



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Marina Volpato Dacoreggio

Influência de diferentes métodos de extração e da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre o perfil fenólico, potencial antioxidante e antibacteriano, bioacessibilidade e atividades biológicas de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Florianópolis

2023

Marina Volpato Dacoreggio

Influência de diferentes métodos de extração e da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre o perfil fenólico, potencial antioxidante e antibacteriano, bioaccessibilidade e atividades biológicas de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.(a) Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dr.(a).

Coorientadora: Prof.(a) Anieli Pinto Kempka, Dr.(a)

Florianópolis

2023

Dacoreggio, Marina Volpato

Influência de diferentes métodos de extração e da digestão gastrointestinal in vitro sobre o perfil fenólico, potencial antioxidante e antibacteriano, bioacessibilidade e atividades biológicas de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) / Marina Volpato Dacoreggio ; orientador, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, coorientador, Aniela Pinto Kempka, 2023.

111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Extração verde. 3. Compostos bioativos. 4. Folhas de uvaia. 5. Atividades biológicas. I. Amboni, Renata Dias de Mello Castanho . II. Kempka, Aniela Pinto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Marina Volpato Dacoreggio

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DA DIGESTÃO
GASTROINTESTINAL IN VITRO SOBRE O PERFIL FENÓLICO, POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO, BIOACESSIBILIDADE E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE FOLHAS DE UVAIA (*EUGENIA PYRIFORMIS* CAMBESS)

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Nathalia Darminia Aceval Arriola, Dr.(a)

Universidad de la Republica do Uruguay

Prof.(a) Ana Carolina Moura de Sena Aquino, Dr.(a)

Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)

Prof.(a) Shirley Kuhnen, Dr.(a)

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Carlise Beddin Fritzen Freire, Dr.(a)

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de “Doutora em Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua
forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Prof.(a) Itaciara Larroza Nunes, Dr.(a)

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Prof.(a) Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dr.(a)

Orientadora

Florianópolis

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença em minha vida, me guiando e me amparando durante essa jornada.

A minha família, especialmente meus pais, Valéria e Mário, e meu irmão Michel, que sempre me apoiaram e incentivaram para que eu chegasse até aqui. Tenho profunda admiração por vocês e sou extremamente privilegiada por tê-los como guias.

Ao meu noivo, companheiro e amigo Henrique, pelo apoio incondicional, por todo amor e parceria, por me apoiar e vibrar com as minhas conquistas. Obrigada por ter sido meu porto seguro em todos os momentos que precisei.

À minha orientadora, a Prof. Dra. Renata Amboni, sou grata por todos os ensinamentos, oportunidades, incentivos e dedicação para comigo, por ter acolhido as minhas ideias e a mim.

À minha co-orientadora, a Prof. Dra. Aniela Pinto Kempka, quem despertou em mim, ainda na graduação, a vontade de ir além. Sou imensamente grata por todos os ensinamentos, oportunidades, dedicação e encorajamentos. Para mim você é exemplo e inspiração. Obrigada por tudo.

Às minhas amigas, Heloísa e Gabriela, meu maior presente dessa jornada. Sem a alegria, leveza e apoio de vocês, nada disso seria possível. Obrigada do fundo do meu coração.

Às colegas do Laboratório de Frutas e Hortaliças - LFH por toda parceria e ajuda no desenvolvimento deste trabalho, em especial a amiga Bruna, obrigada de coração.

Ao Rodrigo Hoff e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela parceria nas análises e por todo conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCAL), pela oportunidade de realização do doutorado, e pela disponibilização da infraestrutura necessária.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação por tantos ensinamentos compartilhados, funcionários e técnicos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial a Dra. Liziane Schittler Moroni, que me auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior por apoiar essa pesquisa.

À banca examinadora, por aceitarem o convite e por todo conhecimento que já me foi transmitido até o momento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho, estiveram ao meu lado durante a minha caminhada e formação, meu sinceros, muito obrigada!

*Epígrafe: "O conhecimento é um tesouro,
mas a prática é a chave para obtê-lo."*

(FULLER, 1642)

RESUMO

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) é uma planta nativa do Brasil que apresenta alta concentração de vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos. Esses fitoquímicos têm sido associados à prevenção e gestão de doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. Pesquisas têm se concentrado na identificação e caracterização desses compostos para compreender melhor seus mecanismos químicos e suas atividades biológicas, e estudos revelaram que extratos da fruta uvaia possuem propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. No entanto, há poucos estudos que investigam outras partes dessa planta, como suas folhas. Assim, este estudo objetivou caracterizar e comparar os extratos aquosos das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess obtidos por técnicas de extração verde, mais sustentáveis e responsáveis no uso de recursos naturais e produção de resíduos, como a extração assistida por ultrassom, a extração com auxílio de enzimas e a infusão, em relação ao teor e perfil de compostos fenólicos, bem como às suas atividades antioxidante e antibacteriana. Além de avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos, bem como as atividades antidiabética e anti-hipertensiva da infusão após digestão simulada *in vitro*. Inicialmente os extratos ultrassônicos (EAU), enzimáticos (EAE) e a infusão foram otimizados para identificar as melhores condições para a obtenção de um extrato com maior teor de compostos fenólicos totais. Os extratos foram caracterizados em relação ao seu conteúdo fenólico total (CFT), atividades antioxidantes (ensaio DPPH, ABTS, FRAP e ORAC) e compostos fenólicos individuais (cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas [LC ESI-MS/MS]). A atividade antimicrobiana dos extratos EAU e EAE também foi testada frente a 17 cepas padrão de bactérias, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A infusão das folhas de uvaia foi submetida a digestão gastrointestinal *in vitro* e posterior análises de compostos fenólicos individuais (LC ESI-MS/MS), capacidade antioxidante e atividade antidiabética (inibição de α -amilase e α -glucosidase) e atividade anti-hipertensiva (atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I). Os extratos otimizados revelaram a presença de até vinte e seis compostos fenólicos. Em particular, para os extratos EAU e EAE, o método de extração enzimática mostrou-se eficiente, apresentando maiores quantidades de compostos fenólicos totais e potencial antioxidante. Além disso, ambos extratos demonstraram potencial atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-positivas. Objetivando contribuir para o conhecimento sobre os benefícios da uvaia na saúde humana, a influência da digestão gastrointestinal nos compostos fenólicos e na atividade antioxidante da infusão das folhas de uvaia também foi avaliada. No estudo da influência da

digestão gastrointestinal da infusão das folhas de uvaia, observou-se que o teor de compostos fenólicos totais se manteve ou aumentou em relação à fração não digerida. Nas diferentes fases da digestão foram identificados diferentes compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e fenóis, nas amostras não digeridas e digeridas e variações nos perfis e concentrações de compostos fenólicos foram observadas durante a digestão gastrointestinal *in vitro*. Embora tenha ocorrido uma diminuição do potencial antioxidante após a digestão, a infusão das folhas de uvaia mostrou alta capacidade antioxidante, destacando-se os compostos antioxidantes predominantes, como o ácido fenólico 2,5-DHBA, o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico. Ademais alguns compostos fenólicos presentes na infusão, mesmo não sendo majoritários nas fases da digestão, apresentaram alta bioacessibilidade, com ênfase para o ácido ferúlico (171,6 %) e o ácido p-cumárico (144,1%). A infusão também apresentou porcentagens significativas de inibição da atividade antidiabética (14-21%) e atividade anti-hipertensiva (11%). Esses resultados sugerem que as folhas de uvaia podem ser uma fonte promissora de antioxidantes naturais e compostos bioativos com potenciais benefícios à saúde, em especial frente a diabetes e hipertensão, e que as técnicas de extração não convencionais exploradas oferecem alternativas viáveis e sustentáveis para agregar valor às folhas de uvaia subutilizadas. No entanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar completamente os mecanismos envolvidos e explorar todo o potencial dessa planta nativa do Brasil.

Palavras-chave: uvaia; valorização de resíduos; extração; atividades biológicas, digestão *in vitro*.

ABSTRACT

The uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) is a plant native to Brazil that has a high concentration of vitamin C, carotenoids and phenolic compounds. These phytochemicals have been linked to the prevention and management of chronic and degenerative diseases such as cancer, cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus and obesity. Research has focused on identifying and characterizing these compounds to better understand their chemical mechanisms and biological activities, and studies have revealed that extracts from uvaia fruit have antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. However, there are few studies that investigate other parts of this plant, such as its leaves. Thus, this study aimed to characterize and compare the aqueous extracts of *Eugenia pyriformis* Cambess leaves obtained by green extraction techniques, which are more sustainable and responsible in the use of natural resources and waste production, such as ultrasound-assisted extraction, extraction with the aid of enzymes and infusion, in relation to the content and profile of phenolic compounds, as well as their antioxidant and antibacterial activities. In addition to evaluating the bioaccessibility of phenolic compounds, as well as the antidiabetic and antihypertensive activities of the infusion after simulated *in vitro* digestion. Initially, ultrasonic (EAU), enzymatic (EAE) extracts and infusion were optimized to identify the best conditions for obtaining an extract with a higher content of total phenolic compounds. The extracts were characterized in relation to their total phenolic content (TFC), antioxidant activities (DPPH, ABTS, FRAP and ORAC assay) and individual phenolic compounds (liquid chromatography followed by mass spectrometry [LC ESI-MS/MS]). The antimicrobial activity of the EAU and EAE extracts was also tested against 17 standard strains of bacteria, using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The infusion of uvaia leaves was subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and subsequent analysis of individual phenolic compounds (LC ESI-MS/MS), antioxidant capacity and antidiabetic activity (inhibition of α -amylase and α -glucosidase) and antihypertensive activity (angiotensin I converting enzyme inhibitory activity). The optimized extracts revealed the presence of up to twenty-six phenolic compounds. In particular, for the EAU and EAE extracts, the enzymatic extraction method proved to be efficient, presenting greater amounts of total phenolic compounds and antioxidant potential. Furthermore, both extracts demonstrated potential antibacterial activity, especially against Gram-positive bacteria. Aiming to contribute to knowledge about the benefits of uvaia on human health, the influence of gastrointestinal digestion on phenolic compounds and the antioxidant activity of the infusion of uvaia leaves was also evaluated. In the study of the influence of the infusion of uvaia leaves on

gastrointestinal digestion, it was observed that the content of total phenolic compounds remained unchanged or increased in relation to the undigested fraction. At different stages of digestion, different phenolic compounds, including phenolic acids, flavonoids and phenols, were identified in undigested and digested samples and variations in the profiles and concentrations of phenolic compounds were observed during *in vitro* gastrointestinal digestion. Although there was a decrease in antioxidant potential after digestion, the infusion of uvaia leaves showed high antioxidant capacity, highlighting the predominant antioxidant compounds, such as phenolic acid 2,5-DHBA, ferulic acid and p-coumaric acid. . Furthermore, some phenolic compounds present in the infusion, even though they are not the majority in the digestion phases, showed high bioaccessibility, with emphasis on ferulic acid (171.6%) and p-coumaric acid (144.1%). The infusion also showed significant percentages of inhibition of antidiabetic activity (14-21%) and antihypertensive activity (11%). These results suggest that uvaia leaves can be a promising source of natural antioxidants and bioactive compounds with potential health benefits, especially against diabetes and hypertension, and that the unconventional extraction techniques explored offer viable and sustainable alternatives to add value to underused uvaia leaves. However, more research is needed to fully elucidate the mechanisms involved and explore the full potential of this plant native to Brazil..

Keywords: Uvaia; waste valorization; extraction; biological activities, *in vitro* digestion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess)	23
Figura 2- Fenólicos totais (a) e capacidade antioxidante (b) da infusão de folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess) antes e após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	73
Figura 3- Soma dos compostos fenólicos individuais da infusão de folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess), antes e após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	76
Figura 4 - Análise dos componentes principais (a) e análise de agrupamento hierárquico (b) dos compostos fenólicos individuais da infusão das folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess) antes e depois da digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Combinação entre as variáveis e os níveis do delineamento experimental para a otimização de compostos fenólicos totais dos extratos assistidos por ultrassom (EAU) e auxiliados por enzimas (EAE), das folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess)	43
Tabela 2- Níveis de variáveis e resposta do conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos ultrassônicos e enzimáticos com base no tempo, volume de solvente e tamanho das partículas das folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess).....	48
Tabela 3- Análise de variância para o conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos ultrassônicos e enzimáticos com base no tempo de extração, volume de solvente e tamanho das partículas das folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess).....	49
Tabela 4- Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de extratos de folha de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess) em condições otimizadas	51
Tabela 5- Teor fenólico individual de extratos de folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess) em condições otimizadas	53
Tabela 6- Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos aquosos de folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess) em condições otimizadas contra dezessete bactérias fitopatogênicas.....	56
Tabela 7- Combinação entre as variáveis e os níveis do delineamento experimental para a extração de compostos fenólicos totais da infusão de folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess)	66
Tabela 8- Análise de variância para o conteúdo fenólico total (CFT) da infusão com base no tempo de extração, temperatura do solvente e tamanho das partículas das folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess)..	71
Tabela 9- Níveis de variáveis e resposta do conteúdo fenólico total (CFT) da infusão com base no tempo, temperatura e tamanho das partículas das folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess)	72
Tabela 10- Teor de fenólicos individuais da infusão de folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess) antes e após a digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	74
Tabela 11- Índice de bioacessibilidade de compostos fenólicos após processo de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> da infusão de folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess)	77
Tabela 12- Atividade antidiabética e anti-hipertensiva da infusão digerida das folhas de uvaia (<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess), em diferentes concentrações.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
BHA	2-terc-butil-4-hidroxianisol/ 3-terc-butil-4-hidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CFT	Conteúdo fenólico total
COX	Ciclo-oxigenase
DES	Solventes eutéticos profundos
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DRI	Ingestão dietética de referência
EAE	Extração auxiliada por enzimas
EAO-EAU	Extrato aquoso otimizado – Extração assistida por ultrassom
EAO-EAE	Extrato aquoso otimizado - Extração auxiliada por enzimas
EAU	Extração assistida por ultrassom
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EE	Extração enzimática
EGCG	Galato de epigallocatequina
FRAP	Capacidade de redução de ferro férrico
EAG	Equivalente de ácido gálico
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDL	Oxidação lipoproteica de baixa densidade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ORAC	Capacidade de remoção de radicais de oxigênio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 OBJETIVOS	19
1.1 OBJETIVOS GERAIS	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO 1	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 UVAIA	21
1.2 EXTRATOS VEGETAIS A PARTIR DE FOLHAS	23
1.2.1 Extração assistida por ultrassom	25
1.2.2 Extração com auxílio de enzimas	26
1.2.3 Infusão	26
2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE UVAIA	29
3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	29
3.2 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA	31
3.3 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA	32
4 BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	33
CAPÍTULO 2	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 MATERIAL	41
2.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS FOLHAS DE UVAIA	41
2.3 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE UVAIA	41
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (CFT)	43
2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS OTIMIZADOS DAS FOLHAS DE <i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	43
2.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS	44
2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	45

2.8.1	Potencial antioxidante pelo método DPPH	45
2.8.2	Potencial antioxidante pelo método ABTS.....	45
2.8.3	Potencial antioxidante pelo método FRAP.....	45
2.8.4	Potencial antioxidante pelo método ORAC.....	46
2.9	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	46
2.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1	DELINIAMENTO EXPERIMENTAL	48
3.2	CONTEÚDO FENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	50
3.3	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR LC-ESI-MS/MS.....	52
3.4	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	55
4	CONCLUSÃO.....	59
	CAPÍTULO 3.....	60
	RESUMO.....	61
	ABSTRACT	62
	1 INTRODUÇÃO	63
2	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1	MATERIAL.....	65
2.2	COLETA E PREPARAÇÃO DAS FOLHAS DE UVAIA.....	65
2.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	66
2.4	PREPARO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE UVAIA	67
2.5	DIGESTÃO SIMULADA <i>IN VITRO</i> PARA INFUSÃO.....	67
2.6	BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS	67
2.7	ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA (INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE E ALFA- GLUCOSIDASE).....	68
2.8	ATIVIDADE ANTI-HIPERTESIVA.....	69
2.9	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	69
2.10	ANÁLISE LC-MS/MS DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS.....	69
2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	71

3.2	EFEITO DA DIGESTÃO NO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	72
3.3	ANÁLISE LC-MS/MS DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS.....	74
3.4	ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA E ANTIHIPERTENSIVA DA INFUSÃO DE UVAIA APÓS DIGESTÃO SIMULADA <i>IN VITRO</i>	79
4	CONCLUSÃO.....	82
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXOS	109

INTRODUÇÃO

Considerando o avanço científico que envolve os estudos farmacológicos de plantas e o crescente interesse na promoção do bem-estar e qualidade de vida da população, há uma motivação em torno da pesquisa e identificação de substâncias naturais que apresentem benefícios para o organismo. Nesse contexto, destaca-se a uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), espécie nativa brasileira da família Myrtaceae, encontrada nos estados de São Paulo até o Rio Grande do Sul, bem como nos países vizinhos, Argentina e Paraguai (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Devido à sua bioatividade, com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, os frutos da uvaia têm potencial valor para a indústria farmacêutica (ANDRADE; FERREIRA, 2000; DONADIO, 1997; FERNANDES DE ARAÚJO *et al.*, 2019). Entretanto, os estudos que relatam a aplicação da uvaia como alimento funcional e fitoterápico ainda são insuficientes, assim como os que exploram diferentes partes desta planta (DA SILVA *et al.*, 2019; SGANZERLA *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2021; SGANZERLA *et al.*, 2021). As folhas da uvaia, por exemplo, ainda são pouco estudadas, e o perfil fitoquímico e atividades biológicas de seus extratos não foram completamente elucidados. Comumente tratadas como resíduos de origem vegetal, as folhas da uvaia representam uma fonte alternativa para a obtenção de compostos bioativos capazes de suprir necessidades básicas para a saúde humana.

A etapa de extração desempenha um papel de destaque na obtenção de compostos bioativos, sendo que a seleção do método apropriado é de grande importância para garantir um alto rendimento e pureza dos compostos de interesse. Nas últimas décadas, em função do crescente interesse por considerações ambientais, econômicas e de segurança, tem-se verificado a implementação de alternativas inovadoras e sustentáveis nas indústrias de processamento de alimentos, cosméticos e farmacêuticos. Nesse contexto, os pesquisadores definiram o termo "extração verde" (CHEMAT *et al.*, 2019), que engloba práticas e técnicas de extração que visam reduzir os impactos ambientais, reduzir os riscos à saúde e promover a sustentabilidade econômica, sem comprometer a eficiência e eficácia do processo de extração.

Diversas tecnologias de extração têm sido amplamente utilizadas para a obtenção de uma variedade de compostos bioativos em alimentos, bem como em aplicações farmacêuticas, incluindo extração assistida por ultrassom, auxílio de enzimas

e infusão. Essas tecnologias têm a vantagem de reduzir ou até mesmo eliminar o uso de solventes químicos tóxicos, além de melhorar a eficiência da extração, aumentando tanto o rendimento quanto a qualidade dos extratos obtidos. Adicionalmente, elas contribuem para a redução do tempo de extração e do consumo de energia, o que representa benefícios significativos sob o ponto de vista econômico e ambiental (UMMAT *et al.*, 2021).

Os extratos naturais têm sido valorizados como fontes de fitoquímicos, incluindo compostos fenólicos, carotenoides e compostos voláteis, muitos dos quais apresentam propriedades biológicas comprovadas, como atividade antimicrobiana e antioxidante, além de seu potencial para prevenir doenças crônicas e degenerativas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidade e amnésia, entre outras (FERNANDES DE ARAÚJO *et al.*, 2019).

Devido à importância de expandir o conhecimento sobre novas propriedades biológicas de espécies nativas brasileiras, as folhas da uvaia são uma fonte promissora de estudos na busca por novas fontes de compostos bioativos. Com o propósito de abordar todos os aspectos mencionados anteriormente, este trabalho foi organizado em capítulos, sendo o primeiro dedicado à revisão bibliográfica e os demais voltados para a apresentação dos resultados da pesquisa experimental, os quais foram redigidos na forma de artigos científicos.

O primeiro capítulo desta tese de doutorado trata de uma revisão bibliográfica que aborda os temas relevantes ao desenvolvimento do trabalho: uvaia; extratos vegetais a partir de folhas; extração verde; infusão; atividade antioxidante; atividades biológicas das folhas de uvaia; biodisponibilidade dos compostos fenólicos em modelo de digestão simulada *in vitro*.

O segundo capítulo apresenta o estudo da eficiência da extração assistida por ultrassom e da extração assistida por enzima na obtenção de extratos de folhas de uvaia com notável atividade antioxidante e antibacteriana. Nesta pesquisa, diferentes tempos de extração, quantidades de solvente e tamanhos de partículas das folhas foram utilizados para definir as melhores condições para obtenção do extrato com o maior teor de compostos fenólicos totais. Além disso, os extratos otimizados foram caracterizados quanto aos seus compostos fenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana.

No terceiro capítulo do trabalho é apresentado o estudo da influência das etapas da digestão gastrointestinal *in vitro* nos compostos fenólicos e na atividade antioxidante

da infusão de folhas de *E. pyriformis* Cambess, bem como a bioacessibilidade, e os efeitos antidiabético e anti-hipertensivo dos compostos fenólicos.

O artigo publicado em revista indexada está disponível no Anexo A.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e comparar os extratos aquosos das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess obtidos por técnicas como a extração assistida por ultrassom, a extração com auxílio de enzimas e a infusão, em relação ao teor e perfil de compostos fenólicos, bem como às suas atividades antioxidante e antimicrobiana. Além de avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos, bem como as atividades antidiabética e anti-hipertensiva da infusão após digestão simulada *in vitro*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Otimizar a eficiência de extração de compostos fenólicos em extratos aquosos das folhas de uvaia, usando como métodos a extração assistida por ultrassom, a extração com auxílio de enzimas e a infusão;
- b) Determinar o teor total e o perfil dos compostos fenólicos de cada extrato e a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos de sequestro de radical (DPPH e ABTS); do poder antioxidante de redução férrico (FRAP); e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC);
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato ultrassônico e enzimático em relação às bactérias de importância patogênica, definindo a concentração inibitória mínima para os extratos;
- d) Avaliar a bioacessibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos e as atividades antidiabética e anti-hipertensiva das folhas de uvaia obtidos por infusão, durante e após a exposição a condições gastrointestinais simuladas, respectivamente.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nota: O texto e os dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Marina Volpato Dacoreggio, Gabriela Soster Santetti, Heloísa Patrício Inácio, Anielá Pinto Kempka, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, disponível em *Food Reviews International*, <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1958226> (ANEXO A)

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 UVAIA

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), pertencente à família Myrtaceae, é uma espécie nativa do Brasil, encontrada nos estados de São Paulo até o Rio Grande do Sul, além dos países vizinhos Argentina e Paraguai (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). Seu nome tem origem na palavra tupi "iwa'ya", que significa "fruto ácido", e é conhecida por diversos outros nomes, tais como uvaia, ubaia, uvalha, orvalha e uvaieira (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

De acordo com Scalon et al. (2004), existem duas espécies de uvaia: *E. pyriformis* e *Eugenia uvalha*. No entanto, a *E. pyriformis* foi aceita como o nome botânico correto para essa fruta, enquanto a *E. uvalha* é considerada um sinônimo. Até o momento foram identificados sete acessos da *E. pyriformis*: Bolívia, Comum, Doce, Doce de Patos de Minas, Pêra, Rugosa e Rugosa Doce (JACOMINO et al., 2018). A uvaia é uma árvore de porte médio, que pode atingir entre 6 e 13 metros de altura, com troncos curtos e diâmetro de até 50 cm, apresentando copa arredondada ou alongada. Suas folhas são simples, opostas, sem pelos, subcoriáceas e, quando jovens, apresentam coloração róseo-avermelhada, medindo de 4 a 7 cm de comprimento. As flores são brancas, normalmente solitárias ou agrupadas em três, hermafroditas, tetrâmeras e possuem grande número de estames. Os frutos são do tipo baga, arredondados, com epicarpo fino e aveludado, e a polpa é carnuda, com coloração amarela ou alaranjada. Suas sementes são grandes, com alta capacidade de germinação, e cada fruto pode conter de 1 a 3 sementes (SILVA; BILIA; BARBEDO, 2005).

