 \pm 1,443\mu\text{g/ml}$, significativamente menor ($p < 0,01$).

Figura 11- Inibição do radical ABTS. Percentual de inibição do radical ABTS pelos extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* nas concentrações de 31,25 a 250 $\mu\text{g/ml}$. Os dados estão expressos como média e desvio padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



O ABTS+ destaca-se em ensaios da interação entre amostras biológicas e radicais livres, para avaliar o potencial desta interação (PRABHU et al., 2011). A utilização do ABTS+ é importante para avaliar *in vitro* o potencial antioxidante de forma simples e rápida, uma vez que sua redução diminui sua absorbância em 734 nm, essa diminuição da absorbância é proporcional à concentração e à atividade antioxidante (SAVITHRAMMA; RAO; ANKANNA, 2011). Apresenta ainda como vantagens, o fato de poder ser utilizado em

diferentes faixas de pH e sua solubilidade em água e solventes orgânicos, permitindo assim avaliar compostos hidro e lipossolúveis. Contudo, existe a limitação de ser um radical modelo, e não uma biomolécula (MAGALHÃES et al., 2008).

O estudo realizado por GARCIA; BRUNETTI, (2016), demonstrou que o extrato aquoso do fruto de *Eugenia brasiliensis* obtido em banho de ultrassônico durante 20 min, a 40° C apresentou IC₅₀ de 51,08µg/ml, maior que o extrato etanólico IC₅₀ de 31,64µg/ml.

VICTORIA et al., (2012), determinaram a atividade antioxidante do óleo essencial obtido pelo extrato aquoso das folhas de *Eugenia uniflora*, o qual inibiu mais de 75% do radical ABTS na concentração de 75µg/ml, valor similar ao encontrado neste estudo.

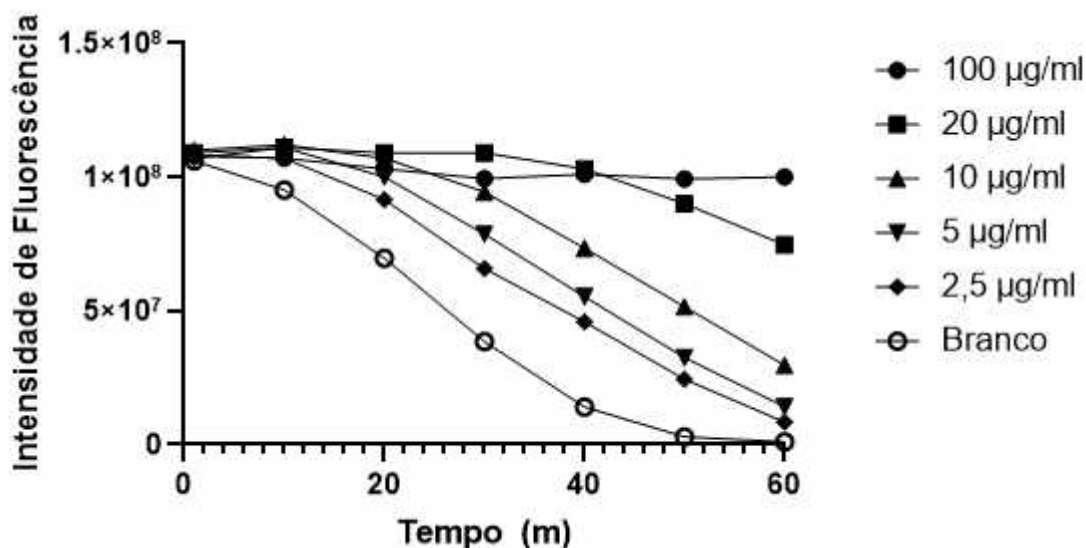
MIRANDA, (2019), avaliou a atividade antioxidante pelo método ABTS em extrato hidroalcoólico 80% (v/v) da folha de *Eugenia uniflora*, a 125°C, tendo como IC₅₀ um valor de $7,58 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$. Conteúdo superior ao extrato aquoso e hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis* analisado no presente estudo.

Não foram encontrados estudos analisando a atividade antioxidante em extratos de folhas de *Eugenia brasiliensis* pelo método ABTS, até o momento.

