

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

Extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtidos por infusão aquosa e por extração com líquido pressurizado: descrição fitoquímica e prospecção de propriedades

Giovana Paula Zandoná

Pelotas, 2021

Giovana Paula Zandoná

Extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtidos por infusão aquosa e por extração com líquido pressurizado: descrição fitoquímica e prospecção de propriedades

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.

Comitê de orientação: Dr. Cesar Valmor Rombaldi
Dr. Fábio Clasen Chaves

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

Z27e Zandoná, Giovana Paula

Extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtidos por infusão aquosa e por extração com líquido pressurizado: descrição fitoquímica e prospecção de propriedades / Giovana Paula Zandoná ; Cesar Valmor Rombaldi, orientador ; Fabio Clasen Chaves, coorientador. — Pelotas, 2021.

105 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Espécies nativas. 2. Myrtaceae. 3. Arecaceae. 4. Compostos fenólicos. I. Rombaldi, Cesar Valmor, orient. II. Chaves, Fabio Clasen, coorient. III. Título.

CDD : 664

Giovana Paula Zandoná

Extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtidos por infusão aquosa e por extração com líquido pressurizado: descrição fitoquímica e prospecção de propriedades

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, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26 de agosto de 2021

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi (Orientador)

Doutor em Biologie Moléculaire Végétale pela Universidade Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

Prof. Dra. Vanessa Galli

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres

Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas.

Pesq. Dr. Rodrigo Cezar Franzon

Doutor em Ciências, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fruticultura de Clima Temperado) da Universidade Federal de Pelotas.

Dra. Ellen Perin

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Claudir Paulo Zandoná e Marilene Ana De Marco Zandoná por serem meus alicerces e me proporcionarem o suporte, o apoio e a motivação para realizar mais um dos meus sonhos. Obrigada por serem pais que acreditam fielmente na minha capacidade e constantemente me instigam a sonhar, a ter esperança e enfrentar todas as situações com garra, sabedoria e humildade. A vocês muito obrigada!

Aos meus irmãos Jovani e Gleison e a minha cunhada Gisiane, por todo o amor, o apoio e a compreensão nos momentos que não pude estar presente nos eventos e solicitações da família.

Ao meu orientador, Dr. Cesar Valmor Rombaldi, por ser uma peça-chave fundamental para o meu aprendizado e amadurecimento tanto profissional como pessoal. Agradeço por todos os conhecimentos transmitidos, os trabalhos realizados e por toda a compressão e paciência.

Ao professor Dr. Fabio Clasen Chaves, por estar sempre me instigando a ter uma visão crítica e detalhista, por estar sempre disponível em me ensinar, e por todas as oportunidades de aprendizagem proporcionadas.

À Dra. Jessica Fernanda Hoffmann, que me acolheu desde o primeiro momento que cheguei ao DCTA e me ensinou diversas análises e continua sempre me auxiliando em todos os trabalhos. Você é um exemplo para mim!

Ao LaCEM, em especial para a Rosane Crizel, Bianca Camargo, Ellen Perin, Ana Clara Antunes, Paula Filoda, Tatiane Siebeneichler, Tanize Acunha pela gratificante convivência, por todos os trabalhos desenvolvidos e conhecimentos compartilhados. Vocês foram fundamentais do início ao fim dessa caminhada!

À Lucíola Bagatini pela parceria de trabalho, por todas as reuniões e tramitações com nossas amostras, que percorriam do RS a SC.

Aos meus colegas de DCTA Jarine Amaral, Cláudio Cruxen, Giseli Crizel, Isis Toralles, Camila Nunes, que tornaram esse período mais leve e divertido.

À Embrapa Clima Temperado, em especial a Dr. Rodrigo Franzon, por gentilmente conceder as amostras necessárias para a realização dos experimentos.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, por possibilitar a realização das extrações. Agradeço, também, à Universidade do Estado de Santa Catarina.

À Prof. Dr. Francieli Moro Stefanello, MSc. Juliane de Souza Cardoso, prof. Dr. Alexander Junges pela colaboração e parceria no trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro à pesquisa.

Agradeço imensamente a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos e pela disposição em contribuírem na formação de profissionais críticos e preparados para a carreira acadêmica, e, principalmente, por serem capazes de construir um ensino público de qualidade.

RESUMO

ZANDONÁ, Giovana Paula. **Extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtidos por infusão aquosa e por extração com líquido pressurizado: descrição fitoquímica e prospecção de propriedades.** 2021. 105 f. 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, Pelotas, 2021.

O Brasil possui a maior diversidade e variabilidade genética de espécies vegetais do planeta, o que gera um ativo ambiental e tecnológico, como é o caso do potencial fitoquímico para aplicações em alimentos ou noutro setor. Nesse contexto, encontram-se o araçazeiro e o butiazeiro, em que os frutos são ricos em compostos bioativos com atividades antioxidante e antimicrobiana, e as folhas se apresentam como uma potencial fonte de compostos bioativos. Por isso, decidiu-se caracterizar os compostos fitoquímicos presentes em extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum*) e de butiazeiro (*Butia odorata*), e avaliar as propriedades antioxidantes e antibacterianas. Foram obtidos extratos das folhas por meio de infusão aquosa (AI) e sistema de extração por líquido pressurizado com água (PLE-W), etanol (PLE-E) e combinação de água: etanol (PLE-W:E). O estudo foi realizado em duas etapas. A etapa 1 consistiu na obtenção e caracterização química dos extratos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Na etapa 2, foi avaliado o potencial biológico por testes da atividade antioxidante em modelo de cérebro de ratos, através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) e em leveduras; e a atividade antibacteriana por Espectro de Ação por Disco de Difusão em Ágar e por Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para os extratos de folhas de araçazeiro, o PLE-W:E apresentou maior diversidade de compostos extraídos. Todos os extratos tiveram atividade antioxidante frente aos ensaios *in vitro* por TBARS, ROS e em leveduras e apresentaram atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas. Para as folhas de butiazeiro, a maior diversidade e concentração total de ácidos fenólicos e flavonoides foram no PLE-E e PLE-W:E; para a atividade antioxidante apenas o PLE-W e PLE-E tiveram efeito protetor frente a TBARS e, para ROS, todos os extratos apresentaram efeito protetor. Já, para a atividade antibacteriana, apenas duas bactérias Gram-positivas foram afetadas pela presença dos extratos, sendo eles, o PLE-W e PLE-E. Isso mostra que, das oito bactérias patogênicas testadas, os extratos de folhas de butiazeiro apenas apresentaram efeito inibitório frente às duas bactérias avaliadas. Assim, especialmente as folhas de araçazeiro se apresentam como uma fonte promissora de compostos bioativos. Mais estudos são necessários para explorar as propriedades protetoras *in vitro* e *in vivo*, principalmente, testes de citotoxicidade para avaliar a segurança à saúde, na utilização dos extratos.

Palavras-chaves: Espécies nativas; Myrtaceae; Arecaceae; compostos fenólicos; antioxidante; antibacteriana.

Abstract

ZANDONÁ, Giovana Paula. **Extracts from araçazeiro leaves (*Psidium cattleianum* Sabine) and butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtained by aqueous infusion and extraction with pressurized liquid: phytochemical description and prospection of properties.** 2021. 105 f. Thesis (Doctorate Degree in Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Postgraduate Program in Food Science and Technology, Agroindustrial Science and Technology Department, Faculty of Agronomy 'Eliseu Maciel', Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Brazil has the greatest genetic diversity and variability of plant species on the planet, which generates an environmental and technological asset, such as the phytochemical potential for applications in food or other field. In this context, araçazeiro and butiazeiro are fruits are rich in bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial activities, whereas the leaves are a potential source of bioactive compounds. Therefore, it was decided to characterize the phytochemical compounds present in extracts of araçazeiro (*Psidium cattleianum*) and butiazeiro (*Butia odorata*) leaves, and to evaluate their antioxidant and antibacterial properties of these extracts. Leaf extracts were obtained through aqueous infusion (AI) and a pressurized liquid extraction system with water (PLE-W), ethanol (PLE-E) and a combination of water: ethanol (PLE-W:E). The study was carried out in two stages. Step 1 consisted of obtaining and chemically characterizing the extracts by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). In step 2, the biological potential was evaluated by testing the antioxidant activity in a rat brain model, using the method of reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) and reactive oxygen species (ROS) methods, and in yeasts; and antibacterial activity by Agar Diffusion Disc Spectrum of Action and by Minimum Inhibitory Concentration (MIC). For araçazeiro leaves extracts, PLE-W:E presented greater diversity of extracted compounds. Furthermore, all extracts had antioxidant activity against *in vitro* assays by TBARS, ROS, and yeast and showed inhibitory activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. For butiazeiro leaves extracts, the greatest diversity and total concentration of phenolic acids and flavonoids were in PLE-E and PLE-W:E; all extracts exhibited an antioxidant activity by ROS, while only PLE-W and PLE-E had a protective effect against TBARS. For the antibacterial activity, only two Gram-positive bacteria were affected by the presence of the extracts, these being the PLE-W and PLE-E. This demonstrates that, among eight pathogenic bacteria tested, only two showed an inhibitory effect for the butiazeiro leaves extracts, as an alternative, araçazeiro leaves are a promising source of bioactive compounds. In this way, subsequent studies are required to explore the extracts protective properties of *in vitro* and *in vivo* assays, especially cytotoxicity assay regarding the health and safety concern of these extracts.

Keywords: Native species; Myrtaceae; Arecaceae; phenolic compounds; antioxidant; antibacterial.

Lista de figuras

Figura 1 - Biomas brasileiros.....	22
Figura 2 – Araçás amarelos (Seleção da Embrapa Clima Temperado). A) Folhas de araçazeiro; B) Araçá (fruto)	24
Figura 3 - Palmeira de <i>Butia odorata</i> : A) Frutos de butiá; B) Folhas de butiazeiro....	29
Figura 4 - Fases do projeto de tese.....	35
Figura 5 - Diagrama esquemático de obtenção de infusão aquosa e extração por líquido pressurizado	37
Figura 6 - Equipamento de extração por líquido pressurizado, URI	38
Figura 7 - Cinética de extração por PLE para as folhas de araçazeiro	45
Figura 8 - Cromatograma de íons totais no modo de ionização negativo por LC-ESI-qTOF/MS para os extratos de folha de araçazeiro: A) AI, B) PLE-W, C) PLE-W:E, D) PLE-E.....	47
Figura 9 - HeatMap dos compostos putativamente identificados em extratos de folhas de araçazeiro.....	58
Figura 10 - Diagrama de <i>Venn</i> para os extratos de folhas de araçazeiro	59
Figura 11 - <i>Score plot</i> da Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) (A) e Projeção de Importância da Variável (VIP score) (B) derivados de dados LC-ESI-qTOF/MS pelo modo negativo de ionização para os extratos de folhas de araçazeiro.....	60
Figura 12 - Atividade antioxidante por TBARS de extratos de folhas de araçazeiro .	62
Figura 13 - Atividade antioxidante por produção de ROS de extratos de folhas de araçazeiro.....	63
Figura 14 - Atividade antioxidante por ensaio de leveduras <i>S. cerevisiae</i> de extratos de folhas de araçazeiro	64
Figura 15 - Cromatograma de íons totais no modo de ionização negativo por LC-ESI-qTOF/MS para os extratos de folha de butiazeiro: A) AI, B) PLE-W, C) PLE-W:E, D) PLE-E.....	68
Figura 16 - Diagrama de <i>Venn</i> para os extratos de folhas de butiazeiro.....	77
Figura 17 - Atividade antioxidante por TBARS de extratos de folhas de butiazeiro ..	79
Figura 18 - Atividade antioxidante por produção de ROS de extratos de folhas de butiazeiro.....	80

Lista de tabelas

Tabela 1 - Delineamento experimental da etapa I.....	36
Tabela 2 - Delineamento experimental da etapa II.....	40
Tabela 3 - Quantidade de compostos totais de extratos obtidos AI e PLE de folhas de araçazeiro através de análise por LC-ESI-qTOF-MS no modo de ionização negativo	46
Tabela 4 - Compostos putativamente identificados em extratos polares de folhas de araçazeiro.....	49
Tabela 5 - Quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides em extratos polares de folhas de araçazeiro	54
Tabela 6 - Atividade antibacteriana de extratos de folhas de araçazeiro	66
Tabela 7 - Quantidade de compostos totais de extratos de folhas de butiazeiro através de análise por LC-ESI-qTOF-MS no modo de ionização negativo	67
Tabela 8 - Compostos putativamente identificados em extratos polares de folhas de butiazeiro.....	71
Tabela 9 - Quantificados dos compostos putativamente identificados em extratos polares de folhas de butiazeiro.....	75
Tabela 10 - Atividade antibacteriana de extratos de folhas de butiazeiro Método de Disco de Difusão e Concentração Inibitória Mínima.....	82

Lista de Abreviações e Siglas

AA	Ácido Ascórbico
AI	Infusão aquosa
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
C	Controle
Caco-2	Células de câncer de cólon
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm	Centímetro
DCFH-DA	Diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína
DCF	Diclorofluoresceína fluorescente
DPPH	Do inglês 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
g	Gramas
<i>g</i>	Força G (aceleração da centrífuga)
GRAS	Solventes geralmente reconhecidos como seguros
h	Horas
ha	Hectare
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography-High Resolution</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Controle induzido
K	Kaempferol
Km ²	Quilômetro quadrado
M	Metros
MCF-7	Células de câncer de mama

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimol
MS	Espectrômetro de massas
MS ⁿ	Perfil de fragmentação do composto
<i>m/z</i>	Razão da massa pela carga
Nº	Número
nd	Não detectado
PCA	Análise de componentes principais
PLE	Extração por Líquido Pressurizado
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
PLS-DA	Do inglês <i>The Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i> (Análise discriminante por quadrados mínimos parciais)
p/v	Razão peso/volume
Q	Quadrupolo
Q	Quercetina
ROS	Do inglês Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigênio)
Spp.	Espécie
t	Toneladas
TBARS	Do inglês <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TOF	Tempo de voo
TR	Tempo de retenção
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
v/v	Volume/volume
YPD	Do inglês <i>Yeast extract – Peptone – Dextrose</i>
µg	Micrograma
µM	Microlitro
°C	Grau Celsius

Sumário

1 Introdução.....	17
2 Objetivos	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 Hipótese	21
4 Revisão bibliográfica	22
4.1 Espécies nativas da flora brasileira	22
4.1.2 Araçazeiro (<i>Psidium</i> spp.)	24
4.1.2 Butiazeiro (<i>Butia odorata</i>)	27
4.2 Extrações de compostos	29
4.2.1 Infusões aquosas (IA).....	30
4.2.2 Extração por líquido pressurizado (PLE)	32
5 Material e Métodos	35
5.1 Etapa I: Obtenção e caracterização química dos extratos	35
5.1.1 Material vegetal	35
5.1.2 Delineamento experimental	36
5.1.3 Obtenção dos extratos por AI e PLE	36
5.1.4 Caracterização química dos extratos	38
5.2 Etapa II: Avaliação de propriedades biológicas.....	40
5.2.1 Delineamento experimental.....	40
5.2.2 Atividade antioxidante	40
5.2.2.1 Em modelo de cérebro de ratos	40
5.2.2.2 Em leveduras	41
5.2.3 Atividade antibacteriana	42
5.3 Desenho experimental e análise estatística	43
6 Resultados	44
6.1 Extratos de folhas de araçazeiro	44
6.1.1 Caracterização química dos extratos de folhas de araçazeiro	44
6.1.1.1 Análise de HeatMap, Diagrama de <i>Venn</i> e PLS-DA dos extratos de folhas de araçazeiro.....	55
6.1.2 Atividade antioxidante (TBARS, ROS e leveduras) dos extratos de folhas de araçazeiro.....	61

6.1.3 Atividade antibacteriana dos extratos de folhas de araçazeiro.....	64
6.2 Extratos de folhas de butiazeiro	67
6.2.1 Caracterização química dos extratos de folhas de butiazeiro	67
6.2.2 Atividade antioxidante dos extratos de folhas de butiazeiro	78
6.2.3 Atividade antibacteriana de extratos de folhas de butiazeiro.....	80
7 Discussão	83
7.1 Extratos de folhas de araçazeiro	83
7.1.1 Folhas de araçazeiro são ricas em compostos fitoquímicos polares.....	83
7.1.2 Os extratos polares de folhas de araçazeiro têm elevada atividade antioxidante	85
7.1.3 Os extratos polares de folhas de araçazeiro têm atividade antimicrobiana, principalmente frente a bactérias Gram-positivas	86
7.2 Extratos de folhas de butiazeiro	88
7.2.1 As folhas de butiazeiro apresentam compostos fenólicos e atividade antioxidante	88
7.2.2 Os extratos polares de folhas de butiazeiro não geram atividade antimicrobiana	89
8 Considerações Finais	91
Referências bibliográficas.....	92

1 Introdução

O Brasil é o país que possui a maior diversidade e variabilidade genética de espécies vegetais do planeta, com cerca de 46.500 espécies já identificadas. Dentre elas, diversas espécies frutíferas possuem potencial para domesticação e/ou utilização nas condições nativas para diversas aplicações, desde o consumo de frutas frescas ou processadas até a utilização de extratos vegetais na indústria cosmética, farmacêutica e de alimentos (ARAÚJO *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2017a; MEDINA *et al.*, 2011; REISSIG; ROMBALDI, 2017). Como exemplos relevantes de espécies nativas do país que chegaram aos mercados internacionais de alimentos, cosméticos e medicamentos e são amplamente consumidos se pode citar o açaí (*Euterpe oleracea*), guaraná (*Paullinia cupana*) e camu-camu (*Myrciaria dubia*) (Ressig & Rombaldi, 2017). De modo geral, as espécies que vêm recebendo mais atenção, ao menos pelo número de publicações científicas (ALQURASHI *et al.*, 2017; BONADIMAN *et al.*, 2017; CUNHA-SANTOS *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019; SILVA; SAMPAIO; FREITAS; TORRES, 2018), são aquelas endêmicas da região Amazônica, justamente pela relevância do Bioma Amazônico no contexto ambiental, econômico, social, cultural (CARDOSO *et al.*, 2017a) e político (JOLY *et al.*, 2011; JOLY, 2007).

No entanto, há ampla diversidade e variabilidade vegetal endêmica em outros biomas brasileiros, como é o caso de espécies nativas dos biomas Pampa, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Cerrado (BESKOW *et al.*, 2014; CRUXEN *et al.*, 2017; DE LIMA *et al.*, 2020; HOFFMANN *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018). Por exemplo, foram detectadas putativas propriedades funcionais, mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes do extrato de folhas, sementes e polpa de quatro frutas dos gêneros *Eugenia* e *Garcinia* [araçá-piranga (*E. leitonii*), cereja-do-rio-grande (*E. involucrata*), grumixama (*E. brasiliensis*), ubajaí (*E. myrcianthes*) e bacupari-mirim (*Garcinia brasiliensis*)] (INFANTE *et al.*, 2016), todas típicas da Mata Atlântica. Quatro das espécies desses biomas que têm despertado interesse de nosso grupo de pesquisa, são o araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, pitangueira (*Eugenia uniflora*) e guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) O. Berg. Nessa Tese, a ênfase será o araçazeiro e o butiazeiro, tendo em vista que as duas outras espécies foram objeto do texto da Tese de Lucíola Bagatini (<https://dctaufpel.com.br/ppgcta>).

O araçazeiro é encontrado no bioma Pampa, e produz frutos denominados de araçá, que são normalmente consumidos *in natura* ou processados em sucos, geleias, doces, sorvetes e balas, e muito apreciados pelas populações locais (PEREIRA *et al.*, 2018, REISSIG; ROMBALDI, 2017). O araçá é rico em compostos com diferentes funções biológicas (DE LIMA *et al.*, 2020, REISSIG; ROMBALDI, 2017). Extratos de araçá demonstraram diminuir as taxas de sobrevivência de células de câncer de mama e cólon (MEDINA *et al.*, 2011), além de gerarem atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (DE LIMA *et al.*, 2020). Embora a composição do araçá tenha sido estudada em detalhes (CARDOSO *et al.*, 2017b; MEDINA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2018), as folhas também são uma fonte prospectiva de importantes compostos bioativos (ALMEIDA *et al.*, 2019; BASTOS *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2019; OLDONI *et al.*, 2019). As folhas de araçazeiro têm, por exemplo, sido utilizadas na prática da medicina popular para o tratamento de diarreias e úlceras, e para o alívio de dores de dente (SOLIMAN *et al.*, 2016).

O gênero *Butia* de ocorrência natural na América do Sul, contém 20 espécies que presentes na Região Sul do Brasil e no Uruguai (BESKOW *et al.*, 2015; HOFFMANN *et al.*, 2014), sendo denominado de “butiazais” os grupos de populações do butiá (HEIDEN; ELLERT-PEREIRA; ESLABÃO, 2020). No Sul do Brasil há o predomínio de butiazais da espécie *Butia odorata* (BESKOW *et al.*, 2015; HOFFMANN *et al.*, 2014). Essa espécie produz frutos denominados de butiás, ricos em compostos bioativos, como os compostos fenólicos, o ácido ascórbico e os carotenoides (BESKOW *et al.*, 2015; BUTTOW, 2008). Os frutos geralmente são consumidos *in natura* e a polpa utilizada em produtos alimentícios, como licor, néctar e sorvetes (CRUXEN *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2017; HOFFMANN *et al.*, 2017a). Por outro lado, são escassos os trabalhos com folhas, sementes e caroços (CRUZ *et al.*, 2017).

Das folhas mais estudadas, dois exemplos são emblemáticos, um no contexto mundial, o chá (*Camelia sinensis*), outro no contexto brasileiro, a erva mate (*Ilex paraguariensis*). Essas folhas e suas infusões estão entre as mais estudadas, e possuem ação antioxidante, antiproliferativa (SANTOS *et al.*, 2018), antibacteriana (LI *et al.*, 2019), antiviral (NANCE; SIWAK; SHEARER, 2009), anti-inflamatória, antidiabética, neuroprotetora, anticâncer (SANLIER; GOKCEN; ALTUĞ, 2018) e antidiarreica (RATNASOORIYA; FERNANDO, 2009). O chá e o mate são normalmente consumidos como infusões aquosas (IA) e, portanto, os benefícios associados ao consumo são derivados dos compostos polares que podem ser

extraídos em água aquecida (SANTOS *et al.*, 2018). Diferentes solventes com polaridades distintas podem melhorar os rendimentos de extração dos componentes bioativos (UOONLUE; MUANGRAT, 2018). No entanto, a escolha do solvente também é limitada pela toxicidade, sobretudo quando se projeta usos futuros dos extratos obtidos. Assim, a etapa de obtenção de extratos é sempre relevante (VIGANÓ *et al.*, 2016). De modo geral, há que se definir os solventes e otimizar as condições de extração (volume de solvente para proporção de massa, tempo, temperatura, pressão), que levam à extração, de modo a se terem incrementos quantitativos e/ou qualitativos (CVETANOVIĆ *et al.*, 2018). A extração por líquido pressurizado (PLE) é um método que usa de forma eficiente solventes que são "geralmente reconhecidos como seguros" (GRAS), como etanol e água, em condições de alta temperatura e pressão, proporcionando altos rendimentos de extração em relativamente curto espaço de tempo (MACHADO; PASQUEL-REÁTEGUI; BARBERO; MARTÍNEZ, 2015).

É nessa perspectiva que esse projeto se insere. O estudo I trata de obtenção e caracterização dos extratos de folhas de araçazeiro e butiazeiro; e, o estudo II trata da prospecção de propriedades desses extratos. Esse trabalho faz parte de uma proposta de projeto em consórcio juntamente com a doutoranda Lucíola Bagatini, do PPGCTA-UFPel, em que o objetivo principal foi obter e caracterizar quimicamente extratos de folhas quatro espécies vegetais, sendo elas: folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum*), butiazeiro (*Butia odorata*), guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) e pitangueira (*Eugenia uniflora*), e prospectar as atividades antioxidantes, antibacterianas e alelopatias das mesmas. Nesse documento são apresentados os resultados referentes às folhas de araçazeiro e butiazeiro.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil fitoquímico de extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum*) e de butiazeiro (*Butia odorata*), e avaliar as propriedades antioxidantes e antibacterianas.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Obter extratos a partir de folhas de araçazeiro e butiazeiro, através dos métodos de extração por AI e PLE, com a utilização de solventes polares como água, mistura de água e etanol, e etanol;
- 2) caracterizar quimicamente os extratos polares obtidos por AI e PLE, por técnica LC-MS/MS;
- 3) avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos.

3 Hipótese

Essa Tese é uma pesquisa tipicamente descritiva e de bioprospecção, em que, no primeiro momento (etapa de projeto), a emissão de hipótese não era pertinente, tendo em vista que não se tinha, a priori, uma potencial explicação para um fenômeno, tampouco 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.

A partir da análise química dos extratos, há pertinência para a emissão de hipóteses: 1) pela riqueza em compostos fitoquímicos dos extratos obtidos se esperam atividades biológicas, com destaque para a antioxidante; 2) extratos obtidos por PLE usando uma combinação 1:1 (v/v) de água e etanol proporcionam uma maior diversidade de compostos bioativos do que o uso de cada solvente isoladamente ou do que o AI; e, 3) devido à maior diversidade e abundância de compostos químicos, o extrato de PLE-W:E proporciona maior atividade antioxidante e antibacteriana.

4 Revisão bibliográfica

4.1 Espécies nativas da flora brasileira

O Brasil é o país que possui a maior diversidade e variabilidade genética de espécies vegetais do planeta, com cerca de 46.500 espécies identificadas. Isso ocorre devido as condições climáticas e geográficas, que são favoráveis para a amplitude da biodiversidade de plantas nativas, que constituem 20% das espécies do planeta e que estão distribuídas em seis principais biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampa (CORADIN; SIMINSKI, REIS, 2011; MEDINA *et al.*, 2011; REISSIG; ROMBALDI, 2017) (Figura 1).