A uvaia é uma planta altamente adaptável em relação ao clima e pode ser cultivada em áreas com temperaturas anuais variando entre 18 e 26 °C, sendo capaz de suportar geadas de até - 4 °C. As baixas temperaturas durante o inverno afetam consideravelmente a quantidade de metabólitos secundários. Além disso, o inverno apresenta outras características que podem influenciar positivamente na produção e composição desses metabólitos, como o estresse hidrológico, devido à diminuição das chuvas, o que pode aumentar a evapotranspiração das espécies (HARRIS, 2009).

Ainda que pouco consumida *in natura*, a polpa da uvaia é frequentemente utilizada na produção de sucos, licores, cervejas, geleias, doces e sorvetes, e apresenta

grande potencial para a indústria agroalimentar. Além disso, devido à sua bioatividade, que inclui propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, os frutos da uvaia podem ser valiosos para a indústria farmacêutica (ANDRADE; FERREIRA, 2000; DONADIO, 1997; FERNANDES DE ARAÚJO *et al.*, 2019).

Os frutos de uvaia possuem bioatividade atribuída, principalmente, ao alto teor de compostos fenólicos e metabólitos secundários, apresentando elevada capacidade antioxidante. Esses compostos podem proteger os sistemas biológicos contra o excesso de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (NACZK; SHAHIDI, 2004). Quando incluídos na dieta humana, esses compostos podem contribuir para reduzir o desenvolvimento de doenças degenerativas, doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, entre outras (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Ainda que a uvaia contenha diversos compostos químicos, tais como minerais, proteínas, açúcares, compostos voláteis e carotenoides, que podem contribuir para a saúde humana, há poucos estudos que exploram o potencial da uvaia como alimento funcional e fitoterápico, bem como a utilização de diferentes partes da planta para esse fim (DA SILVA *et al.*, 2019; SGANZERLA *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2021; SGANZERLA *et al.*, 2021).

As folhas da uvaia (Figura 1), ainda são pouco estudadas quanto ao seu perfil fitoquímico e suas atividades biológicas, sendo necessário mais estudos para explorar seu potencial como fonte de compostos bioativos. Apel e Hirt (2004) caracterizaram quimicamente o óleo essencial das folhas obtido por hidro destilação e relataram a presença de α -cadinol (14,0%), δ -cadineno (12,4%), T-cadinol (11,9%), biciclogermacreno (10,2 %) e β -cariofileno (7,2%). Stefanello *et al.* (2009) avaliaram a variação sazonal dos óleos essenciais das folhas da uvaieira e observaram uma composição variada de mono e sesquiterpenos, com os principais componentes sendo pineno, limoneno, 1,8-cineol e óxido de cariofileno. Além disso, extratos etanólicos das folhas de uvaia foram estudados e apresentaram em sua composição alcaloides, flavonoides, taninos e saponinas (CHAVASCO *et al.*, 2014).

Figura 1 - Folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

1.2 EXTRATOS VEGETAIS A PARTIR DE FOLHAS

Segundo Oliveira e Akisue (1997), extratos vegetais são preparações concentradas com várias características derivadas de matérias-primas vegetais secas, que podem ou não ter passado por tratamentos prévios (como ação enzimática ou moagem). Esses processos complexos envolvem a utilização de solventes, que podem separar compostos específicos ou partes deles.

Os chás ou infusões de ervas são os extratos vegetais mais comuns, amplamente consumidos em todo o mundo, especialmente em países asiáticos, sul-americanos e europeus, devido aos benefícios à saúde e funções fisiológicas que proporcionam (COZ-BOLAÑOS *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2015).

Considerando a importância de expandir o conhecimento sobre as propriedades biológicas de espécies nativas brasileiras, as folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis*

Cambess) se apresentam como uma promissora base de estudos em busca de novas fontes de compostos bioativos.

A extração é uma etapa importante para a obtenção de compostos bioativos, e a escolha do método de extração é crucial para se obter alto rendimento e pureza dos compostos de interesse (DANLAMI *et al.*, 2014). A escolha do solvente adequado está intimamente relacionada com a eficiência do processo de extração.

Embora o uso de solventes orgânicos apresente alta aplicabilidade, eficiência e facilidade de uso, também apresenta aspectos negativos, como alta toxicidade, necessidade de grandes quantidades de solvente, maior resistência à transferência de massa e possíveis degradações na matriz (SAFDAR *et al.*, 2017). Além disso, técnicas convencionais de extração, como soxhlet, extração sólido-líquido e extração líquido-líquido, utilizam grandes volumes de solventes, exigem longos tempos de extração e frequentemente apresentam baixo rendimento e baixa seletividade (IBAÑEZ *et al.*, 2012; ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse por questões relacionadas ao ambiente, à econômica e à segurança, o que resultou na implementação de alternativas inovadoras com valores duráveis e verdes nas indústrias de processamento de alimentos, cosméticos e farmacêuticos. Para seguir esses princípios, pesquisadores definiram o termo "extração verde", que se baseia na descoberta e no desenho de processos de extração que reduzem o consumo de energia, permitem o uso de solventes alternativos e produtos naturais renováveis, e garantem um extrato/produto seguro e de alta qualidade (CHEMAT *et al.*, 2019).

A busca pela substituição dos solventes orgânicos pelos "verdes" ocorreu principalmente devido à demanda por substâncias atóxicas, recicláveis e biodegradáveis (CVJETKO BUBALO *et al.*, 2014). A água é uma das soluções mais utilizadas durante a extração de compostos bioativos, pois atende a essas demandas e apresenta vantagens como fácil acessibilidade, baixo custo, boa seletividade e influência das ligações de hidrogênio durante o processo de transferência de massa (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Diferentes tecnologias de extração têm sido utilizadas para obter compostos bioativos de alimentos e fármacos, dentre elas a extração com água, que pode ser assistida por ultrassom, enzimas ou infusão. Essas tecnologias permitem a redução ou eliminação do uso de solventes químicos tóxicos, melhorando a eficiência da extração, aumentando

o rendimento e qualidade do extrato, além de diminuir o tempo de extração e o consumo de energia (UMMAT *et al.*, 2021).

1.2.1 Extração assistida por ultrassom

O ultrassom é uma técnica que utiliza a energia das ondas sonoras de alta potência (com frequência entre 20 e 100 kHz) e de baixa potência (entre 1 e 10 MHz) para gerar vibrações que resultam em variações na pressão do líquido. Essas ondas consistem em ciclos de compressão e rarefação que podem ser propagados através de meios sólidos, líquidos ou gasosos, provocando o deslocamento e desalojamento das moléculas de suas posições originais. Em ondas sonoras de alta intensidade, a pressão negativa durante a rarefação excede a força de atração das moléculas, causando a separação entre elas e a formação de bolhas de cavitação (MASON; PANIWNKY; LORIMER, 1996; PICÓ, 2013).

As ondas sonoras e bolhas de cavitação em colapso podem resultar na fragmentação, erosão localizada, formação de poros, aumento da absorção e índice de inchaço na matriz celular da planta. As bolhas em colapso geram ondas de choque que aceleram a colisão entre partículas, levando à fragmentação da estrutura celular. A rápida fragmentação resulta na solubilização do componente bioativo no solvente, devido à diminuição do tamanho das partículas, aumento da área da superfície e altas taxas de transferência de massa na camada de limite da matriz sólida (UMMAT *et al.*, 2021).

A aplicação do ultrassom na extração tem como principais efeitos o aumento da permeabilidade das paredes celulares das plantas. Com o aumento da temperatura, ocorre a formação e colapso das bolhas de cavitação, gerando uma pressão que resulta na quebra das paredes celulares, permitindo maior penetração do solvente na matriz (CHEILA *et al.*, 2020). Esse aumento de contato entre o solvente e o analito favorece a solubilização do composto. Klein e colaboradores (2018) compararam diferentes métodos de extração das folhas de uvaia, incluindo a extração supercrítica e assistida por ultrassom, e constataram que a extração assistida por ultrassom apresentou um rendimento máximo (1,69 % em peso), com tempo de extração significativamente menor (60 vezes menor). Outros estudos também indicam que a utilização do ultrassom na extração de compostos fenólicos de folhas é eficaz, rápido e simples (IRAKLI *et al.*, 2018; LUO *et al.*, 2018).

1.2.2 Extração com auxílio de enzimas

A extração por meio de enzimas se baseia na capacidade intrínseca das enzimas em catalisar reações com alta especificidade, regioseletividade e capacidade de funcionar em diferentes condições de processamento (PURI; SHARMA; BARROW, 2012). O princípio fundamental da extração enzimática consiste na hidrólise da parede celular vegetal pela enzima, que é usada como catalisador sob condições experimentais ideais para liberar os componentes intracelulares (GLIGOR *et al.*, 2019). A parede celular da planta se liga ao sítio ativo da enzima, onde o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage, resultando em uma interação máxima entre os dois. A mudança na conformação da enzima provoca a quebra de ligações da parede celular, liberando seus constituintes ativos (NADAR; RAO; RATHOD, 2018).

Geralmente a extração de bioativos de plantas envolve o uso de uma mistura enzimática, devido à composição das paredes celulares das plantas, que consistem principalmente de fibras de celulose, juntamente com hemicelulose e substâncias pécicas incorporadas em uma matriz (MARATHE *et al.*, 2019).

Dessa forma, diversas enzimas, tais como celulase, pectinase, protease e amilase, têm sido empregadas com êxito na extração de compostos bioativos de diferentes fontes (SWER *et al.*, 2018). Boulila *et al.* (2015) ao avaliarem o potencial da aplicação de enzimas (celulase, hemicelulase e xilanase) como ferramenta para aumentar a eficiência da extração de compostos bioativos de folhas de louro, observaram um significativo aumento na liberação de compostos fenólicos e, conseqüentemente, de sua atividade antioxidante residual. Resultados semelhantes sugerem que o pré-tratamento enzimático pode ser útil na extração de componentes de interesse e apresentar amplo potencial de uso em setores alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (CHEN *et al.*, 2011; HOSNI *et al.*, 2013).

1.2.3 Infusão

As infusões de chá e ervas são amplamente consumidas em todo o mundo devido à sua variedade, aroma e sabor, além de serem associadas a múltiplos efeitos benéficos à saúde, como relatado na literatura (COZ-BOLAÑOS *et al.*, 2018; ORTEGA-VIDAL *et*

al., 2019; POHL *et al.*, 2016; WELNA; SZYMCZYCHA-MADEJA; POHL, 2013). O chá é uma bebida feita por infusão de folhas da planta *Camellia sinensis* em água quente e pode ser encontrado em diferentes variedades, como preto, verde, oolong, pu-erh, branco e amarelo. Os tipos de chá mais populares, preto, verde e oolong, diferem entre si apenas pelo grau de fermentação das folhas (SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2012). Por outro lado, as infusões de ervas são preparadas com diferentes partes ou uma mistura de plantas medicinais, como flores, folhas, frutas, ervas, cascas e raízes (POHL *et al.*, 2016).

A composição química das infusões de ervas é altamente complexa, incluindo polifenóis, flavonoides, proteínas, aminoácidos, enzimas, substâncias formadoras de aroma, vitaminas, fibras, óleos voláteis, purinas, carboidratos e minerais, tornando-as uma fonte rica de nutrientes essenciais (SZYMCZYCHA-MADEJA; WELNA; POHL, 2012). A composição elementar é única para cada tipo de erva e é influenciada principalmente pela produção e origem geográfica das plantas, incluindo as condições do solo, clima, ambiente e práticas agrícolas, bem como o método de extração utilizado (CELEP *et al.*, 2019; KOMES *et al.*, 2010; POHL *et al.*, 2016; WELNA; SZYMCZYCHA-MADEJA; POHL, 2013).

Uma prática milenar na China é o consumo de extratos de plantas medicinais através da infusão em água fervente. Esses extratos têm se mostrado seguros para o consumo, já que a água é um solvente de baixa toxicidade se comparada a outros solventes, como o metanol. Portanto, o método de extração por infusão em água fervente é uma escolha mais segura e eficaz para obter extratos ricos em antioxidantes das plantas. Além disso, quando o extrato apresenta forte atividade antioxidante e não é tóxico, não é necessário realizar o isolamento e a purificação de componentes antioxidantes específicos, uma vez que os benefícios para a saúde podem ser decorrentes dos efeitos aditivos e sinérgicos dos fitoquímicos presentes no extrato (LIU, 2003).

Diversas pesquisas foram conduzidas com o objetivo de identificar os benefícios da infusão para a saúde humana. Esses benefícios estão associados a vários fatores, incluindo atividade antioxidante (JIE *et al.*, 2006; POHL *et al.*, 2016), presença de compostos anti-Alzheimer (OKELLO; SAVELEV; PERRY, 2004), efeitos protetores contra o câncer (POHL *et al.*, 2016; SIDDIQUI; RAISUDDIN; SHUKLA, 2005; WAY *et al.*, 2004), doenças vasculares, hipertensão, cárie dentária (SOFUOGLU; KAVCAR, 2008; YOKOGOSHI *et al.*, 1995), prevenção da obesidade (KIM *et al.*, 2009) e redução

dos níveis de colesterol no sangue (FUJITA; YAMAGAMI, 2008). Em vista disso, infusões de ervas podem ser consideradas como bebidas farmacologicamente ativas, pois fornecem uma das principais fontes de polifenóis na dieta humana, tornando-se atraentes para a indústria alimentar, química e farmacológica.

2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diversos estudos têm evidenciado a relação entre o estresse oxidativo, a senescência celular e diversas enfermidades (SALEHI *et al.*, 2018a). O estilo de vida atual tem levado à superprodução de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) em nosso organismo, aumentando o nível fisiológico de estresse oxidativo enquanto reduz a atividade antioxidante (PISOSCHI; NEGULESCU, 2012). Radicais livres e outras ROS, como oxigênio singlete, radical hidroxila, ânion superóxido e radical peroxil, podem surgir do metabolismo normal do corpo humano, causando danos oxidativos a macromoléculas funcionais, como DNA, proteínas e lipídios (APEL; HIRT, 2004). Esse processo aumenta a probabilidade de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, inflamatórias, aterosclerose, câncer e distúrbios relacionados à idade, dentre outros. Entretanto, os antioxidantes protegem o corpo humano contra os radicais livres, prevenindo o estresse oxidativo e as doenças associadas (VALKO *et al.*, 2007).

Além disso, é importante destacar que diversas doenças, incluindo Alzheimer, câncer, diabetes e até mesmo o ganho de peso, podem ser desencadeadas ou agravadas pelos danos celulares causados pelo estresse oxidativo (SALEHI *et al.*, 2019; SATIJA; HU, 2018). Assim, a eliminação dos radicais livres é crucial para prevenir ou retardar o início de algumas doenças relacionadas a esse processo oxidativo, e, portanto, compostos antioxidantes são considerados fundamentais para a manutenção da saúde (SALEHI *et al.*, 2019).

Vários antioxidantes sintéticos estão disponíveis, porém, seu uso pode causar efeitos tóxicos e colaterais em animais e seres humanos, como é o caso do butilhidroxitolueno (BHT) e 2-terc-butil-4-hidroxianisol/3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), que apresentam potencial carcinogênico (BOTTERWECK *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2014). Por isso, a substituição de antioxidantes sintéticos por compostos naturais pode trazer vantagens, uma vez que apresentam implicações positivas na saúde e funcionalidade.

Diversas pesquisas evidenciaram que as plantas medicinais são uma excelente fonte de compostos antioxidantes, incluindo fenólicos, vitaminas e alcaloides, os quais têm potencial para serem utilizados como produtos farmacologicamente ativos, a fim de equilibrar o estado fisiológico antioxidante/prooxidante (COZ-BOLAÑOS *et al.*, 2018; ORTEGA-VIDAL *et al.*, 2019; POHL *et al.*, 2016; WELNA; SZYMCZYCHA-MADEJA; POHL, 2013).

Existem poucos estudos *in vitro* que demonstram o potencial antioxidante das folhas de uvaia. Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2016), foi observada alta atividade antioxidante ($IC_{50} = 2,8 \mu\text{g/mL}$) nos extratos etanólicos das folhas de uvaia, valores próximos aos obtidos com o padrão quercetina ($IC_{50} = 1,1 \mu\text{g/mL}$). Esses resultados também foram semelhantes aos encontrados por Salvador *et al.* (2011) para as folhas de uvaia coletadas no Rio Grande do Sul, com um valor de $IC_{50} = 1,7 \mu\text{g/mL}$. Recentemente, Ueda (2020) estudou o processo de extração de compostos antioxidantes das folhas de uvaia, levando em consideração fatores como o uso de solventes verdes (DES), tempo e temperatura de extração, proporção entre amostra e solvente e o efeito da extração sólido-líquido. Os resultados mostraram valores de atividade antioxidante entre 0,14 e 1,14 mmol Trolox/g de amostra para o método DPPH e 0,51 a 1,78 mmol Trolox/g de amostra para o método FRAP.

3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE UVAIA

3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As doenças infecciosas são a principal causa mundial de mortes prematuras. Infecções devido à variedade de agentes etiológicos bacterianos, como a *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, o *Staphylococcus aureus* são muito comuns (ALAVIJEH; SHARMA, 2012).

Os antimicrobianos são fármacos utilizados com o intuito de provocar a morte ou inibir o crescimento de determinado agente microbiano. São originados de substâncias produzidas pelos próprios microrganismos, oriundas de vegetais ou mesmo sintéticas (ALTERTHUM; TRABULSI, 2003).

Atualmente, tem sido amplamente relatada em todo o mundo a resistência das bactérias patogênicas a fármacos. A resistência a um determinado antimicrobiano é

caracterizada quando uma bactéria é capaz de crescer, *in vitro*, na presença da concentração inibitória mínima deste fármaco. A resistência pode ser natural, quando os genes da bactéria codificam enzimas que inativam o mecanismo de ação do fármaco, ou adquirida, quando a bactéria se torna resistente a um fármaco sensível por meio da aquisição de fatores genéticos ou mutação em seus genes de defesa (CHUA *et al.*, 2020).

Diversas estratégias tecnológicas têm sido propostas para abordar o problema da resistência bacteriana, incluindo a busca por novos antimicrobianos derivados de espécies vegetais. Há relatos sobre a atividade antimicrobiana de vários extratos vegetais (DE BOER *et al.*, 2005; KEYHANFAR; NAZERI; BAYAT, 2004), muitos dos quais têm mostrado eficácia no tratamento de infecções urinárias, distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias e infecções de pele (BRANTNER; GREIN, 1994; SOMCHIT *et al.*, 2003). Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com exceções raras, difere significativamente dos antibióticos de origem microbiana (ALAVIJEH; SHARMA, 2012).

As principais classes de compostos com atividade antimicrobiana obtidos a partir de plantas são: terpenoides, taninos, cumarinas, óleos essenciais, alcaloides, lectinas, polipeptídeos e substâncias fenólicas e polifenólicas, incluindo ácidos fenólicos, fenóis simples, quinonas, flavonóis, flavonas e flavonoides (COWAN, 1999; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008).

Um estudo conduzido por Angela e colaboradores (2014) evidenciou que extratos hidroalcoólicos e de acetato de etila das folhas de uvaia apresentaram notável atividade inibitória contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Em contraste, Ueda (2020) não observou halos de inibição suficientes para afirmar que os extratos obtidos a partir de folhas de uvaia possuem atividade antimicrobiana significativa contra as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*) utilizando solventes eutéticos profundos. Além disso, a atividade antifúngica da uvaia foi estudada, e os resultados sugerem um interessante potencial inibitório para os extratos brutos. Durazzini *et al.* (2019) também investigaram a atividade antifúngica do óleo essencial da parte aérea da uvaia e observaram que ele apresenta alta atividade antifúngica contra *Malassezia furfur*, podendo ser considerado um aliado na preparação de formulações fitoterápicas.

3.2 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA

O Diabetes Mellitus (DM) é um conjunto de doenças metabólicas que se caracteriza pela presença de hiperglicemia crônica. Essa condição pode ser causada tanto pela incapacidade do organismo em produzir insulina quanto pela diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina. A incidência e prevalência do DM estão aumentando e atingindo proporções epidêmicas, de acordo com Soumya e Srilatha (2011). Em 2021, o diabetes causou 6,7 milhões de mortes em todo o mundo e se as tendências atuais continuarem, estima-se que até 2045, cerca de 783 milhões de adultos terão diabetes, de acordo com a IDF (2021).

Tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuem significativamente para o desenvolvimento do diabetes. Durante o processo, as células do corpo são incapazes de metabolizar adequadamente o açúcar, devido à falta ou insensibilidade de insulina nos tecidos-alvo, que é um hormônio peptídico responsável por regular a glicemia. Como consequência, o diabetes pode causar danos a longo prazo, disfunção e falha de vários sistemas orgânicos, incluindo coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos, levando à incapacidade e morte prematura, conforme apontado por Malviya e colaboradores (2010).

Entre os vários tipos de diabetes, o diabetes tipo 1 e tipo 2 são os mais frequentemente discutidos. O diabetes tipo 1 é também conhecido como diabetes dependente de insulina e é caracterizado pela produção insuficiente de insulina pelo organismo. Pacientes com esse tipo de diabetes precisam de doses diárias de insulina para controlar a quantidade de glicose no sangue. Já o diabetes tipo 2, conhecido como diabetes não insulino-dependente, resulta do uso ineficaz da insulina e hiperglicemia pelo corpo e é responsável pela grande maioria dos casos de diabetes em todo o mundo (SALEHI *et al.*, 2019; SOUMYA; SRILATHA, 2011; SPELLMAN, 2010).

As terapias disponíveis para o tratamento do diabetes incluem a administração de insulina e diferentes agentes antidiabéticos orais, como biguanidas, sulfonilureias e glinídeos. Embora tenha havido um progresso considerável no tratamento do diabetes com drogas sintéticas, muitas delas apresentam efeitos adversos graves. Por essa razão, a busca por agentes hipoglicêmicos mais eficazes e seguros é de extrema importância (PATEL *et al.*, 2012).

Algumas plantas medicinais têm se mostrado eficazes como inibidores naturais da glicosidase. Devido ao baixo custo e à facilidade de obtenção, produtos naturais

derivados de plantas têm sido amplamente explorados como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos antidiabéticos (AGNANIET *et al.*, 2016). A atividade anti-hiperglicêmica dessas plantas decorre principalmente de sua habilidade em restaurar a função dos tecidos hepáticos, estimulando a produção de insulina, inibindo a absorção intestinal de glicose ou facilitando a utilização de metabólitos nos processos que dependem de insulina (MALVIYA; JAIN; MALVIYA, 2010; PATEL *et al.*, 2012). Além disso, muitas dessas plantas contêm alcaloides, flavonoides, glicosídeos, terpenoides, entre outros compostos, que frequentemente apresentam efeitos antidiabéticos.

Com base no exposto, fica evidente a importância de explorar novas plantas com potencial terapêutico para identificar medicamentos que ainda não foram descobertos. Nesse sentido, a infusão das folhas da uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) pode representar uma opção promissora para o tratamento do diabetes.

3.3 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA

Diversas pesquisas têm apontado uma correlação crescente entre a ingestão de compostos fenólicos, tais como flavonóis, proantocianidinas, catequinas, ácidos hidrolisáveis, estilbenos, e uma redução do risco de hipertensão arterial (AL SHUKOR *et al.*, 2013).

A hipertensão arterial, ou pressão alta, é uma preocupação crescente para a saúde pública, visto que está fortemente associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como doenças coronárias, acidente vascular cerebral, doenças renais e insuficiência cardíaca, sendo um dos principais fatores de risco para morbidade e mortalidade. Em todo o mundo, mais de um bilhão de pessoas apresentam hipertensão arterial, e é provável que esse número aumente caso não sejam adotadas melhorias significativas na prevenção e tratamento da doença (GEDDES, 2020). Os esforços para reduzir essa prevalência estão se concentrando em abordagens não farmacológicas, incluindo atitudes benéficas ao estilo de vida da população. Entre as medidas amplamente aceitas para diminuir os riscos associados à hipertensão arterial estão a redução de peso, cessação do tabagismo, prática de exercícios físicos, diminuição da ingestão de gorduras, dietas com redução de sódio e aumento do consumo de frutas e vegetais (D'AGOSTINO *et al.*, 2008; REDDY; KATAN, 2004).