4.5 Determinação da capacidade antioxidante através do método Sequestro do radical peroxil-Método ORAC

Na figura 12, podem ser observadas as curvas da cinética da reação da capacidade antioxidante do extrato aquoso de *Eugenia brasiliensis*, no ensaio ORAC. Observa-se, um menor decaimento em todas as concentrações em relação ao branco, evidenciando capacidade antioxidante dose-dependente. O extrato aquoso de grumixama apresentou $3836,235 \pm 234,475 \mu\text{m}$ equivalente a TROLOX/g.

Figura 12 – Sequestro do radical peroxil-Método ORAC - Curva de decaimento da fluorescência durante o ensaio ORAC na presença do extrato aquoso das folhas de *Eugenia brasiliensis*, nas concentrações 2,5 a 100 µg/ml. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

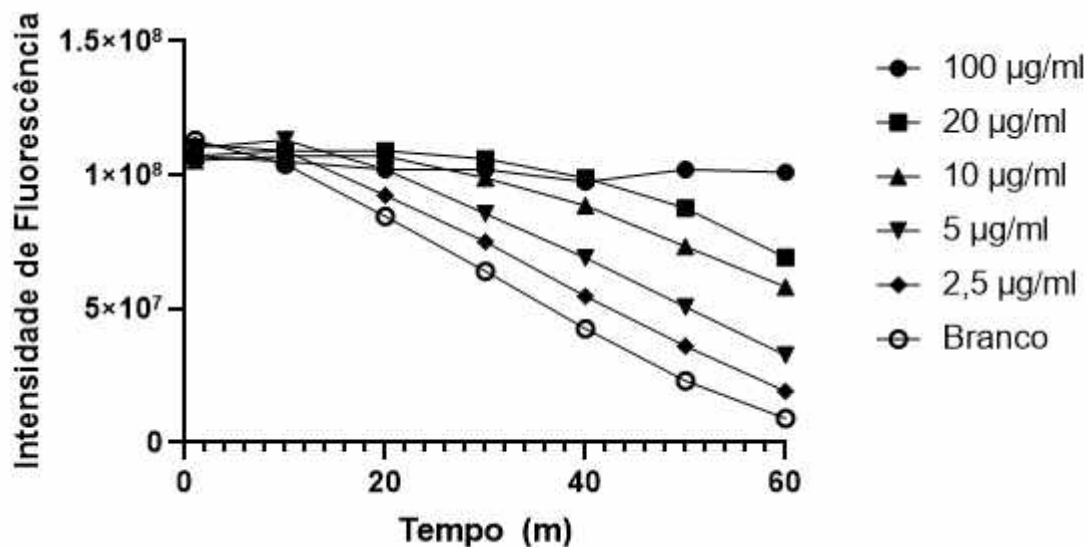


Em relação ao método DPPH• e ABTS, o método ORAC apresenta a vantagem de se utilizar o radical peroxila como pro-oxidantes, o qual está relacionado com a oxidação lipídica, estando estreitamente envolvido em funções biológicas de quebra de cadeia (MAHATTANATAWEE et al., 2006). Além disso, outras vantagens em utilizar esse método incluem, a determinação da capacidade antioxidante tanto de compostos hidrofílicos quanto lipofílicos (RIBEIRO, 2011) e o uso da fluorescência, que possibilita menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras (SOUZA, 2013).

Como a perda da intensidade da fluorescência não é linear com o tempo e sim exponencial utiliza-se a área sob a curva de decréscimo para esse ensaio (PEREIRA, 2009). O maior tempo de retardamento da queda da intensidade da fluorescência no ensaio indica maior eficiência do antioxidante em transferir átomos de hidrogênio ao radical peroxila e, assim, inibir a velocidade de reação de perda da intensidade da fluorescência (OLIVEIRA SILVA, 2015).

Na figura 13, pode ser observada as curvas da cinética de reação do extrato hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis*, no ensaio ORAC. Observa-se, maior decaimento da fluorescência ao longo do tempo nas menores concentrações do extrato, caracterizando também um efeito dose-resposta. O extrato hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis* apresentou $1341,729 \pm 308,873$ µmol equivalentes a TROLOX/g.

