



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e
Bioquímicos



CLEIDIANE DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS
FOLHAS DE *Syzygium malaccense* EM CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO**

DISSERTAÇÃO

**PATO BRANCO
2021**

CLEIDIANE DA SILVA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Syzygium malaccense* EM CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO

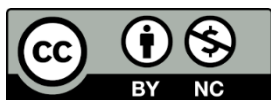
Antioxidant and cytotoxic activity of *Syzygium malaccense* leaf extract and fractions in cutaneous melanoma cells

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

PATO BRANCO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Atribuição – Uso Não Comercial (CC BY-NC) - Permite que outros remixem, adaptem e criem obras derivadas sobre a obra licenciada, sendo vedado o uso com fins comerciais. As novas obras devem conter menção ao autor nos créditos e também não podem ser usadas com fins comerciais. Porém as obras derivadas não precisam ser licenciadas sob os mesmos termos desta licença.



CLEIDIANE DA SILVA

1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE SYZYGIIUM MALACCENSE EM CÉLULAS DE MELANOMA CUTÂNEO

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 27 de Agosto de 2021

Prof.a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, Doutorado Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Jociani Ascari, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Margarete Dulce Bagatini, Doutorado - Universidade Federal da Fronteira Sul (Uffs)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 27/08/2021.

Dedico este trabalho à memória de
Anaclara Prasniewski

Obrigada por tanto, minha estrelinha!

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão e carinho a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial meus pais Avelino e Leonildes; meu companheiro Tobias; meus irmãos Cleverson, Eliane e Elisangela; Maria Ivoly Marchioro; Matheus Calegari; Bruno Ayres; Thariane Bicas; Anaclara Prasniewski (in memorian); Eloisa Zanchet; Beatriz Godoy e Mariane Pesenti; professora Tatiane Luiza Cadorin Oldoni; professoras Sirlei Teixeira, Margarete Bagatini e Jociani Ascari; Filomena Marafon; Anna Paulla Simon; Ana Paula Bilck; Edenes Schroll Loss e Alexandra Elbakyan. Agradeço também à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR); ao Laboratório Multiusuário Central de Análises da UTFPR – Campus Pato Branco e ao grupo de pesquisa de Estudos Biológicos e Clínicos em Patologias Humanas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – Campus Chapecó. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos os supracitados, muito obrigada!

Por fim, agradeço à força maior que está em todos os lugares e dentro de cada um, que move todo o universo e faz da gente um ser único e incomparável.

“Não só estamos no Universo, mas o Universo está em nós”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

O *Syzygium malaccense* é uma planta da família Myrtaceae de origem asiática. A árvore frutífera e ornamental se adaptou às regiões com clima quente do Brasil, sendo conhecida no país como Jambo. É amplamente utilizado na medicina tradicional por apresentar potencial ação anti-inflamatória e hipoglicêmica. Resultados promissores foram apresentados em alguns estudos com as folhas de *S. malaccense*, porém, ainda há poucas informações sobre sua composição química e atividades biológicas, principalmente sobre a espécie encontrada no Brasil. Nesse sentido, esse estudo avaliou a capacidade antioxidante e citotóxica das substâncias presentes nas folhas de *S. malaccense*, com ensaios de atividade antioxidante atribuída à capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, redução do ferro (FRAP) e redução do reagente Folin-Ciocalteu (FCR). A citotoxicidade foi avaliada pelos ensaios de migração celular e viabilidade celular (MTT) em células cancerígenas de melanoma cutâneo (SK-MEL-28) tratadas com extrato bruto, fração acetona e três subfrações da planta, sendo escolhida a fração acetona por esta apresentar bom rendimento e elevado potencial frente aos ensaios antioxidantes. Os marcadores oxidativos e inflamatórios também foram avaliados a partir da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidase (MPO) e a determinação do conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C). Os resultados demonstram que a purificação do extrato hidroetanólico das folhas de *S. malaccense* potencializou a bioatividade da planta e aumentou o teor dos compostos majoritários do extrato nas subfrações, as quais apresentaram atividade citotóxica relevante em células de melanoma cutâneo, bem como elevada atividade antioxidante e uma composição rica em flavonoides. Dois compostos com elevada pureza foram isolados das subfrações mais bioativas por CCD preparativa, sendo um deles identificado por CLAE-DAD como o flavonoide glicosilado miricitrina e o outro composto, ainda não identificado, referente ao sinal mais intenso das subfrações. Dessa forma, esse estudo apresenta informações importantes sobre a bioatividade dos compostos presentes nas folhas de *S. malaccense* coletadas na região Sudeste do Brasil, trazendo resultados inéditos referentes à toxicidade *in vitro* da planta em células de melanoma cutâneo.