A terapia para tratar a hipertensão arterial compreende a administração de medicamentos que, dentre as diversas classes existentes, destacam-se os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA desempenha o papel de converter a angiotensina I em angiotensina II, um peptídeo que induz a vasoconstrição (ZHANG *et al.*, 2000), enquanto degrada a bradicinina, um potente vasodilatador (IMIG, 2004). Portanto, a inibição da ECA se tornou uma abordagem promissora para controlar e tratar elevações da pressão arterial. Embora os inibidores da ECA sintéticos, tais como lisinopril, captopril e enalapril, sejam amplamente utilizados com sucesso para tratar a hipertensão, seu uso crônico pode estar relacionado a diversos efeitos colaterais indesejáveis, incluindo tosse persistente, hipotensão postural, insuficiência renal e angioedema (ANTONIOS; MACGREGOR, 1995; IMIG, 2004). Com o intuito de mitigar esses efeitos adversos, pesquisas têm sido conduzidas para identificar inibidores da ECA derivados de produtos naturais, que possam apresentar perfis terapêuticos mais favoráveis e menos efeitos colaterais.

Alguns compostos específicos presentes em frutas e vegetais, como os compostos fenólicos, são reconhecidos por sua capacidade de reduzir a pressão arterial (AL SHUKOR *et al.*, 2013; GUERRERO *et al.*, 2012). Esses compostos têm sido amplamente estudados e demonstram a habilidade de desencadear respostas fisiológicas específicas no organismo humano, incluindo a inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Além disso, a literatura descreve a existência de substâncias naturais que possuem atividade inibitória contra a ECA, como peptídeos (CINQ-MARS; LI-CHAN, 2007) e triterpenos (SOMOVA *et al.*, 2003). Estudos também relatam que a quercetina pode reduzir a pressão arterial sistólica, diastólica e média em pacientes hipertensos estágio 1, após tratamento com alta dose de quercetina e um grupo controle com placebo (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2009). Com base na existência de diversas plantas com atividade anti-hipertensiva e na busca por inibidores da ECA provenientes de fontes naturais, a infusão de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) se apresenta como um objeto de estudo promissor.

4 BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A biodisponibilidade, em termos gerais, refere-se à porção do componente ingerido que está disponível para ser utilizado em funções fisiológicas. Além disso, ela

engloba conceitos adicionais como a bioacessibilidade e a bioatividade. A bioacessibilidade, por sua vez, é definida como a fração do composto que é liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal e se torna disponível para absorção intestinal (SHAHIDI; PENG, 2018). Já o termo bioatividade abrange o processo de como o composto é transportado até o tecido-alvo através da circulação, a interação com biomoléculas nesses tecidos e todos os efeitos biológicos gerados (GUTIÉRREZ-GRIJALVA *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos presentes na dieta não possuem a mesma biodisponibilidade e propriedades biológicas, e assim, nem sempre os compostos mais abundantes em nossa dieta são aqueles com melhor biodisponibilidade. Vários fatores influenciam a biodisponibilidade dos compostos fenólicos. Alguns desses fatores estão ligados à estrutura química ou grau de ionização do composto, enquanto outros estão relacionados à complexidade da matriz alimentar, à quantidade e tipo de outros compostos ingeridos (NETO *et al.*, 2017). Além disso, a absorção e o comportamento dos polifenóis no trato digestivo dependem da absorção intestinal e suas interações subsequentes (MINATEL *et al.*, 2017).

De modo geral, a absorção dos polifenóis da dieta é limitada, pois eles são pouco absorvidos no trato gastrointestinal após a ingestão e sofrem intensa biotransformação intestinal (CAICEDO-LOPEZ *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos com menor peso molecular, como os ácidos fenólicos e alguns flavonoides, como flavonas, quercetina e catequinas, são mais facilmente absorvidos no trato gastrointestinal. Por outro lado, os polifenóis com maior tamanho molecular são absorvidos em menor quantidade, pois precisam ser hidrolisados previamente (GUTIÉRREZ-GRIJALVA *et al.*, 2016; SALEHI *et al.*, 2019).

Dessa forma, para uma avaliação adequada do papel biológico dos polifenóis na saúde humana, é fundamental não apenas entender os níveis de digestão, mas também a quantidade que se torna bioacessível. Somente os polifenóis que são solubilizados e não degradados durante a digestão são verdadeiramente bioacessíveis e, portanto, potencialmente biodisponíveis (CAICEDO-LOPEZ *et al.*, 2019)

Modelos de digestão *in vitro* têm sido amplamente utilizados para estudar possíveis alterações estruturais, digestibilidade e liberação de compostos fenólicos sob condições gastrointestinais simuladas, com base no conhecimento da fisiologia digestiva humana. Em geral, esses modelos consistem em três etapas: a fase oral, uma digestão com

pepsina gástrica em pH ácido, seguida de uma digestão com pancreatina e sais biliares sob condições ligeiramente alcalinas. Para que os resultados sejam relevantes, o tempo de digestão e a temperatura de 37°C utilizada nesses modelos devem mimetizar as condições do organismo *in vivo* (HUR *et al.*, 2011)

A fim de avaliar adequadamente os compostos bioativos, pesquisas utilizando métodos de digestão *in vitro* têm sido amplamente realizadas. É importante destacar que uma alta atividade antioxidante *in vitro* nem sempre se traduz em atividade antioxidante *in vivo* (LAYA; KOUBALA, 2020). Portanto, é crucial determinar a bioacessibilidade de ingredientes funcionais, como no caso da investigação das modificações ocorridas durante a digestão simulada *in vitro* nos compostos fenólicos presentes na infusão das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess).

CAPÍTULO 2

PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE UVAIA (*Eugenia pyriformis* CAMBESS) OBTIDOS POR EXTRAÇÃO VERDE: UMA OPÇÃO PROMISSORA PARA O USO DE EXTRATOS COMO ANTIOXIDANTES E ANTIBACTERIANOS.

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados do artigo submetido em *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, de autoria de Marina Volpato Dacoreggio, Gabriela Soster Santetti, Heloísa Patrício Inácio, Julia Baranzelli, Tatiana Emanuelli, Rodrigo Barcellos Hoff, Liziane Schittler Moroni, Carlise Beddin Fritzen Freire, Aniela Pinto Kempka e Renata Dias de Mello Castanho Amboni

RESUMO

A *Eugenia pyriformis* Cambess (uvaia) é uma fonte reconhecida de compostos bioativos com potenciais benefícios para a saúde, no entanto, há poucos estudos que avaliaram além de seus frutos. Este estudo investigou a eficiência da extração assistida por ultrassom (EAU) e extração auxiliada por enzimas (EAE) na obtenção de extratos de folha de uvaia com alta atividade antioxidante e antibacteriana. Os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa, foram empregados diferentes tempos de extração, volumes de solvente e tamanhos de partículas das folhas para identificar as melhores condições para a obtenção do extrato com o maior teor de compostos fenólicos totais. Na segunda etapa, os extratos otimizados foram caracterizados. No total, vinte e quatro compostos fenólicos foram identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem por ionização por electropulverização (LC-ESI-MS/MS), sendo os mais prevalentes galato de epigalocatequina, rutina, ácido 2,5 - dihidroxibenzoico (2,5-DHBA) e ácido 2,4 – dihidroxibenzoico (2,4-DHBA). O extrato enzimático aquoso nas condições otimizadas apresentou uma significativa maior quantidade de compostos fenólicos totais ($33,53 \pm 0,57$ mg de EAG/g) em comparação com o extrato ultrassônico aquoso ($22,73 \pm 0,75$ mg de EAG/g). O extrato enzimático também apresentou, de maneira significativa, um maior potencial antioxidante nos ensaios DPPH e ORAC. Foi observado um potencial antibacteriano semelhante dos extratos, com uma ação preferencial contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 9933, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 CCT7408 (produtora de biofilme), *Listeria ivanovii* ATCC BAA 139, *Listeria innocua* ATCC 3399, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* Scott A), com menores valores mínimos de concentração inibitória mínima. Esses achados sugerem que os extratos aquosos de folhas de *E. pyriformis* Cambess são alternativas viáveis como forma econômica e sustentável de agregar valor às folhas de uvaia, geralmente subutilizadas, contemplando a vertente de economia circular.

Palavras-chave: uvaia; valorização de resíduos; ultrassom; enzimas; antioxidante; antimicrobiano.

ABSTRACT

Eugenia pyriformis Cambess (uvaia) is a recognized source of bioactive compounds with potential health benefits, however, there are few studies that have examined beyond its fruits. This study investigated the efficiency of ultrasound-assisted extraction (EAU) and enzyme-assisted extraction (EAE) in obtaining uvaia leaf extracts with high antioxidant and antibacterial activity. The experiments were conducted in two stages. In the first stage, different extraction times, solvent volumes, and leaf particle sizes were employed to identify the best conditions for obtaining the extract with the highest total phenolic content. In the second stage, the optimized extracts were characterized. In total, twenty-four phenolic compounds were identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization (LC-ESI-MS/MS), with the most prevalent being epigallocatechin gallate, rutin, 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA) and 2,4-dihydroxybenzoic acid (2,4-DHBA). The aqueous enzymatic extract under optimized conditions showed a significantly higher amount of total phenolic compounds (33.53 ± 0.57 mg EAG/g) compared to the aqueous ultrasound extract (22.73 ± 0.75 mg EAG/g). The uvaia leaf enzymatic extract also showed, in a significant way, higher antioxidant potential in DPPH and ORAC assays. Similar antibacterial potential of the extracts was observed, with a preferential action against Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* ATCC 9933, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 CCT7408 (biofilm producer), *Listeria ivanovii* ATCC BAA 139, *Listeria innocua* ATCC 3399, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* Scott A, with lower minimum inhibitory concentration values. These findings suggest that aqueous extracts of *E. pyriformis* Cambess leaves are viable alternatives as economical and sustainable ways to add value to uvaia leaves, which are generally underutilized, encompassing the circular economy perspective.

Keywords: uvaia; residue valorization; ultrasound; enzymes; antioxidant; antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

A *Eugenia pyriformis* Cambess, também conhecida popularmente como uvaia, é uma espécie nativa da família Myrtaceae encontrada desde o sudoeste até a região sul do Brasil, bem como em países vizinhos como Argentina e Paraguai (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). O fruto da uvaia tem sido amplamente estudado nos últimos anos, principalmente em relação às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, biológicas e controle de distúrbios metabólicos (DA SILVA *et al.*, 2019; FARIAS *et al.*, 2020; KLEIN *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2021; SGANZERLA *et al.*, 2021; VIEIRA GOMES *et al.*, 2019). No entanto, há poucos estudos que investigam outras partes dessa planta, como suas folhas (KLEIN *et al.*, 2018b, 2021). Apesar de as folhas de uvaia serem comumente vistas como resíduos agrícolas, o seu potencial como fonte de compostos bioativos revela uma alternativa, que pode ser explorada para a produção de medicamentos com propriedades antioxidantes e antibacterianas. De fato, o uso de extratos de plantas como fonte de antioxidantes e propriedades antibacterianas tem sido objeto de pesquisa recente (GONÇALVES *et al.*, 2022; MARTÍNEZ-CEJA *et al.*, 2022).

Os antioxidantes são compostos que podem ser produzidos pelo organismo ou obtidos por meio da alimentação, e têm a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, protegendo os tecidos dos danos causados pelos radicais livres e prevenindo doenças relacionadas a esse processo (MASON *et al.*, 2020; SALEHI *et al.*, 2018). Já os antibacterianos são substâncias capazes de inibir o crescimento de bactérias, devido à sua composição química específica (ABDULLAHI *et al.*, 2022). No entanto, o uso inadequado de antibacterianos, especialmente quando utilizados de forma não racional, pode levar ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, representando um grave risco para a saúde humana (CHUA *et al.*, 2020).

O uso de fontes naturais para a obtenção de compostos bioativos, como antioxidantes e antibacterianos, é um campo de pesquisa extenso. As vantagens de se obter tais substâncias de fontes muitas vezes subestimadas ou consideradas como resíduos são ainda mais atrativas para pesquisadores e para a indústria alimentícia.

O processo de extração representa um passo crítico na obtenção de compostos bioativos, em que a escolha do método é muito relevante para obter um alto rendimento e pureza dos compostos de interesse. Técnicas convencionais, como a extração sólido-

líquido, são geralmente aplicadas para extrair compostos biologicamente ativos de fontes vegetais (UMMAT *et al.*, 2021). No entanto, essas técnicas apresentam algumas desvantagens, como o tempo prolongado de extração e, às vezes, baixo rendimento e baixa seletividade. Por outro lado, técnicas não convencionais, como extração assistida por ultrassom e extração assistida por enzima, que usam água como solvente, são consideradas processos verdes que permitem a eliminação do uso de solventes químicos prejudiciais, melhorando a eficiência da extração, bem como o rendimento e a qualidade do extrato obtido (MARATHE *et al.*, 2019; PICÓ, 2013)

Até o momento, apenas alguns relatos foram publicados sobre técnicas de extração não convencionais para folhas de uvaia, destacando-se o uso de extração com fluido supercrítico e/ou sondas de ultrassom (KLEIN *et al.*, 2018a; RODRIGUES *et al.*, 2021). Além disso, o perfil fenólico dos extratos de folhas de uvaia obtidos por meio de extração assistida por enzimas não foi relatado até o momento, assim como sua atividade antibacteriana, que não foi completamente esclarecida (DACOREGGIO *et al.*, 2021).

Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar a eficácia de duas técnicas de extração aquosa de compostos fenólicos das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): extração assistida por ultrassom e extração assistida por enzima (usando Viscozyme® L, V2010). Além disso, o perfil fenólico e as atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos também foram avaliados e discutidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Todos os reagentes químicos utilizados eram de grau analítico. O complexo enzimático (enzimas hidrolisantes de carboidratos, incluindo arabinase, celulase, β -glucanase, hemicelulase e xilanase) (Viscozyme[®] L, V2010), com atividade de 100 FBGU/g, foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Padrões analíticos (pureza $\geq 95\%$) de apigenina, isorhamnetin, pinobanksin, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido p-aminobenzóico, ácido p-cumárico, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, rutina, naringina, (+)-catequina, sinapaldeído, ácido cafeico, ácido clorogênico, coniferaldeído, siringaldeído, crisina, hesperidina, ácido siringico, kaempferol, naringenina, galato de (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina, pinocembrina, galangina, ácido salicílico, quercetina, ácido gálico, ácido benzóico, 3 ácido ,4-dihidroxibenzóico e luteolina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

2.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS FOLHAS DE UVAIA

Folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) foram coletadas de espécimes cultivados em Gravatal, Santa Catarina, Brasil (coordenadas geográficas S 28° 32' 23" W 49° 07' 06"), em julho de 2019. O espécime foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o código FLOR 68473. As folhas foram selecionadas de acordo com sua uniformidade de cor, descartando-se o material vegetal que apresentasse sinais de apodrecimento, lesões e/ou quaisquer defeitos. O material vegetal foi higienizado com gaze umedecida em água destilada e seco em estufa de circulação de ar forçado a 40 ± 5 °C por 6 dias. Após a secagem, as folhas foram trituradas utilizando um moinho de facas (IKA, A11, Alemanha), até atingirem dois tamanhos de partícula diferentes, 0,68 mm e 1,40 mm (Makanjuola, 2017). As amostras foram identificadas, rotuladas e embaladas em polietileno e armazenadas a uma temperatura de -18 ± 2 °C.

2.3 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE UVAIA

O procedimento para produção dos extratos foi adaptado do proposto por Larrauri e colaboradores (LARRAURI; RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 1997). Foram realizadas duas extrações aquosas distintas. Para a extração assistida por ultrassom (EAU), 1 g de pó de folhas de uvaia foi submetido a ultrassom com quantidades apropriadas de água deionizada usando um banho ultrassônico de 70 W (Unique, 1650A, Brasil) por 60 minutos. Na extração auxiliada por enzimas (EAE), 1 g de pó de folhas de uvaia foi disperso em quantidades apropriadas de água deionizada em um banho de água (Dist, DI-950 M, Brasil) com agitação constante (100 rpm). Após adicionar o complexo enzimático (Viscozyme[®] L, V2010) (20 µL), a suspensão foi incubada a 45 °C por 60 minutos. Em seguida, as enzimas foram inativadas a 0° C por 5 min em um banho de gelo. Os extratos foram filtrados com papel filtro quantitativo ('Whatman' n° 40) e os filtrados foram armazenados em frascos âmbar e mantidos congelados a -18 ± 2 °C até o uso.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um experimento com um delineamento fatorial fracionário 2^{3-1} para determinar as condições ideais para a extração aquosa de compostos fenólicos das folhas de uvaia. As variáveis usadas foram: tempo, volume do solvente e tamanho das partículas das folhas. A quantidade de folhas secas em pó usadas no procedimento de extração foi mantida constante (1 g). O experimento foi composto por oito combinações de variáveis independentes, selecionadas com base em estudos anteriores. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória para minimizar o efeito da variabilidade não explicada nas respostas obtidas. As variáveis e os níveis dos experimentos são apresentados na Tabela 1. A variável resposta foi o conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos. Os extratos aquosos de uvaia otimizados com o maior CFT foram escolhidos para serem caracterizados quanto ao seu perfil fenólico e atividades antioxidante e antibacteriana.

Tabela 1- Combinação entre as variáveis e os níveis do delineamento experimental para a otimização de compostos fenólicos totais dos extratos assistidos por ultrassom (EAU) e auxiliados por enzimas (EAE), das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Tratamentos	Variáveis independentes			Variável dependente
	Tempo (min)	Tamanho de partícula (mm)	Volume (mL)	
1	30	0,68	50	Compostos fenólicos totais
2	30	0,68	100	
3	30	1,40	50	
4	30	1,40	100	
5	60	0,68	50	
6	60	0,68	100	
7	60	1,40	50	
8	60	1,40	100	

Fonte: elaborado pela autora

2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (CFT)

A quantificação do conteúdo fenólico total foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com modificações (BONOLI *et al.*, 2004). Em resumo, 100 µL do extrato diluído foi misturado com 500 µL de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada, em um tubo de ensaio envolvido em papel alumínio, em um ambiente escuro. Após isso, 2 mL de carbonato de sódio a 20% foram adicionados à mistura. As medidas foram realizadas 2 horas depois, em um espectrofotômetro UV-VIS (U-2900, Hitachi, Japão), a um comprimento de onda de 750 nm. O conteúdo fenólico dos extratos foi expresso como a média de três repetições independentes e os resultados foram calculados usando a equação linear $y = 0,0013x - 0,0114$ ($R^2 = 0,9925$), em que o eixo y é a absorbância e o eixo x é a concentração de ácido gálico, e foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (EAG/g de amostra seca).

2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS OTIMIZADOS DAS FOLHAS DE *Eugenia pyriformis* Cambess

Após a análise dos dados experimentais e dos resultados estatísticos, foram realizadas extrações nas condições otimizadas por ambos os métodos (EAU e EAE), e os extratos aquosos otimizadas (EAO-EAU e EAO-EAE) foram analisados em relação ao

perfil de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro* e atividade antimicrobiana. Em todas as análises a seguir os resultados dos extratos das folhas de uvaia foram expressos como a média de três repetições independentes.

2.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS

O método descrito por Seraglio e colaboradores (2018) foi utilizado para identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais a partir de extratos de EAO-EAU e EAO-EAE. As medições de espectrometria de massa por cromatografia líquida com ionização por electrospray e tandem (LC-ESI-MS/MS) foram realizadas usando um sistema cromatográfico Agilent 1290 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido de armadilha linear de quadrupolo QTRAP 5500 (Sciex, Foster City, CA), que foi equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna VENUSIL C18 (100 mm × 2,1 mm; diâmetro de partícula de 3 µm; Bona Angela Technologies, Wilmington, DE, EUA). A taxa de fluxo utilizada foi de 300 µL/min e um volume de 5 µL de padrões e amostras foram injetados para análise. A fase móvel foi composta de solvente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico). O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: 98% A (v/v) de 0 a 4,0 min, 98-80% A (v/v) de 4,0-7,0 min, 80-10% A (v/v) de 7,0-14,0 min, 10% A (v/v) de 14,0-15,0 min, e 10-98% A (v/v) de 15,0-17,0 min. O tempo total de corrida foi de 17 min e o tempo de equilíbrio da coluna entre cada corrida foi de 4 min, com a coluna mantida a 40 °C.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no modo MRM com os seguintes parâmetros: voltagem de Ion Spray (IS): 5500 V; gás cortina: 25 psi; gás nebulizador (GS1) e gás auxiliar (GS2): 55 psi e; temperatura da fonte: 400 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador e gás de colisão. Os parâmetros específicos de cada composto foram otimizados por meio da infusão direta de solução padrão para cada composto. O software Analyst 1.6.2 (Sciex, Foster City, CA) foi utilizado para aquisição e processamento de dados. A quantificação de cada composto foi realizada em triplicata por calibração externa. O desempenho do método estava em conformidade com os parâmetros de validação relatados anteriormente.

2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A atividade antioxidante dos extratos EAO-EAU e EAO-EAE foi medida utilizando quatro diferentes ensaios: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido)], FRAP (poder antioxidante redutor férrico) e ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio).

2.8.1 Potencial antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada utilizando uma metodologia baseada na capacidade do extrato em eliminar radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (método DPPH), com pequenas modificações (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIS (U-2900, Hitachi, Japão), com uma absorvância de 515 nm, após 1 hora. Os resultados foram calculados usando a equação linear $y = 0,0274x - 0,0064$ ($R^2 = 0,9964$), onde o eixo y é a absorvância e o eixo x é a concentração de ácido gálico, obtendo a porcentagem de inibição. A atividade antioxidante dos compostos foi expressa como EC50 ($\mu\text{g/mL}$), que expressa a concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. .

2.8.2 Potencial antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante usando o radical ABTS foi realizada de acordo com o método descrito por Re e colaboradores (1999). A mistura foi incubada por 6 minutos protegida da luz, e a absorvância foi medida em um espectrofotômetro UV-VIS (U-2900, Hitachi, Japan) a 734 nm. Os resultados foram calculados usando a equação linear $y = 0,0767x + 5,5749$ ($R^2 = 0,9935$), onde o eixo y representa a absorvância e o eixo x representa a concentração de Trolox, e foram expressos em μM Trolox/g de amostra seca.

2.8.3 Potencial antioxidante pelo método FRAP

O ensaio de potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP) foi realizado seguindo a metodologia de Benzie e Strain (1996) com modificações propostas por

Arnous e colaboradores (2002). Os resultados foram calculados usando a equação linear $y = 0,0018x + 0,0379$ ($R^2 = 0,9915$), onde o eixo y é a absorvância e o eixo x é a concentração de Trolox, e foram expressos em μM Trolox/g de amostra seca.

2.8.4 Potencial antioxidante pelo método ORAC

A capacidade de varredura de radicais livres de oxigênio (ORAC) foi determinada de acordo com o método descrito por OU e colaboradores (2001). Os resultados foram calculados usando a equação linear $y = 2,9819x - 9,7906$ ($R^2 = 0,9915$), em que o eixo y é a fluorescência e o eixo x é a concentração de Trolox. Os valores foram expressos em μmol de equivalentes de Trolox/mL de extrato.

2.9 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana dos extratos EAO-EAU e EAO-EAE foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2016) e) seguindo a Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2016). Foram realizados testes contra onze bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 9933, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 CCT7408 (produtora de biofilme), *Listeria ivanovii* ATCC BAA 139, *Listeria innocua* ATCC 3399, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* Fri, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e seis bactérias Gram-negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640, *Salmonella heiderberg* ATCC 8326, *Escherichia coli* O157:H7 e *Escherichia coli* ATCC25922) (estoque de laboratório).