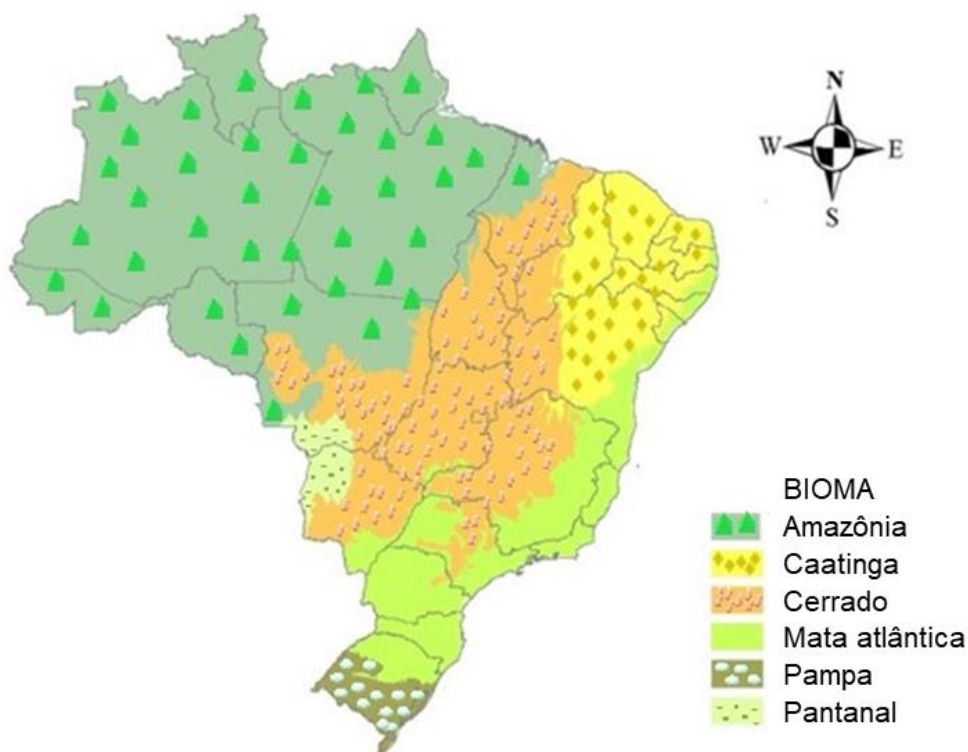


Figura 1 - Biomas brasileiros

Fonte: Adaptado de Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (BRASIL, 2004)

Dentre esses biomas, a Amazônia é o maior, ocupando cerca de 49% do território nacional, com área de 4.196.943 km² (BRASIL, 2004; IBF, 2020), abrangendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e parte do território do Maranhão, Mato Grosso, Rondônia e Tocantins (IBF, 2020), e é constituída

principalmente por floresta tropical, formada por vegetação de matas de terra firme, matas de várzea e matas de igapó, com clima equatorial úmido, com temperaturas variando de 22 a 28 °C (IBF, 2020). Esse bioma possui espécies que, atualmente, são reconhecidas internacionalmente e são de amplo consumo como é o caso do guaraná (*Paullinia cupana*), açaí (*Euterpe oleracea*), castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (BRANDÃO; SOUZA, 2016).

No contexto regional, o Pampa é o bioma que se restringe a 2% do território nacional, com 176.496 km² e estende-se ao Uruguai e parte da Argentina e representa o segundo menor bioma brasileiro (BRASIL, 2004). É constituído principalmente por vegetação campestre (gramíneas, herbáceas e algumas árvores), de clima temperado e com temperaturas médias de 18°C (IBF, 2020). Entre as espécies botânicas presentes nesse bioma, a família das Myrtaceae apresenta uma ampla variedade de espécies frutíferas com interesse científico, alguns exemplos de espécies dessa família presente em diversos biomas brasileiros, pode ser citado o araçazeiro (*Psidium cattleianum*), a pitangueira (*Eugenia uniflora*), a goiabeira (*Psidium guajava*), a jabuticabeira (*Plinia cauliflora*), o camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia*), o jamboleiro (*Syzygium cumini*), a uvaieira (*Eugenia pyriformis*) e a cerejeira-do-rio-grande (*Eugenia involucrata*) (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011; LORENZI *et al.*, 2006). Essas espécies são frutíferas, que apresentam frutos com aspectos sensoriais e nutricionais com potencialidade para domesticação e exploração (SCHIASSI *et al.*, 2018), e apresentaram alto potencial de desenvolvimento de novas opções tanto no âmbito alimentício como de produtos medicinais (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Em contrapartida, ainda não são domesticadas, o que limita a utilização e valorização comercial (DENARDIN *et al.*, 2015; MEDINA *et al.*, 2011).

Na Região Sul do Brasil, essas espécies são utilizadas numa condição de extrativismo de subsistência e sua exploração é limitada por legislação ambiental (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011; HOFFMANN *et al.*, 2014). Seu emprego em escala produtiva comercial passa pelo estabelecimento do seu potencial funcional e nutricional, além do desenvolvimento de técnicas de propagação e manejo fitotécnico (BESKOW *et al.*, 2015; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

4.1.2 Araçazeiro (*Psidium* spp.)

O gênero *Psidium* pertencente à família Myrtaceae e é composto por cerca de 3.800 espécies das quais 150 são árvores ou arbustos frutíferos (FRANZON *et al.*, 2009; SCUR *et al.*, 2016). Dentre as espécies de *Psidium*, destaca-se do ponto de vista comercial, principalmente o *Psidium cattleianum* Sabine, que é amplamente conhecida e com aceitação pelos consumidores (FRANZON *et al.*, 2009) (Figura 2).



Figura 2 – Araçás amarelos (Seleção da Embrapa Clima Temperado). A) Folhas de araçazeiro; B) Araçá (fruto)

Foto: A) Giovana Paula Zandoná (2018); B) Rodrigo Franzon (2017)

Psidium cattleianum Sabine é uma espécie de ocorrência nos biomas de Mata Atlântica, Cerrado e Pampa (RODRIGUEZ *et al.*, 2016), estando presente desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, e apresenta ampla variabilidade genética e fenotípica, adaptada a variadas condições de solo e clima, é utilizada na recuperação de áreas desmatadas da Mata Atlântica (HISTER; TRAPP; TEDESCO, 2016; RODRIGUEZ *et al.*, 2016). Além disso, trata-se de uma espécie com potencial ornamental/paisagístico, por ter boa aparência, folhas com alterações de coloração, floração que vai do esbranquiçado ao levemente rosado, e produtora de frutos que vão do amarelado ao roxo (RODRIGUEZ *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016). A espécie caracteriza-se por ser uma árvore frutífera de pequeno porte (1 a 4 m), com frutos com diâmetros de 2,2 a 5 cm, com forma ovoide ou oblonga, com elevado número de sementes e peso de até 20 g (PEREIRA *et al.*, 2018). As folhas são simples e opostas, com típica venação broquidódroma e flores solitárias (FRANZON *et al.*, 2009). Os frutos apresentam polpa suculenta, com sabor doce-ácido (FRANZON *et al.*, 2009; MEDINA *et al.*, 2011), sendo muito apreciados pela população local onde normalmente são consumidos *in natura*

ou processados como sucos, geleias, doces, sorvetes e balas (PEREIRA *et al.*, 2018; REISSIG; ROMBALDI, 2017), e são ricos em compostos com diferentes funções biológicas, como os compostos fenólicos (DE LIMA *et al.*, 2020; MEDINA *et al.*, 2011; REISSIG; ROMBALDI, 2017). Entretanto, o seu potencial econômico ainda é subutilizado, pois os frutos são consumidos pela população local, onde eles se encontram naturalmente presentes e são colhidos geralmente da vegetação nativa, ou de pequenos pomares domésticos (PATEL, 2012).

Os principais avanços agronômicos em relação a essa espécie foram a seleção de genótipos com potencial de produção comercial de frutos, o estabelecimento de tecnologias para multiplicação por enraizamento de estacas (FACHINELLO *et al.*, 1993; RASEIRA; RASEIRA, 1996), enxertia (FRANZON *et al.*, 2009), ou por propagação de sementes (RASEIRA; RASEIRA, 1996) e a formação de pomares para o estabelecimento de manejo fitotécnico e fitossanitário ideais para a cultura (FACHINELLO *et al.*, 1993; RASEIRA; RASEIRA, 1996). No Rio Grande do Sul, a Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS, lançou duas cultivares da espécie *P. cattleyanum*, uma denominada de “Ya-cy”, a qual caracteriza-se por ter frutos com epicarpo amarelo, e a outra denominada “Irapuã”, produtora de frutos com epicarpo vermelho (FRANZON *et al.*, 2009). Mesmo assim, ainda há fatores limitantes para o aumento da expressão comercial desse fruto.

Estudos de caracterização físico-química e de potencialidade biológica dessa espécie tem sido desenvolvido centrando-se em estudos com os frutos (SANDRI *et al.*, 2014) e outros em folhas (ALVARENGA *et al.*, 2013; ALVARENGA *et al.*, 2016; MOON *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018b). Entre esses estudos, alguns trabalhos fazem a caracterização geral, clássica (DE MELO; SELEGUINI; VELOSO, 2013; MEDINA *et al.*, 2011), outros fazem avaliações mais amplas, com detecção e quantificação de compostos fitoquímicos (RAMOS *et al.*, 2015; MALLMANN *et al.*, 2020), outros estudam putativas propriedades biológicas como antioxidante (MEDINA *et al.*, 2011; SCUR *et al.*, 2016), antimicrobiana (ALVARENGA *et al.*, 2016; DE LIMA *et al.*, 2020; MEDINA *et al.*, 2011; SCUR *et al.*, 2016), antiproliferativa (MEDINA *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2011), analgésica (ALVARENGA *et al.*, 2013), hipoglicemiante (CARDOSO *et al.*, 2017b; PACHECO, 2015) e neuroprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Nesses estudos, quanto à composição química dos frutos de araçás amarelos e vermelhos, Mallmann e colaboradores (2020), detectaram 51 e 50 compostos na fração de compostos citados como fenólicos extraíveis (obtido por extração exaustiva,

em que a amostra foi liofilizada e adicionada de mistura de metanol: água, numa proporção 8: 2 (v / v), acidificada com ácido fórmico e agitação em vórtex por 3 min). Na segunda fração gerada, denominada de fração de compostos fenólicos não extraíveis (compostos que permaneceram no resíduo da matriz da extração e que foram liberados por hidrólise ácida do *pellet*, gerado na extração dos compostos fenólicos extraíveis) foram detectados 43 e 45 compostos fenólicos através de análise por LC-DAD-ESI-MS/MS (MALLMANN *et al.*, 2020). Além disso, evidenciaram que apenas o ácido gálico e ácido elágico estavam presentes nas duas frações (MALLMANN *et al.*, 2020). Quanto à quantificação dos compostos fenólicos, o genótipo amarelo apresentou maior quantidade, quando comparado com o genótipo vermelho. Os compostos majoritários encontrados foram: ácido gálico, vescalagin, galato de metilo, castalagina, dímero de proantocianidina BI, catequina, hexosídeo de taxifolina, ácido vanílico, ácido elágico, derivados de catequina (MALLMANN *et al.*, 2020). A catequina foi flavonoide mais abundante encontrado nos dois genótipos de araçás (MALLMMANN *et al.*, 2020), assim como a epicatequina, o flavonoide encontrado em maior concentração em araçás por Medina *et al.* (2011). Outros estudos desenvolvidos com extratos de araçás relatam o ácido elágico e ácido gálico como principais compostos fenólicos em extratos de araçás (RIBEIRO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014). Mallmann *et al.* (2020) encontrou o ácido vanílico como o segundo e terceiro composto em maior concentração nas frações denominadas de compostos fenólicos não extraíveis, tanto do araçá amarelo, como vermelho. Esses estudos voltados à conhecimento dos compostos fitoquímicos presentes são importantes, em virtude dos possíveis benefícios que esses compostos podem ter quando inseridos na dieta humana (MALLMMANN *et al.*, 2020; MEDINA *et al.*, 2011).

Quanto aos estudos relacionados com a atividade biológica dos extratos etanoicos, os frutos de araçás apresentaram atividade antidiabética, sendo ativos quanto à inibição da alfa-glucosidase (diminuindo a glicose no sangue) (VINHOLES *et al.*, 2017); araçás vermelhos também foram capazes de inibir as enzimas alfa-glucosidase e alfa-amilase, sendo uma alternativa à modulação da hiperglicemia (PACHECO, 2015). Outra atividade que frutos de araçás apresentam é a atividade antioxidante, tendo efeitos positivos frente ao radical DPPH, ânion superóxido, hidroxila e óxido nítrico (VINHOLES *et al.*, 2017); extratos de araçás obtidos com água e com acetona também apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH e proporcionaram uma maior taxa de sobrevivência de leveduras *Saccharomyces*

cerevisiae (acima de 80%), sendo capazes de minimizar os efeitos citotóxicos induzidos por peróxido de hidrogênio (MEDINA *et al.*, 2011). Esses extratos também reduziram a proliferação de células de câncer de cólon (Caco-2) e de mama (MCF-7), apresentaram atividade antiproliferativa independentemente do genótipo (araçás amarelos e vermelhos) e do solvente de extração (água e acetona) (MEDINA *et al.*, 2011). Estudos *in vivo* com ratos resistentes a insulina, mostraram que a administração de extrato de araçá (200 mg/kg/dia, por 21 dias), obtidos através do fruto picado com casca, sem semente, adicionado de etanol e água (pH 1,0) numa proporção de 70:30 (v/v) e submetidos a processo de sonicação por 30 minutos a 25°C, impediram a peroxidação lipídica hepática e a formação de espécies reativas de oxigênio (CARDOSO *et al.*, 2017b).

Relacionado à atividade antimicrobiana, os extratos de frutos de araçás apresentam também atividade contra bactérias Gram-negativas: *Salmonella enteritidis* (MEDINA *et al.*, 2011), e Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (DE LIMA *et al.*, 2020; MCCOOK-RUSSELL *et al.*, 2012) e *Bacillus subtilis* (MCCOOK-RUSSELL *et al.*, 2012). De Lima *et al.* (2020) estudaram o mecanismo de ação do extrato hidroalcóolico de araçá contra *Staphylococcus aureus* e os resultados evidenciados foram que o extrato causou danos à membrana celular dessa bactéria, dependendo da concentração do extrato aplicado, e os danos ocorreram através da ruptura da membrana celular que ocasionou a liberação de constituintes celulares da membrana celular como proteínas, açúcares redutores e ácidos nucléicos (DE LIMA *et al.*, 2020). A liberação desses constituintes intracelulares, quando em pequena quantidade não afeta a viabilidade da bactéria, entretanto conforme for aumentando a liberação, leva a morte da bactéria (BURT, 2004). Além disso, há hipóteses de que os compostos fenólicos como o ácido gálico e ferúlico apresentam ação antimicrobiana, porém os mecanismos de ação desses compostos ainda não são totalmente esclarecidos, mas acredita-se que pode ser um dos fatores responsáveis pela ruptura da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BORGES *et al.*, 2013; DE LIMA *et al.*, 2020).

4.1.2 Butiazeiro (*Butia odorata*)

O gênero *Butia* compõe espécies de palmeira (Figura 3) pertence à família Arecaceae de ocorrência natural no Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil, esse

gênero é constituído por 20 espécies catalogadas, sendo que no Brasil há presença de 18 espécies. Dentre as espécies, a partir de revisão taxonômica, o *Butia capitata* é de ocorrência restrita do Cerrado, enquanto que no Rio Grande do Sul, oito espécies de *Butia* foram reconhecidas, sendo elas: *Butia catarinensis*, *Butia eriospatha*, *Butia exilata*, *Butia lallemantii*, *Butia odorata*, *Butia paraguayensis*, *Butia witeckii* e *Butia yatay* (HOFFMANN *et al.*, 2014). Do ponto de vista comercial, o *Butia odorata*, exclusivo do bioma Pampa, se destaca por produzir frutos com polpa doce, ácida e fibrosa, com alto teor de compostos bioativos com potencial para comercialização (CRUXEN *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2014).

Os aspectos agronômicos da palmeira de butiá caracterizam-se por possuir plantas com altura de 1 a 12 m de altura, o comprimento de cacho de 0,22 a 1,18 m, com 42 a 1.409 de frutos por cacho e produção média de 15 a 56 kg de frutos por planta (NUNES *et al.*, 2010; SCHWARTZ *et al.*, 2010). As características das folhas consistem em coloração verde-acinzentada (Figura 3.B), do tipo pinadas e arqueadas, distribuídas no topo do caule de maneira espiralada, com folíolos compridos, estreitos, lanceolados e alternos; e, bainha e pecíolo indistintos com fibras achatadas nas margens (LORENZI *et al.*, 2004). A espécie *Butia odorata* pode produzir até 53 kg de frutos por planta anualmente, totalizando 22 toneladas por hectares, com rendimento de polpa de aproximadamente 55% (BESKOW *et al.*, 2015). Em contrapartida, a produção e comercialização do butiá baseia-se pelo extrativismo, em propriedades rurais onde as plantas encontram-se naturalmente presentes. Acredita-se que as principais dificuldades encontradas para a implantação de cultivos comerciais baseiam-se na germinação lenta, desuniforme e com longos períodos de juvenildade, levando mais do que cinco anos para produzir frutos (HOFFMANN, 2014). Além disso, os butiazeiros encontram-se em áreas de proteção do Código Florestal Estadual e, portanto, têm seu manejo e exploração comerciais limitados (BESKOW *et al.*, 2015).

Apesar do potencial de comercialização do butiá ser restrito, a exploração científica e tecnológica dessa espécie pode contribuir para o estímulo do cultivo comercial. Nos últimos anos, os estudos referentes à caracterização físico-química e à potencialidades do butiá tem-se voltado para o fruto (BESKOW *et al.*, 2015, 2015; DENARDIN *et al.*, 2015; HOFFMANN *et al.*, 2017a), a polpa (HOFFMANN *et al.*, 2017b) e à semente (amêndoa) (CRUZ *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2016), sendo escassos os trabalhos com as folhas. Dentre os trabalhos, alguns englobam a caracterização geral, através da abordagem de aspectos morfológicos e físico-

químicos básicos (BESKOW *et al.*, 2015; FERRÃO *et al.*, 2013) até análises mais refinadas através da detecção e quantificação de fitoquímicos, fazendo uso de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (HOFFMANN *et al.*, 2017a), bem como dos compostos voláteis produzidos pelo fruto (AGUIAR *et al.*, 2014) também aos estudos com propriedades antioxidante e antimicrobiana (CRUZ *et al.*, 2017; PERALTA *et al.*, 2013).



Figura 3 - Palmeira de *Butia odorata*: A) Frutos de butiá; B) Folhas de butiazeiro

Foto: Giovana Paula Zandoná (2018)

4.2 Extrações de compostos

Os extratos de plantas têm sido amplamente utilizados para a purificação de compostos naturais, com potencial para aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (BELWAL *et al.*, 2018; HERRERO; SÁNCHEZ-CAMARGO; CIFUENTES; IBÁÑEZ, 2015; NASTIĆ *et al.*, 2018a; ZHAO; SALDAÑA, 2019). Para isso, são utilizadas diferentes formas de extração, as quais vão desde as mais simples

(infusão, maceração, *soxhlet*, hidrodestilação) (BELWAL *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018) até as mais sofisticadas (micro-ondas, ultrassom, fluídos supercrítico, enzimas, campo elétrico, líquido pressurizado) (BELWAL *et al.*, 2018; PLAZA; TURNER, 2015). Os métodos de extrações sólido-líquido são mais utilizados para extração de compostos bioativos, sendo classificados como “tradicionais”, os que são realizados à pressão atmosférica, e “modernos”, os métodos que permitem alterar as condições de temperatura e pressão, como é o caso da extração por fluído supercrítico e extração por líquido pressurizado (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

4.2.1 Infusões aquosas (IA)

A infusão aquosa, também conhecida por “chá”, é uma das bebidas mais antigas, e junto à água é umas das mais consumidas (FOLCH-CANO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2018). De acordo com a legislação brasileira, o chá é um produto constituído de uma ou mais partes de espécies vegetais inteiras, fragmentadas ou moídas, com ou sem fermentação, tostadas ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás, podendo ser adicionado de aroma e ou de especiaria para conferir aroma e ou sabor (BRASIL, 2005). O seu consumo regular e o aumento do consumo estão atrelados ao seu sabor, aroma, e principalmente, associado à prevenção de doenças (FOLCH-CANO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2018).

Das folhas mais consumidas e estudadas, tem-se dois exemplos simbólicos, um no contexto mundial, o chá (*Camellia sinensis*), e outro no contexto brasileiro, a erva-mate (*Ilex paraguayensis*) (ANESINI *et al.*, 2012; SANLIER; GOKCEN; ALTUĞ, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). De acordo com dados da *Food and Agriculture Organization*, referente a produção de chá, no ano de 2018, a China produziu 2.625.138 toneladas, a Índia 1.344.827 toneladas, a Quênia 492.990 toneladas, Sri Lank 303.840 toneladas, a Argentina 81.981 toneladas e o Brasil 483 toneladas (FAOSTAT, 2020). Espera-se que a produção mundial de chá aumente na próxima década, atingindo 4,4 milhões de toneladas no ano de 2027 para o chá preto e 3,6 milhões de toneladas, no ano de 2027 para o chá verde, refletindo no aumento de produção na China, Quênia e Sri Lank (FAO, 2018). Esse aumento no consumo de chás no mercado mundial também está atrelado ao público jovem, em que os chás estão passando a fazer parte de produtos da moda, que inclui chá de qualidade

gourmet, consumindo em ambientes sofisticados de lanchonetes e restaurantes, hotéis e cafés (FAO, 2018).

As folhas e infusões de *Camellia sinensis* são amplamente estudadas, em virtude das propriedades farmacológicas, como antioxidante, proteção cardiovascular, antimutagênica, antiviral, anticâncer (DU *et al.*, 2012; HAJIAGHAALIPOUR *et al.*, 2015; NANCE; SIWAK; SHEARER, 2009; SANTOS *et al.*, 2018; THAKUR; GUPTA; GUPTA, 2012), anti-inflamatórias, antidiabéticas, neuroprotetoras (SANLIER; GOKCEN; ALTUĞ, 2018). Muitas das possíveis propriedades medicinais estão atribuídas a sua composição química, com a presença de metabólitos como os ácidos fenólicos e flavonoides (BINDES *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2012; MONDAL; DE, 2018; SANTOS *et al.*, 2018). Estudos com compostos presentes nos chás demonstraram, que há correlações positivas entre concentração de catequina e a diminuição da proliferação de células causadoras de câncer de pele, do cólon, da próstata e da mama (DU *et al.*, 2012; SANLIER; GOKCEN; ALTUĞ, 2018).

Hajiaghaalipour *et al.* (2015) evidenciaram que chás de *Camellia sinensis* apresentaram alta atividade antiproliferativa contra células de câncer de cólon (HT-29), através do receptor de morte e por via apoptótica, demonstrada pelo aumento da expressão das caspases -3/7, -8 e -9, além de alta atividade antioxidante frente a cinco ensaios realizados (FRAP, DPPH, óxido nítrico, ânion superóxido e em ensaio de eliminação de radical hidroxil), e também foram evidenciadas atividades antivirais contra HIV (NANCE; SIWAK; SHEARER, 2009).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma folha consumida tradicionalmente no Brasil, em bebidas como o chimarrão (infusão a quente) e tereré (infusão a frio), a qual apresenta características semelhantes ao chá verde, e é apreciada pelas propriedades sensoriais e estimulantes (MEINHART *et al.*, 2010; STREIT *et al.*, 2007). Essa espécie é nativa da América do Sul, de ocorrência restrita ao Brasil, Paraguai e Argentina, onde as plantas encontram-se na forma nativa e cultivada (MEINHART *et al.*, 2010). No Brasil, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2018 foram produzidas 546.618 toneladas de erva-mate, ocupando uma área de 77.731 ha, com rendimento médio de 7.594 kg ha⁻¹ de folha verde (BRASIL, 2018). Desse total, o Rio Grande do Sul foi responsável por produzir, no ano de 2018, 232.971 toneladas de erva-mate, numa área destinada à colheita de 28.948 ha, com rendimento médio 10.039 kg ha⁻¹ de folha verde (BRASIL, 2018). Essa produção, ocorre em pequenas propriedades familiares com mão-de-obra familiar,

sendo que 80% do total da produção é oriunda de áreas de até 20 hectares (PENTEADO JUNIOR; GOULART, 2019), sendo o Rio Grande do Sul o estado com maior consumo da erva-mate, por ser um estado em que o chimarrão faz parte da tradição gaúcha (MALLMANN, 2018).

A erva-mate além de fazer parte da história cultural o Sul do Brasil, o seu consumo também está atrelado ao efeito estimulante (SANTOS *et al.*, 2015), por conter em sua composição cafeína, a qual é um composto que proporciona efeito estimulante ao consumidor (SANTOS *et al.*, 2015). Além disso, apresenta também diversos compostos como os ácidos 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido gálico; flavonoides como a rutina, quercetina, kaempferol e luteolina; alcalóides como a cafeína e teofilina, e saponinas (HECK; DE MEJIA, 2007; SANTOS *et al.*, 2015; DA SILVEIRA *et al.*, 2016; DA SILVEIRA *et al.*, 2017), os quais podem ser responsáveis pelas alegações biológicas e farmacológicas da erva-mate (SANTOS *et al.*, 2015), como efeito antioxidante (BOAVENTURA *et al.*, 2013; BRAVO; GOYA; LACUMBERRI, 2007), estimulante (SANTOS *et al.*, 2015), antidepressivo (REIS *et al.*, 2014), diurético e antidiabético (BOAVENTURA *et al.*, 2013).

Todavia, o perfil de compostos presentes nas folhas que podem ser obtidos a partir de infusões depende da espécie vegetal, do local de cultivo da planta, do processamento, do tamanho de partícula, das condições de armazenamento, do tempo de extração e da temperatura da água de infusão (BINDES *et al.*, 2019; ISLAM; EBIHARA, 2017). Além de que, o emprego de infusões possibilita a extração de compostos utilizando a água como solvente, que proporciona a sua aplicação em diversas áreas, principalmente, alimentícia e farmacêutica (MONDAL; DE, 2018), em decorrência que a água faz parte dos solventes seguros (VIGANÓ *et al.*, 2016) e também por ser uma condição de extração que poderia ser utilizada facilmente pelas pessoas consumidoras.

4.2.2 Extração por líquido pressurizado (PLE)

Outra técnica de extração de compostos químicos presentes em espécies vegetais é através da Extração por Líquido Pressurizado (em inglês *Pressurized Liquid Extraction* - PLE), que utiliza solventes líquidos em amplas faixas de temperatura e pressão que afetam a eficiência da extração, pois essas condições de extração

aumentam a solubilidade e as propriedades de transferência de massa (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2015; MUSTAFA; TURNER, 2011; NASTIĆ *et al.*, 2018b; PLAZA; TURNER, 2015). A extração por PLE, consiste na absorção do solvente pela matriz vegetal, o que leva ao inchamento da estrutura e a dilatação das membranas celulares e dos canais intercelulares, que faz com que os compostos existentes na matriz sejam dessorvidos, ocorrendo uma interface matriz-fluido, que proporciona a extração dos compostos, sendo afetados pelo processo de convecção (transferência de calor) (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2005; LOU; JANSSEN; CRAMERS, 1997; MACHADO *et al.*, 2015; MUSTAFA; TURNER, 2011; NASTIĆ *et al.*, 2018b; PLAZA; TURNER, 2015). Esse método faz o uso de solventes orgânicos e aquosos, os quais são submetidos a temperaturas acima do ponto de ebulição dos solventes e pressões controladas para que o solvente permaneça em estado líquido, em um ambiente fechado e inerte (MACHADO *et al.*, 2015; SÁNCHEZ-CAMARGO *et al.*, 2017). As temperaturas podem variar de 25 a 200 °C, e a pressão média fica em torno de 10,4 Mpa (1.500 *psi*) (MACHADO *et al.*, 2015; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2012).