Palavras-chave: capacidade antioxidante; citotoxicidade; estresse oxidativo; flavonoides glicosilados, Jambo.

ABSTRACT

Syzygium malaccense is a plant of the Myrtaceae family of Asian origin. The fruit and ornamental tree has adapted to the hot climate regions of Brazil, being known in the country as Jambo. It is widely used in traditional medicine because of its potential anti-inflammatory and hypoglycemic action. Promising results were presented in some studies with the leaves of *S. malaccense*, however, there is still little information about its chemical composition and biological activities, mainly about the species found in Brazil. In this sense, this study evaluated the antioxidant and cytotoxic capacity of substances present in the leaves of *S. malaccense*, with tests of antioxidant activity attributed to the scavenging capacity of DPPH and ABTS radicals, iron reduction (FRAP) and reduction of the Folin-Ciocalteu reagent (FCR). Cytotoxicity was evaluated by cell migration and cell viability (MTT) assays in cutaneous melanoma cancer cells (SK-MEL-28) treated with crude extract, acetone fraction and three subfractions of the plant, the acetone fraction being chosen because it presents good yield and high potential against antioxidant assays. The oxidative and inflammatory markers were also evaluated from the analysis of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS), nitric oxide (NO), myeloperoxidase (MPO) and the determination of the content of ascorbic acid (vitamin C). The results demonstrate that the purification of the hydroethanolic extract from the leaves of *S. malaccense* potentiated the plant's bioactivity and increased the content of the extract's major compounds in the subfractions, which showed relevant cytotoxic activity in cutaneous melanoma cells, as well as high antioxidant and a composition rich in flavonoids. Two compounds with high purity were isolated from the most bioactive subfractions by preparative CCD, one of them being identified by HPLC-DAD as the glycosylated flavonoid myricitrin and the other compound, not yet identified, referring to the more intense signal of the subfractions. Thus, this study presents important information about the bioactivity of the compounds present in the leaves of *S. malaccense* collected in the Southeast region of Brazil, bringing unprecedented results regarding the *in vitro* toxicity of the plant in cutaneous melanoma cells.