Os extratos EAO-EAU e EAO-EAE foram submetidos à determinação da MIC em uma placa estéril de 96 poços. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento bacteriano visível, a partir do uso do corante resazurina. Todas as atividades dos extratos das folhas de uvaia foram expressas como a média de três repetições independentes.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados e analisados estatisticamente utilizando o método de variância (ANOVA). Na etapa inicial dos métodos para a produção dos extratos, foi aplicado um modelo fatorial para avaliar os efeitos significativos e suas interações entre as variáveis calculadas, seguido da análise de médias comparadas utilizando o teste de Tukey, com um intervalo de confiança entre 99% e 95%. A análise e o tratamento dos dados foram realizados usando o software SASM-Agri, versão 8.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DELINIAMENTO EXPERIMENTAL

Os valores do conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos aquosos das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess, otimizados com base em diversas variáveis, são apresentados na Tabela 2. As interações possíveis entre as variáveis e a importância dos seus efeitos são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Níveis de variáveis e resposta do conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos ultrassônicos e enzimáticos com base no tempo, volume de solvente e tamanho das partículas das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Ensaio ^A	Níveis das variáveis			Extração assistida por ultrassom (EAU)	Extração auxiliada por enzimas (EAE)
	Tempo (min)	Tamanho de partícula (mm)	Volume (mL)	Resposta ^C	
				CFT ^B	CFT ^B
1	-1 (30)	-1 (0,68)	-1 (50)	2517,54 ^b	2835,49 ^a
2	-1 (30)	-1 (0,68)	+1 (100)	2732,92 ^a	2712,41 ^a
3	-1 (30)	+1 (1,40)	-1 (50)	2901,13 ^b	3689,85 ^a
4	-1 (30)	+1 (1,40)	+1 (100)	2146,77 ^b	2487,79 ^a
5	+1 (60)	-1 (0,68)	-1 (50)	3095,49 ^b	4120,62 ^a
6	+1 (60)	-1 (0,68)	+1 (100)	2435,49 ^b	2842,67 ^a
7	+1 (60)	+1 (1,40)	-1 (50)	2781,13 ^b	3810,36 ^a
8	+1 (60)	+1 (1,40)	+1 (100)	2209,85 ^b	2431,90 ^a

*Letras minúsculas distintas na mesma linha representam, respectivamente, uma diferença significativa entre o conteúdo fenólico total dos extratos EAU e EAE, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. ^A Experimentos foram conduzidos randomicamente e os valores são resultantes de medidas em triplicata. ^B CFT = Conteúdo fenólico total. ^C µg EAG/g (EAG: ácido gálico equivalente). Fonte: elaborado pela autora

Tabela 3- Análise de variância para o conteúdo fenólico total (CFT) dos extratos ultrassônicos e enzimáticos com base no tempo de extração, volume de solvente e tamanho das partículas das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Variável	GL	Extração assistida por ultrassom (EAU)	Extração auxiliada por enzimas (EAE)
		CFT	
		Quadrado médio	
T	1	18747,01*	821400,00*
TP	1	206775,2996*	3124,06 ^{ns}
TxV	1	179733,71*	521695,79*
TPxV	1	291077,33*	359028,77*
TxTPxV	1	420127,38*	8998845,22*
Total		23	23
C.V (%)		1,05	1,05

T: Temperatura, TP: tamanho de partícula, V: volume, GL: Graus de liberdade. C.V: Coeficiente de variação. *: Significativo a 1% de probabilidade de erro. ns: Não significativo a 5% de probabilidade de erro. CFT: Conteúdo fenólico total. Elaborado pela autora.

As combinações de variáveis utilizadas em ambos os extratos otimizados, OAE-EAU e OAE-EAE, apresentaram efeito significativo ($p < 0,01$) para todas as variáveis, exceto para o tamanho de partícula durante a extração assistida por ultrassom (OAE-EAU). A quantidade e exposição dos compostos fenólicos das folhas de uvaia foram diretamente relacionadas ao efeito das variáveis utilizadas. Além disso, a variável volume demonstrou um efeito altamente significativo ($p < 0,01$) tanto na extração assistida por ultrassom quanto na extração com auxílio de enzimas.

Os resultados evidenciaram uma tendência consistente no comportamento da resposta (CFT) em relação às variáveis investigadas, onde o aumento do tempo, a redução do tamanho de partícula e o menor volume de solvente utilizado foram associados a maiores valores do conteúdo fenólico total. O tratamento OAE-EAE apresentou a maior resposta em comparação com os outros tratamentos.

A influência do tempo na extração foi avaliada e constatou-se que um tempo maior (60 minutos) resultou em um maior conteúdo fenólico total (CFT). Essa tendência é comumente encontrada em estudos de otimização de extratos e já foi relatada por outros pesquisadores (IRAKLI *et al.*, 2018; JOVANOVIĆ *et al.*, 2021; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2021). A melhoria no rendimento com o aumento do tempo pode ser explicada pelo aumento do tempo de difusão dos compostos na matriz sólida. Na extração enzimática, o

aumento do tempo permite maior contato entre a enzima e o substrato, levando ao rompimento dos tecidos e liberação dos compostos para o meio. Já na extração com auxílio de ultrassom, um tempo maior resulta em mais ondas geradas no meio aquoso, promovendo a quebra da estrutura por cisalhamento. Conseqüentemente, uma quantidade maior de compostos solúveis é removida da matriz, fato que se evidencia até o esgotamento dos materiais solúveis (AZMIR *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2016; LUTHRIA, 2008).

Os resultados indicaram também que a redução do tamanho das partículas das folhas de uvaia influenciou significativamente na extração dos compostos fenólicos. Essa relação ocorre devido ao aumento da área de contato entre o material e o solvente de extração. Partículas com dimensões homogêneas favorecem a eficiência da extração, uma vez que proporcionam maior contato entre o material vegetal e o líquido extrator (AZMIR *et al.*, 2013; MAKANJUOLA, 2017). Apesar disso, entre as variáveis estudadas, o tamanho de partícula apresentou o menor efeito na otimização da extração dos compostos fenólicos. Assim, a combinação dos parâmetros que resultaram em melhor desempenho na recuperação de CFT das folhas de uvaia utilizaram partículas de 0,68 mm e 50 mL de água destilada por 60 minutos (corrida número 5) (Tabela 2).

3.2 CONTEÚDO FENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Os resultados deste estudo são os primeiros obtidos para folhas de uvaia utilizando apenas água como solvente. O CFT e a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos a partir das condições ideais de extração são apresentados na Tabela 4. Os resultados apontam que a forma de extração dos compostos fenólicos presentes nas folhas de uvaia exerceu uma influência significativa sobre o seu teor. O método de extração assistido por enzimas nas condições otimizadas (OAE-EAE) apresentou o maior conteúdo fenólico total ($p < 0,05$). Esses resultados são de grande relevância para o desenvolvimento de novos processos de extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais. Embora a literatura seja escassa em relação à composição química das folhas de uvaia, os teores de compostos fenólicos encontrados estão de acordo com os valores relatados em estudos similares realizados com folhas da mesma espécie. Por exemplo, Canabarro *et al.* (2019) encontraram valores entre 0,12 mg a 0,3 mg/g de EAG ao analisarem os extratos das folhas de *Eugenia uniflora* L. obtidos por extração

supercrítica utilizando etanol como cossolvente, enquanto Peixoto Araújo *et al.* (2020) identificaram valores de 0,204 mg/g de EAG para os extratos das folhas de *Eugenia calycyna* Cambess alcançados por extração ultrassônica com solvente metanol-acetona-água (7:7:6, v/v/v).

Tabela 4- Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de extratos de folha de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) em condições otimizadas

Parâmetros	Extração assistida por ultrassom (EAO-EAU)*	Extração auxiliada por enzimas (EAO-EAE)*
Compostos fenólicos totais (mg de EAG/ g extrato p.s.)	22,73 ± 0,75 ^b	33,53 ± 0,57 ^a
Atividade antioxidante DPPH - EC50 (µg/mL)	3,03 ± 0,8 ^b	8,2 ± 0,5 ^a
Atividade antioxidante FRAP (mM de Trolox/g extrato p.s.)	1,76 ± 0,012 ^b	1,99 ± 0,01 ^a
Capacidade antioxidante ABTS (mM de Trolox/ g extrato p.s.)	73,46 ± 3,49 ^a	81,26 ± 0,98 ^a
Capacidade antioxidante ORAC (mM de Trolox/ g extrato p.s.)	7,1 ± 0,6 ^a	9,6 ± 1,0 ^a

EAO-EAU (Extrato aquoso otimizado – Extração assistida por ultrassom), EAO-EAE (Extrato aquoso otimizado - Extração auxiliada por enzimas). Letras minúsculas distintas na mesma linha representam, respectivamente, uma diferença significativa entre os extratos EAO-EAU e EAO-EAE, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. * Condições otimizadas (corrida 5): tamanho de partícula (0,68 mm), volume de solvente (50 mL), tempo de extração (60 min). Valores são resultantes de medidas em triplicata. Elaborada pela autora.

Ao avaliar a atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess, observou-se que a técnica do ensaio DPPH apresentou resultados mais expressivos para ambos os extratos em relação aos obtidos pelos demais métodos testados. Esses resultados sugerem que os flavonoides presentes nas folhas, como a epigallocatequina (EGCG) e a rutina (item 3.3) podem ter um papel significativo na melhoria das habilidades antioxidantes do extrato, por meio da eliminação de espécies reativas de oxigênio, como a doação de hidrogênio e/ou elétrons aos radicais livres, e consequente estabilização dos mesmos (DACOREGGIO *et al.*, 2021). Além disso, é importante considerar que é difícil comparar valores de EC50 com outros estudos, devido

às diferenças nas matérias-primas, condições de cultivo, clima, condições experimentais de preparo do extrato e condições de extração.

Para o ensaio FRAP, foi observada influência significativa da forma de extração nos valores encontrados. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos por UEDA *et al.* (2021), que investigaram o processo de extração de compostos antioxidantes de folhas de uvaia utilizando solventes eutéticos profundos (DES), e reportaram valores de capacidade de redução de ferro férrico (FRAP) de 0,51 a 1,78 mmol Trolox/g de amostra. Já no ensaio ABTS e ORAC, não houve influência significativa do método de extração utilizado.

A análise comparativa dos extratos de folhas obtidos pelo método de extração ultrassônico e enzimático revelou um maior CFT e uma promissora atividade antioxidante no extrato enzimático. Assim, dentro das condições estudadas, pode-se evidenciar que os fenólicos do extrato enzimático apresentam potencial em reduzir o estresse oxidativo *in vitro*.

3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR LC-ESI-MS/MS

Um total de vinte e três e um total de vinte e quatro compostos fenólicos foram identificados por LC-ESI-MS/MS nos extratos otimizados EAO-EAU e EAO-EAE das folhas de uvaia, respectivamente, dentre eles ácidos fenólicos, flavonoides e fenóis (Tabela 5).

A presença do galato de epigallocatequina (EGCG) foi predominante em ambos os extratos otimizados, sendo cerca de 60% mais elevada na extração assistida por enzimas. Estudos têm relatado que o EGCG pode apresentar efeitos terapêuticos em patologias como câncer, diabetes, derrame, obesidade, doença de Parkinson e Alzheimer (CHOWDHURY *et al.*, 2016). Recentemente, Joseph *et al.* (2021) demonstraram a atividade antiviral do EGCG contra o SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 e MERS-CoV *in vitro*. Seus efeitos benéficos são atribuídos principalmente ao seu papel como antioxidante e eliminador de radicais livres, os quais estão relacionados à presença de grupos fenólicos sensíveis à oxidação, que é aumentada pela existência do grupo tri-hidroxila no anel D dessa catequina (SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011; TAO;

LAMBERT, 2013). No entanto, em alguns contextos celulares, também foi sugerido um papel como agente pró-oxidante e citotóxico (KIM; QUON; KIM, 2014).

Tabela 5- Teor fenólico individual de extratos de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) em condições otimizadas

Compostos fenólicos	Método de extração	
	Extração assistida por ultrassom (EAO-EAU)* (µg/mL)	Extração auxiliada por enzimas (EAO-EAE)* (µg/mL)
Ácido benzóico	0,33 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,06 ^a
Ácido p-aminobenzóico	< LOQ	< LOQ
Cumarina	< LOQ	< LOQ
Siringaldeído	< LOQ	< LOQ
Ácido ferúlico	0,51 ± 0,03 ^a	0,75 ± 0,01 ^a
Ácido siríngico	< LOQ	< LOQ
Pinocembrina	0,1 ± 0,13 ^b	1,03 ± 0,14 ^a
Galangina	< LOQ	< LOQ
Apigenina	< LOQ	< LOQ
Kaempferol	< LOQ	< LOQ
Epicatequina	17,83 ± 0,29 ^a	21,42 ± 1,13 ^a
Catequina	17,09 ± 0,20 ^a	20,03 ± 0,88 ^a
Ácido elágico	n.d	n.d
Ácido clorogênico	0,59 ± 0,06 ^a	0,76 ± 0,01 ^a
Hesperidina	0,41 ± 0,03 ^a	0,52 ± 0,05 ^a
2,5-DHBA (ácido 2,5 - dihidroxibenzoico)	123,99 ± 2,65 ^a	135,22 ± 7,72 ^a
2,4-DHBA (ácido 2,4 - dihidroxibenzoico)	113,97 ± 0,51 ^a	126,54 ± 1,37 ^a
Luteolina	n.d	n.d
Ácido salicílico	0,10 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	0,31 ± 0,01 ^b	0,38 ± 0,01 ^a
Ácido p-cumárico	4,79 ± 0,06 ^b	18,18 ± 2,49 ^a
Ácido vanílico	< LOQ	n.d
Ácido gálico	47,04 ± 4,53 ^a	51,30 ± 1,98 ^a
4-metilumbeliferona	n.d	< LOQ
Coniferaldeído	< LOQ	< LOQ
Ácido cafeico	0,48 ± 0,03 ^b	1,06 ± 0,07 ^a
Sinapaldeído	0,23 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,01 ^a
Ácido 3,5-dinitrobenzóico	< LOQ	< LOQ
Ácido sináptico	0,21 ± 0,05 ^a	0,23 ± 0,08 ^a
Crisina	< LOQ	< LOQ
Naringenina	< LOQ	0,44 ± 0,18
Pinobanksin	0,27 ± 0,08 ^b	3,11 ± 0,01 ^a
Isorhamnetina	0,03 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,04 ^a

Galato de epigallocatequina	960,09 ± 102 ^b	1552,07 ± 111,90 ^a
Isoquercetina	40,39 ± 10,42 ^b	67,89 ± 8,2 ^a
Naringina	0,37 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,01 ^a
Rutina	163,75 ± 51,62 ^a	264,85 ± 38,35 ^a

Letras minúsculas distintas na mesma linha representam, respectivamente, uma diferença significativa entre os extratos EAO-EAU e EAO-EAE, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. <LOQ: abaixo do limite de quantificação (50 µg/mL). n.d: não detectado. EAO-EAU (Extrato aquoso otimizado – Extração assistida por ultrassom), EAO-EAE (Extrato aquoso otimizado - Extração auxiliada por enzimas). * Condições otimizadas (corrida 5): tamanho de partícula (0,68 mm), volume de solvente (50 mL), tempo de extração (60 min). Valores são resultantes de medidas em triplicata. Fonte: elaborada pela autora.

A rutina foi identificada como o segundo composto mais abundante na amostra de folhas de uvaia, em concentrações superiores às encontradas na polpa da fruta, conforme relatado por Haminiuk *et al.* (2014) e variando entre 0,83 e 1,1 µg/g. Esse flavonoide tem sido objeto de estudos devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antialérgicas, anticâncer e pelo seu potencial no tratamento de diabetes e hipertensão (ALAM *et al.*, 2017; YINGYUEN; SUKRONG; PHISALAPHONG, 2020). Além disso, os ácidos 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA) e 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA), também compostos fenólicos, possuem importantes atividades biológicas, tais como anti-mutagênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, conforme descrito por Madureira *et al.* (2016). De acordo com a Tabela 5, estes ácidos foram encontrados em concentrações variando de 113,97 a 135,22 µg/mL.

Com base nos resultados obtidos, constatou-se que a extração aquosa utilizando enzimas apresentou um perfil fenólico superior em relação à extração assistida por ultrassom, com um aumento significativo de aproximadamente 50%. Ademais, a extração auxiliada por enzimas apresentou teores significativamente mais elevados ($p < 0,05$) de Pinocembrina, Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, Ácido cafeico, Pinobanksin, Isorhamnetina e Isoquercetina, em relação aos teores medidos nos extratos ultrassônicos. Esses resultados corroboram os valores encontrados para o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante *in vitro* das folhas de uvaia. Portanto, a extração aquosa com auxílio de enzimas mostrou-se mais eficiente na obtenção dos compostos fenólicos desejados. É importante mencionar que estudos que avaliaram o perfil fenólico de extratos aquosos de folhas de uvaia ainda são escassos na literatura.

3.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos das folhas de *E. pyriformis* Cambess obtidos nas condições ótimas de extração para onze bactérias Gram-negativas e seis bactérias Gram-positivas são apresentados na Tabela 6. A atividade antibacteriana observada nos extratos obtidos pelas duas técnicas de extração sugere a presença de uma ampla gama de fitoquímicos com atividade antibiótica, como ácidos fenólicos, fenóis simples, quinonas, flavonóis, flavonas e flavonoides. Esses resultados evidenciam a potencialidade das folhas de uvaia como fonte de compostos bioativos com propriedades antibacterianas.

Tabela 6- Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos aquosos de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) em condições otimizadas contra dezessete bactérias fitopatogênicas

	Cepas	Método de extração	
		Extração assistida por ultrassom (EAO-EAU)*	Extração auxiliada por enzimas (EAO-EAE)*
Bactéria Gram-positiva	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9933	112,15 ^b	335,3 ^a
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	112,15 ^b	335,3 ^a
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644 CCT7408 (biofilme)	112,15 ^b	335,3 ^a
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC BAA 139	112,15 ^b	335,3 ^a
	<i>Listeria innocua</i> ATCC 3399	112,15 ^b	335,3 ^a
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	112,15 ^b	335,3 ^a
	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	112,15 ^b	335,3 ^a
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> Fri	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-
Bactéria Gram-negativa	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	227,3 ^b	335,3 ^a
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	227,3 ^b	335,3 ^a
	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC14028	227,3 ^b	335,3 ^a
	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	227,3 ^b	335,3 ^a
	<i>Salmonella abaeetuba</i> ATCC 35640	227,3 ^b	335,3 ^a
	<i>Salmonella Heiderberg</i> ATCC 8326	227,3 ^b	335,3 ^a

Os dados são expressos em $\mu\text{g/mL}$. (-): sem inibição. Letras diferentes para a mesma linha indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). EAO-EAU (Extrato aquoso otimizado – Extração assistida por ultrassom), EAO-EAE (Extrato aquoso otimizado - Extração auxiliada por enzimas). * Condições otimizadas (corrida 5): tamanho de partícula (0,68 mm), volume de solvente (50 mL), tempo de extração (60 min). Valores são resultantes de medidas em triplicata. Elaborada pela autora.

Em geral, os extratos aquosos ultrassônicos obtidos apresentaram atividade mais significativa contra bactérias Gram-positivas. Essa tendência também foi observada em outros estudos, o que sugere que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos efeitos antimicrobianos dos compostos fenólicos do que as bactérias Gram-negativas (COMAN *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2016; WAFA *et al.*, 2017). A forte eletronegatividade da membrana externa na parede celular de bactérias Gram-negativas pode enfraquecer as interações com moléculas de compostos fenólicos, que geralmente exibem múltiplos grupos hidroxil associados ao potencial antimicrobiano desses compostos (CHUA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2014).

Quanto às outras bactérias testadas, a atividade inibitória dos extratos poderia estar relacionada com o composto majoritário encontrado, o galato de epigallocatequina (EGCG), que é um excelente composto antimicrobiano contra uma variedade de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias Gram-negativas (FRIEDMAN *et al.*, 2006). Além disso, o efeito antibacteriano pode ser resultado de uma ação sinérgica de vários compostos bioativos nos extratos aquosos, uma vez que esses extratos são multicomponentes brutos. Angela *et al.* (2014) observaram resultados positivos para a atividade antimicrobiana de seis extratos de folhas de uvaia em relação às bactérias Gram-positivas, com valores de MIC entre 62,5 e 125 µg/mL e 250 a 1000 µg/mL para as bactérias Gram-negativas.

Observou-se que os extratos aquosos das folhas de uvaia não exibiram atividade antibacteriana contra o gênero *Staphylococcus*. Essa falta de inibição pode ser explicada pela presença dos ácidos 2,5-DHBA e 2,4-DHBA em ambos os extratos. Liu *et al.* (2014) relataram que os sideróforos mamíferos, 2,5-DHBA e 2,3-DHBA, conferem vantagem de crescimento a *E. coli*, promovendo a captação de ferro. De maneira semelhante, a infecção por *Staphylococcus* requer a absorção de ferro do hospedeiro humano, mas o ferro é altamente restrito neste ambiente. Assim, pode-se inferir que a presença desses ácidos ajudou na absorção desse nutriente e, conseqüentemente, aumentou a resistência desse gênero frente aos extratos testados.

Com base nos resultados obtidos, a técnica de extração ultrassônica mostrou-se mais eficaz na obtenção de um extrato com propriedades antibacterianas mais acentuadas ($p < 0.05$). Isso pode ser explicado pelo fato de que o ultrassom pode aumentar a solubilidade dos compostos bioativos, tornando-os mais biodisponíveis para interagir com as bactérias, bem como dispersar o extrato uniformemente no meio, facilitando a interação frente as bactérias. Além disso, a energia ultrassônica, ao causar microcavitações, pode perturbar as membranas celulares das bactérias, tornando-as mais permeáveis a agentes antibacterianos ou causando danos diretos às células bacterianas (MACIEL, 2021).

4 CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, as técnicas de extração não-convencionais foram exploradas e foram eficazes na obtenção de altos teores de compostos polifenólicos e atividades biológicas *in vitro*. A otimização do processo de extração, utilizando partículas de 0,68 mm e 50 mL de água destilada por 60 minutos, resultou em uma fonte promissora de compostos polifenólicos, destacando-se o galato de epigallocatequina, a rutina e o 2,5-DHBA. A extração assistida por enzimas, nas condições otimizadas, foi considerada a mais adequada para obter consideráveis quantidades de fenóis, com atividades antioxidantes e antibacterianas elevadas. Ambos os extratos otimizados apresentaram atividade antibacteriana contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, mas com maior eficácia contra as bactérias Gram-positivas. Os extratos aquosos otimizados por extração assistida por ultrassom (OAE-EAU) e os extratos aquosos otimizados por extração auxiliada por enzimas (EAO-EAE) são alternativas viáveis e sustentáveis para agregar valor às folhas de uvaia, usualmente subaproveitadas.

CAPÍTULO 3

PERFIL FENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *EUGENIA PYRIFORMIS* CAMBESS APÓS DIGESTÃO *IN VITRO*: AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE, EFEITO ANTIDIABÉTICO E ANTI-HIPERTENSIVO.

Nota: O texto e os dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados do artigo submetido em *Food Science and Human Wellness*, de autoria de Marina Volpato Dacoreggio, Gabriela Soster Santetti, Heloísa Patrício Inácio, Isabel da Silva Haas, Bruna da Silva Monteiro Wanderley, Rodrigo Barcellos Hoff, Carlise Beddin Fritzen Freire, Aniela Pinto Kempka e Renata Dias de Mello Castanho Amboni

RESUMO

A ingestão de infusões de folhas ricas em compostos bioativos tem sido objeto de muitas pesquisas devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana e a biodisponibilidade desses compostos é um fator crítico para a sua eficácia na prevenção e tratamento de doenças. A influência das etapas da digestão gastrointestinal *in vitro* nos compostos fenólicos e atividade antioxidante da infusão de folhas de *E. pyriformis* Cambess foram avaliadas, bem como a bioacessibilidade e os efeitos antidiabético e anti-hipertensivo dos compostos fenólicos. Todas as fases da digestão mantiveram ou apresentaram aumento no teor de fenólicos totais em comparação à fração não digerida, com aumento de 86% na fase oral e 32% na fase intestinal. Um total de 26 compostos fenólicos incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e fenóis foram identificados na amostra não digerida e digerida (fase oral, gástrica e intestinal). Diferenças nos perfis e concentrações dos compostos fenólicos avaliados foram observadas durante a digestão gastrointestinal *in vitro*. Embora o potencial antioxidante tenha sido menor após o processo da digestão, a infusão ainda apresentou capacidade antioxidante elevada ao final desse processo, sendo o ácido fenólico 2,5-DHBA e os compostos fenólicos ácido ferúlico e ácido p-cumárico (171,57 % e 144,06%, índice de bioacessibilidade, respectivamente), os compostos antioxidantes predominantes. A infusão também apresentou porcentagem de inibição para todas as atividades biológicas testadas, variando entre 14% e 21% para a atividade antidiabética e 11% para a atividade anti-hipertensiva. Os resultados obtidos destacam, pela primeira vez, o valor da infusão das folhas de *E. pyriformis* Cambess como fontes bioacessíveis de fenólicos antioxidantes para consumo humano, potencialmente benéficos para a prevenção de doenças, como o diabetes mellitus e a hipertensão.

Palavras-chave: uvaia; decocção; digestão *in vitro*; antioxidante; síndrome metabólica.