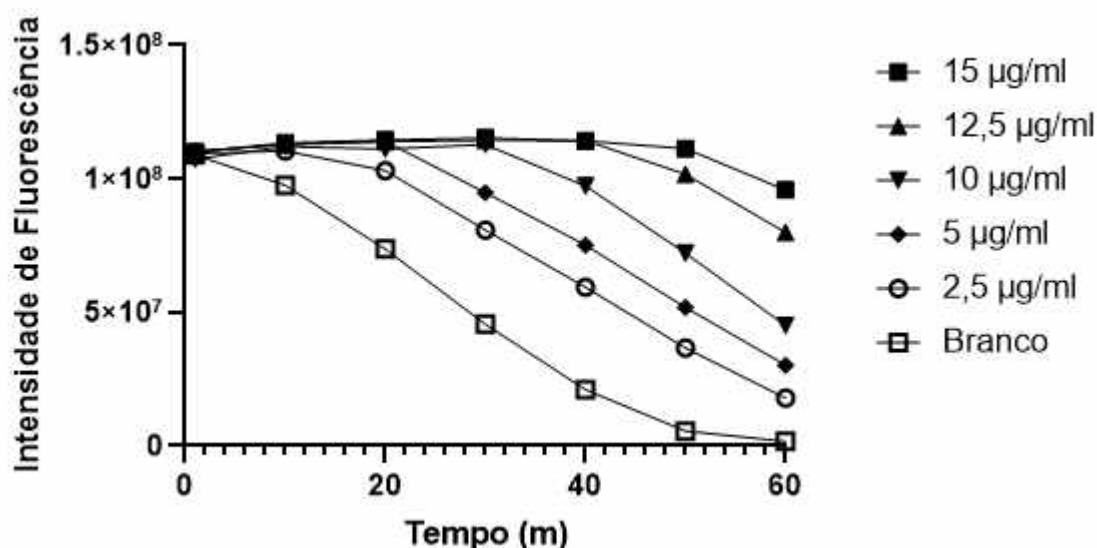
Figura 13 - Sequestro do radical peroxil-Método ORAC - Curva de decaimento da fluorescência durante o ensaio ORAC na presença do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis*, nas concentrações 2,5 a 100 µg/ml. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



Na figura 14, observamos as curvas da cinética da reação da capacidade antioxidante do TROLOX, pelo método ORAC. As concentrações de 12,5 e 15 µg/ml, mostraram ter maior capacidade antioxidante em relação ao tempo.

O TROLOX (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) é usado como um análogo da vitamina E, permeável as células e solúvel em água. Ele é utilizado como um padrão para medir a capacidade antioxidante de misturas complexas, pois atua como antioxidante neutralizando radicais livres (PUBCHEM, 2020).

Figura 14 - Sequestro do radical peroxil-Método ORAC - Curva de decaimento da fluorescência durante o ensaio ORAC na presença de TROLOX nas concentrações 2,5 a 15 $\mu\text{g/ml}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



Estudo feito por INFANTE et al., (2016), avaliou a capacidade de captura do radical peroxila através do método ORAC. Este ensaio monitorou a ação antioxidante do extrato etanólico através do decaimento da fluorescência da fluoresceína pela sua oxidação com $\text{ROO}\cdot$. O extrato da folha de *Eugenia brasiliensis* apresentou o maior valor (757,32 $\mu\text{m ET/g}$), seguida pelo extrato da polpa (477,45 $\mu\text{m ET/g}$) e o extrato da semente de grumixama (211,84 $\mu\text{m ET/g}$).

SCHUMACHER, (2015), não encontrou diferenças significativas entre o extrato aquoso e etanólico das folhas de *Eugenia uniflora*, apresentando $1118 \pm 262,6 \mu\text{m ET/g}$ e $1021 \pm 202,6 \mu\text{m ET/g}$ respectivamente, ambos os valores inferiores aos encontrados neste estudo para os extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis*, pelo método ORAC.