Nas últimas décadas a extração por líquido pressurizado ganhou popularidade em virtude de apresentar vantagens por ser uma tecnologia ambientalmente limpa e segura (NASTIĆ *et al.*, 2018a), por possibilitar menor tempo de extração com menor quantidade de solventes, quando comparada com outras técnicas usuais, como por exemplo extração por *Soxhlet* e ainda por permitir a utilização de solventes como água e etanol que são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) para aplicações em alimentos (VIGANÓ *et al.*, 2016). Há também o interesse da automação dos processos de extração de compostos antioxidantes, com objetivo de produzir e comercializar como aditivos e/ou conservantes naturais para aplicação em alimentos e cosméticos (GALANAKIS; TSATALAS; GALANAKIS, 2018).

Nesse âmbito, a extração por líquido pressurizado consiste numa tecnologia inovadora de extração de compostos bioativos, que apresenta propriedades desejáveis de aplicação (JASKI *et al.*, 2019), por isso tem sido utilizada recentemente em extrações de compostos bioativos termicamente sensíveis de fontes vegetais como folhas (LEYVA-JIMÉNEZ *et al.*, 2018; XYNOS *et al.*, 2014), sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2014), frutos (ANDRADE; TRIVELLIN; FERREIRA, 2017; FEUEREISEN *et al.*, 2017; KAMALI *et al.*, 2018), cascas (LACHOS-PEREZ *et al.*, 2018), grãos (OLIVEIRA *et al.*, 2018; SETYANINGSIH *et al.*, 2016), resíduos de

processamento de frutos (GARCIA-MENDOZA *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2015; SÁNCHEZ-CAMARGO *et al.*, 2017).

Com isso, há possibilidade em desenvolver novos chás, bebidas funcionais e produtos prontos para beber. Além do desenvolvimento de novas bebidas, o estudo de infusões aquosas possibilita a pesquisa de compostos existentes nessas matrizes vegetais, que podem até mesmo serem extraídos e purificados para aplicação em produtos farmacêuticos, cosméticos e de alimentos, despertando o interesse industrial, científico e tecnológico (MONDAL; DE, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

5 Material e Métodos

A pesquisa dessa tese compreendia três fases principais: 1) obtenção do material de estudo, dos extratos por PLE e AI e caracterização química dos extratos; 2) prospecção de propriedades funcionais; e, 3) aplicações. Um esquema apresentando as fases estão apresentados na Figura 4. As ações futuras serão realizadas na sequência, por estudantes do PPGCTA e/ou em colaboração.

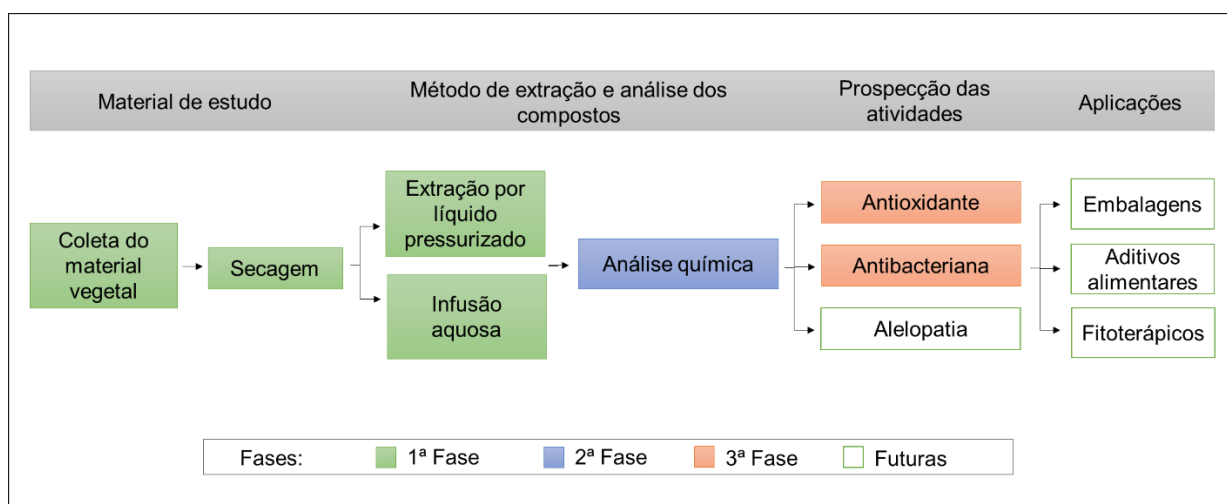


Figura 4 - Fases do projeto de tese

5.1 Etapa I: Obtenção e caracterização química dos extratos

5.1.1 Material vegetal

As folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine, da variedade com frutos amarelos, genótipo AR118) e butiazeiro (*Butia odorata*) foram coletadas nos pomares da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil, (31° 42' S, 52° 24' W, Altitude: 57 m), das 8 às 10 horas da manhã do mês de dezembro de 2017. Os genótipos foram selecionados a partir do potencial para serem lançados como cultivares. O estudo foi registrado (#A8703BA) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (Sisgen) de acordo com a regulamentação federal brasileira.

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar (Ethink Technology®), por 72 h a 40°C, e, posteriormente, foram moídas em moinho de facas (Marconi M48) com peneira de 30 *mesh*, resultando partículas de aproximadamente 0,595-0,600 mm.

As folhas secas e trituras foram armazenadas em sacos plásticos embrulhados em papel alumínio a -20°C.

5.1.2 Delineamento experimental

Os tratamentos realizados na etapa I e as variáveis independentes e dependentes estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Delineamento experimental da etapa I

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Matéria-prima	Método de extração	
1	Folha de araçazeiro	AI	Caracterização química dos extratos (LC-MS/MS)
2			
3			
...	Folha de butiazeiro	PLE-W	Compostos fenólicos e flavonoides individuais (LC-MS/MS)
5		PLE-W:E	
6		PLE-E	
7			
8			

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.

5.1.3 Obtenção dos extratos por AI e PLE

As folhas secas e moídas foram extraídas por infusão aquosa (AI) na proporção de 1:50 (m/v), a 80°C por 10 min (SANTOS *et al.*, 2018) e extração por líquido pressurizado (PLE) usando 15 g de amostra e água (PLE-W), etanol (PLE-E) e uma combinação de 1:1 de água e etanol (v/v) (PLE-W:E), a 1500 *psi*, 50°C, e fluxo de solvente de 2 mL s⁻¹ (JACQUES *et al.*, 2008). Após a extração por PLE, os extratos PLE-W:E e PLE-E foram secos em estufa a vácuo (modelo Quimis Q819V2), a 50°C

até peso constante. Os extratos PLE-W e PLE-W:E foram posteriormente liofilizados e armazenados em frascos âmbar (-60°C).

A massa total acumulada do extrato (g) foi realizada medindo-se a quantidade de extrato seco total nos pontos: 1, 3, 5, 9, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 120 e 180 minutos. As curvas cinéticas foram construídas traçando a massa acumulada do extrato (g) pelo tempo de extração (Figura 7). O processo de extração foi 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 da extração por AI e PLE e a figura 6 o equipamento de extração por PLE utilizado nesse trabalho.

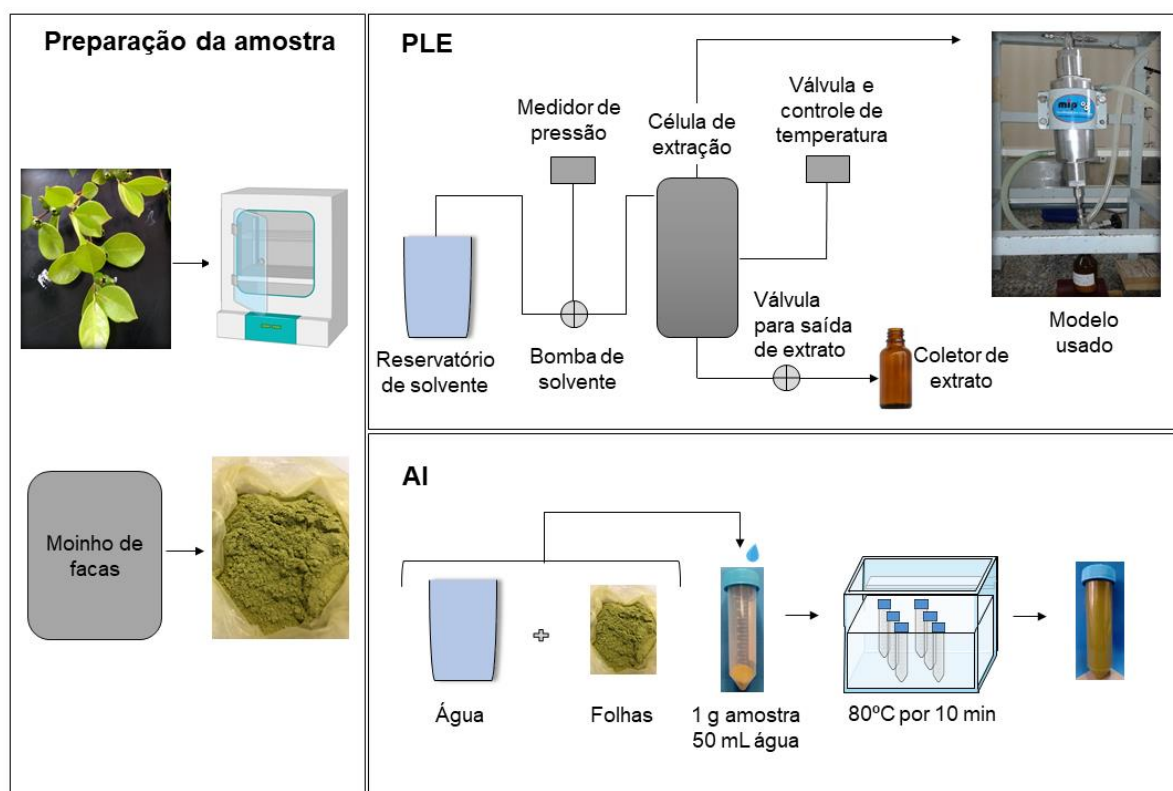


Figura 5 - Diagrama esquemático de obtenção de infusão aquosa e extração por líquido pressurizado



Figura 6 - Equipamento de extração por líquido pressurizado, URI

Foto: Lucíola Bagatini (2018)

5.1.4 Caracterização química dos extratos

100 mg de extrato seco/liofilizado 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 °C. Antes da injeção, os extratos foram diluídos com água acidificada/acetonitrila 9:1 até 30 mg mL⁻¹ (utilizando a solução de água/acetonitrila descrita anteriormente) e filtrados através de um filtro de seringa de náilon de 0,22 µm para posterior injeção. Foi adicionada reserpina na concentração final de 2 µg mL⁻¹ em cada amostra, como um padrão interno. Foram injetados 10 µL da amostra diluída (três injeções de cada *vial* para cada extrato) cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de vóo) (Maxis Impact, BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha). Para a separação cromatográfica foi utilizada 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 40 °C.

O espectrômetro de massas foi operado nos modos de ionização ESI negativo 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 (N₂) 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, com as seguintes energias de colisão: 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 usando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A anotação dos compostos foi realizada por comparação com espectro de massas (MS e MSn), perfil isotópico e comparação de fragmentos de íons detectados com bancos de dados online FooDB Version 1.0 (<https://foodb.ca/>) e Metlin™ (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage). Dependendo dos níveis de evidencia disponíveis, os compostos foram apresentados como compostos identificados, compostos putativamente identificados pela classe, compostos putativamente identificados e compostos não identificados (SUMNER *et al.*, 2007).

Para a análise quantitativa, foi realizada uma curva de calibração para cada composto fenólico com padrão comercial disponível, sendo eles: ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, ácido elágico, ácido ferúlico, (+)-catequina, miricetina, luteolina, quercetina e kaempferol, na concentração de 0,039 a 10 µg mL⁻¹. Os resultados foram expressos em µg g⁻¹ como uma média ± erro padrão da média de três injeções. Para os compostos fenólicos das folhas de araçazeiro para os quais não havia padrão comercial disponível, a quantificação foi realizada usando a área dos compostos de estrutura química semelhante e os resultados expressos como média ± erro padrão de três injeções.

A caracterização química dos extratos foi realizada no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da UFPel – RS.

5.2 Etapa II: Avaliação de propriedades biológicas

Na etapa II foram realizadas as análises de atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos, conforme delineamento experimental apresentado na Tabela 2.

5.2.1 Delineamento experimental

Tabela 2 - Delineamento experimental da etapa II

Tratamentos	Variáveis independentes	Variáveis dependentes
	Matéria-prima	
1	Folha de araçazeiro (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E)	Atividade antioxidante
2		TBARS
3		ROS
...		Levedura
6	Folha de butiazeiro (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E)	Atividade antibacteriana
7		Disco de difusão em ágar
8		Concentração inibitória mínima

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.

5.2.2 Atividade antioxidante

5.2.2.1 Em modelo de cérebro de ratos

Para a análise antioxidante em modelo de cérebro de ratos foram utilizados Ratos *Wistar* machos (35 dias de idade), mantidos sob temperatura, umidade e iluminação constantes, com ração e água *ad libitum*. Todo o protocolo experimental foi previamente aceito pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição (CEEA 5747-2015) e realizado com o Guia do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Os ratos foram sacrificados por decapitação e os cérebros foram

dissecados (imediatamente após serem sacrificados) e homogeneizados em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7,4) contendo KCl (140 mM, 1:10, p / v).

O material homogeneizado foi centrifugado a 800 g por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante foi usado para as mensurações bioquímicas. 10 µL de peróxido de hidrogênio (5 mM) e 5 µL de sulfato ferroso (20 µM) foram adicionados a 225 µL de cérebro para induzir o dano oxidativo (IC: controle induzido). Posteriormente, 10 µL de diferentes concentrações de extratos de cada espécie vegetal (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E, nas concentrações de 25, 50, 100 e 250 µg mL⁻¹) foram adicionadas à mistura e incubadas durante 1 h a 37°C. O ácido ascórbico (AA) a 100 µM foi usado como antioxidante padrão. As 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 nmol TBARS mg⁻¹ proteína (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 (C: 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.

As análises antioxidantes em modelo animal foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores, do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, da UFPel – RS.

5.2.2.2 Em leveduras

Para a atividade antioxidante também foram determinadas usando células eucarióticas de 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 dessa cepa foi mantido em meio de cultura sólido contendo extrato de levedura (1% p/v), glicose (2% p/v), peptona (2 % p/v) e ágar (2% p/v) (YPD). As células foram então transferidas para um meio de cultura líquido (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 tratadas com extratos de folhas de araçazeiro (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E) diluídos em 25, 50, 100, 250 e 500 µg mL⁻¹ (extrato: água) e incubou-se durante 1 hora a 28°C, sob agitação

constante no escuro. As células foram então centrifugadas (2000 *g*, a 28°C por 5 min) e lavadas, duas vezes, com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v). Posteriormente, as células foram tratadas com solução de peróxido de hidrogênio (50 mM), por 1 h a 28°C, e as amostras foram diluídas com solução de cloreto de sódio (0,9% p/v) e cultivadas em meio de cultura YPD e incubadas a 28°C 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 controles foram cultivadas em meio de cultura sem tratamento com peróxido de hidrogênio (C), com tratamento com peróxido de hidrogênio (IC), e com ácido ascórbico (AA) a 100 µg mL⁻¹, quercetina (Q) a 100 µg mL⁻¹ e kaempferol (K) a 100 µg mL⁻¹ foram usados como controles positivos, pela sua alta capacidade antioxidante (FU *et al.*, 2001).

5.2.3 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos foi determinada usando o método de Espectro de Ação por Disco de Difusão em Ágar e por Concentração Inibitória Mínima (MIC) (OSTROSKY *et al.*, 2008). A atividade antibacteriana foi testada em bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Enterococcus faecalis* FAIR (E77) e *Enterococcus faecium* FAIR (E178), e em bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 e *Shigella flexeri* ATCC1202. As bactérias foram escolhidas em virtude de apresentarem importância na ciência e segurança de alimentos e pelas características estruturais das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

As culturas bacterianas foram incubadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 36 °C *overnight*. 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 placas e, em seguida, três discos de papel de filtro estéril de 6 mm de diâmetro foram adicionados a cada placa e cobertos com 10 µL de extratos diluídos em água destilada (1 mg mL⁻¹). O diâmetro do halo de inibição da multiplicação bacteriana foi medido e o resultado expresso em milímetros (mm), após 48 horas de incubação.

Os extratos que apresentaram atividade antibacteriana no teste de Espectro de Disco de Difusão em Ágar, promovendo um halo de inibição de crescimento superior a 10 mm, foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra cada bactéria acima citada. A CIM foi estabelecida como a menor concentração de extrato, que inibiu a multiplicação bacteriana após o período de incubação.

As análises antibacterianas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da UDESC – SC.

5.3 Desenho experimental e análise estatística

O experimento foi realizado a partir da coleta de folhas de um acesso. A partir das folhas secas e moídas, fracionou-se o *pool* em 12 porções (3 para cada condição de extração). As variáveis dependentes foram avaliadas em triplicata.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=3$) e foram testados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$ usando o *software* SAS versão 8.0 (SAS, Cary, NC). Para a análise estatística de TBARS e ROS foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Para avaliar o efeito geral dos tratamentos, com intuito de explorar o conjunto de dados e visualizar as diferenças entre os tratamentos a Análise Estatística Multivariada (Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais - PLS-DA, do inglês *The Partial Least Squares - Discriminant Analysis - PLS-DA*), foi realizada na caracterização química da análise por HPLC-MS (usando o valor da área de cada composto), com a seleção dos métodos: Normalização em linha: Normalização por soma constante; Transformação de dados: N/A; Escalonamento de dados: Escalonamento automático, usando *software* MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

A representação do *Heatmap* foi utilizada para estimar a expressão dos compostos entre as amostras (a escala utilizada corresponde à área dos compostos) usando *software* Mev 4.8.1 (<http://mev.tm4.org/>), baseado na análise estatística (ANOVA e teste de Tukey, $p \leq 0,05$ utilizando o *software* SAS versão 8.0) (SAS, Cary, NC). Diagrama de Venn para os compostos fitoquímico foi realizado para analisar os compostos em comum entre os extratos, utilizando a ferramenta online Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) (OLIVEIROS, 2015).

6 Resultados

6.1 Extratos de folhas de araçazeiro

6.1.1 Caracterização química dos extratos de folhas de araçazeiro

Como descritos em material e métodos, são quatro os extratos do estudo, um obtido por infusão aquosa (AI) clássica e 3 por PLE, alterando-se os solventes (água, etanol e água: etanol). Para as extrações obtidas por PLE, foram construídas as curvas de cinéticas a partir do rendimento percentual acumulado do extrato (g extrato / 100 g de folhas secas) em diferentes tempos de extração (Figura 7). A partir de 15 g de material seco, em 180 min de extração, a massa total obtida foi, em média, 5,7 g de extrato seco (Figura 7), o que representa 40% do potencial máximo de extração. Em 60 min de extração foi obtida uma média de 3,6 g de massa de extrato acumulada. Isso indica que para todos os três solventes usados após 60 min de extração, uma média de 60% do total de massa do extrato foi obtida. Além disso, 60 minutos de extração resultam em economia de energia de 65% em comparação com 180 min. Essa é a condição que foi retida para a continuidade dos trabalhos de tentativa de identificação e quantificação dos compostos e para os ensaios de atividade antioxidante e antibacteriana.

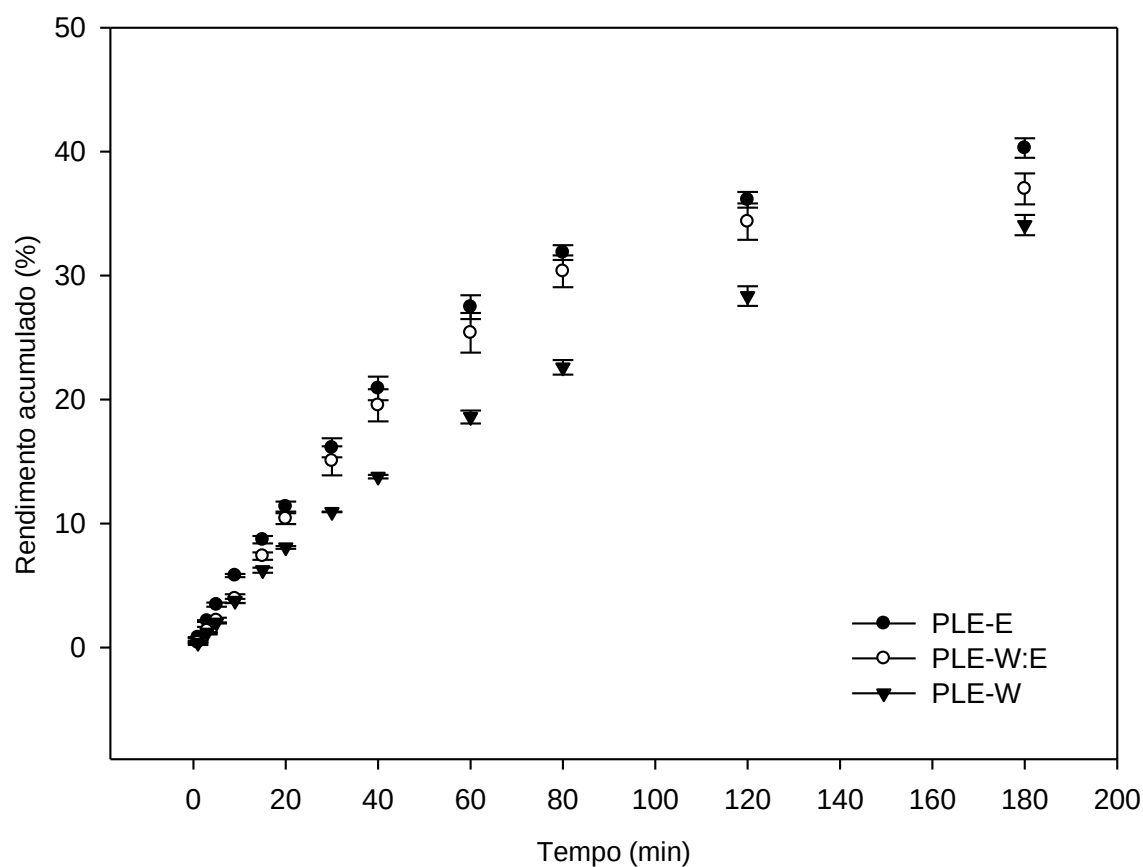


Figura 7 - Cinética de extração por PLE para as folhas de araçazeiro

Os extratos das folhas de araçazeiro foram avaliados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, no modo de ionização negativo, sendo esse modo eficiente para avaliar os compostos com funções ácidas, como os ácidos carboxílicos e fenólicos, onde ocorre a desprotonação dos compostos (CROTTI *et al.*, 2006). Dessa avaliação, houve variação na quantidade de íons detectados nesse modo de ionização em função do tipo de extrato (maior número de *features* no PLE-W:E) (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantidade de compostos totais de extratos obtidos AI e PLE de folhas de araçazeiro através de análise por LC-ESI-qTOF-MS no modo de ionização negativo

Material vegetal	Extratos	Nº total de <i>features</i> [M ⁺ H ⁺]
Folha de araçazeiro	AI	38
Folha de araçazeiro	PLE-W	77
Folha de araçazeiro	PLE-W:E	81
Folha de araçazeiro	PLE-E	68

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.

A partir do cromatograma de íons totais no modo de ionização negativo por LC-ESI-qTOF/MS para os extratos de folha de araçazeiro é possível observar que há diferenças no perfil de compostos em função do solvente extrator (Figura 8).

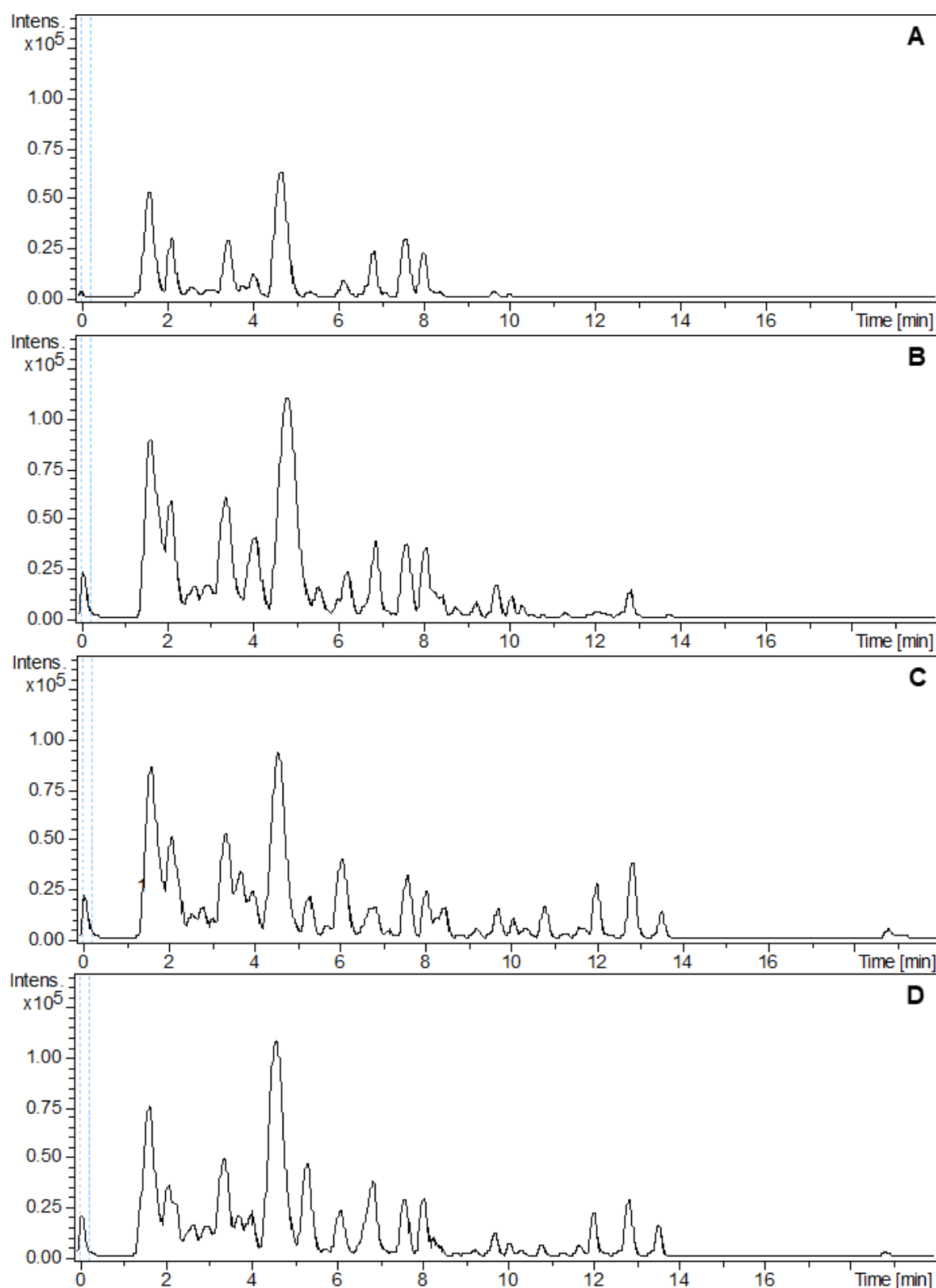


Figura 8 - Cromatograma de íons totais no modo de ionização negativo por LC-ESI-qTOF/MS para os extratos de folha de araçazeiro: A) AI, B) PLE-W, C) PLE-W:E, D) PLE-E

Concentração do extrato injetada: AI 20 mg mL⁻¹; PLE-W, PLE-W:E e PLE-E 30 mg mL⁻¹; volume de injeção: 10 µL.