ABSTRACT

The ingestion of leaf infusions rich in bioactive compounds has been the subject of much research due to their beneficial effects on human health and the bioavailability of these compounds is a critical factor for their effectiveness in preventing and treating diseases. The influence of *in vitro* gastrointestinal digestion steps on phenolic compounds and antioxidant activity of *E. pyriformis* Cambess leaf infusion were evaluated, as well as the bioaccessibility and antidiabetic and antihypertensive effects of phenolic compounds. All digestion phases maintained or showed an increase in total phenolic content compared to the undigested fraction, with an increase of 86% in the oral phase and 32% in the intestinal phase. A total of 26 phenolic compounds including phenolic acids, flavonoids and phenols were identified in the undigested and digested sample (oral, gastric and intestinal phase). Differences in the profiles and concentrations of the phenolic compounds evaluated were observed during *in vitro* gastrointestinal digestion. Although the antioxidant potential was lower after the digestion process, the infusion still showed high antioxidant capacity at the end of this process, with the phenolic acid being 2,5-DHBA and the phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid (171.57% and 144.06%, bioaccessibility index, respectively), the predominant antioxidant compounds. The infusion also showed a percentage of inhibition for all biological activities tested, ranging between 14% and 21% for antidiabetic activity and 11% for antihypertensive activity. The results obtained highlight, for the first time, the value of the infusion of *E. pyriformis* Cambess leaves as bioaccessible sources of antioxidant phenolics for human consumption, potentially beneficial for the prevention of diseases such as diabetes mellitus and hypertension.

Keywords: uvaia; decoction; *in vitro* digestion; antioxidant; metabolic syndrome.

1 INTRODUÇÃO

A uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) é uma espécie nativa brasileira da família Myrtaceae. Seus frutos têm sido extensivamente estudados nos últimos anos devido às suas qualidades, particularmente suas capacidades antioxidantes, antibacterianas e biológicas, assim como sua habilidade de gerenciar problemas metabólicos (KLEIN *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2021; SGANZERLA *et al.*, 2021; WANDERLEY *et al.*, 2022). No entanto, há poucos estudos que exploram diferentes partes da planta, como suas folhas (KLEIN *et al.*, 2021, 2018). Como demonstrado no capítulo anterior, identificamos por meio da análise LC-ESI-MS/MS cerca de 23 compostos em duas extrações aquosas distintas das folhas da uvaia (ultrassônica e assistida por enzimas), incluindo epigalocatequina galato, rutina, ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (2,5-DHBA) e ácido 2,4-di-hidroxibenzóico (2,4-DHBA).

A ingestão de infusões de folhas ricas em compostos bioativos tem sido objeto de muitas pesquisas devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana. Esses efeitos estão associados à presença de compostos fenólicos, incluindo alcaloides, flavonoides, glicosídeos e terpenoides, que apresentam atividade antioxidante (POHL *et al.*, 2016), efeito anti-Alzheimer (OKELLO; SAVELEV; PERRY, 2004), proteção contra o câncer (POHL *et al.*, 2016), doenças vasculares, hipertensão e cárie dentária (SOFUOGLU; KAVCAR, 2008), prevenção da obesidade (KIM *et al.*, 2009) e redução dos níveis de colesterol no sangue (FUJITA; YAMAGAMI, 2008). As infusões fitoterápicas podem ser consideradas bebidas farmacologicamente ativas, uma vez que fornecem uma das principais matrizes de polifenóis para a dieta humana, tornando-as atraentes para a indústria química, farmacológica e alimentar. No entanto, a bioatividade desses compostos pode ser influenciada por fatores como a espécie vegetal utilizada e a bioacessibilidade dos compostos após a digestão gastrointestinal (DE PAULO FARIAS *et al.*, 2021).

A biodisponibilidade de compostos fenólicos da dieta é um fator crítico para a sua eficácia na prevenção e tratamento de doenças. A bioacessibilidade, definida como a fração do composto que se torna disponível para a absorção intestinal após a digestão, é influenciada por diversos fatores, incluindo a solubilização e alterações estruturais dos polifenóis durante o processo digestivo (SHAHIDI; PENG, 2018). Os compostos fenólicos da dieta podem diferir significativamente quanto a sua biodisponibilidade e às propriedades biológicas. Nesse caso, somente os polifenóis que forem solubilizados e alterados estruturalmente durante a digestão serão realmente bioacessíveis, e por conseguinte, potencialmente biodisponíveis (CAICEDO-LOPEZ *et al.*, 2019). Estudos recentes avaliaram os efeitos da digestão gastrointestinal na

bioacessibilidade de polifenóis (DE LIMA OLIVEIRA *et al.*, 2020; DE PAULO FARIAS *et al.*, 2021; INADA *et al.*, 2020), e atividades biológicas, como antidiabética e anti-hipertensiva (FERNÁNDEZ; LABRA, 2013; SANTANA ANDRADE *et al.*, 2022) em espécies nativas subutilizadas no Brasil, como o jambolão, uvaia, guabiroba e jambo vermelho.

O Diabetes Mellitus e a hipertensão são duas condições médicas comuns e frequentemente associadas. Salehi e colaboradores (2019) definem o Diabetes como um conjunto de doenças metabólicas caracterizado pela deficiência na produção de insulina ou redução da sensibilidade dos tecidos à sua ação. Geddes (2020), por sua vez, descreve a hipertensão como uma condição em que os níveis de pressão sanguínea nas artérias estão elevados. Embora possuam diferentes impactos no organismo humano, ambas as doenças têm sido relacionadas inversamente ao consumo de compostos fenólicos, tais como flavonoides e ácidos fenólicos. Estudos indicam que algumas plantas medicinais têm sido eficazes como inibidoras naturais de glicosidases e/ou enzimas conversoras de angiotensina I (ECA), apresentando atividade antidiabética e anti-hipertensiva (SANTANA ANDRADE *et al.*, 2022). Diante disso, os produtos naturais à base de plantas são opções atraentes para o desenvolvimento de novos tratamentos antidiabéticos e anti-hipertensivos, dada a fácil disponibilidade e baixo custo.

Até o momento não há estudos que demonstrem os potenciais antioxidante e biológico da infusão de folhas de uvaia após a digestão gastrointestinal *in vitro*, ou que relatem o perfil fenólico dessa infusão após a digestão simulada. Portanto, esta pesquisa teve como objetivo analisar a influência da digestão gastrointestinal simulada, utilizando um modelo *in vitro*, na bioacessibilidade de compostos fenólicos e nas atividades antioxidante, antidiabética e anti-hipertensiva da infusão de folhas de uvaia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. O etanol, n-hexano, acetato de etila, hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Padrões analíticos (pureza $\geq 95\%$) de apigenina, isorhamnetina, pinobanksina, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido p-aminobenzóico, ácido p-cumárico, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, rutina, naringina, (+)-catequina, sinapaldeído, ácido cafeico, ácido clorogênico, coniferaldeído, siríngaldeído, crisina, hesperidina, ácido siríngico, quercetina, naringenina, (-)-epigallocatequina galato, (-)-epicatequina, pinocembrina, galangina, ácido salicílico, ácido gálico, ácido benzóico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e luteolina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Água ultrapura (tipo I) com resistividade mínima de 18,2 M Ω cm foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q® da Millipore (Molsheim, França). Dimetil sulfóxido (DMSO), metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) de grau HPLC foram comprados da Merck (Darmstadt, Alemanha), e ácido fórmico de grau HPLC foi adquirido da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). As enzimas alfa-amilase de *Aspergillus oryzae* (A10065; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), pepsina de mucosa gástrica de porco (P7125; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), pancreatina de pâncreas de porco (P7545; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), sais biliares (taurocolato de sódio hidratado, glicodeoxicolato de sódio e taurodeoxicolato de sódio hidratado), Folin-Ciocalteu, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), ABTS+ [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)], Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), alfa-amilase (86250), DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), alfa-glicosidase (A7420), pNP (4-nitrofenil N-acetil- β -D-glicosaminídeo), ACE (enzima conversora de angiotensina, humana, SAE0075), FAPGG (substrato furilacriloil-fenilalanilglicil-glicina) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

2.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS FOLHAS DE UVAIA

Em julho de 2019, folhas da planta *Eugenia pyriformis* Cambess, conhecida como uvaia, foram coletadas em Gravatal, Santa Catarina, Brasil, com coordenadas geográficas S 28° 32' 239" e W 49° 072' 065". Um exemplar da planta foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina, recebendo o código FLOR 68473 para identificação.

Para a seleção das folhas utilizadas no estudo, foram escolhidas aquelas com uniformidade de cor, e aquelas que apresentavam sinais de podridão, lesões ou defeitos foram descartadas.

Após a coleta e seleção, o material vegetal foi higienizado usando gaze umedecida em água destilada e, posteriormente, seco em um forno de circulação de ar forçado a 40 ± 5 °C por 6 dias. Após a secagem, as folhas foram moídas em um moinho de faca (IKA, A11, Alemanha) até alcançarem duas diferentes granulometrias, 0,68 mm e 1,40 mm, seguindo o método de Makanjuola (2017). As amostras foram devidamente embaladas em pacotes de polietileno, etiquetadas e armazenadas em temperatura de -18 ± 2 °C.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um experimento com um delineamento fatorial fracionário 2^{3-1} para determinar as condições ideais para a extração aquosa de compostos fenólicos das folhas de uvaia. As variáveis usadas foram: tempo, volume do solvente e tamanho das partículas das folhas. A quantidade de folhas secas em pó usadas no procedimento de extração foi mantida constante (1 g). O experimento foi composto por oito combinações de variáveis independentes, selecionadas com base em estudos anteriores. Todas as experiências foram realizadas em ordem aleatória para minimizar o efeito da variabilidade não explicada nas respostas obtidas. As variáveis e os níveis do experimento são apresentados na Tabela 7. A variável resposta foi o conteúdo fenólico total (CFT) da infusão. A infusão aquosa de uvaia otimizada com o maior CFT foi escolhida para ser caracterizada quanto ao seu conteúdo e perfil fenólico, atividades antioxidante, antidiabética e anti-hipertensiva após o processo de digestão simulada *in vitro*.

Tabela 7- Combinação entre as variáveis e os níveis do delineamento experimental para a extração de compostos fenólicos totais da infusão de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Tratamentos	Variáveis independentes			Variável dependente
	Tempo (min)	Tamanho de partícula (mm)	Temperatura (°C)	
1	5	0,68	85	Compostos fenólicos totais
2	5	0,68	85	
3	5	1,40	90	
4	5	1,40	90	
5	10	0,68	85	
6	10	0,68	85	
7	10	1,40	90	
8	10	1,40	90	

Fonte: elaborado pela autora

2.4 PREPARO DA INFUSÃO DE FOLHAS DE UVAIA

O procedimento para produção do extrato foi adaptado de Larrauri *et al.* (1997). Em resumo, 250 mL de água potável foram aquecidos a 85°C. Em seguida, a infusão foi preparada despejando água fervente em 1 g das folhas moídas, deixando repousar por dez minutos.

A infusão foi filtrada com papel filtro quantitativo ('Whatman' nº 40) e o filtrado foi armazenado em frascos âmbar, identificado e mantido congelado a -18 ± 2 °C até o uso.

2.5 DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO* PARA INFUSÃO

A simulação estática da digestão gastrointestinal *in vitro* foi realizada conforme metodologia descrita por Minekus *et al.* (2014). Brevemente, a digestão consistiu-se em três fases, denominadas fases oral, gástrica e intestinal. A amostra controle (não digerida) foi submetida às mesmas condições de digestão *in vitro* (tempo e temperatura) mas sem a presença das enzimas (α -amilase, pepsina, pancreatina) e sais biliares (taurocolato de sódio hidratado, glicodesoxicolato de sódio e taurodesoxicolato de sódio hidratado). Na fase oral, 5 mL do extrato, fluido salivar a pH 7,0 e enzima α -amilase (75 U/mL) foram agitados (100 x g) por 2 minutos a 37 °C. As amostras foram então submetidas à fase gástrica para a sequência da digestão simulada. Nesta fase, o líquido gástrico (pH 3,0), pepsina (2000 U/mL) e CaCl₂ (0,075 mol/L) foram adicionados à mistura oral e mantidos em um banho termostático por 2 h a 37 °C. Após a digestão gástrica, a mistura foi submetida à fase intestinal pela adição de fluido intestinal, pancreatina (800 U/mL), sais biliares (10 mol/L) e CaCl₂ (0,3 mol/L), com o pH ajustado para 7,0 com NaOH 1 mol/L. A mistura intestinal foi incubada por 2 h em banho termostático a 37 °C. No final de cada fase da digestão uma alíquota foi coletada e analisada quanto ao teor e perfil de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (pelos ensaios de ABTS e DPPH). Ao final da digestão as atividades anti-hipertensiva e antidiabética foram avaliadas.

2.6 BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O efeito da digestão *in vitro* na composição dos compostos fenólicos individuais da infusão foi avaliado, em triplicata, utilizando o índice de bioacessibilidade (BI) calculado pela Equação 1 (Ortega *et al.*, 2011).

$$BI (\%) = 100 * \frac{A}{B} \quad (1)$$

Onde A é a concentração de cada composto fenólico individual no final da fase intestinal e B é a concentração de cada composto fenólico na amostra antes da digestão *in vitro* (não digerida).

2.7 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA (INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE E ALFA-GLUCOSIDASE)

Um ensaio inibidor de α -amilase foi realizado de acordo com o método de Ademiluyi e Oboh (2013), com modificações. Em tubos de ensaio foram adicionados 50 μ L da amostra digerida diluída em diferentes concentrações (4000 μ g mL⁻¹ (concentração padrão da infusão de uvaia), 2000 μ g mL⁻¹ e 1000 μ g mL⁻¹) e 500 μ L da solução de α -amilase (0,5 mg/mL) preparada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). O conteúdo de cada tubo foi pré-incubado a 25 °C por 10 min. Após, foram adicionados 500 μ L de solução de amido a 1% e as misturas reacionais foram incubadas a 25 °C durante 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL do reagente DNS e, posteriormente, incubada em água fervente por 5 min e resfriada à temperatura ambiente. O conteúdo de cada tubo de ensaio foi diluído com 10 mL de água destilada e a absorbância foi medida a 540 nm. Um controle foi preparado, usando o mesmo procedimento descrito anteriormente, exceto que a amostra digerida que foi substituída por tampão fosfato de sódio 20 mM.

A atividade inibitória da α -glucosidase foi determinada de acordo com o método descrito por Apostolidis *et al.* (2007). Foram misturados 1 mL da amostra digerida, diluída em diferentes concentrações (4000 μ g mL⁻¹ (concentração da infusão de uvaia após a digestão), 2000 μ g mL⁻¹ e 1000 μ g mL⁻¹) com 2 mL da solução de α -glucosidase e incubados durante 10 min, a 25 °C. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de pNP (5 mM) e as amostras foram incubadas durante 5 min a 25 °C. A absorbância foi lida a 405 nm. Um controle foi preparado, usando o mesmo procedimento descrito anteriormente, exceto que a amostra digerida que foi substituída por tampão fosfato de sódio 0,1M. A atividade inibidora da α -amilase e a atividade inibidora da α -glucosidase, expressas em % de inibição, foram calculadas pela diferença entre a absorbância do controle e absorbância da amostra, dividido pela absorbância do controle, vezes cem.

2.8 ATIVIDADE ANTI-HIPERTESIVA

A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA) foi determinada de acordo com Elavarasan e Shamasundar (2014) e Raghavan e Kristinsson (2009). Uma alíquota de 200 μL da amostra digerida, diluída em diferentes concentrações (4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração da infusão de uvaia após a digestão), 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL da solução 50 mU de ACE e 2 mL de uma solução 0,5 mM do substrato furilacrilóil-fenilalanilglicil-glicina (FAPGG) foram adicionadas em tubos de ensaio. O conteúdo de cada tubo foi incubado a 25 °C por 30 min. A absorbância foi lida a 340 nm. Um controle foi preparado, usando o mesmo procedimento descrito anteriormente, exceto que a amostra digerida que foi substituído por tampão Tris-HCl 50mM. A inibição percentual da atividade ECA foi calculada, utilizando-se Equação 2:

$$\% \text{ inibição da atividade ECA} = \frac{\text{Abs Controle} - \text{Abs Amostras}}{\text{Abs Controle}} \times 100 \quad (2)$$

onde $\text{Abs}_{\text{Controle}}$ é a absorbância da amostra controle e $\text{Abs}_{\text{Amostras}}$ a absorbância das amostras digeridas.

2.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A quantificação do teor de fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com modificações (BONOLI *et al.*, 2004). O teor de compostos fenólicos totais das folhas foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico por mL de infusão (EAG/mL de infusão). A atividade do radical DPPH foi medida usando o método de Brand-Williams *et al.* (1995), enquanto a atividade do radical ABTS foi medida usando a metodologia de Re *et al.* (1999). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Trolox}$ equivalentes por mL de infusão ($\mu\text{mol Trolox/mL}$).

2.10 ANÁLISE LC-MS/MS DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS

A identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais na infusão não digerida e digerida (fases oral, gástrica e intestinal) foram realizadas de acordo com o método

descrito por (SERAGLIO *et al.*, 2018) Soluções-padrão estoque de cada composto foram preparadas dissolvendo 10 mg de padrão analítico, com as seguintes exceções: isorhamnetina (12,5 mg) e pinobanksina (11,5 mg) foram dissolvidas em 10 mL de MeOH e hesperidina foi dissolvida em 10 mL de DMSO. Todas as soluções foram armazenadas a 4°C. Uma solução intermediária contendo todos os compostos padrão (1 µg/mL) foi preparada em metanol. A infusão foi obtida de acordo com o descrito no item 2.3. As medições de cromatografia líquida-espectrometria de massas com ionização por electrospray em tandem (LC-ESI-MS/MS) foram realizadas em um sistema cromatográfico Agilent 1290 series (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-linear trap QTRAP 5500 (Sciex, Foster City, CA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). A taxa de fluxo adotada foi de 300 µL/min, e um volume de 5 µL foi injetado para todas as soluções padrão e amostras. A fase móvel foi composta por solvente A (água com 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (ACN com 0,1% de ácido fórmico). O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: 98% de A (v/v) de 0 a 4,0 min, 98-80% de A (v/v) de 4,0 a 7,0 min, 80-10% de A (v/v) de 7,0 a 14,0 min, 10% de A (v/v) de 14,0 a 15,0 min, 10-98% de A (v/v) de 15,0 a 17,0 min. O tempo total de execução foi de 17 min e o tempo de equilíbrio da coluna entre cada execução foi de 4 min. A coluna foi mantida a 40°C. Os parâmetros específicos de cada analito foram otimizados usando a infusão direta de soluções padrão para cada composto químico, como mostrado no Apêndice A.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), com intervalos de confiança de 95%, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) usando o software SASM-Agri versão 8,2. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Uma análise multivariada foi realizada para examinar a influência dos compostos fenólicos individuais na digestão gastrointestinal *in vitro*. Para isso, foram utilizadas a análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (HCA), ambas com variáveis padronizadas (0,1). Para o HCA, o método de agrupamento do algoritmo de Ward e a medida de distância euclidiana foram utilizados. A análise multivariada foi conduzida através do software Origin Pro 2022 (OriginLab Co., Northampton, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Tabela 8 apresenta os tratamentos elaborados pela combinação do tempo, temperatura e tamanho de partícula em relação ao conteúdo fenólico total dos extratos. Os resultados indicam efeito significativo ($p < 0,01$) para todas as variáveis e suas combinações, onde o efeito das variáveis é diretamente relacionado com a maior quantidade e exposição dos compostos bioativos das folhas de uvaia. Foi possível observar também um efeito altamente significativo ($p < 0,01$) para a variável correspondente ao tamanho de partícula, mantendo o comportamento encontrado pela extração EAE (Capítulo 2).

Tabela 8- Análise de variância para o conteúdo fenólico total (CFT) da infusão com base no tempo de extração, temperatura do solvente e tamanho das partículas das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess).

Variável	GL	CFT
	Quadrado médio	
T	1	18747,01*
TP	1	206775,2996*
V	1	1175178,69*
TxTP	1	42698,56*
TxV	1	179733,71*
TPxV	1	291077,33*
TxTPxV	1	420127,38*
Total		23
C.V (%)		1,05

T: Temperatura, TP: tamanho de partícula, V: volume, GL: Graus de liberdade. C.V: Coeficiente de variação. *: Significativo a 1% de probabilidade de erro. ns: Não significativo a 5% de probabilidade de erro. CFT: Conteúdo fenólico total. Elaborado pela autora

O comportamento da resposta em função das variáveis tempo e tamanho de partícula seguiu a mesma tendência apresentada para as extrações EAU e EAE (Capítulo 2). Ou seja, quanto maior o tempo e menor o tamanho de partícula, melhor foi a resposta em relação ao conteúdo fenólico total (Tabela 9).

No que se refere à temperatura, o aumento da mesma durante a extração promoveu maior solubilidade de analitos, aumentando tanto a solubilidade quanto a taxa de transferência de massa e, conseqüentemente, nesse caso, o conteúdo fenólico total (SAKLAR AYYILDIZ *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram relatados por Guo *et al.* (2016) ao estudarem o

processo de extração de polifenóis a partir do chá verde. Assim, a combinação dos parâmetros que resultaram em melhor desempenho na recuperação de CFT das folhas de uvaia utilizaram partículas de 0,68 mm por 10 minutos a 85°C (ensaio número 5).

Tabela 9- Níveis de variáveis e resposta do conteúdo fenólico total (CFT) da infusão com base no tempo, temperatura e tamanho das partículas das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

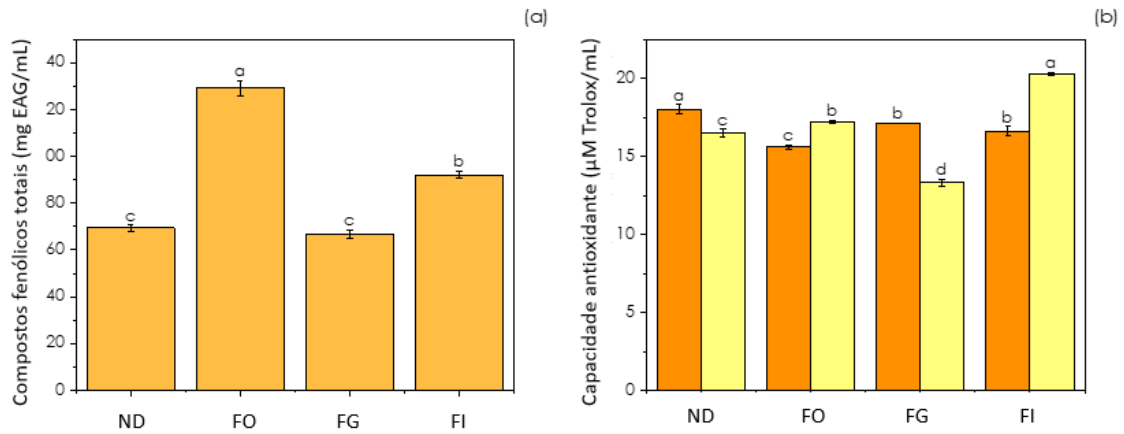
Ensaio ^a	Níveis das variáveis			Resposta ^c
	Tempo (min)	Tamanho de partícula (mesh)	Temperatura (°C)	CFT ^b
1	-1 (5)	-1 (0,68)	-1 (85)	2517,54
2	-1 (5)	-1 (0,68)	-1 (85)	2732,92
3	-1 (5)	+1 (1,40)	+1 (90)	2901,13
4	-1 (5)	+1 (1,40)	+1 (90)	2146,77
5	+1 (10)	-1 (0,68)	-1 (85)	3095,49
6	+1 (10)	-1 (0,68)	-1 (85)	2435,49
7	+1 (10)	+1 (1,40)	+1 (90)	2781,13
8	+1 (10)	+1 (1,40)	+1 (90)	2209,85

^aExperimentos foram conduzidos randomicamente. ^bCFT = Compostos fenólicos totais. ^c µg EAG/g (EAG: equivalente de ácido gálico). Valores são resultantes de medidas em triplicata. Elaborada pela autora

3.2 EFEITO DA DIGESTÃO NO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados dos compostos fenólicos totais e da capacidade antioxidante da infusão antes e após o processo de digestão *in vitro* estão apresentados na Figura 2. A digestão influenciou o teor fenólico, onde as fases oral e intestinal aumentaram significativamente o conteúdo fenólico total em comparação com a infusão não digerida (aumento de 86% e 36%, respectivamente). A fase gástrica apresentou um conteúdo de fenólicos totais ($66,61 \pm 7,73$ mg EAG/mL) próximo ($p > 0,05$) ao encontrado na amostra não digerida ($69,39 \pm 1,27$ mg EAG/mL).