Contudo, é possível observar uma grande dificuldade em comparar os resultados de diferentes métodos para se avaliar a capacidade antioxidante de extratos, com dados reportados na literatura científica. Essas dificuldades ocorrem por diversos fatores, como a complexidade e diversidade dos compostos antioxidantes presentes, que diferem quanto a sua polaridade, solubilidade e composição, diferentes metodologias empregadas que diferem quanto ao solvente, radical utilizado, mecanismo de reação, diferentes condições de análise e forma de expressão dos resultados.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir deste trabalho demonstram que os extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Eugenia brasiliensis*, apresentam alto teor de compostos bioativos e atividade antioxidante. O extrato aquoso apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonoides totais que o extrato hidroalcoólico. No entanto, ambos extratos possuem alta atividade antioxidante, comprovada através de ensaios com diferentes radicais ABTS, DPPH• e ORAC. Assim, esses dados fornecem subsídio para futuros estudos de bioprospecção, investigação de potencial farmacológico, além de contribuir para valorização da biodiversidade da Mata Atlântica.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. F. L. DOS S. **Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais**. 2017. 51 p. Projeto de Pós-Graduação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2017. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/6104/1/PPG_26189.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2020.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

APREMAVI. **Biodiversidade**. 2020. Disponível em: <<https://apremavi.org.br/mata-atlantica/biodiversidade/>>. Acesso em: 15 ago. 2020.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 1 jan. 2006.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, dez. 2005.

BARBOSA, N. A. et al. **Influência da temperatura e do solvente na obtenção de extrato de milho de grãos pretos**. 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149779/1/Influencia-temperatura.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2020.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense**. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 17 ago. 2020.

BARROSO, G. M. . et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Imprensa U ed. Viçosa: EMBRAPA, 1984.

BIANCHI, L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>>. Acesso em: 1 set. 2020.

BINDUJA, S. et al. **Protective action of ursolic acid against chemical induced hepatotoxicity in rats**. 1996. Disponível em: <<http://www.ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=1996;volume=28;issue=4;spage=232;epage=239;aulast=Binduja;type=0>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

BORN, G. C. C. **Plantas medicinais: conservação e desenvolvimento na mata atlântica**. 1998. Disponível em: <<https://acervo.socioambiental.org/sites/default/files/documents/22D00055.pdf>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

BRAGANÇA, D. **Desmatamento na Mata Atlântica é o menor já registrado**. 2019. Disponível em: <<https://www.oeco.org.br/noticias/desmatamento-na-mata-atlantica-e-o-menor-ja-registrado/>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **ELSEVIER, LWT - Food Science and Technology**, v. 28, ed. 1, p. 25-30, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5). Acesso em: 3 set. 2020.

CAMINHA, A. F. **Ministério do meio ambiente**. 2010. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/informma/item/6596-escolhidos-11-projetos-para-conservacao-da-mata-atlantica>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata atlântica**. 2020. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/estruturas/202/_arquivos/adequao_ambiental_publicacao_web_202.pdf>. Acesso em: 9 set. 2020.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2–3, p. 153–177, 30 jun. 2012.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246–L255, 1 ago. 2002.

COOK, N. Flavonoids?Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 7, n. 2, p. 66–76, 1 fev. 1996.

CORBETT, J. T. **The scopoletin assay for hydrogen peroxide A review and a better method**. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2674266>>. Acesso em: 3 jul. 2020.

DAMETTO, A. C.; SILVA, D. H. S. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. Disponível em: <<https://orcid.org/0000-0002-1516-7765>>. Acesso em: 15 jul. 2020.

DAVID, P.; NEVES, O. **Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde**. 2015. Disponível em: <https://bdigital.ufpr.pt/bitstream/10284/5241/1/PPG_15639.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2020.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos antioxidants properties of phenolic compounds**. 2004. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/academica/article/viewFile/540/453>>. Acesso em: 9 set. 2020.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. DE. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 426–443, set. 2007.

EMBRAPA. Biomas: Mata Atlântica. 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/rede-ilpf/bioma/mata-atlantica>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

FERRERA, T. S. et al. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em ervaíras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2 suppl 1, p. 588–596, 2016.

FIGUEIRÔA, E. DE O. et al. **Evaluation of Antioxidant, Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of Fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content**. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/125027>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. 2000. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, nov. 2000a.

FLORES, G. et al. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1256–1262, out. 2012.

FRIGHETTO, N. et al. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 338–343, dez. 2005.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627–641, dez. 2008.

GARCIA, K. C.; BRUNETTI, I. L. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam.** 2016. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/146737>>. Acesso em: 9 ago. 2020.

GEORGÉ, S. et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370–1373, 9 mar. 2005.

GLAZER, A. N. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. **The FASEB Journal**, v. 2, n. 9, p. 2487–2491, jun. 1988.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601–617, jul. 1995.