A análise química dos compostos (análise não-direcionada) de cada extrato revelou que, entre os extratos de PLE, aquele contendo água e etanol apresentou uma maior diversidade de compostos, com maior número de compostos que os extratos aquosos e a infusão aquosa, essa última a que apresentou menor quantidade de compostos. Uma investigação abrangente de todos os compostos em cada amostra permitiu a identificação de vários compostos pertencentes às seguintes classes: ácidos fenólicos (glicosídeos, benzoico), flavonoides (glicosídeos, catequinas, metilados, poliflavonoides e isoflavonoides), taninos (hidrolisáveis), carboidratos, entre outros (Tabela 4). Os flavonoides foram os compostos mais abundantes encontrados em termos de número de compostos, incluindo catequinas, poliflavonóis, flavonoides metilados, flavonoides glicosilados, flavonas e isoflavonoides.

Dos ácidos fenólicos quantificados a partir da curva de calibração de cada composto, observou-se que, independentemente do solvente utilizado, o ácido vanílico foi o composto majoritário em todos os extratos de folhas de araçazeiro ($2.326,92 \mu\text{g g}^{-1}$ para PLE-W a $28,20 \mu\text{g g}^{-1}$ para AI) (Tabela 5). Na sequência, os ácidos fenólicos encontrados em maiores concentrações foram o ácido siríngico e o ácido gálico no PLE-W:E ($256,37$ e $111,27 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). De maneira geral, esses foram os ácidos fenólicos encontrados em concentrações mais elevadas em todos os extratos foliares do araçazeiro. Dentre os compostos encontrados em menor concentração foram o ácido 4-hidroxibenzóico no extrato obtido por PLE-W ($52,34 \mu\text{g g}^{-1}$) e no PLE-W:E ($51,71 \mu\text{g g}^{-1}$), o ácido elágico e ácido clorogênico no PLW-W:E ($11,84$ e $6,22 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) e o ácido cafeico no PLE-E ($7,41 \mu\text{g g}^{-1}$) (Tabela 5).

Para os flavonoides, a catequina foi o composto que esteve presente em maior concentração em todos os extratos de folhas de araçazeiro, sendo que a maior concentração é no PLE-W ($1.999,78 \mu\text{g g}^{-1}$) e a menor concentração no AI ($37,26 \mu\text{g g}^{-1}$). Em menores quantidades foram detectados a miricetina no PLE-E ($4,58 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido quercetina, kaempferol e luteolina para PLE-W:E ($17,43$, $3,51$ e $1,32 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 4 - Compostos putativamente identificados em extratos polares de folhas de araçazeiro

Número do pico	Rt (min)	Classe	Composto	Fórmula química	[M-H] ⁻ medida	Fragmentos	mSigma	Ocorrência			
								Al	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
Ácidos fenólicos											
8	2,3	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169,0139	125,0241 (100) 169,0138 (6,4)	16,5	+	+	+	+
21	5,0	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido 4-Hidroxibenzóico	C ₇ H ₆ O ₃	137,0235		2,6	+	+	+	+
22	5,1	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0865		36,5	+	+	+	+
24	5,4	Ácido hidroxibenzóico	*Vanillic acid 4-beta-D-glucoside	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329,088		51,0	+	+	-	-
26	5,6	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	167,0345		18,4	+	+	+	+
45	7,2	Ácido hidroifenilpropanóico	*Ácido diidroferúlico 4-glucuronídeo	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371,0976		52,3	+	+	+	+
47	7,5	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido sirínico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0452		21,5	-	-	+	+
48	7,6	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9984		23,3	+	+	+	+
37	6,5	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	179,0326		13,9	-	+	+	+
68	9,6	Ácido hidroxibenzóico	* Ácido hidroxiisofáltico	C ₈ H ₆ O ₅	181,0134		23,3	-	-	-	+
Flavonoides											
10	2,7	Flavanols	*Galocatequina; Epigalocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0664		50,4	+	+	+	+
19	4,6	Flavanols	**(+)-Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0712	109,0291 (100) 125,0237 (67,3) 123,0446 (62,6) 203,0706 (51,1)	13,6	+	+	+	+
25	5,4	Flavanols	* Epigalocatequina; Galocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0694		57,2	-	+	+	+
28	5,9	Flavonoides metilados	* 8- Demetiltimonina	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	347,0764		33,7	-	-	+	+
30	5,9	Fenólico glicosilado ou Flavanols	*3'-(2"-Galoilglucosil) - floroacetofenona; Epigalocatequina 7-glucuronídeo	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₃	481,0988		39,2	-	-	-	+
33	6,3	Fenólico glicosilado ou Flavanols	*3'-(2"- Galoilglucosil) - floroacetofenona; Epigalocatequina 7-glucuronídeo	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₃	481,0991		49,4	-	-	-	+
35	6,4	Fenólico glicosilado	*Neocretanina; Castamollissin	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃	467,0828		43,2	-	+	+	+
42	6,9	Flavonoide glicosilado	Plantagoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	465,1038	194,9927 (100) 168,0059 (67,2) 299,9900 (63,7)	11,2	+	+	+	+
43	7,0	Fenólico glicosilado ou Flavanols	*3'-(2"-Galoilglucosil) - floroacetofenona; Epigalocatequina 7-glucuronídeo	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₃	481,0986		54,8	+	-	+	+
46	7,3	Flavanones	*Hesperetina 7-O-glucuronídeo	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1035		55,8	-	-	+	+
49	7,6	Flavanols	Quercetina 3'-glucuronídeo	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0679	301,0349 (100) 151,0029 (6,9)	50,8	+	+	+	+

Tabela 4 – Continuação

Número do pico	Rt (min)	Classe	Composto	Fórmula química	[M-H] ⁻ medida	Fragmentos	mSigma	Ocorrência			
								Al	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
Flavonoides											
50	7,9	Flavonols ou flavones	*Kaempferol 3-glucuronídeo; Luteolina 7-glucuronídeo	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0721	300,0270 (100) 301,0337 (59,8)	31,8	+	+	+	+
51	7,9	Flavonols	*Quercetina 3-arabinoóido	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0774		86,5	-	-	-	+
52	8,1	Flavonols	Quercetrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0935		46,0	+	+	+	+
53	8,2	Flavonols	**Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,0279		17,7	-	-	+	+
54	8,2	Dihidrocalcona	*Phloretin 2'-O-glucuroídeo	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449,1088		56,6	+	+	-	+
55	8,4	Flavones	Apigenina-7-O-glucosídeo (Apigetrina)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0986	301,0357 (100) 302,0392 (10,9) 463,0886 (17,4)	58,3	+	+	-	+
56	8,5	Flavonols	Spiraeoside (Quercetina 4'-glucosídeo)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0885		26,0	-	-	+	-
57	8,8	Isoflavonoides O-glicosídeo	*Afrormosin 7-glucosídeo *Pelargonidina 3-(2gluglucosil rutinosídeo);	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	459,1299		56,7	-	+	+	+
59	8,8	Antocianinas ou Flavonols	Kaempferol 3-ramnosil-(1->3)-ramnosl-(1->6)-glucosídeo	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739,2098		98,4	-	+	-	-
62	9,2	Flavonoides glicosilados	*Tectoridin; Tricin arabinoside; Hispiduloside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461,1091		53,4	-	-	-	+
63	9,2	Antocianinas ou Flavonols	*Malvidina-3-O-arabinosídeo; Peonidina 3-O-glucosídeo; Kaempferol 7-metil éter 4'-glucosídeo	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461,1087		61,5	+	+	+	-
64	9,2	Flavones	**Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0397		12,4	-	-	+	+
65	9,2	Flavonols	**Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0346		5,4	-	+	+	+
70	9,9	Flavonols	**Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0399		10,0	-	-	+	-
75	10,5	Flavonoides metilados	*5,3',4'-Trihidroxi-3-metoxi-6,7-metilenedioxiflavone	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	343,0453		92,0	-	+	+	-
76	10,6	Flavonoides metilados	*Diosmetin; Hispidulin; Kaempferide	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299,0554		89,8	-	+	+	-
78	10,9	Flavonoides metilados	*4',5-Dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavone; Sayanedin	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	297,0761		155,3	-	-	+	-
85	11,8	Flavonoides metilados	*Gardenin A	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313,0707		95,3	-	-	-	+
87	12,0	Flavonoides	8-Hidroxi-5-metoxiflavanone	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269,0814	269,0823 (100) 296,0685 (100) 311,0916 (9,4) 297,0716 (8,2)	43,0	-	+	+	+
90	12,8	Flavonoides	3',4'-Dimetoxi-7-hidroxiflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	311,0922		41,9	-	+	+	+
91	13,7	Flavonoides	*Farrerol; 5,7-Dimetoxi-4'-hidroxiflavanona	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	299,0919		32,1	-	+	-	-

Tabela 4 – Continuação

Número do pico	Rt (min)	Classe	Composto	Fórmula química	[M-H] ⁻ medida	Fragmentos	mSigma	Ocorrência			
								AI	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
Taninos											
9	2,5	Taninos hidrolisáveis	*Granatina A	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783,0685		78,6	-	+	+	+
11	2,9	Taninos hidrolisáveis	Corilagina	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633,0732	300,9984 (100) 275,0189 (14,0)	68,1	+	-	+	-
12	3,0	Taninos hidrolisáveis	*Granatina B; Sanguiin H11	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	951,0747		71,5	+	+	+	+
13	3,2	Taninos hidrolisáveis	*Granatin A	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	783,0688		82,7	+	+	+	+
14	3,5	Taninos condensados	Procianidina B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1356	289,0714 (100) 125,0238 (58,0) 407,0770 (41,7) 300,9986 (100)	34,6	+	+	+	+
15	3,7	Taninos hidrolisáveis	Telimagrandina I	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	785,0846	275,0189 (23,7) 249,0395 (20,4) 289,0715 (100)	69,5	+	+	+	+
16	4,0	Taninos condensados	Procianidina B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1359	125,0237 (94,1) 407,0769 (60,4) 161,0239 (29,7)	41,9	-	+	+	+
17	4,2	Taninos hidrolisáveis	*Sanguiin H4; Isostrictinina	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633,0733		53,1	-	-	+	+
18	4,4	Taninos condensados	Epicatequina-(4-beta-6)-epicatequina-(4-beta-8)-catequina	C ₂₇ H ₄₆ O ₃₁	865,1992	125,0238 (100) 289,0716 (59,4) 287,0559 (48,7)	34,0	-	+	+	+
20	5,0	Taninos condensados	*Epicatequina-(4-beta-6)-epicatequina-(4-beta-8)-catequina; Procianidina trémero EEC; Procianidina C1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865,1988		102,8	+	+	+	+
27	5,7	Taninos condensados	*Epicatequina-(4beta->8)-epicatequina-(4beta->8)-catequina 3"-galato	C ₅₂ H ₄₂ O ₂₂	1017,2098		99,8	+	+	+	+
31	6,1	Taninos hidrolisáveis	Telimagrandina I	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	785,0847	300,9987 (100) 275,0190 (19,8) 249,0395 (18,9)	49,0	+	-	+	-
40	6,6	Taninos	*1,4,6-Trigaloil-beta-D-glucopiranoose	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635,0888		63,1	-	-	+	-
41	6,7	Taninos condensados	Procianidina B4 3-galato	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729,1463	125,0233 (100) 289,0715 (80,6) 169,0135 (68,0)	92,2	+	+	+	+
44	7,0	Taninos condensados	*Procianidina B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1347		70,6	+	+	+	+

Tabela 4 – Continuação

Número do pico	Rt (min)	Classe	Composto	Fórmula química	[M-H] ⁻ medida	Fragmentos	mSigma	Ocorrência			
								Al	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
Outros compostos											
1	1,4	Carboidratos e carboidratos conjugados	***Carboidratos	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341,1091		76,8	+	-	-	-
2	1,5	Carboidratos e carboidratos conjugados	***Carboidratos	C ₆ H ₁₂ ClO ₆	215,0330		60,7	+	+	+	-
3	1,7	Ácido quínico	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0564	191,0561 (100) 85,0296 (6,2) 93,0350 (6,1) 169,0144 (100)	10,0	+	+	+	+
4	1,7	Ácido benzoico	2- Galoiliglicose	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331,0676	125,0248 (25,7) 151,0030 (23,8) 169,0144 (100)	44,4	-	-	-	+
6	1,9	Ácido benzoico	2- Galoiliglicose	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₁	331,0673	125,0249 (25,7) 151,0030 (23,8) 125,0242 (100) 99,0454 (69,5)	51,6	-	-	-	+
5	1,9	Ácidos carboxílicos e derivados (ácidos tricarboxílicos e derivados)	Cis-2- Metilaconitado	C ₇ H ₈ O ₆	187,0249	191,0556 (34,5) 115,0402 (20,2) 143,0346 (12,5)	19,6	+	+	+	-
7	2,1	Ácidos carboxílicos e derivados (ácidos tricarboxílicos e derivados)	Cis-2- Metilaconitado	C ₇ H ₈ O ₆	187,0247	187,0247 (100) 125,0242 (30,9)	16,3	+	+	+	+
23	5,3	Ácido orgânico	*Citrato de 1-isopropil	C ₉ H ₁₄ O ₇	233,0664	125,0236 (100) 173,0449 (89,1) 97,0290 (74,3) 99,0447 (53,0)	31,1	-	-	+	+
29	5,9	Acilos graxos (acil glicosídeos graxos)	*3-Metil-3-butenil apiosil-(1->6)-glucosídeo; Prenil arabinosil-(1->6)-glucosídeo	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₀	379,1599		83,4	-	+	-	-
32	6,2	Acilos graxos (acil glicosídeos graxos)	*ácido 2,4-Dimetil-2-pentenoico; 5-Metil-2,3-hexanodiona; ácido 4-heptenoico	C ₇ H ₁₂ O ₂	127,0759			-	-	-	+
34	6,3	Compostos organooxigênio	*Benzil 6-O-beta-D-apiofuranosil-beta-D-glucosídeo	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	401,1456		51,6	-	+	+	+
36	6,5	Acilos graxos (acil glicosídeos graxos)	*Glicosídeo do ácido 12-hidroxijasmonico	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	387,1668		49,0	+	+	-	-
38	6,5	Alcaloides and derivados	*Loquatosídeo	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₁	437,1091		98,8	-	-	-	+
39	6,6	-	Desconhecido	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	387,1660		66,9	-	-	-	+
58	8,8	-	*4,8-Dihidroxi-3-(3-metoxi-3-oxo-1-propen-2-il)-8a-metil-5-oxodecahidro-2-naphtalenil 3,4-dihidroxi-2-metilenebutanoato	C ₂₀ H ₂₈ O ₉	411,1660		50,9	-	+	-	-

Tabela 4 – Continuação

Número do pico	Rt (min)	Classe	Composto	Fórmula química	[M-H] ⁻ medida	Fragmentos	mSigma	Ocorrência			
								Al	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
60	8,9	Esteroides e derivados ou glicosídeos terpênicos	*Piceatanol 3,4'-diglicosídeo; Phloretin xilosil-galactosídeo	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	567,1725		47,7	-	+	-	-
61	9,0	Diterpenoides	*Bacatina III	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₁	585,2349		63,7	-	+	-	-
66	9,5	Esteroides e derivados ou glicosídeos terpênicos	*Momordicoside E; Passiflorato de glucosil	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₂	695,4016		103,2	-	+	+	+
67	9,5	Esteroides e derivados ou glicosídeos terpênicos	*Momordicoside E; Passiflorato de glucosil	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₂	695,4013		54,0	-	+	-	+
69	9,7	-	Desconhecido	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327,2175	211,1331 (100) 229,1438 (45,6) 327,2176 (32,1)	60,2	+	+	+	+
71	10,1	Acilos graxos (acil glicosídeos graxos)	Ácido pinélico	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2329	211,1326 (100) 229,1440 (34,5)	62,0	+	+	+	+
72	10,2	Acilos graxos (ácidos lineólicos e derivados)	*Ácido corcoriforduroso F	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327,2171		41,3	+	+	+	+
73	10,3	Ácidos orgânicos e derivados	*Ácido 3-oxododecanoico	C ₁₂ H ₂₂ O ₃	213,1488		35,8	-	+	+	+
74	10,4	Fenol lipídeos (Triterpenoides)	*Ácido medicagênico	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	501,3220		75,3	-	-	+	+
77	10,8	-	*Ácido medicagênico	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503,3382		16,7	-	-	+	+
79	10,9	Acilos graxos	*Ácido dihidrojasmonico	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	211,1330			-	+	-	-
80	11,2	Fenol lipídeos (Triterpenoides)	* Ácido actinídico	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485,3269		79,9	-	-	+	-
81	11,5	Fenol lipídeos	*Mirsinone	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	293,1753			+	+	+	-
82	11,6	Fenol lipídeos (Triterpenoides)	*Ácido Pigênico B	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3431		73,0	-	-	+	+
83	11,8	Fenol lipídeos (Triterpenoides)	* Ácido Pigênico B	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487,3430		76,8	-	-	+	-
84	11,8	Outros polifenóis	*6-Metilgingodiol	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	309,2060		40,9	-	-	+	-
86	11,9	Outros polifenóis	*6-Metilgingodiol	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	309,2062		116,2	-	+	-	-
88	12,2	Fenóis	*Acetal de vanilina 1,2-butilenoglicol; 2-Etoxi-4- (4-metil-1,3-dioxolan-2-il) fenol	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	223,0966		75,9	-	-	+	+
89	12,7	Fenois lipídeos	*Isoacitretina	C ₂₁ H ₂₆ O ₃	325,1839		74,6	-	+	-	-
92	17,3	Acilos graxos	*ácido γ-linolênico; ácido pinolênico	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	277,2167			-	-	-	+
93	18,8	-	*4,17-Dihidroxipregn-4-eno-3,20-diona 4-acetato 17-hexanoato	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	485,2906		75,8	-	-	+	+

Número do pico: os compostos foram ordenados pelo tempo de retenção; RT: tempo de retenção (minutos); mSigma: similaridade entre o padrão isotópico teórico e o experimental (quanto menor o valor de mSigma maior a similaridade entre o resultado experimental e o teórico); * compostos identificados putativamente (pelo nome do composto); ** compostos identificados (pelo padrão do composto); *** putativamente identificado pela classe; sem * compostos identificados e não identificados; + presente; - ausente.

Tabela 5 - Quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides em extratos polares de folhas de araçazeiro

Compostos	Extratos de folhas de araçazeiro							
	AI		PLE-W		PLE-W:E		PLE-E	
Ácidos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
Ácido gálico	1,20 $\pm$ 0,07	d	32,11 $\pm$ 0,54	c	111,27 $\pm$ 0,77	a	105,50 $\pm$ 0,47	b
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,90 $\pm$ 0,00	c	52,34 $\pm$ 0,59	a	51,71 $\pm$ 0,21	a	39,47 $\pm$ 0,03	b
Ácido clorogênico	0,09 $\pm$ 0,00	d	5,26 $\pm$ 0,02	b	6,22 $\pm$ 0,04	a	4,31 $\pm$ 0,00	c
Ácido vanílico	28,20 $\pm$ 0,65	c	2.326,92 $\pm$ 3,13	a	1.492,47 $\pm$ 8,08	b	1.526,94 $\pm$ 18,64	b
Ácido cafeico	nd		6,80 $\pm$ 0,01	c	7,20 $\pm$ 0,01	b	7,41 $\pm$ 0,01	a
Ácido siríngico	nd		nd		256,37 $\pm$ 1,39	a	74,59 $\pm$ 0,20	b
Ácido elágico	0,16 $\pm$ 0,00	d	4,13 $\pm$ 0,04	c	11,84 $\pm$ 0,04	a	7,97 $\pm$ 0,03	b
Total	30,55		2.427,56		1.937,05		1.766,19	
Flavonoides ($\mu\text{g g}^{-1}$)								
(+)-Catequina	37,26 $\pm$ 0,53	d	1.999,78 $\pm$ 13,36	a	1.388,69 $\pm$ 5,95	c	1.732,05 $\pm$ 8,06	b
Miricetina	nd		nd		4,39 $\pm$ 0,00	b	4,58 $\pm$ 0,01	a
Luteolina	nd		0,50 $\pm$ 0,00	c	1,32 $\pm$ 0,00	a	0,71 $\pm$ 0,01	b
Quercetina	nd		4,85 $\pm$ 0,01	c	17,43 $\pm$ 0,07	a	9,00 $\pm$ 0,05	b
Kaempferol	nd		2,86 $\pm$ 0,00	b	3,51 $\pm$ 0,00	a	2,33 $\pm$ 0,00	c
Total	37,26		2.007,99		1.415,34		1.748,67	

Valores expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$; média $\pm$ erro padrão; nd: não detectado; média seguida pela mesma letra na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 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.

6.1.1.1 Análise de HeatMap, Diagrama de Venn e PLS-DA dos extratos de folhas de araçazeiro

Para visualizar os compostos discriminatórios identificados putativamente entre os extratos, foi construído um *heatmap* baseado na análise por LC-ESI-qTOF/MS. As cores diferentes entre os blocos no *heatmap*, as quais variam do azul claro a amarelo, indicam mudança na área de um composto em cada extrato (Figura 9). Por essa análise, se evidencia que os compostos 1 e 69 (carboidrato e não identificado) discriminam o AI dos demais extratos por serem detectados exclusivamente no extrato obtido por esse método, representado pela cor amarela. Por outro lado, o composto 16 (procianidina B2), 17 (sanguin H4 ou isostrictinin), e 18 ([epicatequina-(4-beta-6)-epicatequina-(4-beta-8)-catequina]) não foram detectados no AI, representados pela cor azul (Figura 9).

Os compostos 29 (glicosídeos de ácido graxos), 58 [4,8-ihidroxi-3-(3-metoxi-3-oxo-1-propen-2-il)-8a-metil-5-oxodecahidro-2-naphthalenyl 3,4-dihidroxi-2-metileno butanoato], 59 (pelargonidina 3-(2gluglucosilrutinosídeo) ou kaempferol 3-ramnosil-(1->3)-ramnosil-(1->6)-glucosídeo), 60 (estilbeno glicosídeo ou flavonoide glicosídeo), 61 (bacatina III), 79 (ácido dihidrojasmonico), 89 (isoacitretina) e 91 estiveram exclusivamente presentes no PLE-W. O composto 43 (3'-(2"-galoilglucosil)-phloroacetophenone ou epigallocatequina 7-glucuronídeo) também se apresenta como discriminante, mas por não estar presente apenas nesse extrato. O composto 4 e 6 (2-galoilglicose), 30 e 33 (3'-(2"-galoilglucosil)-phloroacetophenone, 3'-(6"-galoilglucosil)-phloroacetophenone ou epigallocatequina 7-glucuronídeo), 32 (ácidos graxos), 38 (loquatosídeo), 39 (desconhecido), 51 (quercetina 3-arabinosídeo), 62 (tectoridina, tricina arabinosídeo ou hispidulosídeo), 85 (gardenina A) e 92 (ácido γ -linolênico ou ácido pinolênico) estão presentes somente em PLE-E (Figura 9). Os compostos 2 (carboidratos), 5 (*cis*-2-metillaconitato) não estiveram presentes somente no PLE-E. Os compostos (taninos), 56 (quercetina 4'-glucosídeo), 70 (kaempferol), 78 (flavonoides metilados), 80 e 83 (triterpenoides) e o 54 (flavonoide glicosilado) discriminou no PLE-W, por estarem presentes apenas nele, e o 55 (apigenina-7-O-glucosídeo) por não estarem presente nesse extrato.

A partir do Diagrama de Venn (Figura 10) observa-se que 26,9% dos compostos putativamente identificados eram elementos em comum entre todos os extratos (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E), e entre os extratos obtidos pela extração

com líquido pressurizado (PLE-W, PLE-W:E e PLE-E) havia 14% de compostos em comum. Entre os extratos que foram obtidos com a presença de etanol (PLE-W:E e PLE-E) 12,9% dos compostos obtidos são em comum entre eles (Figura 10). Dos compostos exclusivos de cada extrato, 12,9% fazem parte do PLE-E, 7,5% do PLE-W:E, 9,7% do PLE-W e 1,1% do AI (Figura 10). O total de compostos tentativamente identificados nos extratos foram: AI 37; PLE-W 58; PLE-W:E 66 e PLE-E 66 compostos. De modo geral, o AI apresentou a menor quantidade de compostos, quando comparada aos extratos obtidos pelo PLE.

Ainda com o objetivo de caracterizar a influência dos solventes (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E) utilizados para a obtenção dos extratos de folhas de araçazeiro, realizou-se análise multivariada (*Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais - PLS-DA e VIP Score*), na qual levou-se em consideração todos os compostos identificados putativamente no modo negativo de ionização (Figura 11). Essa abordagem é usada para discriminar ou detectar rapidamente as diferenças entre os extratos, onde todos os compostos foram identificados putativamente no modo de ionização negativa. Com essa avaliação, podemos identificar os principais compostos discriminantes entre os extratos e gerar uma projeção da importância de uma variável, conhecida como pontuação *VIP Score*. Uma variável importante é considerada significativa quando apresenta um *VIP Score* maior que 1,0 (KIM *et al.*, 2018). Dessa análise de dados, formaram-se quatro grupos (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E) (Figura 11.A), em outras palavras, a formação de diferentes grupos de compostos é dependente do método de extração (Figura 11.A). O PLS-DA explicou 57,05% de toda a variação dos dados, considerando os componentes principais 1 (PC1 36%) e 2 (PC2 34,5%).