Figura 2- Fenólicos totais (a) e capacidade antioxidante (b) da infusão de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*



ND: Não digerida; FO: Fase Oral; FG: Fase gástrica; FI: Fase intestinal; CFT: conteúdo fenólico total; ■: ABTS; ■: DPPH. (a) Letras minúsculas iguais significam que não houve diferença estatística entre as médias das fases da digestão para CFT, pelo teste de Tukey a 5% de significância. (b) Letras minúsculas iguais significam que não houve diferença estatística entre as médias de capacidade antioxidante do método DPPH em relação ao ABTS, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Elaborada pela autora.

As folhas, em geral, possuem suas fibras constituídas de diferentes polissacarídeos, incluindo celulose, hemicelulose e pectina. Já os fenólicos ligados à sua parede celular são principalmente polifenóis não extraíveis. Esses polifenóis formam complexos macromoleculares de polissacarídeos com estruturas complexas de rede. Desta forma, a liberação desses polifenóis pode ter sido auxiliada pela enzima α -1,4-amilase presente na fase oral (RIBAS-AGUSTÍ *et al.*, 2018). Durante a fase intestinal também houve liberação de fenólicos, e isso pode ter ocorrido devido a ação de enzimas microbianas, provenientes de bactérias comumente presentes no intestino grosso, que poderiam causar na liberação de polifenóis não extraíveis (CASSANI *et al.*, 2018).

A capacidade antioxidante avaliada pelos métodos de DPPH e ABTS das amostras de infusão digeridas e não digeridas apresentou comportamento distinto para cada método. Os componentes antioxidantes medidos pelo método de sequestro de radicais DPPH, apresentaram uma atividade antioxidante significativamente maior na maioria das fases, exceto na fase gástrica, em comparação com a amostra não digerida. A fase intestinal apresentou o resultado de maior significância para atividade antioxidante em relação ao método DPPH. O aumento observado na capacidade antioxidante sob as condições intestinais tem sido atribuído a desprotonação das porções hidroxila presentes nos anéis aromáticos dos compostos fenólicos (CÔMERT; GÖKMEN, 2022). Por outro lado, para os componentes capazes de sequestrar o radical ABTS, a atividade medida na fase intestinal e oral foi significativamente menor quando comparada à amostra não digerida. Isto pode ser justificado pelo fato de que os compostos

fenólicos podem existir de diferentes formas (formas livres, conjugadas e ligadas) e cada metodologia para capacidade antioxidante age sequestrando formas diferentes (KOLTOVER; SKIPA, 2023; ZHONG; SHAHIDI, 2015). Os resultados mostram que o processo da digestão gastrointestinal *in vitro* liberou com sucesso os compostos fenólicos da matriz alimentar, provavelmente como resultado de diversas ações enzimáticas (α -amilase, pepsina, pancreatina) e mudanças no pH.

3.3 ANÁLISE LC-MS/MS DE COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS

A Tabela 10 mostra o perfil fenólico da infusão de folhas de uvaia antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro*. Um total de 26 compostos fenólicos foram identificados, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e lignanas na amostra não digerida e durante as três fases da digestão (oral, gástrica e intestinal).

A amostra não digerida e as amostras das fases oral e intestinal apresentaram como composto fenólico majoritário o ácido 2,5-DHBA (2,5 - ácido dihidroxibenzóico), na seguinte ordem: amostra não digerida > amostra fase intestinal > amostra fase oral. Os valores foram significativamente diferentes entre si. O 2,5-DHBA é um composto fenólico que possui bioatividades relevantes, como antimutagênico, anti-inflamatório e antimicrobiano (MADUREIRA; PEREIRA; PINTADO, 2016).

Tabela 10- Teor de fenólicos individuais da infusão de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro*

(continua)

Compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$)	ND	FO	FG	FI
Ácido benzóico	26,28 ^d \pm 1,01	67,33 ^a \pm 5,0	26,92 ^c \pm 1,26	31,32 ^b \pm 0,79
Ácido p-aminobenzóico	nd	nd	38,7 \pm 2,32	nd
Siringaldeído	12,59 ^c \pm 1,39	26,32 ^a \pm 2,39	12,66 ^c \pm 2,36	13,75 ^b \pm 1,38
Ácido ferúlico	14,56 ^c \pm 2,01	51,88 ^a \pm 4,1	14,34 ^d \pm 1,22	24,98 ^b \pm 3,35
Ácido siríngico	30,12 ^c \pm 2,92	32,2 ^a \pm 2,17	30,14 ^c \pm 3,14	30,45 ^b \pm 3,12
Pinocembrina	nd	4,38 ^c \pm 0,04	16,48 ^a \pm 2,68	5,26 ^b \pm 0,07
Galangina	10,74 \pm 0,87	nd	nd	10,73 \pm 1,13
Apigenina	nd	10,87 ^a \pm 0,7	10,98 ^a \pm 0,86	nd
Kaempferol	nd	nd	26,46 \pm 1,32	nd
Epicatequina	14,04 ^c \pm 0,45	15,04 ^b \pm 2,4	20,63 ^a \pm 1,44	nd
Catequina	nd	33,14 ^b \pm 1,1	39,29 ^a \pm 2,25	32,99 ^b \pm 2,86
Ácido clorogênico	21,28 ^c \pm 2,83	33,14 ^a \pm 0,4	30,57 ^b \pm 2,11	12,14 ^d \pm 2,11

Tabela 10- Teor de fenólicos individuais da infusão de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro*

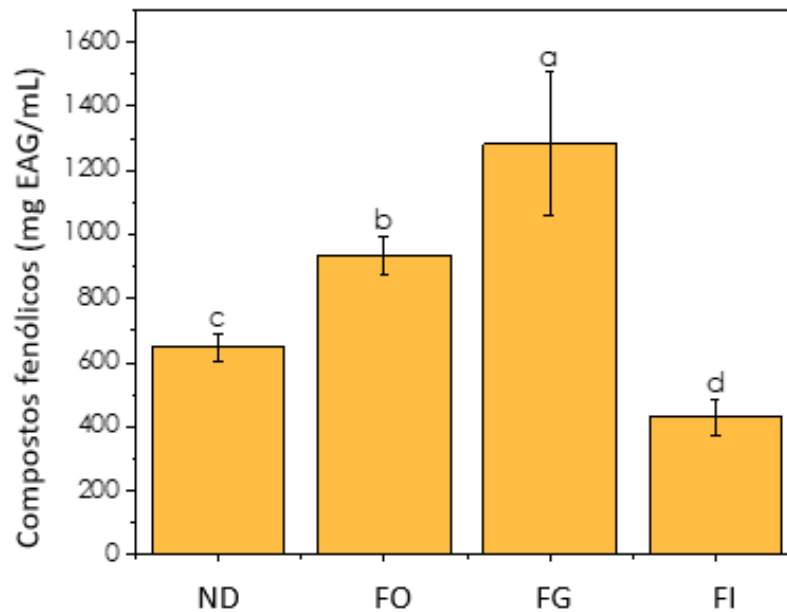
(conclusão)

Compostos fenólicos (µg/mL)	ND	FO	FG	FI
Hesperidina	5,97 ^b ± 0,04	4,39 ^c ± 0,01	24,93 ^a ± 1,26	4,39 ^c ± 0,04
2,5-DHBA (ácido 2,5 - dihidroxibenzoico)	174,65 ^a ± 7,28	125,8 ^c ± 4,7	74,92 ^d ± 4,15	160,56 ^b ± 9,8
2,4-DHBA (ácido 2,4 - dihidroxibenzoico)	40,07 ^c ± 3,21	79,99 ^a ± 5,5	11,64 ^c ± 1,31	46,02 ^b ± 7,71
Ácido gálico	nd	63,52 ^a ± 5,7	20,69 ^b ± 1,02	10,92 ^c ± 1,24
Ácido cafeico	36,26 ^b ± 2,25	38,10 ^a ± 3,6	nd	nd
Sinapaldeído	nd	6,31 ± 0,26	nd	nd
Ácido sináptico	nd	39,72 ± 2,5	nd	nd
Naringenina	10,58 ^b ± 0,96	13,87 ^a ± 1,2	10,46 ^c ± 0,08	nd
Quercetina	nd	25,11 ^b ± 2,5	28,67 ^a ± 1,24	nd
Isoquercetina	60,09 ^b ± 1,15	42,45 ^c ± 3,1	172,2 ^a ± 10,8	nd
Rutina	109,61 ^b ± 7,25	85,58 ^c ± 5,7	473,4 ^a ± 12,3	nd

<LOQ: abaixo do limite de quantificação (50 µg/mL). nd: não detectado. ND (não digerido), FO (fase oral), FG (fase gástrica) e FI (fase intestinal). Letras minúsculas iguais na mesma linha significam que não houve diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. Valores são resultantes de medidas em triplicata. Elaborada pela autora.

Dentre todas as fases avaliadas, a fase gástrica apresentou a maior concentração no número total de compostos fenólicos individuais identificados, acima de 95% em relação a amostra não digerida. A fase oral também apresentou alta taxa de liberação, em torno de 44%. Já durante a fase intestinal houve uma redução próxima a 33%. A redução do teor de compostos fenólicos observados após a digestão intestinal pode estar associada à sensibilidade desses compostos a faixa de pH 7-11, uma vez que a hidrólise desses compostos em moléculas menores durante o processo digestivo resulta em moléculas menos estáveis (DE PAULO FARIAS *et al.*, 2021). Estes resultados podem ser verificados na Figura 3, que ilustra a soma dos compostos individuais após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro* da infusão.

Figura 3- Soma dos compostos fenólicos individuais da infusão de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), antes e após digestão gastrointestinal *in vitro*



ND: Não digerida; FO: Fase Oral; FG: Fase gástrica; FI: Fase intestinal. Letras iguais significam que não houve diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de significância. Elaborada pela autora.

Em geral, os compostos fenólicos são altamente sensíveis ao pH e às enzimas digestivas, resultando em uma redução considerável em suas concentrações ao longo do processo de digestão (SPÍNOLA; LLORENT-MARTÍNEZ; CASTILHO, 2018). De fato, muitas dessas matrizes têm uma estrutura porosa muito complexa que retém polifenóis intactos e os protegem para sobreviver à digestão gastrointestinal, como pode ser o caso da folha de uvaia (MA *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2019).

Para avaliar a estabilidade e as mudanças no perfil de compostos fenólicos da infusão durante a simulação gastrointestinal *in vitro*, o índice de bioacessibilidade foi calculado após a digestão completa e os resultados estão apresentados na Tabela 11. Os índices de bioacessibilidade dos compostos fenólicos da infusão apresentaram variabilidade, podendo ser justificada pelo comportamento dos compostos durante o processo digestivo. Apenas 10 dos 26 compostos identificados apresentaram bioacessibilidade, o que provavelmente pode ter relação com a composição da folha de uvaia, estabilidade e capacidade de absorção dos compostos.

Tabela 11- Índice de bioacessibilidade de compostos fenólicos após processo de digestão gastrointestinal *in vitro* da infusão de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess)

Compostos fenólicos	Índice de bioacessibilidade (%)
Ácido benzóico	118,85
Siringaldeído	109,21
Ácido ferúlico	171,57
Ácido siríngico	101,10
Galangina	99,91
Ácido clorogênico	57,07
Hesperidina	74,04
2,5-dhba	91,93
2.4-dhba	114,85
Ácido p-cumárico	144,06

Valores são resultantes de medidas em triplicata. Fonte: elaborada pela autora.

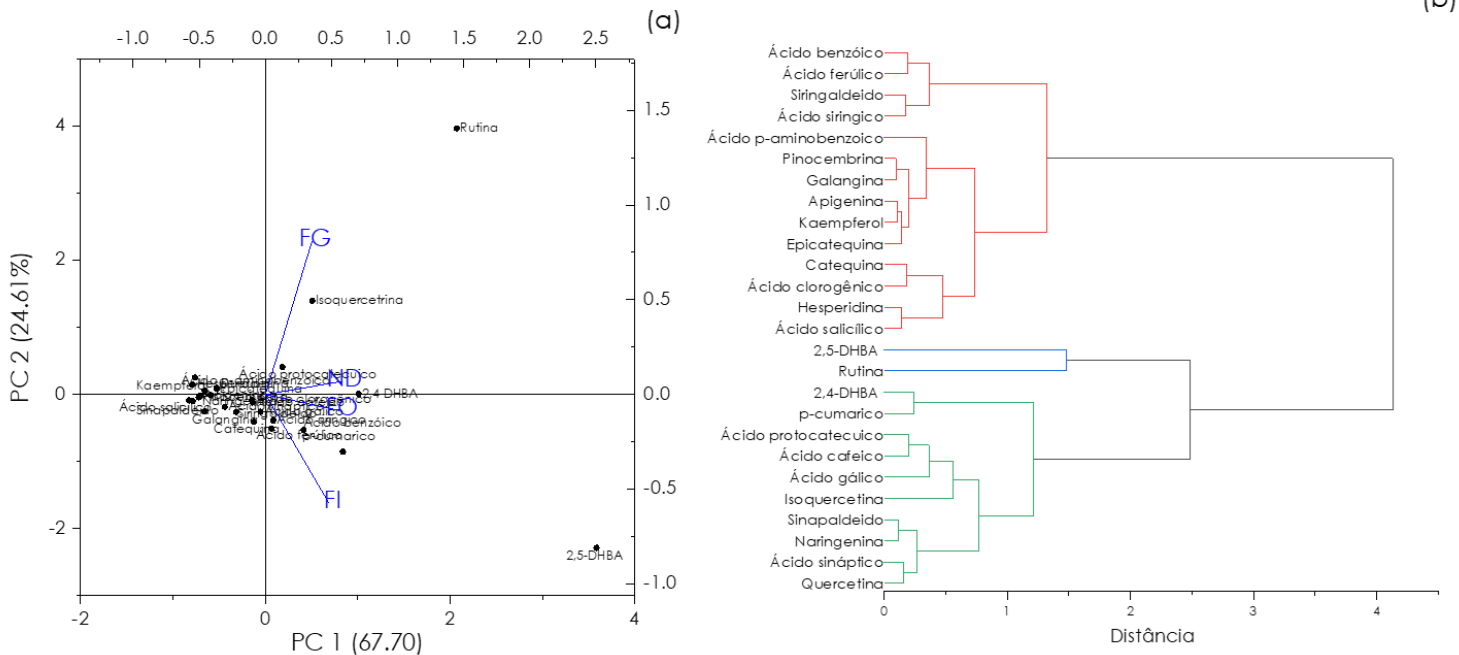
Os compostos fenólicos são encontrados principalmente como conjugados de O- ou C-glicosídeos na natureza e sofrem certas alterações durante a digestão no sistema gastrointestinal superior (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Uma vez no intestino delgado, esses compostos são extensivamente degradados por glicosidases citosólicas, liberando aglicona e degradando-os em ácidos fenólicos (ANGELINO *et al.*, 2017). A microbiota intestinal pode mudar a estrutura dos compostos fenólicos enquanto passa pelo cólon, como rearranjo estrutural e a adição ou remoção de grupos hidroxila e metoxila, o que afeta o metabolismo dos polifenóis (WANG *et al.*, 2022). Verificou-se que alguns compostos fenólicos presentes na infusão, mesmo não sendo majoritários nas fases da digestão, apresentaram alta bioacessibilidade, com ênfase para o ácido ferúlico (171,6 %) e o ácido p-cumárico (144,1%). Estes compostos possuem ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antitumoral (GARCIA-JIMENEZ *et al.*, 2018; KOH, 2012). Ainda, galangina, ácido clorogênico, hesperidina and 2,5-DHBA apresentaram índices elevados de bioacessibilidade (99,91 %, 57,07 %, 74,04 % and 91,93 %, respectivamente). Esses compostos apresentam atividades promissoras na melhoria da inflamação, tumores, estresse oxidativo, artrite, obesidade, diabetes, hipertensão danos neuronais, distúrbios cardiovasculares, entre outros (CHRISTIE; ALFENITO; WALBOT, 1994; ESTÉVEZ BRITO *et al.*, 2017; NAVEED *et al.*, 2018). A maioria dos compostos fenólicos presentes nas plantas existem na forma glicosilada, de éster ou polimérica, e seu metabolismo influencia fortemente a biodisponibilidade destes compostos (YANG *et al.*, 2022). Como os fenólicos geralmente existem em estruturas complexas, sua detecção tem variabilidade significativa. O método

analítico utilizado é baseado na razão massa/carga (m/z) e a maioria dos polifenóis são suscetíveis à degradação em condições alcalinas. Como resultado, esses compostos podem ser facilmente convertidos em outras formas estruturais desconhecidas e/ou não detectadas (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

A análise de componentes principais (Figura 4 (a)) revelou que os dois primeiros fatores PC1 (24,61%) e PC2 (67,70%) explicaram 92,31% da variância total dos compostos fenólicos durante o processo de digestão *in vitro*, o que pode ajudar a entender como os compostos são liberados e metabolizados durante esse processo. A maioria dos compostos fenólicos foi associada à fase oral e à amostra não digerida (PC1). Durante a fase gástrica, a isoquercetina e a rutina foram os principais compostos fenólicos observados, enquanto a fase intestinal foi principalmente associada ao 2,5- ácido dihidroxibenzoico.

Ademais, realizou-se o HCA (Figura 4 (b)) com o objetivo de distinguir grupos de compostos fenólicos durante a digestão *in vitro* e visualizar melhor os compostos com comportamento semelhante, visto que a análise PCA apresentou um extenso aglomerado de componentes. A análise criou uma matriz de similaridades entre os compostos detectados e combinou aqueles com maior semelhança em três clusters principais. O primeiro cluster, composto principalmente por ácidos fenólicos e flavonoides, incluiu 14 compostos fenólicos, já o terceiro cluster, representado principalmente por ácidos fenólicos ($n=7$), incluiu 10 compostos fenólicos. Ambos evidenciam a ampla associação e semelhante comportamento entre esses compostos. Em contraste, o segundo cluster consistiu apenas da rutina e 2,5- ácido dihidroxibenzoico, que foram distinguidos dos demais compostos no PCA (Figura 4 (a)), mostrando que esses compostos não apresentaram associação com nenhuma das fases avaliadas, isto é, apresentaram um comportamento diferente dos demais compostos analisados, durante o processo digestivo. Essa abordagem multivariada permitiu uma compreensão mais aprofundada e abrangente dos compostos estudados, além de confirmar os resultados discutidos anteriormente.

Figura 4 - Análise dos componentes principais (a) e análise de agrupamento hierárquico (b) dos compostos fenólicos individuais da infusão das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) antes e depois da digestão gastrointestinal *in vitro*



ND: Não digerida; FO: Fase Oral; FG: Fase gástrica; FP: Fase intestinal.

3.4 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA E ANTIHIPERTENSIVA DA INFUSÃO DE UVAIA APÓS DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO*

A infusão das folhas de uvaia após digestão simulada *in vitro* apresentou porcentagem de inibição para todas as concentrações e enzimas testadas (Tabela 12). As maiores inibições ocorreram para a infusão na sua concentração padrão (4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sendo de 21%, 14% e 11% para inibição da α -amilase, α -glucosidase e ACE, respectivamente.

Tabela 12- Atividade antidiabética e anti-hipertensiva da infusão digerida das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), em diferentes concentrações

Extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inibição da α -amilase (%)	Inibição da α -glucosidase (%)	Inibição da ECA* (%)
1000	0,68 \pm 0,08 ^c	7,57 \pm 0,53 ^c	7,28 \pm 0,14 ^c
2000	8,90 \pm 0,78 ^b	12,44 \pm 0,28 ^b	9,75 \pm 0,09 ^b
4000**	21,70 \pm 1,18 ^a	14,54 \pm 0,50 ^a	11,17 \pm 0,12 ^a

*Letras minúsculas distintas na mesma coluna representam, respectivamente, uma diferença significativa entre a concentração do extrato testada, para cada uma das inibições, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. *ECA: enzima conversora de angiotensina I. ** Concentração da infusão de uvaia após a digestão. Valores são resultantes de medidas em triplicata. Elaborada pela autora.

O metabolismo dos carboidratos envolve concisamente a quebra do amido pela α -amilase para produzir maltose, maltotriose e α -dextrina, e pelas α -glucosidases (como maltase e sacarase) que agem convertendo esses compostos em monossacarídeos facilmente digestíveis (ARUMUGAM; MANJULA; PAARI, 2013; SOUMYA; SRILATHA, 2011). Compostos fenólicos, especialmente flavonoides e derivados de ácido fenólico, são os principais compostos com ação antidiabética. Estudos têm demonstrado que extratos ricos em fenólicos inibem enzimas digestivas-chave, modulam a ação/secreção da insulina, suprimem a formação de produtos finais de glicação avançada e protegem/regeneram células β -pancreáticas (ARRUDA; PASTORE, 2019; SANCHO; PASTORE, 2012). Ademais, estes compostos alteram a função biocatalítica das enzimas através de ligações de hidrogênio, quelação ou ligações covalentes; os grupos carboxila e hidroxila dos ácidos fenólicos se ligam ao amido para formar pontes ou ligações cruzadas (CHHIKARA *et al.*, 2018).

Peixoto Araujo *et al.* (2021) ao revisarem estudos relacionados às plantas do gênero *Eugenia* e sua atividade antidiabética em frutos encontraram 28 artigos relatando seus efeitos sobre a doença, suas complicações e comorbidades. As porcentagens de inibição variaram de 3,57% (*in vivo*) a 53,57% (*in vitro*), sendo que das sete espécies listadas, a *Eugenia pyriformis* Cambess ainda não tinha sido estudada, o que releva ainda mais a importância dessa descoberta.

Da mesma forma que para o diabetes mellitus, os estudos demonstram um aumento no isolamento, identificação e caracterização dos inibidores de angiotensina. Esta enzima (ECA; EC 3.4.15.1) transforma a proteína inerte angiotensina I no vasoconstritor ativo angiotensina II, elevando a pressão arterial (ZHAO; XU, 2008). Além disso, ela catalisa a degradação da bradicinina, que controla a natriurese (exclusão urinária de íons de sódio) e o estresse oxidativo, bem como a vasodilatação (TADDEI; BORTOLOTTI, 2016). A maioria das substâncias fenólicas, incluindo ácidos fenólicos e flavonoides, tem demonstrado inibição competitiva por meio de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos no sítio catalítico e interação iônica com o zinco, além da hidrofobicidade dos anéis de benzeno (CHAKRABORTY; ROY, 2021).

O conhecimento do perfil de compostos bioativos presentes em extratos após o processo digestivo é importantíssimo para avaliar qualquer atividade biológica, entretanto, são restritas as pesquisas que avaliam a atividade anti-hipertensiva de extratos de folhas após o processo de digestão. Consolini e colaboradores (1999) avaliaram o extrato bruto aquoso de folhas de outra espécie do gênero *Eugenia*. Nesse estudo, a administração intraperitoneal do extrato de *Eugenia uniflora* L. diminuiu a pressão arterial de ratos normotensos em até $47,1 \pm 8,2\%$ do controle. Já Fernández e Labra (2013) ao estudarem a casca e sementes de uvas negra

peruanas verificaram que seus extratos perderam a capacidade de inibir a ACE após a digestão intestinal, o que reforça os dados encontrados nessa pesquisa de porcentagens de inibições abaixo dos 12 %.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos reforçam a importância das folhas de *E. pyriformis* Cambess como fitoterápicos antioxidantes. Todas as fases da digestão gastrointestinal *in vitro* mantiveram ou apresentaram aumento na quantidade de compostos fenólicos, com uma elevação de 86% para a fase oral.

Apesar das variações observadas nas atividades antioxidantes antes e após a digestão gastrointestinal simulada, a infusão permaneceu com potencial antioxidante ao final desse processo. Assim, é possível concluir que compostos que conferem capacidade redutora e atividade sequestradora de radicais nessas infusões podem permanecer ou podem ser convertidos em outros constituintes antioxidantes após a digestão gastrointestinal *in vitro*. A infusão testada também apresentou compostos fenólicos potencialmente bioacessíveis, com destaque para o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico, que possuem importantes funções biológicas para a saúde. Em termos de concentração, a fase gástrica apresentou a maior porcentagem de compostos fenólicos individuais encontrados na infusão. Já em relação a fase final do processo digestório, que apresenta grande importância no que se refere a absorção dos compostos bioativos, verificou-se uma composição fenólica mista, em maiores concentrações, majoritariamente, por ácidos fenólicos.