HORTO BOTÂNICO. 2020. Disponível em: <<http://museunacional.ufrrj.br/hortobotanico/arvoresearbustos/eugeniabrasiliensis.html>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **FRIN**, v. 44, p. 672–676, 2011.

HUANG, D. et al. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4437–4444, 31 jul. 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. 2005 **J. Agric. Food Chem.**, p. 1841–1856, 2005.

IBGE. 2020. Disponível em: <<https://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio.html>>. Acesso em: 9 set. 2020.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811–1815, mar. 2003.

INFANTE, J. et al. **Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits**. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152974>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

Iniciativa BNDES Mata Atlântica. 2020. Disponível em:
<<https://www.iniciativaverde.org.br/programas-e-projetos-bndes-mata-atlantica.php>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

JIE, L. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 2–1, p. 57–68, dez. 1995.

KABERA, J. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377–392, 2014.

Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; García-Parilla, M. G. et al. **Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos.** *Ciência e tecnologia de alimentos*, 24, 4, 12 2004.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **General pharmacology**, v. 27, n. 7, p. 1145–7, out. 1996.

LEITE, J. P. V. et al. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 77–87, 2001.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F. **Bioma Mata Atlântica.** 1998. Disponível em:
<<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=964&sid=2>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

M, P. C.; PENA, L. DE A. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas. . 1974, p. 687.

MAFFEI, M. E.; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 8, p. 1359, 2011.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1–19, abr. 2008.

MAGINA, M. A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Am. J. Pharm**, v. 29, n. 3, p. 376–82, 2010.

MAGINA, M. D. A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero Eugenia.** 2008. Disponível em:
<<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/84737/262174.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

MAHATTANATAWEE, K. et al. Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7355–7363, set. 2006.

MARIA GOMES RIBEIRO, E. **Atividade antioxidante e polifenóis totais do fruto de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) com e sem casca**. 2011. Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/59/teses/764378.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

MATOS LOPES, R. et al. **Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais**. 2018. Disponível em: <https://paulasennafarma.webnode.com.br/_files/200000094-1f27420215/17_f.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2020.

MIRANDA, N. V. D. S. **Avaliação da atividade antioxidante e citotóxica dos extratos hidroetanólicos das folhas e cascas de eugenia uniflora**. 2019. Disponível em: <<http://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/handle/prefix/1787>>. Acesso em: 9 set. 2020.

MOLYNEUX, P. **The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity**. 2003. Disponível em: <<http://www.thaiscience.info/Journals/Article/SONG/10462423.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2020.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 29 out. 2004.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes**. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 ago. 2020.

OLIVEIRA SILVA, M. **Atividade antioxidante e composição de oligossacarídeos em subproduto obtido do processamento industrial da goiaba**. 2015. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/256721/1/Silva_MairaOliveira_M.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. **Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe**. 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010586o>>. Acesso em: 16 ago. 2020.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepato biliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138–144, abr. 2001.

PATHIRANA, C. L.; FEREIDOON; SHAHIDI. **Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology**. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050>>. Acesso em: 8 ago. 2020.

PAVLOVA, N. I. et al. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 489–492, jul. 2003.

PEREIRA, A. C. DA S. **Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de frutas tropicais e cítricas produzidas no Ceara**. 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/574374>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. 2020. Disponível em: <[https://cursosextensao.usp.br/pluginfile.php/18438/mod_resource/content/1/Apostila 01b - Metabolismo secundário.pdf](https://cursosextensao.usp.br/pluginfile.php/18438/mod_resource/content/1/Apostila%201b%20Metabolismo%20secund%C3%A1rio.pdf)>. Acesso em: 21 mar. 2020.

PÉREZ, J. A. M.; AGUILAR, T. A. F. **Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico**. 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/chemistry-of-natural-antioxidants-and-studies-performed-with-different-plants-collected-in-mexico>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

PESSOA, G. V. A. et al. Ação da associação L-triptofano e citrato de ferro amoniacal sobre a formação de bafo de Proteus / L-tryptophan and ferric ammonium citrate as an anhibitory association on Proteus Swarming. 1971. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ses-32176>>. Acesso em: 3 ago. 2020.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PRABHU, R. et al. Scavenging potential of reactive oxygen species by Tetra-hydrocurcumin. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, p. 114–118, 2011.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. **Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements**. 2005. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0502698>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

PUBCHEM. **Trolox**. 2020. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox>>. Acesso em: 3 set. 2020.