A partir da pontuação *VIP Score*, foi possível identificar os 15 compostos mais importantes que influenciaram na diferenciação dos extratos (Figura 11.B). Os compostos são plotados no eixo y, e quanto maior a pontuação *VIP* (eixo x), maior a contribuição para a discriminação em grupo. 15 compostos identificados putativamente que tiveram uma pontuação de *VIP Score* maior que 1,0, indicando sua influência na separação dos grupos. O composto 63 (malvidina-3-O-arabinosídeo, peonidina 3-O-glucosídeo ou kaempferol 7-metil éter 4'-glucosídeo), 16 (procianidina B2), 73 (ácido 3-oxododecanóico), 18 (epicatequina-(4-beta-6)-epicatequina-(4-beta-8)-catequina), 27 (epicatequina-(4beta->8)-epicatequina-(4beta->8)-catequina-3"-galato), 25 epigalocatequina ou galocatequina), 75 (flavonoide metilado), 72 (corchorifatty acid

F), 57 (isoflavonoide *O*-glicosídeo), 26 (ácido vanílico), 50 (kaempferol 3-glucuronídeo ou luteolina 7-glucuronídeo), 14 (procianidina B1), e 2 (carboidrato) foram responsáveis pela discriminação do PLE-W, enquanto que o composto 35 (fenólico glicosilado) e 21 (ácido 4-hidroxibenzóico) foram responsáveis para o PLE-W:E. Notavelmente, dos 15 compostos discriminantes, somente um foi detectado no AI (composto 2: carboidrato), demonstrando o potencial da técnica de extração de compostos por PLE.

Apesar das diferenças qualitativas e quantitativas entre os extratos, todos apresentaram uma grande diversidade de compostos potencialmente bioativos.

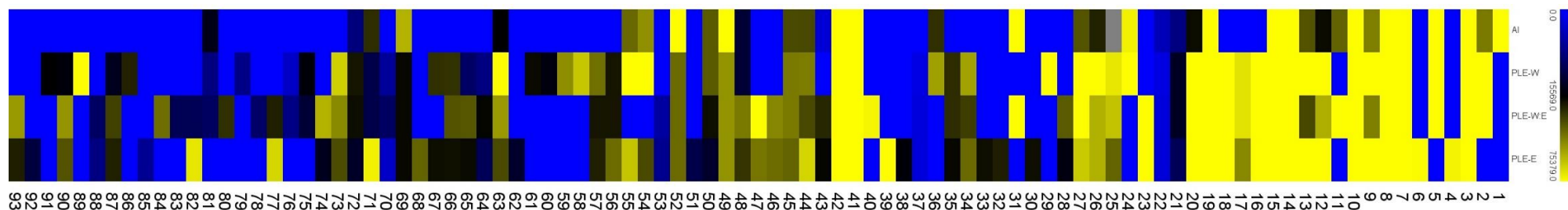


Figura 9 - HeatMap dos compostos putativamente identificados em extratos de folhas de araçazeiro

Cada linha representada uma amostra e cada coluna representa a média de área ($n=3$) de cada composto putativamente identificado, baseado na análise estatística (ANOVA e teste de Tukey $p \leq 0,05$). O azul claro representa menores áreas e o amarelo representa maiores áreas. Os números dos picos correspondem aos números da Tabela 4. 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.

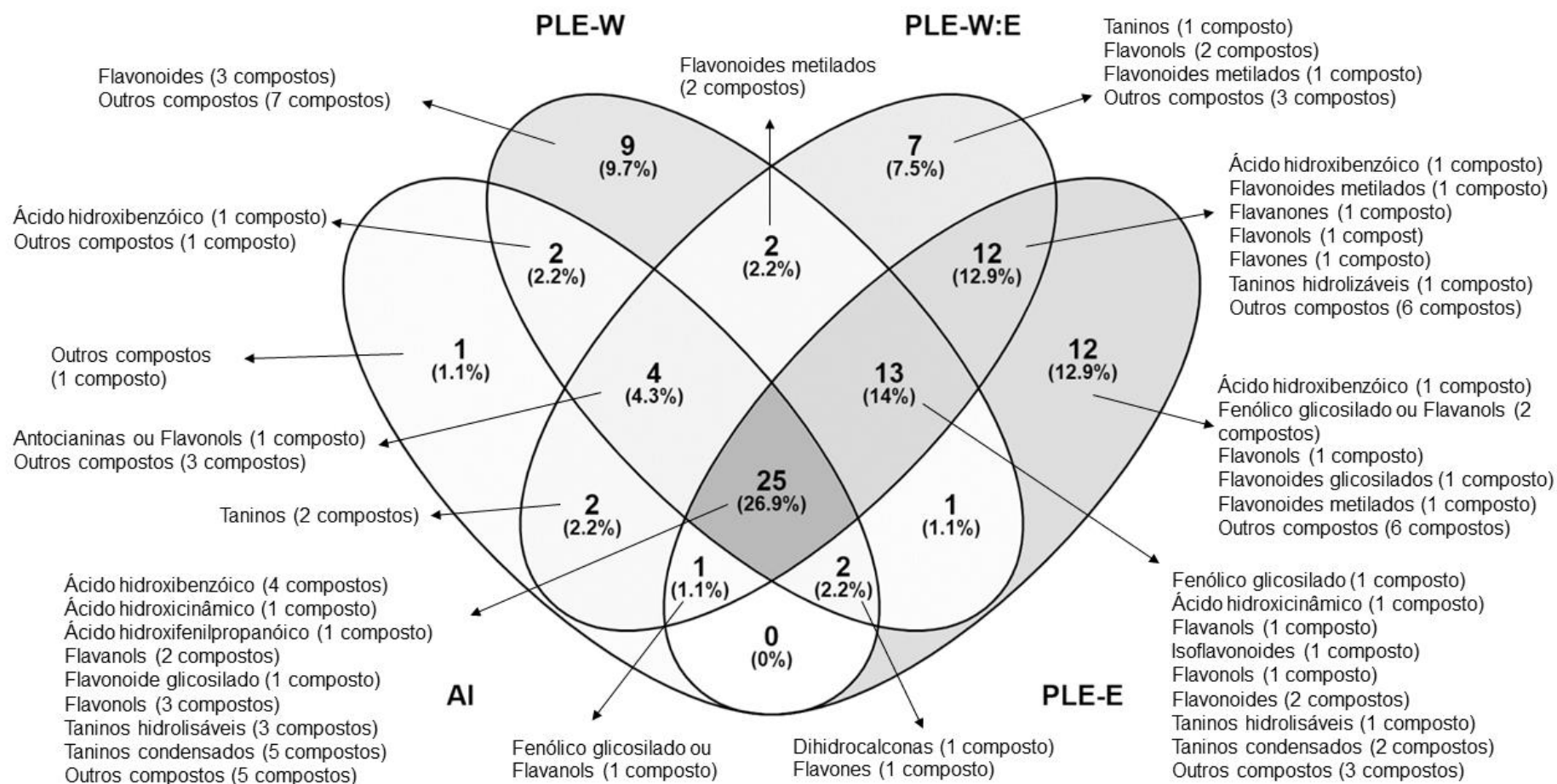


Figura 10 - Diagrama de Venn para os extratos de folhas de araçazeiro

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.

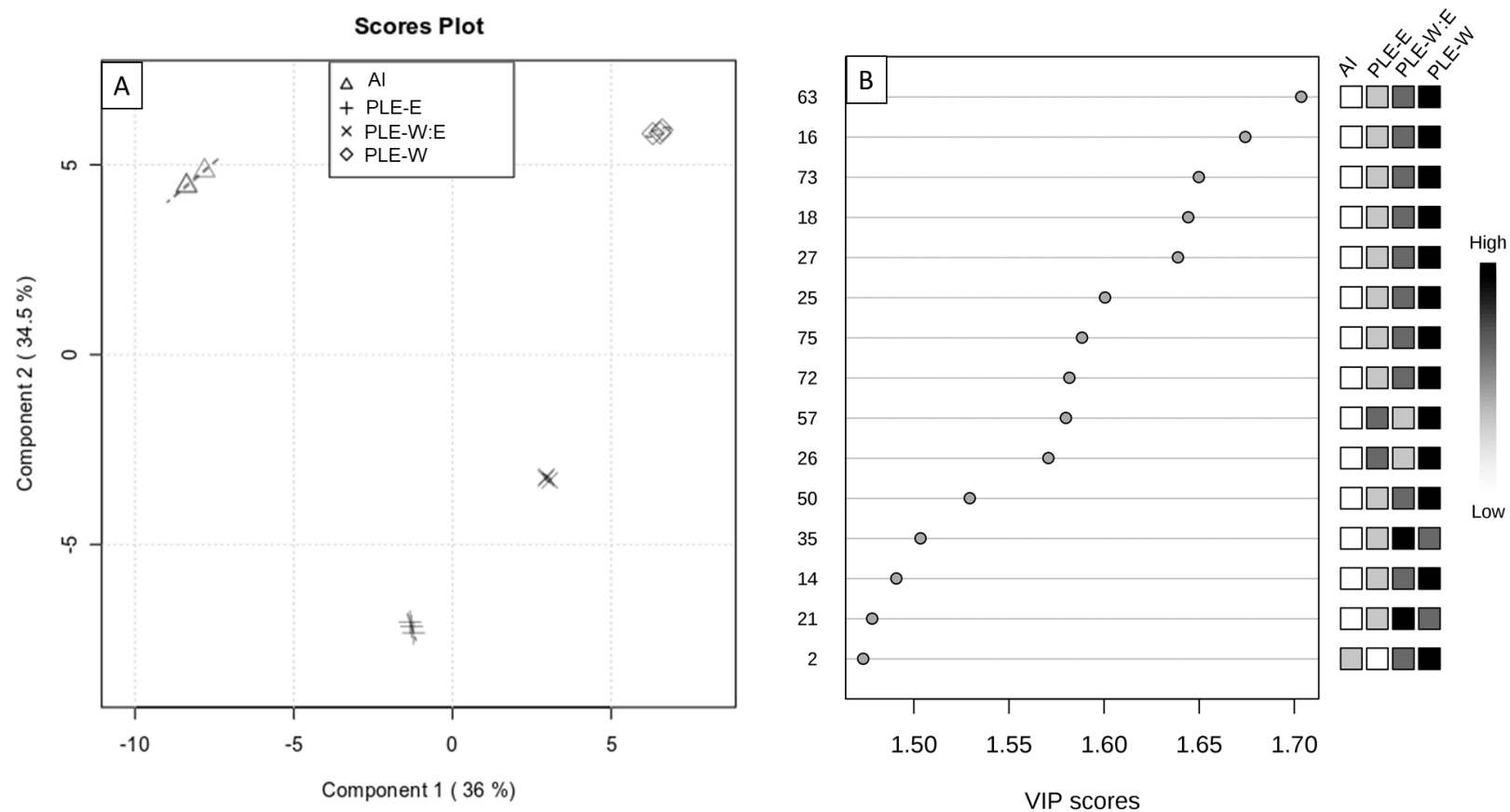


Figura 11 - *Score plot* da Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA) (A) e Projeção de Importância da Variável (VIP score) (B) derivados de dados LC-ESI-qTOF/MS pelo modo negativo de ionização para os extratos de folhas de arazazeiro

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; Números verticais no VIP score (Figura B) corresponde a número do pico conforme Tabela 4.

6.1.2 Atividade antioxidante (TBARS, ROS e leveduras) dos extratos de folhas de araçazeiro

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos em amostras cerebrais de ratos, foram determinadas a peroxidação lipídica (TBARS) (Figura 12) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 13). Todos os extratos reduziram os níveis de TBARS (Figura 12). No entanto, os extratos PLE-W e PLE-W:E apresentaram a maior capacidade de proteção contra peroxidação lipídica na menor concentração testada ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 12.B e 12.C). Em todas as doses teste com PLE-W houve prevenção à formação de TBARS ($p \leq 0.001$) (Figura 12.B). Em relação ao PLE-W:E, as melhores proteções à formação de TBARS foram obtidas com 50 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, que se equivaleram com o ácido *L*-ascórbico (AA) ($p \leq 0,001$), padrão de antioxidante (Figura 12.C). O AI foi capaz de prevenir o aumento de TBARS nas concentrações 25 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p \leq 0,05$), assim como o controle positivo (AA) ($p \leq 0,001$) (Figura 12.A). Para o PLE-W, pode-se observar um aumento nos níveis de TBARS nos grupos IC, e nos extratos nas concentrações de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p \leq 0,001$) e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p \leq 0,01$), em relação ao grupo C (Figura 12.B). Para o PLE-E o melhor resultado na prevenção foi obtida na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p \leq 0,001$) (Figura 12.D).

Pelo método ROS (Figure 13), observa-se que, assim como para o TBARS, o tratamento IC induz o processo oxidativo e o AA protege. Em relação aos extratos AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E, todos foram efetivos ($p \leq 0,01$), em prevenir o aumento nos níveis de ROS em células de cérebro total de ratos (Figura 13.A, 13.B, 13.C e 13.D). Novamente, os melhores resultados foram obtidos com os extratos PLE-W e PLE-W:E.

Pelo teste antioxidante frente a leveduras, os tratamentos de controle do método demonstram sua eficiência, tendo em vista que a aplicação do agente oxidante H_2O_2 na concentração 50 mM gerou a mortandade de aproximadamente 60% das células, enquanto o uso de compostos antioxidantes como AA, Q ou K, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, proporcionou sobrevivência de, no mínimo, 60% das células de leveduras (Figure 14). Quando se aplicaram os extratos durante o cultivo, em todos os casos houve proteção às células frente à ação do H_2O_2 , e essa proteção foi crescente até a concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 14.A, 14.B, 14.C e 15.D). Nessa concentração, os níveis de sobrevivência para os extratos foram: AI 69%, PLE-

W 90%, PLE-W:E 89% e PLE-E 83%. Isso indica que, nessa concentração, a capacidade antioxidante dos extratos é similar (AI) ou superior (PLE-W, PLE-W:E e PLE-E) aos compostos padrões testados (ácido *L*-ascórbico, quercetina e kaempferol).

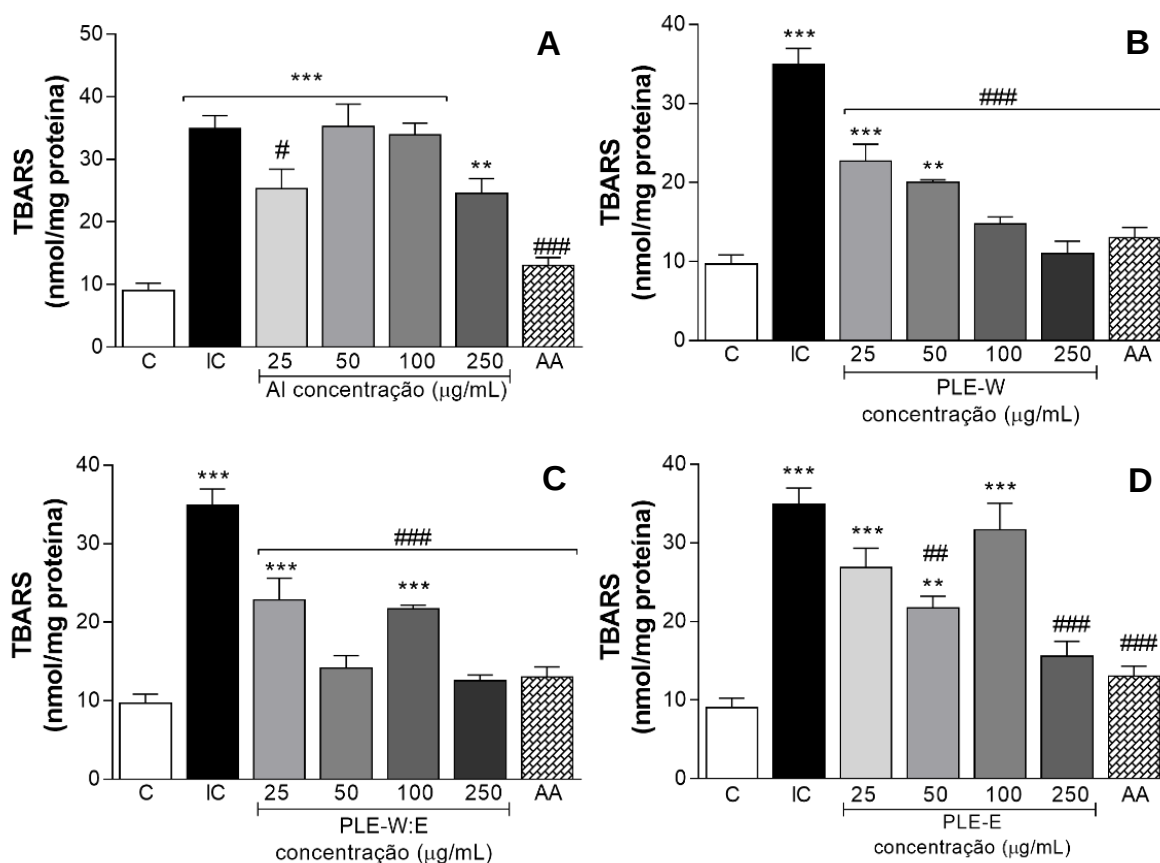


Figura 12 - Atividade antioxidante por TBARS de extratos de folhas de araçazeiro

A: AI: infusão aquosa; B: PLE-W: extração por líquido pressurizado com água; C: PLE-W:E: extração por líquido pressurizado com água e etanol; D: PLE-E: extração por líquido pressurizado com etanol. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=3$) por *one-way* ANOVA e teste *post hoc* Tukey *post hoc*: *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo C (controle); ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo C; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo C. ### $p < 0,001$ em comparação com o IC (controle induzido); ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo IC; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo IC; AA: ácido ascórbico.

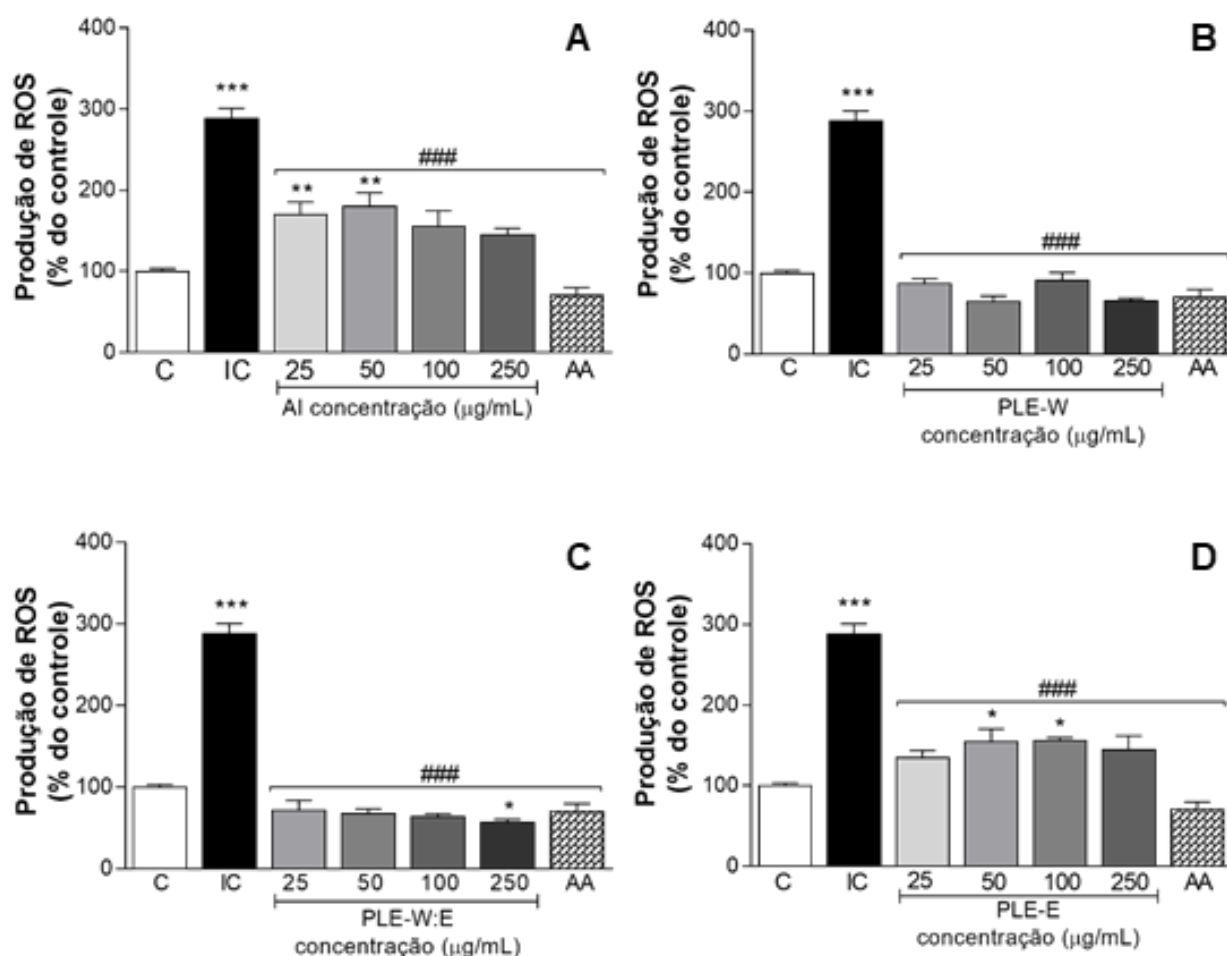


Figura 13 - Atividade antioxidante por produção de ROS de extratos de folhas de araçazeiro

A: AI: infusão aquosa; B: PLE-W: extração por líquido pressurizado com água; C: PLE-W:E: extração por líquido pressurizado com água e etanol; D: PLE-E: extração por líquido pressurizado com etanol. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=3$) por one-way ANOVA e teste *post hoc* Tukey *post hoc*: *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo C (C: controle); ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo C; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo C. ### $p < 0,001$ em comparação com o IC (IC: controle induzido); ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo IC; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo IC; AA: ácido ascórbico.

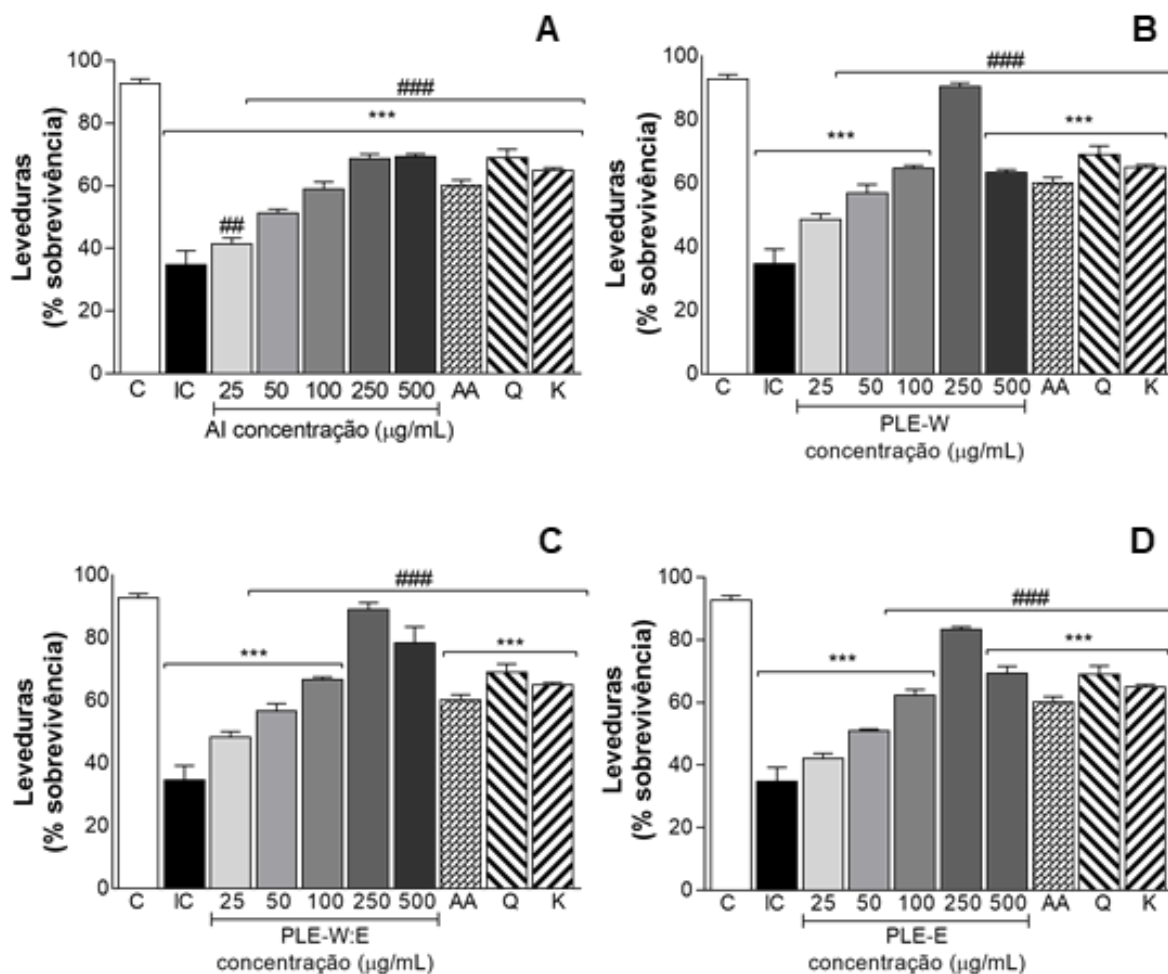


Figura 14 - Atividade antioxidante por ensaio de leveduras *S. cerevisiae* de extratos de folhas de araçazeiro

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

6.1.3 Atividade antibacteriana dos extratos de folhas de araçazeiro

Para a atividade antibacteriana, o extrato PLE-W proporcionou atividade antibacteriana contra maior número de cepas, seguido do AI e PLE-W:E (Tabela 6). Por outro lado, o extrato que apresentou menor atividade antibacteriana foi o PLE-E. Das bactérias estudadas, que foram selecionadas por serem micro-organismos patogênicos causadores de doenças transmitidas por alimentos, as mais afetadas

pelos extratos foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva, CIM 1,56 mg mL⁻¹ no PLE-W:E), *Listeria monocytogenes* Scott A (Gram-positiva, CIM 1,56 mg mL⁻¹ no PLE-W:E) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gram-negativa, CIM 1,56 mg mL⁻¹ no PLE-W:E). Por outro lado, nenhum dos extratos apresentou ação inibitória satisfatória contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Shigella flexeri* ATCC 12022, sendo essas bactérias Gram-negativas. Para *Enterococcus faecalis* FAIR (E77), apenas o extratos PLE-W e PLE-E tiveram efeito antibacteriano, e para *Enterococcus faecium* FAIR (E178) apenas o PLE-W. Diante disso, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gram-negativa), os extratos foram mais eficientes na inibição do crescimento das bactérias Gram-positivas.