Observou-se inibições para todas as enzimas testadas, com valores de 21%, 14% e 11% para inibição *in vitro* da α -amilase, α -glucosidase e ACE, respectivamente, o que confere potencial antidiabético e anti-hipertensivo para a infusão de uvaia. Dessa forma, os resultados são promissores como uma primeira evidência do potencial antidiabético e anti-hipertensivo de infusões de folhas de uvaia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os resultados deste estudo destacam os potenciais benefícios das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess para a saúde, comumente conhecida como uvaia, como fonte de compostos bioativos com propriedades antioxidantes, antidiabéticas e anti-hipertensivas. A utilização de técnicas de extração não convencionais mostrou-se eficaz na obtenção de altos teores de compostos polifenólicos e atividades biológicas *in vitro*. Os processos de extração otimizados resultaram em uma fonte promissora de compostos polifenólicos, sendo epigalocatequina galato, rutina e 2,5-DHBA os mais proeminentes. A extração assistida por enzimas mostrou ser o método mais adequado para a obtenção de quantidades significativas de compostos fenólicos e altas atividades antioxidantes e antibacterianas.

Visando tornar os resultados mais aplicáveis ao consumo humano, os ensaios de digestão gastrointestinal *in vitro* revelaram que a infusão de uvaia manteve seu potencial antioxidante após o processo de digestão simulada. Os compostos fenólicos bioacessíveis, incluindo ácido ferúlico e ácido p-cumárico, têm importantes funções biológicas para a saúde humana. Além disso, a infusão de uvaia apresentou atividade inibitória significativa contra α -amilase, α -glicosidase e ECA, indicando seu potencial como agente antidiabético e anti-hipertensivo.

No geral, os resultados deste estudo sugerem que as folhas de uvaia podem ser uma fonte promissora de antioxidantes naturais e compostos bioativos com potenciais benefícios à saúde, em especial frente a diabetes e hipertensão, e que as técnicas de extração não convencionais exploradas oferecem alternativas viáveis e sustentáveis para agregar valor às folhas de uvaia subutilizadas. Precisam-se de estudos *in vivo* e/ou *in silico* mais aprofundados para validar esses resultados e possível futura aplicação destes em formulações a base de folhas de uvaia com potencial bioativo, mas esses resultados contribuem para a busca contínua por fontes naturais de compostos bioativos com potenciais benefícios à saúde e fornecem uma base para futuros estudos sobre o potencial uso terapêutico dos extratos de uvaia.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A.; TIJJANI, A.; ABUBAKAR, A. I.; KHAIRULMAZMI, A.; ISMAIL, M. R. Plant biomolecule antimicrobials: an alternative control measures for food security and safety. **Herbal Biomolecules in Healthcare Applications**, p. 381–406, 1 jan. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032385852600024X>>. Acesso em: 15 out. 2021.
- ADEMILUYI, A. O.; OBOH, G. Aqueous extracts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) varieties inhibit α -amylase and α -glucosidase activities *in vitro*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 1, p. 88–93, 1 jan. 2013.
- AGNANIET, H.; MBOT, E. J.; KEITA, O.; FEHRENTZ, J.-A.; ANKLI, A.; GALLUD, A.; GARCIA, M.; GARY-BOBO, M.; LEBIBI, J.; CRESTEIL, T.; MENUT, C. Antidiabetic potential of two medicinal plants used in Gabonese folk medicine. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 71, 22 dez. 2016. Disponível em: <<http://bmccomplementaltermmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1052-x>>. Acesso em: 27 maio. 2020.
- AL SHUKOR, N.; VAN CAMP, J.; GONZALES, G. B.; STALJANSSENS, D.; STRUIJS, K.; ZOTTI, M. J.; RAES, K.; SMAGGHE, G. Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of structure activity relationships. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 11832–11839, 2013.
- ALAM, P.; ALAJMI, M. F.; ARBAB, A. H.; PARVEZ, M. K.; SIDDIQUI, N. A.; ALQASOUMI, S. I.; AL-REHAILY, A. J.; AL-DOSARI, M. S.; BASUDAN, O. A. Comparative study of antioxidant activity and validated RP-HPTLC analysis of rutin in the leaves of different *Acacia* species grown in Saudi Arabia Production and hosting. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 715–723, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2016.10.010>>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- ALAVIJEH, P.; SHARMA, D. A study of antimicrobial activity of few medicinal herbs. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 4, p. 496–502, 2012. Disponível em: <www.pelagiaresearchlibrary.com>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- ANDRADE, R. N. B.; FERREIRA, A. G. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 118–125, 2000. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/23264/000293585.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 30 ago. 2019.

- ANGELA, M. de S.; LORENE, A.; CRISTINA, L. B. M.; OBDULIO, G. M.; MARILIS, D. M. *In vitro* effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., *Myrtaceae*: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, set. 2014. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/ACC644947464>>. Acesso em: 13 set. 2019.
- ANGELINO, D.; COSSU, M.; MARTI, A.; ZANOLETTI, M.; CHIAVAROLI, L.; BRIGHENTI, F.; DEL RIO, D.; MARTINI, D. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: A review. **Food and Function**, v. 7, p. 2368–2393, jul. 2017.
- ANTONIOS, T. F. T.; MACGREGOR, G. A. Angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertension: Potential problems. **Journal of Hypertension**, v. 13, p. S11–S16, 1995.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 99–379, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y. I.; SHETTY, K. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 46–54, mar. 2007.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 655–665, dez. 2002.
- ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 123, p. 450–480, set. 2019.
- ARUMUGAM, G.; MANJULA, P.; PAARI, N. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 3, p. 196–200, jan. 2013.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, ago. 2013.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.
- BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in barley

- (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5195–5200, ago. 2004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf040075c>>. Acesso em: 4 jul. 2018.
- BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 599–605, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942321>>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- BOULILA, A.; HASSEN, I.; HAOUARI, L.; MEJRI, F.; AMOR, I. Ben; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 485–493, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.050>>. Acesso em: 16 mar. 2021.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- BRANTNER, A.; GREIN, E. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 1, p. 35–40, ago. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7990502>>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- CAICEDO-LOPEZ, L. H.; LUZARDO-OCAMPO, I.; CUELLAR-NUÑEZ, M. L.; CAMPOS-VEGA, R.; MENDOZA, S.; LOARCA-PIÑA, G. Effect of the *in vitro* gastrointestinal digestion on free-phenolic compounds and mono/oligosaccharides from *Moringa oleifera* leaves: Bioaccessibility, intestinal permeability and antioxidant capacity. **Food Research International**, v. 120, p. 631–642, jun. 2019.
- CANABARRO, N. I.; UGALDE, G. A.; MAZUTTI, M. A.; FERREIRA, M. do C. Conveyor-belt drying of *Eugenia uniflora* L. leaves: Influence of drying conditions on the yield, composition, antioxidant activity and total phenolic content of supercritical CO₂ extracts. **Food and Bioproducts Processing**, v. 116, p. 140–149, jul. 2019.
- CASSANI, L.; GERBINO, E.; MOREIRA, M. del R.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Influence of non-thermal processing and storage conditions on the release of health-related compounds after *in vitro* gastrointestinal digestion of fiber-enriched strawberry juices. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 128–136, jan. 2018.

CELEP, E.; SEVEN, M.; AKYÜZ, S.; İNAN, Y.; YESILADA, E. Influence of extraction method on enzyme inhibition, phenolic profile and antioxidant capacity of *Sideritis trojana* Bornm. **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 360–365, mar. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629918315424>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

CHAKRABORTY, R.; ROY, S. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from plants: A review of their diversity, modes of action, prospects, and concerns in the management of diabetes-centric complications. **Journal of Integrative Medicine**, v. 6, p. 478-492, nov. 2021.

CHAVASCO, J. M.; PRADO E FELIPHE, B. H. M.; CERDEIRA, C. D.; LEANDRO, F. D.; COELHO, L. F. L.; DA SILVA, J. J.; CHAVASCO, J. K.; DIAS, A. L. T. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos de plantas do cerrado do Sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13–20, jan. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 9 dez. 2020.

CHEILA, C. B.; DOS ANJOS, G. L.; NÓBREGA, R. S. A.; DA S. MAGATON, A.; DE MIRANDA, F. M.; DE S. DIAS, F. Greener ultrasound-assisted extraction of bioactive phenolic compounds in *Croton heliotropiifolius* Kunth leaves. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105525, dez. 2020.

CHEMAT, F.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A. S.; STRUBE, J.; UHLENBROCK, L.; GUNJEVIC, V.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 248-263, set. 2019.

CHEN, S.; XING, X. H.; HUANG, J. J.; XU, M. S. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 100–105, 2011.

CHHIKARA, N.; KAUR, R.; JAGLAN, S.; SHARMA, P.; GAT, Y.; PANGHAL, A. Bioactive compounds and pharmacological and food applications of: *Syzygium cumini*-a review. **Food and Function**, v. 9, n. 12, p. 6096–6115, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30379170/>>. Acesso em: 30 out. 2022.

CHOWDHURY, A.; SARKAR, J.; CHAKRABORTI, T.; PRAMANIK, P. K.; CHAKRABORTI, S. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 12, p. 371, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.013>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

CHRISTIE, P. J.; ALFENITO, M. R.; WALBOT, V. Impact of low-temperature stress on

- general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. **Planta**, v. 194, n. 4, p. 541–549, dez. 1994. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00714468>>. Acesso em: 25 set. 2018.
- CHUA, H. C.; TSE, A.; SMITH, N. M.; MERGENHAGEN, K. A.; CHA, R.; TSUJI, B. T. Combatting the Rising Tide of Antimicrobial Resistance: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Dosing Strategies for Maximal Precision. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 3, p. 106269, dez. 2020.
- CINQ-MARS, C. D.; LI-CHAN, E. C. Y. Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology and ultrafiltration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9380–9388, nov. 2007.
- COMAN, M. M.; OANCEA, A. M.; VERDENELLI, M. C.; CECCHINI, C.; BAHRIM, G. E.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A.; SILVI, S. Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 4, p. 735–745, out. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-017-2997-9>>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Effect of food combinations and their co-digestion on total antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 414–422, jan. 2022.
- CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33–39, jul. 1999.
- CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste. **Brasília, DF: MMA**, 2018. (Série Biodiversidade; 51) Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/142-serie-biodiversidade.html>>, Acesso em: 28 fev. 2020.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 564-582, out. 1999. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.12.4.564>>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- COZ-BOLAÑOS, X.; CAMPOS-VEGA, R.; REYNOSO-CAMACHO, R.; RAMOS-GÓMEZ, M.; LOARCA-PIÑA, G. F.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H. Moringa infusion (*Moringa oleifera*) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator *in vitro*. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 95–101, ago. 2018.

Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018302504>>.

Acesso em: 3 jul. 2019.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, jul. 2009. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/np/b802662a>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

CVJETKO BUBALO, M.; RADOŠEVIĆ, K.; RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ, I.; HALAMBEK, J.; GAURINA SRČEK, V. A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **Academic Press**, v. 99, p. 1–12, jan. 2014.

D'AGOSTINO, R. B.; VASAN, R. S.; PENCINA, M. J.; WOLF, P. A.; COBAIN, M.; MASSARO, J. M.; KANNEL, W. B. General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham heart study. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 743–753, fev. 2008.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DA SILVA, A. P. G.; SPRICIGO, P. C.; PURGATTO, E.; DE ALENCAR, S. M.; SARTORI, S. F.; JACOMINO, A. P. Chemical composition, nutritional value and bioactive compounds in six uvaia accessions. **Food Chemistry**, v. 294, p. 547–556, out. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619307939#s0100>>. Acesso em: 9 set. 2019.

DACOREGGIO, M. V.; SANTETTI, G. S.; INÁCIO, H. P.; KEMPKA, A. P.; DE MELLO CASTANHO AMBONI, R. D. A Comprehensive Review of Eugenia Pyriformis Cambess: Reported Bioactivities and Health Effects. **Food Reviews International**, 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2021.1958226>>. Acesso em: 15 out. 2021.

DANLAMI, J. M.; ARSAD, A.; ZAINI, M. A. A.; SULAIMAN, H. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, p. 605–626, dez. 2014.

DE BOER, H. J.; KOOL, A.; BROBERG, A.; MZIRAY, W. R.; HEDBERG, I.; LEVENFORS, J. J. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 461–469, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15619565>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

DE LIMA OLIVEIRA, P. M.; DANTAS, A. M.; DOS SANTOS MORAIS, A. R.; GIBBERT,

- L.; KRÜGER, C. C. H.; DOS SANTOS LIMA, M.; MAGNANI, M.; DA SILVA CAMPELO BORGES, G. Juá fruit (*Ziziphus joazeiro*) from Caatinga: A source of dietary fiber and bioaccessible flavanols. **Food research international**, v. 129, p. 108745, mar. 2020.
- DE PAULO FARIAS, D.; DE ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; DIAS-AUDIBERT, F. L.; DELAFIORI, J.; CATHARINO, R. R.; PASTORE, G. M. Effect of in vitro digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in fractions of *Eugenia pyriformis* fruit. **Food Research International**, v. 150, p. 110767, dez. 2021.
- DONADIO, L. C. Study of some brazilian myrtaceae in jaboticabal-sp. **Acta Horticulturae**, v. 452, n. 452, p. 181–183, set. 1997. Disponível em: <https://www.actahort.org/books/452/452_24.htm>. Acesso em: 19 set. 2019.
- DURAZZINI, A. M. S.; MACHADO, C. H. M.; FERNANDES, C. C.; WILLRICH, G. B.; CROTTI, A. E. M.; CANDIDO, A. C. B. B.; MAGALHÃES, L. G.; SQUARISI, I. S.; RIBEIRO, A. B.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G.; MIRANDA, M. L. D. *Eugenia pyriformis* Cambess: a species of the *Myrtaceae* family with bioactive essential oil. **Natural Product Research**, v. 16, p. 1–5, 2019.
- ELAVARASAN, K.; SHAMASUNDAR, B. A. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates prepared from three freshwater carps (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*) using Flavorzyme. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 1344–1350, 2014.
- ESTÉVEZ BRITO, R.; RODRÍGUEZ MELLADO, J. M.; RUIZ MONTOYA, M.; PALMA, A.; RODRÍGUEZ-AMARO, R.; MAYÉN, M. Spectroscopic determination of the dissociation constants of 2,4- and 2,5-dihydroxybenzaldehydes and relationships to their antioxidant activities. **Comptes Rendus Chimie**, v. 20, n. 4, p. 365–369, abr. 2017.
- FARIAS, D. de P.; DE ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; DIAS-AUDIBERT, F. L.; DELAFIORI, J.; CATHARINO, R. R.; PASTORE, G. M. Distribution of nutrients and functional potential in fractions of *Eugenia pyriformis*: An underutilized native Brazilian fruit. **Food Research International**, v. 137, p. 109522, nov. 2020.
- FERNANDES DE ARAÚJO, F.; ANGÉLICA NERI-NUMA, I.; DE PAULO FARIAS, D.; RAHYARA MIRANDA CASTRO DA CUNHA, G.; MARIA PASTORE, G. 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.018>>. Acesso em: 13 maio. 2019.
- FERNÁNDEZ, K.; LABRA, J. Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE)

- inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 196–202, ago. 2013.
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; LEVIN, C. E.; MANDRELL, R. E.; KOZUKUE, N. Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 354–361, 2006.
- FUJITA, H.; YAMAGAMI, T. Antihypercholesterolemic effect of Chinese black tea extract in human subjects with borderline hypercholesterolemia. **Nutrition Research**, v. 28, n. 7, p. 450–456, jul. 2008.
- GARCIA-JIMENEZ, A.; GARCÍA-MOLINA, F.; TERUEL-PUCHE, J. A.; SAURA-SANMARTIN, A.; GARCIA-RUIZ, P. A.; ORTIZ-LOPEZ, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCIA-CANOVAS, F.; MUNOZ-MUNOZ, J. Catalysis and inhibition of tyrosinase in the presence of cinnamic acid and some of its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 548–554, nov. 2018.
- GEDDES, R. F. Hypertension: Why Is It Critical? **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 50, p. 1037-1052, set. 2020.
- GLIGOR, O.; MOCAN, A.; MOLDOVAN, C.; LOCATELLI, M.; CRIȘAN, G.; FERREIRA, I. C. F. R. Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, p. 302-315, jun. 2019.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários fatores que influenciam o conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No2_374_25-RV05289.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2018.
- GOLDONI, F. C.; BARRETTA, C.; NUNES, R.; BROERING, M. F.; DE FAVERI, R.; MOLLERI, H. T.; CORRÊA, T. P.; FARIAS, I. V.; AMORIN, C. K.; PASTOR, M. V. D.; MEYRE-SILVA, C.; BRESOLIN, T. M. B.; DE FREITAS, R. A.; QUINTÃO, N. L. M.; SANTIN, J. R. Effects of *Eugenia umbelliflora* O. Berg (*Myrtaceae*)-leaf extract on inflammation and hypersensitivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 112133, nov. 2019.
- GONÇALVES, T. P. R.; PARREIRA, A. G.; ZANUNCIO, V. S. dos S.; FARIAS, K. de S.; SILVA, D. B. da; LIMA, L. A. R. dos S. Antibacterial and antioxidant properties of flowers from *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (*Bignoniaceae*). **South African Journal of Botany**, v. 144, p. 156–165, jan. 2022.
- GUERRERO, L.; CASTILLO, J.; QUIÑONES, M.; GARCIA-VALLVÉ, S.; AROLA, L.; PUJADAS, G.; MUGUERZA, B. Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by

Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. **Plos one**, v. 7, n. 11, p. 229-234, nov. 2012.

GUO, L.; GUO, J.; ZHU, W.; JIANG, X. Optimized synchronous extraction process of tea polyphenols and polysaccharides from *Huaguoshan Yunwu* tea and their antioxidant activities. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 303–310, out. 2016.

GUSTAVO SGANZERLA, W.; CAROLINA BELING, P.; PERUZZO FERRAREZE, J.; AKITOSHI KOMATSU, R.; RAMOS NUNES, M.; DE LIMA VEECK, A. P. Nutritional, physicochemical and antimicrobial properties of uvaia pulp (*Eugenia pyriformis* Cambess). **Communications in Plant Sciences**, v. 8, p. 1-7, 2018. Disponível em: <<https://cpsjournal.org/2018/02/06/nutritional-physicochemical-and-antimicrobial-properties-of-uvaia-pulp-eugenia-pyriformis-cambess/>>. Acesso em: 9 set. 2019.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; AMBRIZ-PÉRE, D. L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; CASTILLO-LÓPEZ, R. I.; HEREDIA, J. B. Review: Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 66, n. 2, p. 87–100, 2016.

HAMINIUK, C. W. I.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; DE MATTOS, G.; CARPES, S. T.; BRANCO, I. G. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2862–2866, out. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13197-012-0759-z>>. Acesso em: 12 set. 2019.

HARRIS, W. C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 6. ed. Saunders/Elsevier, 2009. 619 p.
HOSNI, K.; HASSEN, I.; CHAÂBANE, H.; JEMLI, M.; DALLALI, S.; SEBEI, H.; CASABIANCA, H. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 291–299, maio 2013.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1-12, mar. 2011.

IBAÑEZ, E.; HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CASTRO-PUYANA, M. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: Macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. **Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications**, v.13, p. 55–98, 212.

IMIG, J. D. ACE Inhibition and Bradykinin-Mediated Renal Vascular Responses. **Hypertension**, v. 43, p. 533-535, mar. 2004.

INADA, K. O. P.; SILVA, T. B. R.; LOBO, L. A.; DOMINGUES, R. M. C. P.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Bioaccessibility of phenolic compounds of jaboricaba (*Plinia jaboricaba*)

peel and seed after simulated gastrointestinal digestion and gut microbiota fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 103851, abr. 2020.

IRAKLI, M.; TSIFODIMOU, K.; SARROU, E.; CHATZOPOULOU, P. Optimization infusions conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Sideritis scardica* tea using response surface methodology. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 8, p. 67–74, mar. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786117304473>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

JACOMINO, A. P.; DA SILVA, A. P. G.; DE FREITAS, T. P.; DE PAULA MORAIS, V. S. Uvaia— *Eugenia pyriformis* Cambess. **Exotic Fruits**, p. 435–438, 2018.

JIE, G.; LIN, Z.; ZHANG, L.; LV, H.; HE, P.; ZHAO, B. Free radical scavenging effect of *Pu-erh* tea extracts and their protective effect on oxidative damage in human fibroblast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 21, p. 8058–8064, out. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf061663o>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

JOSEPH, J.; KARTHIKA, T.; DAS, V. R. A.; RAJ, V. S. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a potential molecule for the development of therapeutics against emerging SARS-CoV-1, MERS-CoV and SARS-CoV-2 coronaviruses. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 26, p. 26–28, set. 2021.

JOVANOVIĆ, M.; MUDRIĆ, J.; DRINIĆ, Z.; MATEJIĆ, J.; KITIĆ, D.; BIGOVIĆ, D.; ŠAVIKIN, K. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bitter compounds and polyphenols from willow gentian underground parts. **Separation and Purification Technology**, v. 281, p. 119868, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586621015756>>. Acesso em: 15 out. 2021.

KEYHANFAR, M.; NAZERI, S.; BAYAT, M. Evaluation of antibacterial activities of some medicinal plants, traditionally used in Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 353–358, out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325735>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

KIM, H. J.; JEON, S. M.; LEE, M. K.; JUNG, U. J.; SHIN, S. K.; CHOI, M. S. Antilipogenic effect of green tea extract in mice. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 4, p. 467–471, abr. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2647>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

KIM, H. S.; QUON, M. J.; KIM, J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v. 2, p. 187-195, jan. 2014.

KLEIN, E. J.; CARVALHO, P. I. N.; NÁTHIA-NEVES, G.; VARDANEGA, R.; MEIRELES,

- M. A. A.; DA SILVA, E. A.; VIEIRA, M. G. A. Techno-economical optimization of uvaia (*Eugenia pyriformis*) extraction using supercritical fluid technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 174, p. 105239, ago. 2021.
- KLEIN, E. J.; SANTOS, K. A.; PALÚ, F.; VIEIRA, M. G. A.; DA SILVA, E. A. Use of supercritical CO₂ and ultrasound-assisted extractions to obtain α/β -*amyrin*-rich extracts from uvaia leaves (*Eugenia pyriformis* Cambess.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, p. 1–8, jul. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844617307726?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 ago. 2019.
- KOH, P. O. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. **Neuroscience Letters**, v. 507, n. 2, p. 156–160, jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22200499/>>. Acesso em: 18 jun. 2022.
- KOLTOVER, V. K.; SKIPA, T. A. Antioxidant pharmacology. **Anti-Aging Pharmacology**, v. 15, p. 341–365, 2023.
- KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K. K.; VULIĆ, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 167–176, jan. 2010.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of *Myrtaceae* in Brazil: An illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508–536, out. 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2307/2807742>>. Acesso em: 19 set. 2019.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390–1393, abr. 1997. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf960282f>>. Acesso em: 4 jul. 2018.
- LAYA, A.; KOUBALA, B. B. Polyphenols in cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) and their stability in antioxidant potential after *in vitro* gastrointestinal digestion. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. 35-67, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03567>>. Acesso em: 28 maio. 2020.
- LI, A. N.; LI, S.; ZHANG, Y. J.; XU, X. R.; CHEN, Y. M.; LI, H. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 12, p. 6020-6047, 2014. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/nutrients>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 517-520, 2003.

LIU, Z.; REBA, S.; CHEN, W. D.; PORWAL, S. K.; BOOM, W. H.; PETERSEN, R. B.; ROJAS, R.; VISWANATHAN, R.; DEVIREDDY, L. Regulation of mammalian siderophore 2,5-DHBA in the innate immune response to infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 6, p. 1197–1213, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4042634/>. Acesso em: 28 jul. 2021.

LOPES, J. M. M.; LAGE, N. N.; GUERRA, J. F. C.; SILVA, M.; BONOMO, L. F.; PAULINO, A. H. S.; REGIS, A. L. R. S.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E. A preliminary exploration of the potential of *Eugenia uvalha* Cambess juice intake to counter oxidative stress. **Food Research International**, v. 105, p. 563–569, mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917308372>. Acesso em: 3 jul. 2019.

LUO, Y.; PENG, B.; LIU, Y.; WU, Y.; WU, Z. Ultrasound extraction of polysaccharides from guava leaves and their antioxidant and antiglycation activity. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 228–234, out. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318306603>. Acesso em: 4 jul. 2019.

LUTHRIA, D. L. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 745–752, mar. 2008.