QUEIROZ, J. M. G. et al. **Aspectos populares e científicos do uso de espécies de Eugenia como fitoterápico**. 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2446-4775.20150008>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

RAMOS, JAKELINE DE OLIVEIRA. **Avaliação da atividade tóxica e do perfil fitoquímico de extratos e frações de *Vernonia condensata baker* e *Vernonia polyanthes less.*** Orientador: Gracielle Oliveira Sabbag Cunha. 2014. Monografia (CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA) - INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS, Anápolis, 2014. Disponível em: <http://www.ifg.edu.br/attachments/article/1704/TCC%20-%20Jakeline%20de%20Oliveira%20Ramos.pdf>. Acesso em: 17 set. 2020.

RIBEIRO, M. G. E. Atividade antioxidante e polifenóis totais do fruto de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) com e sem casca. 2011. Disponível em: <http://objdig.ufrj.br/59/teses/764378.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604005904>. Acesso em: 20 ago. 2020.

ROJAS-RODRÍGUEZ, F.; TORRES-CÓRDOBA, G. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Grumichama. **Revista Forestal Mesoamericana Kurú**, v. 15, n. 37, p. 70–72, 27 jun. 2018.

RUFINO, M. DO S. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +.** 2007. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf.

SANTOS, M. T. **Caracterização de compostos bioativos em frutas exóticas da mata atlântica.** 2015. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/256723>. Acesso em: 5 jul. 2020.

SAÚDE, M. DA. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.** 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>. Acesso em: 16 set. 2020.

SAVITHRAMMA, N.; RAO, M. L.; ANKANNA, S. **Screening of traditional medicinal plants for secondary metabolites.** 2011. Disponível em: <https://pharmascope.org/ijrps/article/view/977>. Acesso em: 9 ago. 2020.

SCHUMACHER, N. S. G. **Caracterização da propriedade antiinflamatória dos componentes do extrato aquoso das folhas de eugenia uniflora sobre a expressão do diabetes, no modelo experimental de diabetes espontâneo tipo 1.** 2015. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/311757/1/Schumacher_NayaraSimonGonzalez_M.pdf. Acesso em: 30 ago. 2020.

SEBASTIAN, R. S. et al. A New Database Facilitates Characterization of Flavonoid Intake, Sources, and Positive Associations with Diet Quality among US Adults. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1239–1248, 1 jun. 2015.

SESA. **Plantas medicinais são alternativa no tratamento de diversas doenças**. 2015. Disponível em: <<https://saude.es.gov.br/plantas-medicinais-sao-alternativa-no-tratame>>. Acesso em: 16 set. 2020.

SILVA, A. A. DA; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 26 mar. 2010.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012–1018, jan. 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: 1999.

SOUZA, W. DE. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1593/1/CM_COALM_2013_1_10.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2020.

TIVERON, A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. p. 103, 2010.

TOKUDA, H. et al. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Letters**, v. 33, n. 3, p. 279–285, dez. 1986.

TONG, L. et al. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 18–25, out. 2015.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. R.; DE NADRA, M. C. M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, n. 2, p. 93–101, fev. 2007.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, ago. 2012.

VIEIRA, L. ; SOUSA, R. S.; LEMOS, J. R. Plantas medicinais conhecidas por especialistas locais de uma comunidade rural maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1061–1068, 2015.

YOKOZAWA, T. et al. **Antioxidative Activity of Flavones and Flavonols In Vitro**. 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199709\)11:6%3C446::AID-PTR128%3E3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199709)11:6%3C446::AID-PTR128%3E3.0.CO;2-8)>. Acesso em: 17 ago. 2020.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139–162, 1 jan. 1994.

ZAMORA-ROS, R. et al. Dietary Intakes of Individual Flavanols and Flavonols Are Inversely Associated with Incident Type 2 Diabetes in European Populations. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 3, p. 335–343, 1 mar. 2014.

ZHANG, Y. et al. Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 670–675, fev. 2008.

ZOPPI, C. C. et al. Alterações em Biomarcadores de Estresse Oxidativo, Defesa Antioxidante e Lesão Muscular em Jogadores de Futebol Durante uma Temporada Competitiva. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 17, n. 2, p. 119–130, 2003.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310–316, maio 2009.