Tabela 6 - Atividade antibacteriana de extratos de folhas de araçazeiro

Bactéria	AI			PLE-W		PLE-W:E		PLE-E	
	Gram	Halo de inibição (mm)	MIC (mg mL ⁻¹)	Halo de inibição (mm)	MIC (mg mL ⁻¹)	Halo de inibição (mm)	MIC (mg mL ⁻¹)	Halo de inibição (mm)	MIC (mg mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	14,5 ± 2,1 A	6,25	18,5 ± 0,7 A	1,56	16,5 ± 0,7 A	6,25	≤ 10	nd
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	+	19,0 ± 0,0 A	3,13	18,5 ± 0,7 A	1,56	14,0 ± 0,0 B	6,25	≤ 10	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	10,5 ± 2,1 B	6,25	15,0 ± 0,0 B	3,13	20,5 ± 0,7 A	1,56	≤ 10	nd
<i>Enterococcus faecalis</i> FAIR (E77)	+	≤ 10	nd	13,5 ± 0,7 A	1,56	≤ 10	nd	10,5 ± 0,7 B	6,25
<i>Enterococcus faecium</i> FAIR (E178)	+	≤ 10	nd	12,5 ± 0,7 A	0,78	≤ 10	nd	≤ 10	nd
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd
<i>Shigella flexeri</i> ATCC 12022	-	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd	≤ 10	nd

Valores expressos em média ± desvio padrão; nd: não detectado; médias seguidas pela mesma letra na linha, não difere entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); 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).

6.2 Extratos de folhas de butiazeiro

6.2.1 Caracterização química dos extratos de folhas de butiazeiro

Os extratos das folhas de butiazeiro também foram avaliados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-qTOF/MS), no modo de ionização negativo. Na tabela 7 apresentam-se as quantidades de compostos detectados nas amostras de AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E.

Tabela 7 - Quantidade de compostos totais de extratos de folhas de butiazeiro através de análise por LC-ESI-qTOF-MS no modo de ionização negativo

Material vegetal	Extratos	Nº de compostos [M ⁻ H ⁻]
Folha de butiazeiro	AI	63
Folha de butiazeiro	PLE-W	64
Folha de butiazeiro	PLE-W:E	70
Folha de butiazeiro	PLE-E	70

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

A figura 15 apresenta os cromatogramas de íons totais no modo de ionização negativo por LC-ESI-qTOF/MS para os extratos de folha de butiazeiro, sendo possível observar que há diferenças no perfil de compostos em função do solvente extrator.

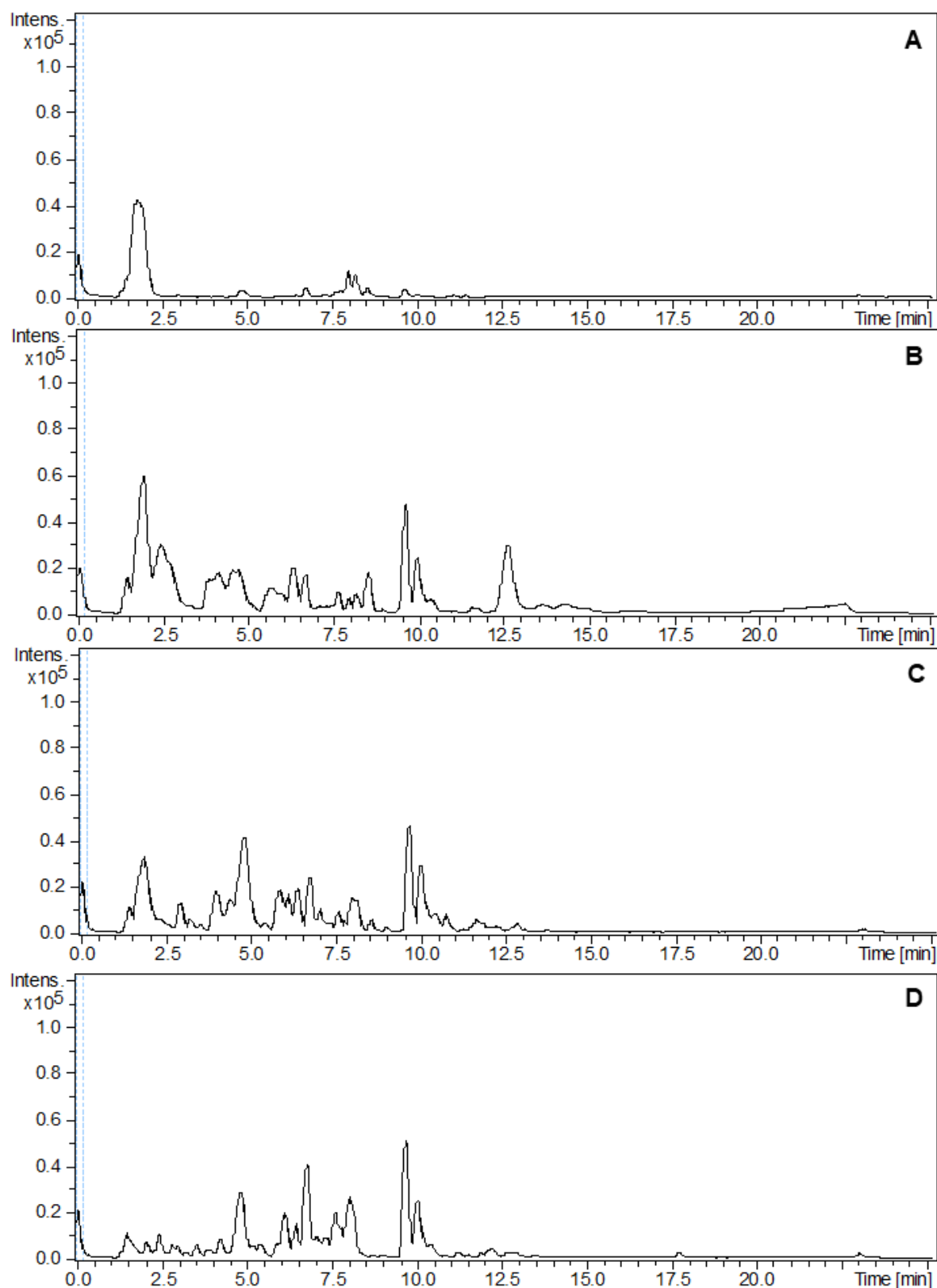


Figura 15 - Cromatograma de íons totais no modo de ionização negativo por LC-ESI-qTOF/MS para os extratos de folha de butiroz: A) AI, B) PLE-W, C) PLE-W:E, D) PLE-E

Concentração do extrato injetada: AI 20 mg mL⁻¹; PLE-W, PLE-W:E e PLE-E 30 mg mL⁻¹; volume de injeção 10 µL.

Os compostos presentes nos extratos de folhas de butiazeiro foram tentativamente identificados por análises da massa exata, espectro MS/MS e fórmula molecular por LC-ESI-qTOF/MS. Dentre os extratos, 73 foram putativamente identificados (Tabela 8): 63 presentes no AI, 64 no PLE-W, 70 no PLE-W:E e 70 no PLE-E. Dezesesseis compostos são ácidos fenólicos da classe do ácido hidroxibenzóico (7 compostos), do ácido hidroxicinâmico (8 compostos) e fenólicos glicosilados (1 composto); 16 são flavonoides das classe flavanols (4 compostos), flavonols (4 compostos), flavanones (1 composto) e flavones (1 composto); e, 41 são da classe de outros compostos (Tabela 8).

A partir do Diagrama de *Venn* (Figura 16), observa-se que 58 (80,6 %) dos compostos putativamente identificados são comuns a todos os extratos, e três (4,2 %) são específicos dos extratos obtidos da extração por PLE. Seis compostos (8,3%) são específicos dos extratos com etanol (PLE-W:E e PLE-E); dois compostos (2,8%) são específicos do AI e PLE-W; um composto (1,4 %) é em comum entre AI, PLE-W e PLE-W:E; um composto (1,4%) é em comum entre os extratos AI, PLE-W e PLE-E; e um composto é em comum AI, PLE-W:E e PLE-E (Figura 16). Não teve compostos exclusivos de cada extrato (Figura 16). Com base nesses resultados, se pode observar que a extração por PLE resultou em maior diversidade e concentração de compostos fitoquímicos (Tabela 8 e Tabela 9). De modo geral, o AI apresentou a menor quantidade de compostos quando comparada aos extratos obtidos pelo PLE (Tabela 8). Apesar das diferenças qualitativas e quantitativas entre os extratos, todos apresentaram uma grande diversidade de compostos potencialmente bioativos.

Com base na quantificação dos compostos analisados por LC-ESI-qTOF/MS, os ácidos fenólicos encontrados em maior concentração foram o ácido vanílico, ácido clorogênico, ácido 4-hidroxibenzóico e o composto tentativamente identificado como ácido 2-trans-O-Feruloilglucário (Tabela 9). Para o ácido vanílico a maior concentração foi no PLE-E ($385,86 \mu\text{g g}^{-1}$) e PLE-W:E ($200,65 \mu\text{g g}^{-1}$); para o ácido clorogênico a maior concentração foi encontrada no PLE-W:E ($274,93 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido do PLE-E ($164,33 \mu\text{g g}^{-1}$) e PLE-W ($136,30 \mu\text{g g}^{-1}$); para o ácido 4-hidroxibenzóico a maior concentração foi no PLE-E ($215,46 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido no PLE-W:E ($164,14 \mu\text{g g}^{-1}$) e PLE-W ($151,88 \mu\text{g g}^{-1}$). Em menores concentrações foram detectados ácido cafeico, gálico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido 3-hidroxibenzóico.

Na classe dos flavonoides, o composto tentativamente identificado como isoramnetina 7-glucosídeo foi encontrado em maior concentração no PLE-E ($285,89$

$\mu\text{g g}^{-1}$), PLE-W:E ($133,77 \mu\text{g g}^{-1}$) e AI ($107,95 \mu\text{g g}^{-1}$); o composto tentativamente identificado como quercetina 3- α -*D*-galactosídeo esteve em maior concentração no PLE-E ($122,21 \mu\text{g g}^{-1}$) e PLE-W:E ($48,72 \mu\text{g g}^{-1}$); o composto tentativamente identificado como eujambolin foi encontrado em maiores concentrações no AI ($117,34 \mu\text{g g}^{-1}$) e no PLE-W ($79,46 \mu\text{g g}^{-1}$). Em menores concentrações foram detectados (+)-catequina, (-)-epicaquetina, quercetrina, kaempferol e rutina.

É possível observar que para os ácidos fenólicos, o PLE-E foi o extrato que extraiu a maior quantidade total desta classe de compostos ($940,53 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido pelo PLE-W:E ($889,00 \mu\text{g g}^{-1}$) e PLE-W ($610,34 \mu\text{g g}^{-1}$), e o AI foi o método que extraiu a menor quantidade desses compostos ($156,54 \mu\text{g g}^{-1}$). Para os flavonoides, o extrato com maior concentração total de compostos foi o PLE-E ($628,13 \mu\text{g g}^{-1}$), seguido de PLE-W:E ($357,67 \mu\text{g g}^{-1}$), AI ($308,56 \mu\text{g g}^{-1}$) e PLE-W ($196,66 \mu\text{g g}^{-1}$). De modo geral, a maior extração total de compostos foi no PLE-E, seguido do PLE-W:E, PLE-W e AI.

Tabela 8 - Compostos putativamente identificados em extratos polares de folhas de butiazeiro

Nº do pico	Rt (min)	Classe	Composto	Fórmula química	[M-H] ⁻ medida	Fragmentos	mSigma	Ocorrência			
								A I	PLE-W	PLE-W:E	PLE-E
Ácidos fenólicos											
10	2,3	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169,0139	-	8,4	+	+	+	+
11	2,4	Fenólico glicosilado	***Fenólico glicosilado	C ₁₄ H ₁₈ O ₈	313,0923	-	47,2	+	+	+	+
12	2,5	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido protocatecuico 4-glucosídeo	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315,0712	-	43,2	+	+	+	+
14	3,0	Ácido hidroxicinâmico	*Chlorogenate	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,087	191,0550 (100); 179,0336 (63,8); 135,0448 (37,2)	45,1	+	+	+	+
16	3,3	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido 2-trans-O-Feruloilglucário	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₁	385,0769	-	56,9	+	+	+	+
19	4,0	Ácido hidroxicinâmico	*Glucuronídeo do ácido p-cumárico; Glucuronídeo do ácido O-cumárico	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	339,0719	-	37,3	+	+	+	+
20	4,1	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido 2-trans-O-Feruloilglucário	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₁	385,0771	85,0290 (100) 147,0293 (57,7) 129,0187 (57,7) 191,0553 (100) 173,0455 (2,6)	54,9	+	+	+	+
23	4,9	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0873	179,0350 (2,0) 135,0452 (1,7) 161,0244 (1,2)	32,2	+	+	+	+
24	5,0	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido 4-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	137,0235	-	9,5	+	+	+	+
29	6,5	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	167,0345	-	12,9	+	+	+	+
32	6,5	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	179,0326	-	4,8	+	+	+	+
41	7,5	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido sirínico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0452	-	12,8	-	-	+	+
44	7,6	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	163,0399	-	7,3	+	+	+	+
45	7,6	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9984	-	34,8	+	-	+	+
47	7,9	Ácido hidroxicinâmico	**Ácido ferulico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0501	-	8,7	+	+	+	+
55	8,9	Ácido hidroxibenzóico	**Ácido 3-hidroxibenzoico	C ₇ H ₆ O ₃	137,0234	-	41,6	+	+	+	+

Tabela 8 – Continuação

<i>Flavonoides</i>											
17	3,5	Flavanols	*Procianidina B5, B6, B7, B4, B3, B2, B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1348	-	52,7	-	+	+	+
22	4,6	Flavanols	**(+)-Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0715	-	10,9	+	+	+	+
31	6,0	Flavonols	*Quercetina 3-(4-glucosilramnosídeo); Quercetina 8-C-(2"-ramnosilglucosídeo); Quercetina 3-ramnos 7-glucosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1457	-	81,3	+	+	+	+
33	6,6	Flavanols	**(-)-Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0711	-	4,9	+	+	+	+
34	6,6	Flavonols	*Ranupenina 3-rutinosídeo; 3-metilquercetina 7-[galactosil-(1->4)-glucosídeo]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	639,1566	-	53,8	+	+	+	+
35	7,1	Flavonols	*Kaempferol-3-O-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1517	-	50,8	+	+	+	+
36	7,2	Flavonols	*Quercetrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0937	-	50,5	+	+	+	+
40	7,4	Flavanols	**Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1463	-	39,8	+	+	+	+
43	7,6	Flavonols	*Quercetina 3-alfa-D-galactosídeo; Quercetina 3-O-alfa-L-galactosídeo; Quercetina 7-glucosídeo (14)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0876	-	63,5	+	+	+	+
46	7,8	Antocianinas	*Petunidina 3-ramnosídeo 5-glucosídeo; Peonidina 3-soforosídeo; 4'-metildelfinidina 3-rutinosídeo	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,1618	-	34,9	+	+	+	+
48	8,0	Flavonols	*Isoramnetina 7-glucosídeo	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1032	314,0424 (100) 315,0464 (18,0) 477,1028 (11,1) 271,0238 (5,5)	15,2	+	+	+	+
49	8,2	Flavonols	*Eujambolin	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	519,1153	-	94,7	+	+	+	+
56	9,2	Flavones	**Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0397	-	6,0	-	-	+	+
57	9,2	Flavonols	**Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0346	-	16,4	-	+	+	+
60	9,9	Flavonols	**Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0396	-	27,9	-	-	+	+
72	13,7	Flavanones	*Farrerol; 5,7-Dimetoxi-4'-hidroxilavanona	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	299,0908	-	24,9	-	-	+	+

Tabela 8 - Continuação

Outros compostos										
1	1,4	*trans-4-Carboximetilenebut-2-en-4-olida	C ₆ H ₄ O ₄	139,0033		35,2	+	+	+	+
2	1,6	*Ácido arabinônico; ácido ribônico	C ₅ H ₁₀ O ₆	165,0401		32,0	+	+	+	+
3	1,7	*Geshoidin	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	377,0858		132,5	+	+	-	+
4	1,8	*Ácido malônico	C ₃ H ₄ O ₄	103,0037		18,6	-	+	+	+
5	1,8	(S)-Malato	C ₄ H ₆ O ₅	133,0137	115,0032 (100)	12,9	+	+	+	+
					111,0083 (100);					
					87,0081 (18,9);					
6	1,9	Ácido cítrico (Citrato)	C ₆ H ₈ O ₇	191,0192	85,0289 (7,5);		+	+	+	+
					112,0116 (5,7)					
					129,0187 (5,0)					
7	2,1	*Ácido sucínico; succinato	C ₄ H ₆ O ₄	117,0190		2,3	+	+	+	+
8	2,1	*Ácido quelidônico	C ₇ H ₄ O ₆	182,9931		25,1	+	+	+	+
			C ₁₂ H ₂₃ NO							
9	2,1	*N-(1-Deoxi-1-fructosil)isoleucina	7	292,1400		41,7	-	-	+	+
13	2,8	*Ácido glucosirínico	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	359,0978		25,5	+	+	+	+
15	3,3	*Ácido 2,3-Dihidroxibenzóico	C ₇ H ₆ O ₄	153,0186		41,1	+	+	+	+
18	3,9	*Ácido elenaico; ácido genípinico	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	241,0710		27,2	+	+	+	+
21	4,6	*Ácido (-)-2-Hidroxi-2-isopropilbutanedioico; (2S)-2-isopropilmalato	C ₇ H ₁₂ O ₅	175,0602	115,0391 (100); 113,0606 (34,9)	26,9	+	+	+	+
25	5,2	*Glucosídeo de etil (S)-3-hidroxibutirato	C ₁₂ H ₂₂ O ₈	293,1233		75,5	+	+	+	+
26	5,2	*Phenol	C ₆ H ₆ O	93,0342		7,2	+	+	+	+
28	5,5	*Verbenalina; Secologanina	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	387,1290		58,1	+	+	+	+
27	5,4	*Ácido 2,5-Dimetoxocinâmico; ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207,0653		66,4	+	+	+	+
30	5,9	*Ácido 2-trans-O-Feruloilglucárico	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₁	385,0769		58,3	+	+	+	+
37	7,2	*5a,6a-Epoxi-7E-megastigmene-3a,9e-diol 3-glucosídeo; Corchoionosídeo A	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	387,2018			+	+	+	+
38	7,3	*(+)-Lioniresinol 9-glucosídeo; (7'R)-(+)-Lioniresinol 9'-glucosídeo	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	581,2231		86,9	+	+	+	+
39	7,4	*Kanokosídeo A	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	475,1813		61,7	+	+	+	+
42	7,5	*Hipochoerosídeo A	C ₂₁ H ₃₂ O ₉	427,1974		60,5	+	+	+	-
50	8,4	Desconhecido	C ₉ H ₁₆ O ₄	187,0965			+	+	+	+
51	8,6	*1(4R,5S,7R,11S)-11,12-Dihidroxi-1(10)-spirovetiven-2-one 11-glucosídeo;	C ₂₁ H ₃₄ O ₈	413,2171		75,9	+	+	+	+

Tabela 8 - Continuação

Outros compostos										
52	8,6	*Ácido isolimônico	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₀	505,2084		33,7	+	+	+	+
53	8,7	*1H-Indol-3-carboxaldeído	C ₉ H ₇ NO	144,0447		55,9	+	+	+	+
54	8,8	*5(6)-Pentil-1,4-dioxan-2-ona	C ₁₈ H ₃₂ O ₆	343,2115		69,8	+	+	+	+
58	9,5	*Allixin; ácido 7-Epi-12-hidroxijasmônico	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	225,1131		9,5	+	+	+	+
59	9,7	*2,3-Dinor-8-iso prostaglandina F1alfa	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327,2177	171,1015 (100); 211,1328 (89,4); 229,1434 (39,9); 183,1379 (11,1) 211,1328 (100); 171,1016 (85,0); 229,1435 (42,4); 139,1117 (23,9); 99,0812 (11,3)	41,8	+	+	+	+
61	10,2	9,10,13-TriHOME	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329,2322			+	+	+	+
62	10,3	*Corchorifatty acid F; Auxin a	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	327,2168		19,9	+	+	+	+
63	10,8	*Ácido protobássico; ácido 6beta-hidroxiasiatico	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503,3368		83,3	-	-	+	+
64	11,5	*Ácido carnósico	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331,1898		46,1	+	+	+	+
65	11,4	*Mirsinona; Phytuberin	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	293,1749			+	+	+	+
66	11,8	*Sterebin A; ácido (9Z,11S,12S,13S,12Z)-12,13-Epoxi-11-hidroxi-9,15-octadecadienóico	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	309,2057		55,2	+	+	+	+
67	12,1	*Metil (9Z)-10'-oxo-6,10'-diapo-6-carotenoato; 4'-Hidroxi-5,5'-diisopropil-2,2'-dimetil-3,4-bifenilquinona	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	311,1674		23,2	+	+	+	+
68	12,8	*Isoacitretina	C ₂₁ H ₂₆ O ₃	325,1847		29,2	+	-	+	+
69	12,7	*Isoleptospermona; [4]-Gingerol	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	265,1470		64,0	+	+	-	-
70	12,9	*Ácido 9-OxoODE; (9Z,12Z,14E)-16-Hidroxi-9,12,14-octadecatrienóico	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293,2109		47,5	+	+	+	+
71	13,5	*Ácido (Z)-13-Oxo-9-octadecenóico; ácido 12-Hidroxi-8,10-octadecadienóico	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295,2257			-	-	+	+
73	13,7	*Metil (9Z)-10'-oxo-6,10'-diapo-6-carotenoato; 5-Metoxi-7-(4-hidroxifenil)-1-fenil-3-heptanona	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	311,1671		66,7	+	+	-	-

Número do pico: os compostos foram ordenados pelo tempo de retenção; RT: tempo de retenção (minutos); mSigma: similaridade entre o padrão isotópico teórico e o experimental (quanto menor o valor, maior a similaridade entre o resultado experimental e o teórico); *compostos identificados putativamente (pelo nome do composto); **compostos identificados (pelo padrão do composto); ***putativamente identificado pela classe; + presente; - ausente. Al: 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.

Tabela 9 - Quantificados dos compostos putativamente identificados em extratos polares de folhas de butiazeiro

Compostos		Extratos de folhas de butiazeiro							
		AI		PLE-W		PLE-W:E		PLE-E	
Ácidos fenólicos (µg g ⁻¹)									
10	**Ácido gálico ⁽¹⁾	1,81 ± 0,03	c	3,52 ± 0,00	b	0,87 ± 0,00	d	8,56 ± 0,01	a
11	***Fenólico glicosilado ⁽²⁾	3,42 ± 0,02	c	3,15 ± 0,04	d	4,55 ± 0,04	b	11,38 ± 0,04	a
12	*Ácido protocatecuico 4-glucosídeo ⁽²⁾	5,51 ± 0,01	d	11,69 ± 0,23	c	29,23 ± 0,05	a	17,88 ± 0,07	b
14	*Chlorogenate ⁽²⁾	1,64 ± 0,18	d	19,51 ± 0,40	c	53,58 ± 0,28	a	20,82 ± 0,19	b
16	*Ácido 2-trans-O-Feruloilglucário ⁽²⁾	4,01 ± 0,05	c	27,13 ± 0,14	a	24,71 ± 0,23	b	2,51 ± 0,01	d
19	*Glucuronídeo do ácido <i>p</i> -cumárico; Glucuronídeo do ácido <i>O</i> -cumárico ⁽⁷⁾	6,47 ± 0,07	d	14,43 ± 0,25	c	16,15 ± 0,28	b	35,12 ± 0,10	a
20	*Ácido 2-trans-O-Feruloilglucário ⁽²⁾	5,02 ± 0,03	c	145,37 ± 2,32	a	58,94 ± 0,19	b	2,82 ± 0,03	c
23	**Ácido clorogênico ⁽²⁾	25,20 ± 0,62	d	136,30 ± 0,51	c	274,93 ± 0,20	a	164,33 ± 0,64	b
24	**Ácido 4-hidroxibenzóico ⁽³⁾	19,70 ± 0,61	d	151,88 ± 0,17	c	165,14 ± 0,34	b	215,49 ± 0,39	a
29	**Ácido vanílico ⁽⁴⁾	50,53 ± 1,35	c	56,27 ± 1,17	c	200,65 ± 1,39	b	385,86 ± 8,62	a
32	**Ácido cafeico ⁽⁵⁾	9,94 ± 0,06	c	13,95 ± 0,27	b	13,50 ± 0,00	b	21,62 ± 0,08	a
41	**Ácido siríngico ⁽⁶⁾	nd		nd		4,33 ± 0,02	a	4,15 ± 0,02	b
44	**Ácido <i>p</i> -cumárico ⁽⁷⁾	5,69 ± 0,75	b	4,91 ± 0,03	c	10,90 ± 0,07	a	11,08 ± 0,03	a
45	**Ácido elágico ⁽⁸⁾	2,15 ± 0,01	a	nd		1,54 ± 0,01	c	1,69 ± 0,01	b
47	**Ácido ferúlico ⁽⁹⁾	7,26 ± 0,16	a	6,38 ± 0,07	b	5,28 ± 0,01	c	2,52 ± 0,01	d
55	*Ácido 3-hidroxibenzóico ⁽³⁾	8,19 ± 0,19	d	15,85 ± 0,02	c	24,70 ± 0,14	b	34,70 ± 0,20	a
Total		156.54		610.34		889.00		940.53	

Valores expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$; 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 g^{-1} ⁽¹⁾; μg ácido clorogênico g^{-1} ⁽²⁾; μg ácido 4-hidroxibenzóico g^{-1} ⁽³⁾; μg ácido vanílico g^{-1} ⁽⁴⁾; μg ácido cafeico g^{-1} ⁽⁵⁾; μg ácido siríngico g^{-1} ⁽⁶⁾; μg ácido *p*-cumárico g^{-1} ⁽⁷⁾; μg de ácido elágico g^{-1} ⁽⁸⁾; μg de ácido ferúlico g^{-1} ⁽⁹⁾; μg (+)-Catequina g^{-1} ⁽¹⁰⁾; μg (-)-Epicatequina g^{-1} ⁽¹¹⁾; μg rutina g^{-1} ⁽¹²⁾; μg luteolina g^{-1} ⁽¹³⁾; μg quercetina g^{-1} ⁽¹⁴⁾; μg Kaempferol g^{-1} ⁽¹⁵⁾.