Key-words: antioxidant capacity; cytotoxicity; glycosylated flavonoids; Jambo; oxidative stress.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Figuras de mérito dos padrões de compostos fenólicos separados por CLAE-DAD.	34
Tabela 2 – Teores dos compostos fenólicos identificados no extrato, fração e subfrações das folhas de <i>S. malaccense</i>	36
Tabela 3 – Resultados das análises de atividade antioxidante pelos métodos FCR, DPPH, ABTS e FRAP para o extrato, fração e subfrações.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Syzygium malaccense</i> : inflorescência (a), fruto (b) e árvore (c).	12
Figura 2 – Fluxograma dos processos de purificação das folhas de <i>S. malaccense</i>	19
Figura 3 – Filtrados resultantes da extração no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º e 11º dia de fracionamento com acetona.	30
Figura 4 – Purificação da Fr-ace em coluna aberta de sílica gel: (a) início da eluição em luz visível, (b) irradiada com luz UV a 365 nm, (c-e) aumento da polaridade do gradiente em luz visível e (f) final da eluição em luz visível.....	31
Figura 5 – CCD das subfrações coletadas na purificação da Fr-ace (a) em luz visível, (b) irradiada com luz UV em 254 nm e (c) irradiada com luz UV em 365 nm.	32
Figura 6 – Cromatograma da mistura de padrões utilizadas na identificação e quantificação por CLAE-DAD: (1) ácido gálico, (2) ácido clorogênico, (3) rutina, (4) miricitrina, (5) isoquercetina, (6) astragalina, (7) miricetina, (8) quercetina, (9) canferol.....	35
Figura 7 – Cromatograma do EB hidroetanólico das folhas de <i>S. malaccense</i>	36
Figura 8 – Cromatograma da Fr-ace e os perfis de absorção no UV de alguns compostos identificados com biblioteca do software.	37
Figura 9 – Cromatogramas das subfrações obtidas na purificação da Fr-ace em coluna aberta: (a) Sub-1, (b) Sub-2 e (c) Sub-3 com concentração de 1000 mg L ⁻¹	38
Figura 10 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de <i>S. malaccense</i> na viabilidade de células de melanoma cutâneo.....	43
Figura 11 – Estudo da migração celular de células SK-MEL-28 tratadas com extrato, fração e subfrações das folhas de <i>S. malaccense</i>	45
Figura 12 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de <i>S. malaccense</i> na peroxidação lipídica avaliado pelo ensaio de TBARS em células de melanoma cutâneo.	48

Figura 13 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de <i>S. malaccense</i> no teor de óxido nítrico produzido no sobrenadante de células de melanoma cutâneo.....	49
Figura 14 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de <i>S. malaccense</i> no teor de mieloperoxidase presente em células de melanoma cutâneo.....	51
Figura 15 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de <i>S. malaccense</i> no conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C) em células de melanoma cutâneo.....	51
Figura 16 – Otimização da fase móvel para eluição das subfrações de <i>S. malaccense</i> em placas de CCD analítica irradiadas com luz UV em 254 e 365 nm.....	55
Figura 17 – Eluição da Sub-2 em placa de CCD preparativa revelada em luz visível (a), irradiada com luz UV a 254 nm (b) e 365 nm (c).	56
Figura 18 – Cromatograma dos compostos isolados C1 (a) e C2 (b) e perfil de absorção no ultravioleta.	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	análise de variância
BHT	hidroxitolueno butilado (do inglês: Butylated Hydroxytoluene)
C1	Composto 1
C2	Composto 2
CCD-p	Cromatografia em Camada Delgada preparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	detector de arranjo de fotodiodos (do inglês: Diode Array Detector)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNPH	2,4- dinitrofenilhidrazina
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EB	Extrato Bruto
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Equivalente de Trolox
ϵ°	força eluotrópica
FCR	Redução do reagente Folin-Ciocalteu
FM	fase móvel
Fr-ace	Fração acetona
FRAP	poder de redução do ferro (do inglês: Ferric Reducing Antioxidant Power)
HAT	transferência de átomos de hidrogênio (do inglês: Hydrogen Atom Transfer)

	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espectrometria de
LC-MS/MS	massas de alta resolução (do inglês: Liquid Chromatography - Mass Spectrometry)
MDA	malondialdeído (do inglês: malondialdehyde)
MPO	mieloperoxidase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium
NO	Óxido Nítrico
PBS	Phosphate Buffered Saline
Rf	fator de retenção (do inglês: Retention Factor)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SET	transferência de um elétron (do inglês: Single Electron Transfer)
Sub-1	subfração 1
Sub-2	subfração 2
Sub-3	subfração 3
TBA	ácido tiobarbitúrico (do inglês: Thiobarbituric Acid)
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: Thiobarbituric Acid Reactive Substances)
TCA	ácido tricloroacético (do inglês: Trichloroacetic Acid)
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
Tr	tempo de retenção
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