MA, Y.; YANG, Y.; GAO, J.; FENG, J.; SHANG, Y.; WEI, Z. Phenolics and antioxidant activity of bamboo leaves soup as affected by *in vitro* digestion. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 110941, jan. 2020.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, A.; PINTADO, M. Chitosan nanoparticles loaded with 2,5-dihydroxybenzoic acid and protocatechuic acid: Properties and digestion. **Journal of Food Engineering**, v. 174, p. 8–14, abr. 2016.

MAKANJUOLA, S. A. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea–ginger blend. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 6, p. 1179–1185, nov. 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/fsn3.509>. Acesso em: 2 jun. 2020.

MALVIYA, N.; JAIN, S.; MALVIYA, S. Antidiabetic potential of medicinal plants. **Acta poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 2, p. 113–118, 2010. Disponível em: <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>. Acesso em: 27 maio. 2020.

MARATHE, S. J.; JADHAV, S. B.; BANKAR, S. B.; KUMARI DUBEY, K.; SINGHAL, R. S. Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. **Current Opinion in**

Food Science, v. 25, p. 62-72, fev. 2019.

MARTÍNEZ-CEJA, A.; ROMERO-ESTRADA, A.; COLUMBA-PALOMARES, M. C.; HURTADO-DÍAZ, I.; ALVAREZ, L.; TETA-TALIXTACTA, R.; SÁNCHEZ-RAMOS, M.; CRUZ-SOSA, F.; BERNABÉ-ANTONIO, A. Anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity of leaf and cell cultures extracts of *Randia aculeata* L. and its chemical components by GC-MS. **South African Journal of Botany**, v. 144, p. 206–218, jan. 2022.

MARTINS, N.; BARROS, L.; SANTOS-BUELGA, C.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. **Food Chemistry**, v. 167, p. 131–137, jan. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614009923>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

MASON, S. A.; TREWIN, A. J.; PARKER, L.; WADLEY, G. D. Antioxidant supplements and endurance exercise: Current evidence and mechanistic insights. **Redox Biology**, v. 35, p.101471, ago. 2020.

MASON, T. J.; PANIWNKYK, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, n. 3, p. 253–260, nov. 1996.

MINATEL, I. O.; BORGES, C. V.; FERREIRA, M. I.; GOMEZ, H. A. G.; CHEN, C.-Y. O.; LIMA, G. P. P. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. **Phenolic Compounds - Biological Activity**, 2017.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24803111/>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 95-111, out. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304014098?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 set. 2019.

NADAR, S. S.; RAO, P.; RATHOD, V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. **Food Research International**, v. 108, p.

309-330, jun. 2018.

NAVEED, M.; HEJAZI, V.; ABBAS, M.; KAMBOH, A. A.; KHAN, G. J.; SHUMZAID, M.; AHMAD, F.; BABAZADEH, D.; FANGFANG, X.; MODARRESI-GHAZANI, F.; WENHUA, L.; XIAOHUI, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, jan. 2018.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797–1806, 2008. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

NETO, J. J. L.; DE ALMEIDA, T. S.; DE MEDEIROS, J. L.; VIEIRA, L. R.; MOREIRA, T. B.; MAIA, A. I. V.; RIBEIRO, P. R. V.; DE BRITO, E. S.; FARIAS, D. F.; CARVALHO, A. F. U. Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 999–1007, abr. 2017.

NCCLS. **Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana**. M100-S15, v. 25, 2016.

OKELLO, E. J.; SAVELEV, S. U.; PERRY, E. K. *In vitro* anti- β -secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 624–627, ago. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1519>>. Acesso em: 25 jan. 2021.

OLIVEIRA, B. D.; RODRIGUES, A. C.; CARDOSO, B. M. I.; RAMOS, A. L. C. C.; BERTOLDI, M. C.; TAYLOR, J. G.; CUNHA, L. R. da; PINTO, U. M. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 59–66, jun. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016300371>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, Ü. Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 978-989, jul. 2011.

ORTEGA-VIDAL, J.; RUIZ-RIAGUAS, A.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M. L.; ORTEGA-BARRALES, P.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. Phenolic profile and antioxidant activity of *Jasonia glutinosa* herbal tea. Influence of simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, v. 287, p. 258–264, jul. 2019.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an

improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001.

PATEL, D. K.; PRASAD, S. K.; KUMAR, R.; HEMALATHA, S. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 4, p. 320–330, 2012.

PEIXOTO ARAUJO, N. M.; ARRUDA, H. S.; DE PAULO FARIAS, D.; MOLINA, G.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Plants from the genus *Eugenia* as promising therapeutic agents for the management of diabetes mellitus: A review. **Food Research International**, v. 142, p. 110192, abr. 2021.

PEIXOTO ARAUJO, N. M.; ARRUDA, H. S.; DOS SANTOS, F. N.; DE MORAIS, D. R.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. LC-MS/MS screening and identification of bioactive compounds in leaves, pulp and seed from *Eugenia calycina* Cambess. **Food Research International**, v. 137, p. 109556, nov. 2020.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; SANTOS-BUELGA, C.; OSUNA, A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 67–75, 2009.

PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 84-99, fev. 2013.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 01, n. 01, p. 651-715, 2012. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/methods-for-total-antioxidant-activity-determination-a-review-2161-1009.1000106.php?aid=3538>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

POHL, P.; DZIMITROWICZ, A.; JEDRYCZKO, D.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; JAMROZ, P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 130, p. 326–335, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.042>>. Acesso em: 17 mar. 2021.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 37-44, jan. 2012.

RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 117, n. 4, p. 582–588, dez. 2009.

RAMOS, K. K.; LESSIO, B. C.; MECÊ, A. L. B.; EFRAIM, P. Mathematical modeling of uvaia byproduct drying and evaluation of quality parameters. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 643–651, 2017. Disponível em:

<<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10068-017-0078-2.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

REDDY, K. S.; KATAN, M. B. Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 167–186, 2004.

RIBAS-AGUSTÍ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O.; SOLIVA-FORTUNY, R.; ELEZ-MARTÍNEZ, P. Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, p. 2531-2548, out. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2017.1331200>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

RIBEIRO, A. B.; CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M.; DA SILVA, A. F.; VISENTAINER, J. V.; FERNANDES, E. *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. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S030881461400795X/1-s2.0-S030881461400795X-main.pdf?_tid=bbd28157-4b1f-4f5c-bc1c-92eb725aff7&acdnat=1530715242_65dfaaa92a00e45a79483ef7d2d1abb0>. Acesso em: 4 jul. 2018.

RODRIGUES, L. M.; ROMANINI, E. B.; SILVA, E.; PILAU, E. J.; DA COSTA, S. C.; MADRONA, G. S. Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) residue as a source of antioxidants: An approach to ecofriendly extraction. **LWT-Food Science and Technology**, v. 138, p. 110785, mar. 2021.

SAFDAR, M. N.; KAUSAR, T.; JABBAR, S.; MUMTAZ, A.; AHAD, K.; SADDOZAI, A. A. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 488–500, jul. 2017.

SAKLAR AYYILDIZ, S.; KARADENIZ, B.; SAGCAN, N.; BAHAR, B.; US, A. A.; ALASALVAR, C. Optimizing the extraction parameters of epigallocatechin gallate using conventional hot water and ultrasound assisted methods from green tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 37–44, set. 2018.

SALEHI, B.; ATA, A.; KUMAR, N. V. A.; SHAROPOV, F.; RAMÍREZ-ALARCÓN, K.; RUIZ-ORTEGA, A.; AYATOLLAHI, S. A.; FOKOU, P. V. T.; KOBARFARD, F.;

ZAKARIA, Z. A.; IRITI, M.; TAHERI, Y.; MARTORELL, M.; SUREDA, A.; SETZER, W. N.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SANTINI, A.; CAPASSO, R.; OSTRANDER, E. A.; ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M. I.; CHO, W. C.; SHARIFI-RAD, J. Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. **Biomolecules**, v. 30, p. 551, out. 2019.

SALEHI, B.; MARTORELL, M.; ARBISER, J. L.; SUREDA, A.; MARTINS, N.; MAURYA, P. K.; SHARIFI-RAD, M.; KUMAR, P.; SHARIFI-RAD, J. Antioxidants: Positive or negative actors? **Biomolecules**, v. 4, p. 124, dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30366441/>>. Acesso em: 2 maio. 2023.

SALVADOR, M. J.; DE LOURENÇO, C. C.; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C. R. F.; STEFANELLO, M. É. A. Antioxidant capacity and phenolic content of four myrtaceae plants of the South of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977–982, 2011.

SANCHO, R. A. S.; PASTORE, G. M. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. **Food Research International**, v. 46, p. 378-86, abr. 2012.

SANTANA ANDRADE, J. K.; CHAGAS BARROS, R. G.; PEREIRA, U. C.; NOGUEIRA, J. P.; GUALBERTO, N. C.; SANTOS DE OLIVEIRA, C.; SHANMUGAM, S.; NARAIN, N. Bioaccessibility of bioactive compounds after *in vitro* gastrointestinal digestion and probiotics fermentation of Brazilian fruits residues with antioxidant and antidiabetic potential. **LWT-Food Science and Technology**, v. 153, p. 112469, jan. 2022.

SATIJA, A.; HU, F. B. Plant-based diets and cardiovascular health. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 28, p. 437-441, out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29496410/>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

SCALON, S. de P. Q.; SCALON FILHO, H.; RIGONI, M. R. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1228–1234, 2004.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 782-796, out. 2015.

SERAGLIO, S. K. T.; SCHULZ, M.; NEHRING, P.; DELLA BETTA, F.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Nutritional and bioactive potential of *Myrtaceae* fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 239, p. 649–656, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.118>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

SGANZERLA, W. G.; KOMATSU, R. A.; MANGRICH DOS PASSOS, J. F.; COSTA, M. D.;

- DOBLER STROSCHEIN, M. R.; SCHONS, P. F.; PAULA DE LIMA VEECK, A. Variability in the molecular, phenological, and physicochemical characteristics of uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess - Myrtaceae) accessions from the Brazilian Atlantic rainforest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102082, ago. 2021.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v.18, p. 820-897, 2015. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S1756464615003023/1-s2.0-S1756464615003023-main.pdf?_tid=5deda4cc-f401-401b-ae04-e835de3fdc60&acdnat=1519934738_75b513393ec48cfd3c0f5c51fe8f4c0b>. Acesso em: 1 mar. 2018.
- SHAHIDI, F.; PENG, H. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. **Journal of Food Bioactives**, v. 4, p. 2368-2393, dez. 2018.
- SIDDIQUI, I. A.; RAISUDDIN, S.; SHUKLA, Y. Protective effects of black tea extract on testosterone induced oxidative damage in prostate. **Cancer Letters**, v. 227, n. 2, p. 125–132, set. 2005.
- SILVA, C. V. e; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de *Eugenia*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 86–92, jun. 2005.
- SILVA, Y. L. da; TAKEMURA, O. S.; SANTOS, S. R. da S. R. dos; ROMAGNOLO, M. B.; LAVERDE JUNIOR, A. triagem fitoquímica e avaliação de propriedades biológicas do extrato alcoólico das folhas de *Eugenia pyriformis* cambess. (*Myrtaceae*). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 3, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/5550>>. Acesso em: 17 set. 2019.
- SILVA JÚNIOR, M. E.; ARAÚJO, M. V. R. L.; SANTANA, A. A.; SILVA, F. L. H.; MACIEL, M. I. S. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from ciriguela (*Spondias purpurea* L.) peel: Optimization and comparison with conventional extraction and microwave. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 103260, ago. 2021.
- SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 1807-1821, 2011.
- SINGH, J. P.; KAUR, A.; SINGH, N.; NIM, L.; SHEVKANI, K.; KAUR, H.; ARORA, D. S. *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **LWT**, v. 65, p. 1025–1030, jan. 2016.
- SOFUOGLU, S. C.; KAVCAR, P. An exposure and risk assessment for fluoride and trace metals in black tea. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, n. 2–3, p. 392–400, out. 2008.

- SOMCHIT, M. N.; REEZAL, I.; ELYSHA NUR, I.; MUTALIB, A. R. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 1–4, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499068>>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- SOMOVA, L. O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F. O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2–3, p. 115–121, jan. 2003.
- SOUMYA, D.; SRILATHA, B. Late Stage Complications of Diabetes and Insulin Resistance. **Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 02, n. 09, p. 9, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6156.1000167>>. Acesso em: 27 maio. 2020.
- SPELLMAN, C. W. Pathophysiology of type 2 diabetes: targeting islet cell dysfunction. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 7, p. 110, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/51442959_Pathophysiology_of_type_2_diabetes_targeting_islet_cell_dysfunction>. Acesso em: 28 maio. 2020.
- SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; CASTILHO, P. C. Antioxidant polyphenols of *Madeira sorrel* (*Rumex maderensis*): How do they survive to *in vitro* simulated gastrointestinal digestion? **Food Chemistry**, v. 259, p. 105–112, set. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29680032>>. Acesso em: 28 maio. 2020.
- STEFANELLO, M. É. A.; WISNIEWSKI JR., A.; SIMIONATTO, E. L.; CERVI, A. C. Chemical composition and seasonal variation of essential oils of *Eugenia pyriformis* (*Myrtaceae*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/288069413_Chemical_composition_and_seasonal_variation_of_essential_oils_of_Eugenia_pyriformis_Myrtaceae>. Acesso em: 9 dez. 2020.
- SWER, T. L.; MUKHIM, C.; BASHIR, K.; CHAUHAN, K. Optimization of enzyme aided extraction of anthocyanins from *Prunus nepalensis* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 382–390, maio 2018.
- SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 165–181, 2012. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/trac>>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- TADDEI, S.; BORTOLOTTI, L. Unraveling the Pivotal Role of Bradykinin in ACE Inhibitor Activity. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 16, p. 309–321, jun. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40256-016-0173-4>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- TAO, L.; LAMBERT, J. D. Antioxidant and Pro-Oxidant Activities of Green Tea Polyphenols

- in Cancer Prevention. **Polyphenols in Human Health and Disease**, v. 2, p. 1191–1198, 2013.
- UEDA, K. M.; RONKO, L. Z.; TOCI, A. T.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R.; FARIAS, F. O. Green Designer Solvents for Boosting the Extraction of Biocompounds from *Eugenia pyriformis* Cambess Leaves. **ACS Food Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 532–540, mar. 2021. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsfoodscitech.1c00424>>. Acesso em: 30 abr. 2022.
- UMMAT, V.; SIVAGNANAM, S. P.; RAJAURIA, G.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Advances in pre-treatment techniques and green extraction technologies for bioactives from seaweeds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 90-106, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224421000145>>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- VIEIRA GOMES, D. C.; ALENCAR, M. V. O. B.; DOS REIS, A. C.; DE LIMA, R. M. T.; DE OLIVEIRA SANTOS, J. V.; DA MATA, A. M. O. F.; SOARES DIAS, A. C.; DA COSTA, J. S.; DE MEDEIROS, M. G. F.; PAZ, M. F. C. J.; GAYOSO E ALMENDRA IBIAPINA MORENO, L. C.; CASTRO E SOUSA, J. M.; ISLAM, M. T.; MELO CAVALCANTE, A. A. C. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic/antitumoral bioactives from the phylum Basidiomycota and their possible mechanisms of action. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108643, abr. 2019.
- WAFI, B. A.; MAKNI, M.; AMMAR, S.; KHANNOUS, L.; HASSANA, A. Ben; BOUAZIZ, M.; ES-SAFI, N. E.; GDOURA, R. Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 123–131, jan. 2017.
- WANDERLEY, B. R. S. M.; HAAS, I. C. S.; BILUCA, F. C.; BRUGNEROTTO, P.; GOMES, T. M.; AQUINO, A. C. M. de S.; COSTA, A. C. O.; BURIN, V. M.; AMBONI, R. D. M. C.; FRITZEN-FREIRE, C. B. Phenolic profiling, organic acids and sugars composition of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) and uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) from the southern Brazilian highlands. **Ciencia Rural**, v. 52, n. 12, 2022. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cr/a/H6Lhqq9KHwcqRxJVC9NQB7h/?lang=en>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

- WANG, C.; WU, H.; LIU, Z.; BARROW, C.; DUNSHEA, F.; SULERIA, H. A. R. Bioaccessibility and movement of phenolic compounds from tomato (*Solanum lycopersicum*) during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Food and Function**, v. 13, n. 9, p. 4954–4966, maio 2022. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/fo/d2fo00223j>>. Acesso em: 18 jun. 2022.
- WAY, T. Der; LEE, H. H.; KAO, M. C.; LIN, J. K. Black tea polyphenol theaflavins inhibit aromatase activity and attenuate tamoxifen resistance in HER2/neu-transfected human breast cancer cells through tyrosine kinase suppression. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 14, p. 2165–2174, set. 2004.
- WELNA, M.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; POHL, P. A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 922–930, out. 2013.
- YANG, Z.; BK, A.; ZHAO, W.; SHI, L.; WU, H.; BARROW, C.; DUNSHEA, F.; SULERIA, H. A. R. Bioaccessibility and bioavailability changes of phenolic compounds in pumpkins (*Cucurbita moschata*): A review. **Food Bioscience**, v. 47, p. 101753, jun. 2022.
- YINGYUEN, P.; SUKRONG, S.; PHISALAPHONG, M. Isolation, separation and purification of rutin from Banana leaves (*Musa balbisiana*). **Industrial Crops and Products**, v. 149, p. 112307, jul. 2020.
- YOKOGOSHI, H.; KATO, Y.; SAGESAKA, Y. M.; TAKIHARA-MATSUURA, T.; KAKUDA, T.; TAKEUCHI, N. Reduction Effect of Theanine on Blood Pressure and Brain 5-Hydroxyindoles in Spontaneously Hypertensive Rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 615–618, 1995. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tbbb20>>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- YU, Y.; ZHANG, B.; XIA, Y.; LI, H.; SHI, X.; WANG, J.; DENG, Z. Bioaccessibility and transformation pathways of phenolic compounds in processed mulberry (*Morus alba L.*) leaves after *in vitro* gastrointestinal digestion and faecal fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 60, p. 103406, set. 2019.
- ZHANG, R. Z.; XU, X. H.; CHEN, T. B.; LI, L.; RAO, P. F. An assay for angiotensin-converting enzyme using capillary zone electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 280, n. 2, p. 286–290, maio 2000.
- ZHAO, Y.; XU, C. Structure and function of angiotensin converting enzyme and its inhibitors Shengwu Gongcheng Xuebao. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 171-176, fev. 2008.

ZHONG, Y.; SHAHIDI, F. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods.
Handbook of Antioxidants for Food Preservation, v.12, p. 287–333, 2015.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Material referente ao capítulo 3

Tabela 1 - Espectrometria de massas por transições MRM no monitoramento de íons em modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^-$ *

Composto	Íon precursor (ESI)	Transição (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Ácido benzoico	122,9 ^a	79,0 ^c	36	10	17	12
		51,0	36	10	51	24
<i>Ácido p-Aminobenzoico</i>	138,0 ^a	77,0 ^c	56	10	29	10
		94,0	56	10	19	8
Cumarina	146,9 ^a	90,9 ^c	126	10	31	10
		103,0	126	10	23	8
2,4- Ácido	155,0 ^a	109,9 ^c	41	10	29	20
Diidroxibenzoico		137,0	41	10	19	8
2,5- Ácido Diidroxibenzoico	155,0 ^a	137,0 ^c	41	10	19	8
		114,0	41	10	29	52
Siringaldeido	183,0 ^a	123,1 ^c	41	10	17	8
		77,0	41	10	31	10
Ácido ferúlico	195,0 ^a	176,9 ^c	21	10	11	10
		89,0	21	10	41	10
Ácido siringico	199,0 ^a	140,0 ^c	16	10	21	10
		155,1	16	10	13	10
Pinocembrina	257,0 ^a	153,0 ^c	96	10	33	10
		76,9	96	10	73	10
Galangina	271,0 ^a	153,0 ^c	176	10	43	10
		115,1	176	10	59	8
Apigenina	271,0 ^a	153,0 ^c	181	10	41	10
		90,9	181	10	49	14

Tabela 1 - Espectrometria de massas por transições MRM no monitoramento de íons em modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^-$ *

(continua)

Composto	Íon precursor (ESI)	Transição (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
(-)-Epicatequina	291,0 ^a	138,9 ^c	36	10	21	8
		123	36	10	21	8
(+) -Catequina	291,0 ^a	123	36	10	21	8
		139,0 ^c	16	10	21	10
Ácido clorogênico	355,1 ^a	123	16	10	19	8
		163,0 ^c	46	10	21	10
Hesperidina	611,2 ^a	89	46	10	75	14
		303,0 ^c	51	10	31	16
Ácido salicílico	136,9 ^b	153,1	51	10	67	10
		93,1 ^c	-15	-10	-22	-5
3,4- Ácido diidroxibenzoico	152,9 ^b	64,9	-15	-10	-36	-11
		109,0 ^c	-75	-10	-20	-7
Ácido <i>p</i> -Cumarico	162,9 ^b	90,9	-75	-10	-32	-13
		119,0 ^c	-90	-10	-20	-7
Ácido vanílico	166,9 ^b	93	-90	-10	-40	-5
		137,0 ^c	-140	-10	-12	-9
Ácido gálico	168,9 ^b	109,1	-140	-10	-16	-7
		124,9 ^c	-110	-10	-20	-7
4- Metilumbeliferona	174,9 ^b	79	-110	-10	-30	-11
		133,0 ^c	-135	-10	-28	-9
Coniferaldeido	177,0 ^b	119,1	-135	-10	-36	-7
		134,0 ^c	-30	-10	-28	-9
Ácido cafeico	178,9 ^b	160,8	-30	-10	-28	-11
		135,0 ^c	-115	-10	-22	-9
Sinapaldeido	206,9 ^b	177,0 ^c	-20	-10	-26	-11
		148,9	-20	-10	-34	-9
3,5- Ácido dinitrobenzoico	210,9 ^b	167,0 ^c	-50	-10	-14	-9
		136,9	-50	-10	-22	-9
Ácido sináptico	223,0 ^b	163,9 ^c	-120	-10	-20	-9
		192,9	-120	-10	-28	-11

Tabela 1 - Espectrometria de massas por transições MRM no monitoramento de íons em modo positivo $[M + H]^+$ e negativo $[M - H]^-$ *

(conclusão)

Composto	Íon precursor (ESI)	Transição (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Crisina	252,9 ^b	142,9 ^c	-170	-10	-36	-9
		209,1	-170	-10	-30	-11
Naringenina	270,9 ^b	151,0 ^c	-130	-10	-24	-25
		119	-130	-10	-34	-11
Pinobanksina	270,9 ^b	150,9 ^c	-140	-10	-24	-9
		119,1	-140	-10	-32	-7
Quercetina	301,0 ^b	150,9 ^c	-50	-10	-28	-9
		121	-50	-10	-34	-7
Isorhamnetina	315,0 ^b	300,00 ^c	-225	-10	-28	-15
		150,9	-225	-10	-38	-9
Isoquercetina	462,9 ^b	300,0 ^c	-215	-10	-36	-15
		271	-215	-10	-56	-13
Naringina	579,0 ^b	271,0 ^c	-255	-10	-42	-13
		151	-255	-10	-48	-9
Quercetina-3-rutinoside	609,0 ^b	299,9 ^c	-230	-10	-48	-15
		270,9	-230	-10	-32	-9

*Dados adaptados de Seraglio et al, (2016). PD: potencial de desagrupamento; (V); PE: potencial de entrada (V);

EC: energia de colisão (V); PSC: potencial de saída de colisão (V); ^a íon modo positivo; ^b íon modo negativo; ^c íon de quantificação.

ANEXOS

ANEXO A – Primeira página referente ao artigo publicado na revista *Food Reviews International*



Food Reviews International



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/fri20>

A Comprehensive Review of *Eugenia Pyriformis* Cambess: Reported Bioactivities and Health Effects

Marina Volpato Dacoreggio, Gabriela Soster Santetti, Heloísa Patrício Inácio, Anieli Pinto Kempka & Renata Dias de Mello Castanho Amboni

To cite this article: Marina Volpato Dacoreggio, Gabriela Soster Santetti, Heloísa Patrício Inácio, Anieli Pinto Kempka & Renata Dias de Mello Castanho Amboni (2021): A Comprehensive Review of *Eugenia Pyriformis* Cambess: Reported Bioactivities and Health Effects, Food Reviews International, DOI: [10.1080/87559129.2021.1958226](https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1958226)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1958226>



Published online: 30 Jul 2021.