Tabela 9 - Quantificados dos compostos putativamente identificados em extratos polares de folhas de butiazeiro (Continuação)

Flavonoides (µg g ⁻¹)									
17	*Procianidina B5, B6, B7, B4, B3, B2, B1 ⁽¹⁰⁾	nd		3,68 ± 0,01	b	12,81 ± 0,35	a	3,23 ± 0,02	b
22	**(+)-Catequina ⁽¹⁰⁾	2,51 ± 0,02	c	1,78 ± 0,01	d	21,57 ± 0,07	a	14,82 ± 0,02	b
31	*Quercetina 3-(4-glucosilramnosídeo); Quercetina 8-C-(2"-ramnosilglucosídeo); Quercetina 3-rhamnos 7-glucosídeo ⁽¹⁴⁾	2,15 ± 0,06	d	10,68 ± 0,04	c	17,45 ± 0,08	a	14,39 ± 0,15	b
33	**(-)-Epicatequina ⁽¹¹⁾	8,70 ± 0,03	d	11,60 ± 0,02	c	17,98 ± 0,11	a	16,87 ± 0,33	b
34	*Ranupenina 3-rutinosídeo; 3-metilquercetina 7-[galactosil-(1->4)-glucosídeo] ⁽¹⁰⁾	1,63 ± 0,01	c	1,24 ± 0,05	d	3,94 ± 0,07	b	9,76 ± 0,05	a
35	*Kaempferol-3-O-rutinosídeo ⁽¹⁵⁾	6,75 ± 0,12	c	7,02 ± 0,05	c	11,64 ± 0,03	b	24,08 ± 0,16	a
36	*Quercetrina ⁽¹⁴⁾	3,78 ± 0,05	c	2,36 ± 0,00	d	7,95 ± 0,08	b	22,39 ± 0,05	a
40	**Rutina ⁽¹²⁾	1,95 ± 0,05	c	1,08 ± 0,01	d	3,53 ± 0,02	b	12,20 ± 0,02	a
43	*Quercetina 3-alfa-D-galactosídeo; Quercetina 3-O-alfa-L-galactosídeo; Quercetina 7-glucosídeo ⁽¹⁴⁾	19,44 ± 0,73	c	9,11 ± 0,09	d	48,72 ± 0,66	b	122,21 ± 1,26	a
46	*Petunidina 3-ramnosídeo 5-glucosídeo; Peonidina 3-soforosídeo; 4'-Metildelfinidina 3-rutinosídeo ⁽¹⁴⁾	36,36 ± 0,54	b	18,34 ± 0,04	c	34,72 ± 0,32	b	90,23 ± 0,37	a
48	*Isoramnetina 7-glucosídeo ⁽¹⁰⁾	107,95 ± 1,33	c	46,30 ± 0,08	d	133,77 ± 0,28	b	285,89 ± 1,98	a
49	*Eujambolin ⁽¹⁰⁾	117,34 ± 0,96	a	79,46 ± 0,64	b	32,36 ± 0,03	c	6,64 ± 0,22	d
56	**Luteolina ⁽¹³⁾	nd		nd		0,06 ± 0,00	b	0,13 ± 0,01	a
57	**Quercetina ⁽¹⁴⁾	nd		4,01 ± 0,00	a	2,25 ± 0,01	c	2,73 ± 0,02	b
60	**Kaempferol ⁽¹⁵⁾	nd		nd		1,80 ± 0,00	a	1,80 ± 0,00	a
72	*Farrerol; 5,7-Dimetoxi-4'-hidroxiflavanona ⁽¹⁰⁾	nd		nd		7,12 ± 0,02	a	0,76 ± 0,02	b
Total		308,56		196,66		357,67		628,13	

Valores expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$; média $\pm$ 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 g^{-1} ⁽¹⁾; μg ácido clorogênico g^{-1} ⁽²⁾; μg ácido 4-hidroxibenzóico g^{-1} ⁽³⁾; μg ácido vanílico g^{-1} ⁽⁴⁾; μg ácido cafeico g^{-1} ⁽⁵⁾; μg ácido sirínico g^{-1} ⁽⁶⁾; μg ácido p-cumárico g^{-1} ⁽⁷⁾; μg de ácido elágico g^{-1} ⁽⁸⁾; μg de ácido ferúlico g^{-1} ⁽⁹⁾; μg (+)-Catequina g^{-1} ⁽¹⁰⁾; μg (-)-Epicatequina g^{-1} ⁽¹¹⁾; μg rutina g^{-1} ⁽¹²⁾; μg luteolina g^{-1} ⁽¹³⁾; μg quercetina g^{-1} ⁽¹⁴⁾; μg Kaempferol g^{-1} ⁽¹⁵⁾.

6.2.2 Atividade antioxidante dos extratos de folhas de butiazeiro

Os métodos TBARS e ROS também foram usados para avaliar a atividade antioxidante (Figura 17 e 18). Pelo teste TBARS, observou-se que a adição de peróxido de hidrogênio e sulfato ferroso de homogenatos cerebrais induziram o dano oxidativo, e que o tratamento prévio com ácido *L*-ascórbico a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ protege significativamente ($p \leq 0,001$) as células da formação de TBARS (Figura 17). Quando se aplicaram os extratos, observa-se que o AI não foi capaz de proteger as células da formação de TBARS (Figura 17.A). Esse comportamento também foi observado para o extrato PLE-W:E (Figura 17.C). Para o extrato PLE-W, as concentrações de 25, 100 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ geraram proteção significativa ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,001$, respectivamente) (Figura 17.B). No extrato PLE-E todas as concentrações testadas proporcionaram proteção significativa às células ($p \leq 0,001$) (Figura 17.D). Quando comparado entre as concentrações significativas de cada extrato para TBARS, é possível observar que para o PLE-W a melhor concentração foi 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e para o PLE-E com 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ já se obteve elevada proteção. Resumindo-se, o PLE-E teve destaque positivo, já na menor concentração testada (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), gerou excelente proteção, equivalente ao ácido *L*-ascórbico.

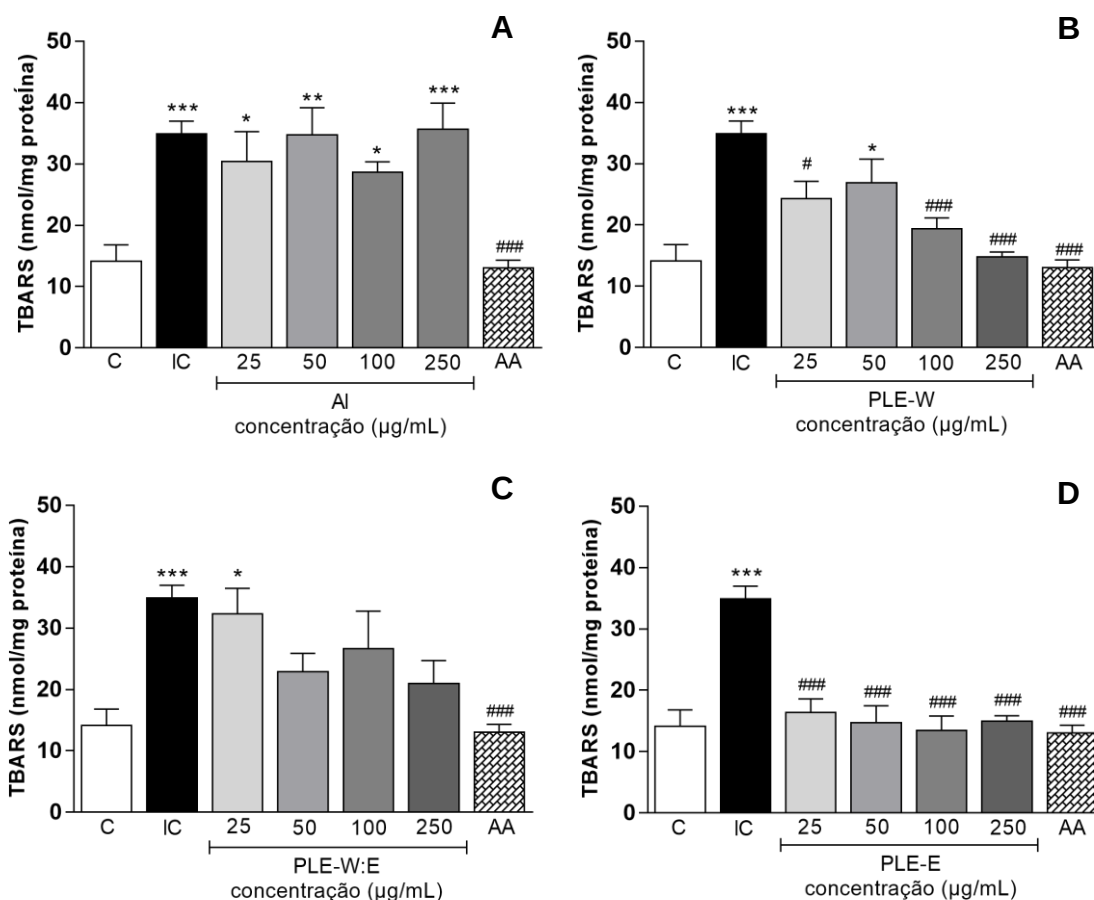


Figura 17 - Atividade antioxidante por TBARS de extratos de folhas de butiazeiro

A: AI: infusão aquosa; B: PLE-W: extração por líquido pressurizado com água; C: PLE-W:E: extração por líquido pressurizado com água e etanol; D: PLE-E: extração por líquido pressurizado com etanol. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=3$) por *one-way* ANOVA e teste *post hoc* Tukey: *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo C (C: controle); * $p < 0,05$ em comparação com o grupo C. ### $p < 0,001$ em comparação com o grupo IC (IC: controle induzido); ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo IC; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo IC; AA: ácido ascórbico.

Para o teste de ROS, todos os extratos de folhas de butiazeiro (AI, PLE-W, PLE-W:E e PLE-E), em todas as concentrações testadas, apresentaram efeito protetor contra a formação de ROS ($p \leq 0,001$) (Figura 18). Quando comparado o efeito entre as concentrações, observa-se que para o AI, PLE-W:E e PLE-E não teve diferença significativa entre os extratos, ou seja, a concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ já foi suficiente para gerar a proteção contra ROS (Figura 18.A, 18.C e 18.D). Entretanto para AI, quando comparada a concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ com $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), ou seja, quando comparado a menor concentração com a

maior, a maior teve melhor proteção. Assim, pelo teste ROS, todos os extratos geraram proteção à oxidação, e isso já acontece na dose mais baixa (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

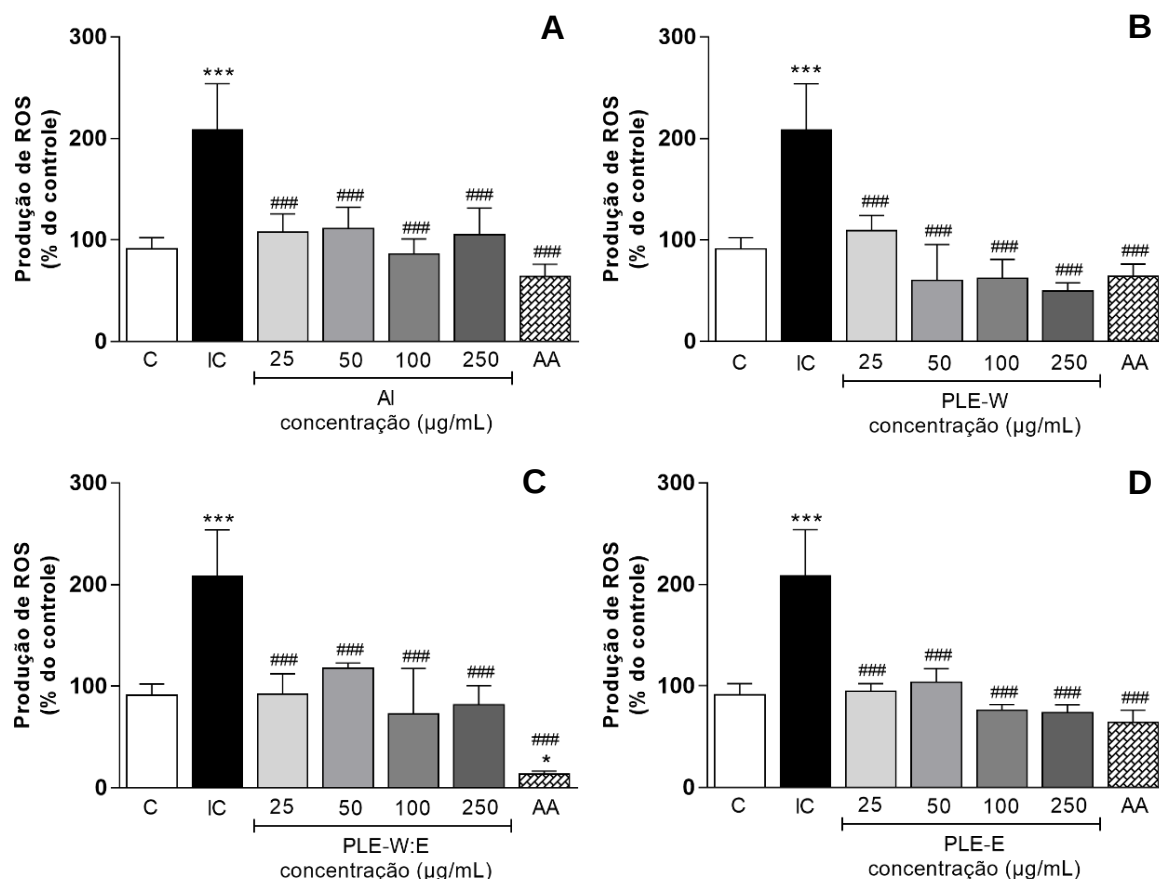


Figura 18 - Atividade antioxidante por produção de ROS de extratos de folhas de butiazeiro

A: AI: infusão aquosa; B: PLE-W: extração por líquido pressurizado com água; C: PLE-W:E: extração por líquido pressurizado com água e etanol; D: PLE-E: extração por líquido pressurizado com etanol. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=3$) por one-way ANOVA e teste *post hoc* Tukey *post hoc*: *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo C (C: controle); ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo C; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo C. ### $p < 0,001$ em comparação com o IC (IC: controle induzido); ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo IC; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo IC; AA: ácido ascórbico.

6.2.3 Atividade antibacteriana de extratos de folhas de butiazeiro

Para a atividade antibacteriana é possível observar que entre as oito bactérias patogênicas causadoras de doenças alimentares testadas, apenas os extratos PLE-W e PLE-E apresentaram efeito antibacteriano, sendo que o PLE-W inibiu apenas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Gram-negativa, CIM de 3,12 mg mL^{-1}) e PLE-

E inibiu apenas *Enterococcus faecalis* FAIR (E77) (Gram-positiva, CIM de 6,25 mg mL⁻¹) (Tabela 10). De modo geral, nenhum extrato apresentou ação inibitória frente às bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Enterococcus faecalis* FAIR (E77), e Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 e *Shigella flexeri* ATCC 12022, ou seja, os extratos de folhas de butiazeiro não apresentam efeito antibacteriano satisfatório frente as bactérias testadas.

Tabela 10 - Atividade antibacteriana de extratos de folhas de butiazeiro Método de Disco de Difusão e Concentração Inibitória Mínima

Bactérias	Gram	AI		PLE-W		PLE-W:E		PLE-E	
		Diâmetro (mm)	CIM (mg mL ⁻¹)	Diâmetro (mm)	CIM (mg mL ⁻¹)	Diâmetro (mm)	CIM (mg mL ⁻¹)	Diâmetro (mm)	CIM (mg mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	nd	nd	16,0 ± 1,4	3,12	nd	nd	nd	nd
<i>Enterococcus faecalis</i> FAIR (E77)	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12,0 ± 0,0	6,25
<i>Enterococcus faecium</i> FAIR (E178)	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC13076	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Shigella flexeri</i> ATCC 12022	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Valores expressos em média ± desvio padrão; nd: não detectado; 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. CIM: Concentração Inibitória Mínima.

7 Discussão

7.1 Extratos de folhas de araçazeiro

7.1.1 Folhas de araçazeiro são ricas em compostos fitoquímicos polares

De modo geral, os trabalhos com espécies frutíferas nativas dão enfoque ao estudo dos frutos, tanto sob o aspecto agrônômico, quanto do processamento e perspectiva nutricional e funcional (ALQURASHI *et al.*, 2017; BESKOW *et al.*, 2015; DONADO-PESTANA *et al.*, 2018; HOFFMANN *et al.*, 2014; HOFFMANN *et al.*, 2017a; HOFFMANN *et al.*, 2017b; PEREIRA *et al.*, 2018; REISSIG; ROMBALDI, 2017; SOARES *et al.*, 2019). Isso também ocorre com frutos do araçazeiro, conhecidos como araçás (MEDINA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2018b; PEREIRA *et al.*, 2018). Esses estudos observaram que os araçás são ricos em ácido gálico e (-)-epicatequina, e, em menores quantidades, apreçam o ácido elágico, quercetina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, miricetina e quercetina (MEDINA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2018) e têm putativas propriedades funcionais, tendo em vista que extratos obtidos por diferentes solventes e métodos resultaram em atividades antioxidante (CARDOSO *et al.*, 2017b), antiproliferativa (MEDINA *et al.*, 2011), antimicrobiana (MEDINA *et al.*, 2011; DE LIMA *et al.*, 2020), com perspectiva de baixa citotoxicidade (ALVARENGA *et al.*, 2013). Esse conhecimento prévio sobre a composição e atividades biológicas relevantes do fruto, combinado com o uso popular das folhas de araçazeiro, levou-nos a caracterizar os compostos bioativo e a atividade antioxidante e antibacteriana de diferentes extratos de folhas de araçazeiro.

O estudo aqui realizado está focado na caracterização dos compostos fitoquímicos polares extraídos de folhas, cuja relevância está no seu uso popular, especialmente por populações que habitam os biomas em que essa espécie ocorre naturalmente. Para isso, utilizaram-se folhas adultas de acesso registrado, cujos estudos agrônômicos encontram-se em estágios mais adiantados.

Para esse estudo, testaram-se duas estratégias de extração, uma comumente utilizada no preparo de infusões e chás, ou seja, uso de água aquecida em folhas secas moídas (80°C/10 min), visando mimetizar o que é de uso popular; e, outra, com o intuito de obter extratos em escala de produção, nesse caso por PLE (aqui testando três condições de solventes). O resultado geral, independentemente da condição de

extração, aponta para uma riqueza em compostos (Tabela 4). A abundância em compostos fenólicos era esperada, em virtude do tipo de solvente utilizado nas extrações e dos compostos conhecidos por estarem presentes nos frutos de araçá. Independentemente do sistema de extração, uma grande diversidade de fitoquímicos foi encontrada nas folhas do araçazeiro. Isso era esperado porque tratam-se de metabólitos especializados produzidos pelas plantas, como forma de defesa, adaptação e, por consequência, aquisição de plasticidade adaptativa (VIGHI *et al.*, 2019; REISSIG; ROMBALDI, 2017; ROLEIRA *et al.*, 2015).

Esse elevado número de compostos supera o que é citado em trabalhos que estudam extratos obtidos de folhas (D'URSO; MONTORO; PIACENTE, 2019; D'URSO *et al.*, 2019; OLDONI *et al.*, 2019, WU *et al.*, 2019), inclusive naquelas de amplo uso internacional, como é o caso do chá – *Camelia sinensis* (AZEVEDO *et al.*, 2019), estévia - *Stevia rebaudiana* (MOLINA-CALLE; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2017), ou mais regionalizado, como é o caso da erva-mate – *Ilex paraguariensis* (DE SOUZA *et al.*, 2011). As causas exatas das diferenças não estão claramente demonstradas, mas podem estar associadas às diferenças inerentes à composição das folhas distintas, das regiões distintas, dos manuseios das folhas pós coleta, das condições de extração com parâmetros distintos e, inclusive, métodos de detecção e identificação diferentes. De todo modo, frente a esses resultados pode-se afirmar que a primeira expectativa de resultado é verdadeira, ou seja, há uma ampla diversidade de compostos fitoquímicos em extratos hidrofílicos de folhas de araçazeiro, seja pela extração por AI ou por PLE, com destaque para a extração PLE-W:E.

Ao se analisarem os perfis fitoquímicos de folhas amplamente estudadas tais como *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* (AZEVEDO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018), se observa que os compostos mais frequentes são ácido quínico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferulico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, catequina, epicatequina, epigallocatequina, rutina, quercetina e kaempferol (AZEVEDO *et al.*, 2019; D'URSO; MONTORO; PIACENTE, 2019; GARCIA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018). Desses, nos extratos de folhas de araçazeiro, os compostos mais frequentes encontrados foram o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido sirínico, ácido elágico, quercetina, quercetrina, catequina e procianidinas. Muitos desses compostos estão associados à atividade antioxidante, anticancerígena,

antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa e cardioprotetora (ALAM; MEERZA; NASEEM, 2014; FERRARI; TORRES, 2013; ROLEIRA *et al.*, 2015).

Quando se comparam os extratos, se observou que, como esperado, eles diferem qualitativa e quantitativamente. A condição que gerou maior extração total foi a PLE-W:E. Como é importante se identificar compostos que possam discriminar os métodos de extração, realizaram-se análise dos perfis e observou-se que os flavonoides foram os principais compostos que influenciaram para a discriminação dos compostos entre as extrações. Com base nos resultados encontrados, observa-se que o PLE contribui para a obtenção de extratos ricos em compostos fitoquímicos e, no caso de folhas de araçazeiro, recomenda-se o uso da combinação de água e etanol, quando se deseja uma maior diversidade de compostos encontrados. Essa condição de extração se apresentou robusta, gerando uma elevada quantidade de compostos, num total de 93 compostos putativamente identificados. Outros estudos, que usaram folhas, encontraram uma diversidade muito menor de compostos (ALMEIDA *et al.*, 2019; BARROS *et al.*, 2020; BASTOS *et al.*, 2019; D'URSO; MONTORO; PIACENTE, 2019; GARCIA *et al.*, 2019; GOUVEA *et al.*, 2012; OLDONI *et al.*, 2019).

7.1.2 Os extratos polares de folhas de araçazeiro têm elevada atividade antioxidante

Os extratos de folhas de araçazeiro contêm uma grande diversidade de compostos, como ácido vanílico, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, catequina e quercitrina, que possuem uma estrutura comum em seu grupo fenol, mas diferem quanto à hidroxilação e conjugação entre os grupos aromáticos (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Esses compostos contribuem para o potencial antioxidante. Assim, esperava-se que os extratos tivessem alta atividade antioxidante, reduzindo os danos causados por espécies reativas, e protegendo células eucarióticas, neste caso células cerebrais de ratos (TBARS e ROS) e leveduras, submetidas ao estresse oxidativo. Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, o que pode ser devido à presença desses compostos, conhecidos por essa propriedade (HOFFMANN *et al.*, 2017b). Os compostos fenólicos possuem características estruturais que fornecem um potencial antioxidante (devido à presença de hidroxilas que podem doar átomos de hidrogênio e prevenir a formação de EROs), evitando danos causados pelo estresse oxidativo (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011).

Dentre os extratos, o PLE-W e PLE-W:E resultaram em maior proteção oxidativa, determinada tanto pelo método TBARS quanto pelo método ROS (Figura 12 e Figura 13). Nesses casos, os resultados foram equivalentes aos obtidos com AA na menor concentração testada ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Todos os extratos foram capazes de proteger a levedura contra a oxidação do peróxido de hidrogênio. Extratos de folhas de araçazeiro na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ proporcionaram as maiores taxas de sobrevivência de leveduras, conforme determinado pelo ensaio TBARS e ROS.

Todos os extratos proporcionaram boa proteção às leveduras, tendo em vista que os níveis de sobrevivência foram consistentemente maiores do que com o tratamento com H_2O_2 sozinho, onde até 90% de sobrevivência foi alcançada, com o extrato na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Noutro estudo que utilizaram a mesma cepa de levedura com extratos de frutos de araçá amarelo e vermelho, os níveis de sobrevivência foram 82 a 86 % (MEDINA *et al.*, 2011). Outros trabalhos com outras espécies também utilizaram a mesma estratégia (GONZALES; VILLENA; KITAZONO, 2021), mas as leveduras consistiam noutros mutantes, o que dificulta a comparação. Nas concentrações testadas, os extratos não geraram toxicidade às células tendo em vista que a sobrevivência nos ensaios em que esses foram utilizados, sem a ação de agentes oxidantes, os níveis foram de 93 %.

7.1.3 Os extratos polares de folhas de araçazeiro têm atividade antimicrobiana, principalmente frente a bactérias Gram-positivas

Pela riqueza de compostos, esperava-se uma alta e ampla atividade antibacteriana. Afora isso, já foi demonstrado que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à ação dos extratos quando comparadas com as Gram-negativas. Isto pode ser explicado pelo fato de que há diferenças quanto à estrutura da parede celular dessas bactérias (JANSEN-ALVES *et al.*, 2019; DA SILVA DANNENBERG *et al.*, 2019). A parede celular de bactérias gram-positivas apresenta uma única camada composta, principalmente, de peptidoglicano (aproximadamente 90 a 95%), o que permite que as moléculas (flavonoides) ajam mais facilmente nas células microbianas. Já a parede celular das bactérias Gram-negativas é constituída por membrana composta por uma dupla camada de fosfolipídios ligada à membrana interna por lipopolissacarídeos, o que promove uma barreira dificultando a permeabilidade e ação dos compostos antimicrobianos, proporcionando assim uma maior resistência a

extratos naturais (DA SILVA DANNENBERG *et al.*, 2019; JANSEN-ALVES *et al.*, 2019; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998). Essas hipóteses foram parcialmente confirmadas: a atividade antibacteriana se deu mais fortemente frente à bactéria Gram-positiva, e a amplitude de ação foi relativamente baixa.

Embora o extrato obtido por PLE-W:E tenha gerado a maior diversidade de compostos, o extrato PLE-W foi o que gerou maior atividade antibacteriana, sobretudo contra bactérias Gram-positivas. O PLE-W extraiu uma quantidade maior de ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico e catequina (Tabela 5), com atividade antimicrobiana conhecida (CUEVA *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2014), dihidrocalconas, apigenina-7-O-glicosídeo e flavonoides metilados (Tabela 4). Além disso, dois compostos putativamente identificados como da classe dos flavonoides, a qual apresenta conhecida atividade antimicrobiana (HE *et al.*, 2014), eram exclusivamente do PLE-W (Tabela 4). Esses compostos podem ter maior solubilidade em água e, assim, facilitar a permeabilidade na célula, exercendo uma ação mais forte sobre os compostos celulares do micro-organismo e podem levar à morte.

Em geral, no presente estudo, foram encontrados importantes flavonoides nos extratos obtidos pelo PLE, incluindo quercitrina, quercetina, catequina, miricetina, luteolina, kaempferol e procianidina (Tabela 4). Os mecanismos pelos quais esses extratos agiram sobre as bactérias testadas não foram estudados no presente trabalho, mas os trabalhos indicam que a atividade dos flavonoides pode estar relacionada com danos na membrana celular bacteriana (HE *et al.*, 2014), inibição da síntese de ácido nucléico (MORI *et al.*, 1987) e inibição do metabolismo energético (HARAGUCHI *et al.*, 1998).