1	Introdução	9
2	Objetivos	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos específicos	11
3	Referencial teórico	12
3.1	Plantas medicinais	12
3.1.1	Syzygium malaccense	12
3.2	Compostos bioativos em plantas	13
3.2.1	Compostos fenólicos	14
3.2.2	Os flavonoides	15
3.3	Espécies reativas	15
3.4	Antioxidantes	16
3.4.1	Ação antioxidante enzimática	17
3.4.2	Ação antioxidante não-enzimática	17
3.5	Citotoxicidade e estresse oxidativo	18
4	Material e métodos	19
4.1	Coleta das folhas e identificação da planta	19
4.2	Preparo do extrato bruto	20
4.3	Obtenção da fração acetona	20
4.4	Purificação da fração acetona em coluna aberta	20
4.5	Cromatografia em camada delgada (CCD)	21
4.6	Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-p)	21
4.7	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
4.8	Determinação da atividade antioxidante	23
4.8.1	Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu (FCR)	23
4.8.2	Sequestro do radical DPPH	24
4.8.3	Sequestro do radical ABTS	24

4.8.4	Poder de redução do ferro (FRAP) -----	25
4.9	Ensaio de citotoxicidade em células de melanoma cutâneo SK-MEL-28 -----	25
4.9.1	Migração celular-----	26
4.9.2	Viabilidade celular: ensaio do MTT-----	26
4.9.3	Marcadores oxidativos e inflamatórios-----	27
4.9.3.1	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)-----	27
4.9.3.2	Óxido nítrico	27
4.9.3.3	Mieloperoxidase-----	28
4.9.3.4	Conteúdo de ácido ascórbico (Vitamina C) -----	28
4.10	Análise estatística -----	28
5	Resultados e discussão -----	30
5.1	Extração e purificação das folhas de S. malaccense -----	30
5.1.1	Purificação da fração acetona em coluna aberta -----	31
5.2	Investigação da composição química do extrato, fração e subfrações por CLAE-----	34
5.3	Determinação da capacidade antioxidante do extrato, fração e subfrações-----	39
5.4	Avaliação da citotoxicidade do extrato, fração e subfrações em células de melanoma cutâneo SK-MEL-28-----	42
5.4.1	Viabilidade celular -----	42
5.4.2	Migração celular-----	44
5.4.3	Análise dos marcadores oxidativos e inflamatórios -----	47
5.5	Isolamento dos compostos majoritários do S. malaccense -----	54
6	Conclusão-----	59
	Referências-----	60

2 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país tropical com uma biota muito diversificada, com um clima propício para o desenvolvimento de plantas, o que favorece a utilização das plantas para fins terapêuticos, com tratamentos antigos que são difundidos na medicina tradicional (ESPINO et al., 2018). Esse conhecimento, de acordo com Messias et al. (2015), é o ponto de partida para o estudo de fitoquímicos e desenvolvimento de medicamentos. *Syzygium malaccense* é uma planta da família Myrtaceae com origem asiática. A árvore frutífera e ornamental é conhecida no Brasil como Jambo, sendo encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste do país (FERNANDES; RODRIGUES, 2018).

Diferentes partes da planta estudadas apresentaram potencial bioativo com ação antioxidante, hipoglicêmica e anti-inflamatória (ARUMUGAM et al., 2014; BAIRY; SHARMA; SHALINI, 2005; BATISTA et al., 2016; DUNSTAN et al., 1997; PRASNIEWSKI et al., 2021). Na medicina tradicional, Noreen et al. (1998) relata o uso do *S. malaccense* para tratar distúrbios de natureza inflamatória como febre, dor de garganta, furúnculos, feridas, úlceras de pele e infecções da boca e garganta.