Recentemente, De Lima *et al.* (2020), demonstraram que a ação antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de araçá (fruto) frente a *Staphylococcus aureus* se dá por modificação da integridade da membrana celular, liberando importantes constituintes celulares, como nucleotídeos e macromoléculas. Além disso, os extratos podem interagir com o DNA de *S. aureus*, inibindo as funções básicas das células (DE LIMA *et al.*, 2020), como a expressão da enzima DNA Girase (WU *et al.*, 2013), que é responsável pela síntese de DNA no micro-organismo para replicação, resultando em consequente morte celular. Em estudo de eficácia de extratos hidroalcoólicos de polpa de araçá frente a *Staphylococcus aureus*, a inibição gerou com halos de 17 mm de diâmetro, com concentração inibitória mínima (CIM) de 9 mg mL⁻¹ (DE LIMA *et al.*, 2020). Com os extratos de folha de araçazeiro, o PLE-W:E foi mais efetivo contra

Pseudomonas aeruginosa, com halo de inibição de 20 mm e CIM de 1,56 mg mL⁻¹, enquanto para AI e PLE-W inibiram *Listeria monocytogenes*, com halos de 19 e 18,5 mm e CIM de 3,13 e 1,56 mg mL⁻¹, respectivamente. O PLE-W foi mais eficaz para inibição do *Staphylococcus aureus*, gerando halos de 18,5 mm e CIM de 1,56 mg mL⁻¹.

7.2 Extratos de folhas de butiazeiro

7.2.1 As folhas de butiazeiro apresentam compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os trabalhos envolvendo butiá são direcionados aos frutos e, quando as folhas são citadas, é para uso em produtos de artesanato (CRUXEN *et al.*, 2017; HOFFMANN *et al.*, 2014; HOFFMANN *et al.*, 2017a; ROCKETT *et al.*, 2020). Esses estudos mostram que o butiá e os extratos obtidos dele apresentam atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* e não apresentam efeito tóxico *in vivo* (ROCKETT *et al.*, 2020). Os principais compostos encontrados no butiá são ácidos fenólicos, dos grupos do ácido hidroxibenzóico e do hidroxicinâmico, e flavonoides dos grupos dos flavonóis, flavonas e flavononas (HOFFMANN *et al.*, 2017a; HOFFMANN *et al.*, 2017b; ROCKETT *et al.*, 2020), sendo que os compostos majoritários presentes são o ácido clorogênico, ácido 4-hidroxibenzóico, (+)-catequina, (-)-epicatequina (HOFFMANN *et al.*, 2017b). Isso também foi observado nos extratos obtidos nas folhas de butiazeiro aqui estudados, em que os compostos majoritários foram o ácido clorogênico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, e em menores quantidades flavonoides como a catequina, epicatequina e quercetina.

De modo geral, o extrato que gerou a maior concentração de ácidos fenólicos e flavonoides foi o extrato PLE-E e o PLE-W:E; esse comportamento foi semelhante ao observado em estudos anteriores desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, em extratos foliares de araçazeiro (ZANDONÁ *et al.*, 2020), de pitangueira e guabirobeira (BAGATINI, 2021). 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).

Os extratos de folhas de butiazeiro apresentaram diversidade e quantidade de ácidos fenólicos e flavonoides, e esses compostos apresentam importantes funções na planta e no fruto, por atuarem como protetores a contra o estresse devido a diversos fatores ambientes que são constantemente expostos, como irradiação, ataque de patógenos e doenças, e quando inseridos na alimentação humana podem proporcionar benefícios à saúde do consumidor, por apresentarem efeitos antioxidantes (ROLEIRA *et al.*, 2015; HAMINIUK *et al.*, 2012). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é descrita *in vivo* e *in vitro* (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011), sendo que a capacidade de eliminação de radicais está relacionada ao número e as posições dos grupos hidroxilas e à sua capacidade quelante de metais (JOMOVÁ *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos também apresentam efeito anticâncer (DÜKEL; TAVSAN; KAYALI, 2021; JOMOVÁ *et al.*, 2019) por terem propriedades pró-oxidantes moderadas, que podem aumentar a formação de ROS e matar células cancerosas (JOMOVÁ *et al.*, 2019).

Conforme os resultados obtidos nesse estudo, os extratos apresentam potencial antioxidante através da proteção das células eucarióticas (células do cérebro de ratos), reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo, sendo que o extrato PLE-W e PLE-E apresentaram melhor proteção para TBARS e com destaque para o extrato PLE-E, que apresentou melhores resultado na menor concentração testada; para ROS, todos os extratos proporcionam proteção já na dose de menor concentração (25 µg mL⁻¹). Com isso, para as folhas de butiazeiro sugere-se obter extratos com etanol.

7.2.2 Os extratos polares de folhas de butiazeiro não geram atividade antimicrobiana

Para a atividade antibacteriana, os extratos de folhas de butiazeiro, quando comparado com os extratos de folhas de araçazeiro (ZANDONÁ *et al.*, 2020), pitangueira e guabirobeira (BAGATINI, 2021), não tiveram efeito antibacteriano frente a diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Pela concentração dos compostos fenólicos presentes nos extratos era esperado que tivesse uma melhor resposta frente às bactérias testadas; entretanto é justificado por ser uma palmeira com maior quantidade de fibras, e que as demais espécies como folhas de araçazeiro,

guabirobeira e pitangueira são folhas que com uma riqueza em diversidade e concentração de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos.

8 Considerações Finais

A pesquisa desenvolvida tem fornecido informações significativas sobre os compostos fenólicos de extratos de folhas de araçazeiro e butiazeiro obtidos por extração de AI ou PLE.

As folhas de araçazeiro contêm uma ampla gama de compostos, principalmente, flavonoides (classe de compostos mais abundante), ácidos fenólicos, taninos e outros, ainda com maior diversidade do que outras folhas amplamente conhecidas, como a erva-mate ou o chá. Já as folhas de butiazeiro apresentam uma menor diversidade de ácidos fenólicos e flavonoides; entretanto, apresentam compostos com benéficas propriedades antioxidantes.

Todos os extratos [AI (técnica de preparação popular) e PLE (alta pressão e temperatura)], geram extratos ricos em compostos fitoquímicos. Dentre os extratos de folhas de araçazeiro, as extrações PLE-W e PLE-W:E proporcionam alta diversidade de compostos, conferindo alta atividade antioxidante *in vitro* (TBARS, ROS e proteção contra leveduras) e atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-positivas. E, para os extratos de folhas de butiazeiro, os extratos PLE-E e PLE-W:E proporcionaram maior extração de compostos fenólicos e flavonoides, sendo que o PLE-E apresentou atividade antioxidante *in vitro* já na menor concentração testada, entretanto, para a atividade antibacteriana os extratos não apresentaram efeitos esperados.

De modo geral, para os extratos de folhas de araçazeiro, quando se deseja obter extratos com maior concentração de compostos sugere-se: PLE-W, PLE-W:E, PLE-E e AI; para atividade antioxidante: PLE-W, PLE-W:E, PLE-E e AI; e, para atividade antibacteriana: PLE-W, PLE-W:E, AI e PLE-E. Para os extratos de folhas de butiazeiro, referente a concentração de compostos fitoquímicos, os extratos se destacaram na seguinte ordem: PLE-E, PLE-W:E, PLE-W e AI; para atividade antioxidante: PLE-E, PLE-W:E, PLE-W e AI; e para atividade antibacteriana: PLE-W e PLE-E, os demais extratos não apresentaram atividade contra as bactérias testadas.

Assim, as folhas de araçazeiro apresentam propriedades putativas para uso em alimentos, alimentos funcionais, produtos nutracêuticos ou antimicrobianos. Testes *in vivo* e de citotoxicidade são necessários para avaliar a eficiência e segurança. Essas ações são ideias ativas para os próximos trabalhos de pesquisa do grupo de trabalho.

Referências bibliográficas

- AGUIAR, M. C. S. *et al.* Volatile compounds from fruits of *Butia capitata* at different stages of maturity and storage. **Food Research International**, v. 62, p. 1095–1099, 2014.
- ALAM, M.; MEERZA, D.; & NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**, v. 109 (1), p. 8–14, 2014.
- ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 637–648, 1992.
- ALMEIDA, R. F. *et al.* Nutraceutical compounds: Echinoids, flavonoids, xanthenes and caffeine identified and quantitated in the leaves of *Coffea arabica* trees from three regions of Brazil. **Food Research International**, v. 115, p. 493-50, 2019.
- ALQURASHI, R. M. *et al.* *In vitro* approaches to assess the effects of açai (*Euterpe oleracea*) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota. **Food Chemistry**, v. 234, p. 190-198, 2017.
- 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.
- ANDRADE, K. S.; TRIVELLIN, G.; FERREIRA, S. R. S. Piperine-rich extracts obtained by high pressure methods. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 370-377, 2017.
- ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 299-304. 2012.
- 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**, v. 121, p. 57-72, 2019.
- AZEVEDO, R. S. A.; TEIXEIRA, B. S.; SAUTHIER, M. C. S.; SANTANA, M. V. A.; 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. 39-49, 2019.

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

BARROS, B. R. S. *et al.* Phytochemical analysis, nutritional profile and immunostimulatory activity of aqueous extract from *Malpighia emarginata* DC leaves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, 101442, 2020.

BASTOS, R. G. *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. 317-322, 2019.

BELWAL, T. *et al.* A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 82-102, 2018.

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

BINDES, M. M. M. *et al.* Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. **Journal of Food Engineering**, v. 241, p. 97–104, 2019.

BOAVENTURA, B. C. B. *et al.* Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1057–1064, 2013.

BONADIMAN, B. DA S. R. *et al.* Guarana (*Paullinia cupana*): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 375–386, 2017.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, p. 256–265, 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**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANDÃO, I. C. D.; SOUZA, S. Amazônia é berço de frutas nativas de alto potencial comercial. **Notícias Mercado de Cultivares e Sementes**. Brasília – DF, 27 de julho de 2016. Embrapa Amazônia, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/14818376/amazonia-e-berco-de-frutas-nativas-de-alto-potencial-comercial>. Acesso em: 02 de abril de 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento Técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005.

Disponível em:

<<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjIwMg%2C%2C>>

Acesso em: 21 dez. 2018.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2004. **Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil**. 2004. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 02 abril de 2018.

BRASIL. Produção Agrícola - Lavoura permanente: Erva-mate. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2018. Disponível em:

<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/11863>. Acesso em: 08 de abril de 2020.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393–405, 2007.

BURT, SARA. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BUTTOW, Miriam Valli. **Etnobotânica e caracterização molecular de Butia sp.**

2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008. Disponível em: < <http://delbutia.com/wp-content/uploads/2014/08/Buttow-2008.pdf>>. Acesso em 23 de junho 2017.

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, D. *et al.* Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS)**, v. 40(114), p. 10695–10700, 2017a.

CARDOSO, J. S. *et al.* Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 23 (1), p. 41-46, 2017b.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região sul**. Brasília: MMA, p. 934, 2011.

CROTTI, A. E. M. *et al.* Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CRUXEN, C. E. DOS S. *et al.* Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 379–385, 2017.

CRUZ, P. N. *et al.* Antioxidant and antibacterial potential of butia (*Butia catarinensis*) seed extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 229–237, 2017.

CUEVA, C. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161(5), p. 372–382, 2010.

CUNHA-SANTOS, E. C. E.; VIGANÓ, J.; NEVES, D. A.; MARTÍNEZ, J.; GODOY, H. T. Vitamin C in camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh: evaluation of extraction and analytical methods. **Food Research International**, v. 115, p. 160–166, 2019.

CVETANOVIĆ, A. *et al.* 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**, v. 266, p. 389–396, 2018.

D'URSO, G. *et al.* LC-ESI/LTQOrbitrap/MS based metabolomics in analysis of *Myrtus communis* leaves from Sardinia (Italy). **Industrial Crops & Products**, v. 128, p. 354–362, 2019.

D'URSO, G.; MONTORO, P.; PIACENTE, S. Detection and comparison of phenolic compounds in different extracts of black currant leaves by Liquid Chromatography coupled with High-Resolution ESI-LTQ-Orbitrap MS and High-Sensitivity ESI-Qtrap MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, 112926, 2019.

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**, v. 95, p. 115–120, 2019.

DA SILVEIRA, T. F. F. *et al.* Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages. **Food Research International**, v. 102, p. 348–354, 2017.

DA SILVEIRA, T. F. F. *et al.* Content of lutein in aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Food Research International**, v. 82, p. 165–171, 2016.

DE LIMA, A. S. *et al.* Action mechanism of araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) hydroalcoholic extract against *Staphylococcus aureus*. **LWT - Food Science and Technology**, 119, 2020.

DE MELO, A. P. C.; SELEGUINI, A.; VELOSO, V. R. S. Caracterização física e química de frutos de araçá (*Psidium guineense* Swartz). **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 91–95, 2013.

DE SOUZA, L. M. *et al.* Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: Development of chemical strategies for catechin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307–7315, 2011.

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.

DONADO-PESTANA *et al.* Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. **Food Science**, v. 19, p. 42–49, 2018.

DU, G. J. *et al.* Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. **Nutrients**, v. 4 (11), p. 1679–1691, 2012.

DÜKEL, M.; TAVSAN, Z.; KAYALI, H. A. Flavonoids regulate cell death-related cellular signaling via ROS in human colon cancer cells. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 11–25, 2021.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407–421, 1990.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; MENEZES, A. L.; NACHTIGAL, J. C. Efeito do ácido indolbutírico e PVP no enraizamento de estacas de araçazeiro (*P. cattleyanum* Sabine) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 90, 1993.

FAO, 2018. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/pt/item/1136255/icode/>. Acesso em: 08 de abril de 2020.

FAOSTAT, 2020. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/>. Acesso em: 08 de abril de 2020.

FERRÃO, T. S. *et al.* Evaluation of composition and quality parameters of jelly palm (*Butia odorata*) fruits from different regions of Southern Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 57–62, 2013.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 251–260, 2003.

FEUERISEN, M. M. *et al.* Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. **Food Chemistry**, v. 214, p. 564–571, 2017.

FOLCH-CANO, C. *et al.* Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β -cyclodextrins by ORAC assays. **Food Research International**, v. 43, n. 8, p. 2039–2044, 2010.

FRANZON, R. C.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B.; SOUSA-SILVA, J. C. Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Planaltina – DF: **Embrapa Cerrados**, p. 1–47, 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/697560/1/doc266.pdf>. Acesso em: 07 de março de 2018.

FU, L. *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v. 129, p. 345–350, 2011.

GALANAKIS, C. M.; TSATALAS, P.; GALANAKIS, I. M. Phenols from olive mill wastewater and other natural antioxidants as UV filters in sunscreens. **Environmental Technology and Innovation**, v. 9, p. 160–168, 2018.

GARCIA, J. A. A. *et al.* Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019.

GARCIA-MENDOZA, M. DEL P. *et al.* Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9–16, 2017.

GONZALES, M.; VILLENA, G. K.; KITAZONO, A. A. Evaluation of the antioxidant activities of aqueous extracts from seven wild plants from the Andes using an *in vivo* yeast assay. **Results in Chemistry**, v. 3, 100098, 2021.

GOUVEA, D. R. *et al.* A new HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart. (Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 28–36, 2012.

HAIAGHAALIPOUR, F.; KANTHIMATHI, M.S.; SANUSI, J.; RAJARAJESWARAN, J. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. **Food Chemistry**, v. 169, p. 401–410, 2015.

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**, v. 47, p. 2023–2044, 2012.

HARAGUCHI, H.; TANIMOTO, K.; TAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; KINOSHITA, T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**, v. 48 (1), p. 125–129, 1998.

HE, M.; WU, T.; PAN, S.; XU, X. Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. **Applied Surface Science**, v. 305, p. 515–521, 2014.

HEIDEN, G.; ELLERT-PEREIRA, P. E.; ESLABÃO, M. P. **Butia in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB120993>>. Acesso em: 27 jul. 2021

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

HERCK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, Nr. 9, p. 138–151. 2007.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. D. P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 26–38, 2015.

HISTER, C. A. L.; TRAPP, K. C.; TEDESCO, S. B. Potencial alelopático e antiproliferativo de extratos aquosos das folhas de *Psidium cattleianum* Sabine sobre *Lactuca sativa* L. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 14, n. 2, p. 124–129, 2016.

HOFFMANN, J. F.; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. *Butia* spp. (Arecaceae): An overview. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 122–121, 2014.

HOFFMANN, J. F.; CARVALHO, I. R.; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. *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 a.

HOFFMANN, J. F.; ZANDONÁ, G. P.; DOS SANTOS, P. S.; DALLMANN, C. M.; MADRUGA, F. B.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and néctar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638–644, 2017 b.

HOFFMANN, Jessica Fernanda. **Potencial funcional e tecnológico de *Butia odorata***. 60f. Dissertação (Mestrado 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, 2014.

INFANTE, J.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. D. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS ONE**, 11(4), 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS (IBF). 2020. **Bioma Amazônico**. Disponível em: <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-amazonico>. Acesso em: 02 de abril de 2020.

- ISLAM, M. A.; EBIHARA, M. Elemental characterization of Japanese green tea leaves and tea infusion residue by neutron-induced prompt and delayed gamma-ray analysis. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 677–682, 2017.
- JACQUES, R. A.; DARIVA, C.; DE OLIVEIRA, J. V.; CARAMÃO, E. B. Pressurized liquid extraction of mate tea leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, n. 1, p. 70–76, 2008.
- JANSEN-ALVES, C. *et al.* Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 703–711, 2019.
- JASKI, J. M. *et al.* β -Cyclodextrin complexation of extracts of olive leaves obtained by pressurized liquid extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 662–672, 2019.
- JOLY, C. A. Biodiversidade e mudanças climáticas: contexto evolutivo, histórico e político. **Ambiente & Sociedade**, v. x, n. 1, p. 169-172, 2007.
- JOLY, C. A. *et al.* Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Journal USP**, v. 89, p. 114–133, 201.
- JOMOVÁ, K. *et al.* A switch between antioxidant and prooxidant properties of the phenolic compounds myricetin, morin, 3',4'-dihydroxyflavone, taxifolin and 4-hydroxycoumarin in the presence of copper(II) ions: A Spectroscopic, Absorption Titration and DNA Damage Study. **Molecules**, v. 24 (23), 4335, 2019.
- KAMALI, H. *et al.* A comparison between pressurized hot water and pressurized liquid extraction for optimizing phenolic and antioxidants capacity of the wooden layer between of walnut seed. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 535–541, 2018.
- KIM, H. W.; KIM, S. R.; LEE, Y. M.; JANG, H. H.; KIM, J. B. Analysis of variation in anthocyanin composition in Korean coloured potato cultivars by LC-DAD-ESI-MS and PLS-DA. **Potato Research**, v. 61, p. 1–17, 2018.
- LACHOS-PEREZ, D. *et al.* Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 7–16, 2018.
- LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, p. 288–306, 2011.
- LEYVA-JIMÉNEZ, F. J. *et al.* Comparative study of conventional and pressurized liquid extraction for recovering bioactive compounds from *Lippia citriodora* leaves. **Food Research International**, v. 109, p. 213–222, 2018.
- LI, Y.; JIANG, X.; HAO, J.; ZHANG, Y.; HUANG, R. Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases. **Archives of Oral Biology**, v. 102, p. 74–82, 2019.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 640, 2006.

LORENZI, H. et al. **Flora Brasileira: Arecaceae (palmeiras)**. [s.l.] Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 367, 2010.

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

MACHADO, A. K. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has anti-inflammatory potential through NLRP3-inflammasome modulation. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 364–371, 2019.

MACHADO, A. P. D. F.; PASQUEL-REÁTEGUI, J. L.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675–683, 2015.

MALLMANN, L. P., TISCHER, B., VIZZOTTO, M. 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, 2020.

MALLMANN, Milena. **Influência do tipo de plantio e etapas do processo de industrialização sobre os compostos fenólicos e metilxantinas da erva-mate**. 2018. 90 f. Dissertação (Química) - Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MCCOOK-RUSSELL, K.P.; NAIR, M.G.; FACEY, P.C.; BOWEN-FORBES, C.S. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1069–1073, 2012.

MEDINA, A. L. et al. 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.

MEINHART, A. D. et al. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58(4), p. 2188–2193, 2010.

MENDES, T. M. N. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) catechins and procyanidins: Gastrointestinal/colonic bioaccessibility, Caco-2 cell permeability and the impact of macronutrients. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 352–361, 2019.

MOLINA-CALLE, M.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Characterization of Stevia leaves by LC–QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. **Food Chemistry**, v. 219, p. 329–338, 2017.

MONDAL, M.; DE, S. Enrichment of (–) epigallocatechin gallate (EGCG) from aqueous extract of green tea leaves by hollow fiber microfiltration: Modeling of flux decline and identification of optimum operating conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 206, n. March, p. 107–117, 2018.

MOON, J. Y. *et al.* 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.

MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, v. 26(8), p. 2231–2234, 1987.

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

NANCE, C. L.; SIWAK, E. B.; SHEARER, W. T. Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 123(2), 459–465, 2009.

NASTIĆ, N. *et al.* Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 200–206, 2018 (a).

NASTIĆ, N. *et al.* Optimization of the extraction of phytochemicals from black mulberry (*Morus nigra* L.) leaves, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 68, n 25, p. 282-292, 2018 (b).

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

OLDONI, T. L. C. *et al.* Bioguided extraction of phenolic compounds and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of extracts of *Moringa oleifera* leaves collected in Brazil. **Food Research International**, v. 125, 108647, 2019.

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

OLIVEIRA, P. S. *et al.* *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 935–941, 2017.

OLIVEIRA, P. S. *et al.* Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. **Metabolic Brain Disease**, v. 33(5), p. 1551–1562, 2018b.

OLIVEIRA, S. R.; CHACÓN-MADRID, K.; ARRUDA, M. A. Z.; JÚNIOR, F. B. *In vitro* gastrointestinal digestion to evaluate the total, bioaccessible and bioavailable concentrations of iron and manganese in açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulps. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 53, p. 27–33, 2019.

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

OSTROSKY, E. A. *et al.* 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.

PACHECO, Simone. **Frutos da família Myrtaceae: Caracterização físico-química e potencial inibitório da atividade das enzimas digestiva**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

PATEL, SEEMA. Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, p. 243–248, 2012.

PENTEADO JUNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. R. **Erva 20: Sistema de produção para erva-mate**. Brasília, DF: Embrapa, 1ª edição, p. 152, 2019.

PERALTA, S. L. *et al.* Self-etching dental adhesive containing a natural essential oil: anti-biofouling performance and mechanical properties. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 29, p. 345–355, 2013.

PEREIRA, E. S. *et al.* *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, 2018.

PLAZA, M.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, 2015.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513–523, 2011.

RAMOS, A. S. *et al.* Chemical characterization and antioxidant capacity of the araçá-pera (*Psidium acutangulum*): An exotic Amazon fruit. **Food Research International**, v. 75, p. 315–327, 2015.

RASEIRA, M.C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro (*Psidium cattleianum*)**. Pelotas: EMBRAPA/CPACT, p. 96, 1996.

REIS, E. D. M. *et al.* Antidepressant-Like Effect of *Ilex paraguariensis* in Rats. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014.

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

RIBEIRO, A. B. *et al.* *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient *in vitro* scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p.140–148, 2014.

ROCKETT, F. C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of *Butia* and *Opuntia* fruits. **Food Research International**, v. 137, 109740, 2020.

RODRIGUEZ, E. A. G. *et al.* Asexual propagation of araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) by leaf and young branches cuttings. **Revista árvore**, v. 40, p. 707–714, 87, 2016.

ROLEIRA, F. M. F. *et al.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v. 183, p. 235–258, 2015.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. DEL P. *et al.* New approaches for the selective extraction of bioactive compounds employing bio-based solvents and pressurized green processes. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 112–120, 2017.

SANDRI, I. G. *et al.* Application of enzymatic preparations to produce araçá pulp and juice. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 4, p. 657–662, 2014.

SANLIER, N.; GOKCEN, B. B.; ALTUĞ, M. Tea consumption and disease correlations. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 95–106, 2018.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 444–452, 2012.

SANTOS, E. C. S. *et al.* M. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13–21, 2015.

SANTOS, J. S. *et al.* 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.

SCHWARTZ, E. *et al.* Avaliação de populações de *Butia capitata* de Santa Vitória do Palmar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 736–745, 2010.

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.

SETYANINGSIH, W. *et al.* Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. **Food Chemistry**, v. 192, p. 452–459, 2016.

SILVA, C. P.; SAMPAIO, G. R.; FREITAS, R. A. M. S.; TORRES, E.A.F.S. Polyphenols from guaraná after in vitro digestion: Evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. **Food Chemistry**, v. 267, p. 405–409, 2018.

SILVA, E. F. D. A. *et al.* Diversity and genetic structure of natural population of araçá (*Psidium guineense* Sw.). **Revista Caatinga**, v. 2125, p. 37–44, 2016.

SILVA, N. A.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z.; ROSSO, V. V. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5072–5084, 2014.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118–122, 1998.

SOARES, J. C. *et al.* Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, p. 178–188, 2019.

SOARES, K. P. *et al.* Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 1, p. 113–139, 2014.

SOLIMAN, F. M.; FATHY, M. M.; SALAMA, M. M.; SABER, F. R. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 54 (2), p. 219–225, 2016.

SOUZA, F. C. A. *et al.* Thermosonication applied on camu-camu nectars processing: effect on bioactive compounds and quality parameters. **Food and Bioprocess Processing**, v. 116, p. 212–218, 2019.

STREIT, N. M. *et al.* Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 560–564, 2007.

SUMNER, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, p. 211–221, 2007.

THAKUR, V. S.; GUPTA, K.; GUPTA, S. The chemopreventive and chemotherapeutic potentials of tea polyphenols. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 191–199, 2012.

UOONLUE, N.; MUANGRAT, R. Effect of different solvents on subcritical solvent extraction of oil from Assam tea seeds (*Camellia sinensis* var. *assamica*): Optimization of oil extraction and physicochemical analysis. **Journal of Food Process Engineering**, 12960, 2018.

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**, v. 2019, p. 1-14, 2019.

VIEIRA, B. M. *et al.* The synthesis and characterization of *Butia capitata* seed oil as a FAME feedstock. **Fuel**, v. 184, p. 533–535, 2016.

VIGANÓ, J. *et al.* Pressurized liquids extraction as an alternative process to readily obtain bioactive compounds from passion fruit rinds. **Food and Bioprocess Processing**, v. 100, p. 382–390, 2016.

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**, v. 38 (2), p. 99-116., 2019.

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

WU, H. *et al.* Blueberry leaves from 73 different cultivars in southeastern China as nutraceutical supplements rich in antioxidants. **Food Research International**, v. 122, p. 548–560, 2019.

WU, T.; ZANG, X.; HE, M.; PAN, S.; XU, X. Structure–Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-*Escherichia coli* Activity and Inhibition of DNA Gyrase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61(34), p. 8185–8190, 2013.

XYNOS, N. *et al.* Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 323–330, 2014.

ZANDONÁ, G. P. *et al.* Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (*Psidium cattleianum*) leaf: putatives antioxidant and antimicrobial properties. **Food Research International**, v. 137, 109573, 2020.

ZHAO, Y.; SALDAÑA, M. D. A. Use of potato by-products and gallic acid for development of bioactive film packaging by subcritical water technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 97–106, 2019.