Os compostos bioativos das plantas são conhecidos como metabólitos secundários, sendo os compostos fenólicos um dos grupos mais relevantes (ESPINO et al., 2018). Estudos fitoquímicos realizados com as folhas de *S. malaccense* isolaram o composto fenólico miricitrina (flavonol) identificando-a como um dos compostos mais abundantes da planta (ARUMUGAM et al., 2016; NOREEN et al., 1998; PRASNIEWSKI et al., 2021). A presença de outros metabólitos secundários também foi relatada nesses estudos: ácido gálico (ácido fenólico), catequina (flavan-3-ol), miricetina-3-O-glicosídeo, mearnsitrina e quercitrina (flavonóis), entre outros.

A bioatividade dos compostos fenólicos tem sido relatada em diversos estudos. Atividades imunomoduladora, citotóxica, hipoglicêmica, anti-inflamatória, antidepressivas, hepatoprotetora e antioxidantes (ARUMUGAM et al., 2016; DOMITROVIĆ et al., 2015; MEYER et al., 2017; Pelinson et al. (2019); PRASNIEWSKI et al., 2021; SOBEH et al., 2018; Yang et al. (2018) são atribuídas a esses compostos.

Em função da composição química rica em compostos fenólicos, das propriedades farmacológicas reportadas para esses compostos e da escassez de estudos de citotoxicidade com a planta, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da purificação do extrato das folhas de *S. malaccense* nas características antioxidantes e citotóxicas da planta, a partir da análise do extrato bruto, da fração acetona e das subfrações quanto à composição química, atividade

antioxidante frente a radicais sintéticos e citotoxicidade em células cancerígenas de melanoma cutâneo SK-MEL-28.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da purificação do extrato das folhas de *Syzygium malaccense* na composição química, capacidade antioxidante e atividade citotóxica em células de melanoma cutâneo.

3.2 Objetivos específicos

- Purificar o extrato hidroetanólico das folhas de *S. malaccense* por fracionamento sucessivo para obter frações com maior bioatividade.
- Purificar a fração mais bioativa por cromatografia em coluna aberta com sílica gel.
- Obter subfrações com maior concentração dos compostos majoritários das folhas de *S. malaccense*.
- Isolar os compostos majoritários das subfrações por cromatografia em camada delgada preparativa.
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto, fração e subfrações a partir dos ensaios de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, redução do Folin-Ciocalteu (FCR) e do ferro (FRAP).
- Determinar o efeito citotóxico do extrato bruto, fração e subfrações em células cancerígenas de melanoma cutâneo SK-MEL-28 com ensaios de viabilidade (MTT) e migração celular.
- Avaliar os marcadores oxidativos e inflamatórios das células de melanoma cutâneo tratadas com extrato bruto, fração e subfrações a partir dos ensaios de peroxidação lipídica (TBARS), óxido nítrico, mieloperoxidase e conteúdo de ácido ascórbico.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Plantas medicinais

O conhecimento popular e o uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é muito antigo, sendo um alicerce importante na descoberta de novos fármacos, representando o ponto de partida em estudos químicos para o desenvolvimento de medicamentos (Messias et al. (2015). O Brasil possui a maior floresta tropical do mundo, com uma biota rica e diversificada, o que favorece a utilização de plantas medicinais em todas as regiões do país (Espino et al. (2018). Estudos referentes a composição química dessas plantas são de grande importância, pois permitem a identificação de novos compostos bioativos e a elucidação dos seus mecanismos de ação em organismos vivos.

4.1.1 *Syzygium malaccense*

Syzygium malaccense (L.) Merr. & L. M. Perry é uma árvore frutífera e ornamental nativa da Malásia que pertence à família Myrtaceae (Fernandes; Rodrigues (2018). A espécie se naturalizou em regiões de clima tropical Batista et al. (2016), sendo popularmente conhecida no Brasil como Jambo. A planta que é apresentada na **Figura 1** tem frutos comestíveis e suas folhas são utilizadas na medicina tradicional como diurético, no tratamento de infecções dérmicas, do trato gastrointestinal, de doenças respiratórias, inflamações e diabetes (Dunstan et al. (1997 e Noreen et al. (1998).

Figura 1 – *Syzygium malaccense*: inflorescência (a), fruto (b) e árvore (c).



Fonte: autoria própria (2019).

Estudos que comprovem o potencial bioativo e a composição química das folhas de *S. malaccense* ainda são escassos. Em trabalho realizado por Arumugam et al. (2014) com o extrato etanólico produzido a partir das folhas da planta, os autores observaram a capacidade de inibição da enzima α -glicosidase, indicando a possibilidade de um potencial antiglicêmico. O extrato também melhorou os níveis de colesterol e de glicose em ratos (Bairy et al. (2005). Outros estudos com as folhas de *S. malaccense* ainda demonstram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Arumugam et al. (2014); Dunstan et al. (1997); Noreen et al. (1998); PRASNIEWSKI et al., 2021).

Estudos fitoquímicos realizados com as folhas de *S. malaccense* isolaram a miricitrina, identificando-a como um dos compostos mais abundantes da planta (Arumugam et al. (2016); Noreen et al. (1998); PRASNIEWSKI et al., 2021). Outros flavonoides como catequina, mearnsetina e miricetina também foram identificados nesses estudos, além dos flavonoides glicosilados quercitrina e mearnsitrina.

4.2 Compostos bioativos em plantas

A composição química das plantas medicinais é considerada complexa e varia de acordo com a espécie, a sazonalidade e o estágio de crescimento da planta. Em extratos de plantas, além dos metabólitos primários, relacionados diretamente com o crescimento do

vegetal, destacam-se os metabólitos secundários, também chamados de especializados, que são produzidos como sistema de defesa e geralmente são os responsáveis pela bioatividade da planta. De acordo com Kalyanaraman (2013), dentre as atividades biológicas desempenhadas por esses metabólitos, destaca-se a atividade antioxidante, considerada extremamente importante à saúde por atuar na estabilização e inibição dos radicais livres, que são causadores de estresse oxidativo e consequentemente de danos aos tecidos de organismos vivos.

4.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados na maioria das plantas conhecidas atualmente. Quimicamente, são definidos como substâncias que possuem anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituídas, incluindo seus grupos funcionais. Representam um grupo heterogêneo de metabólitos secundários que são biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do poliacetato. Esses compostos são classificados a partir das diferenças estruturais e incluem as classes de fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, taninos e tocoferóis Angelo; Jorge (2007 e Eghbaliferiz; Iranshahi (2016).

A estrutura variável dos fenólicos lhes confere inúmeras funcionalidades, permitindo que esses compostos apresentem atividades biológicas importantes em organismos vivos. A atividade antioxidante é uma das bioatividades mais estudadas dos compostos polifenólicos e está associada à capacidade de neutralizar espécies reativas a partir da transferência de elétron ou de átomo de hidrogênio para o radical Olszowy (2019). O mesmo autor também cita a possibilidade de que, sob certas condições, como altas concentrações do composto, pH elevado e presença de metais de transição, os polifenóis podem exercer atividade pró-oxidante, ou seja, podem aumentar os níveis de radicais livres no meio em que se encontram.

Estudos com diferentes estruturas de compostos fenólicos Kim et al. (2016 e Oršolić et al. (2014 e Pham-Huy et al. (2008 e Valko et al. (2007) indicam que estes compostos podem apresentar um efeito positivo sobre diversas doenças crônicas. Eghbaliferiz; Iranshahi (2016) ressaltam que os polifenóis são utilizados não apenas para defesa antioxidante, mas também para regulação do crescimento, atividade hormonal, atividade antimicrobiana, regulação do pH, metabolismo, entre outras funções do organismo.

4.2.2 Os flavonoides

Uma das classes de compostos fenólicos que tem recebido bastante atenção nos últimos anos é a classe dos flavonoides, sendo citados como um grupo de fitoquímicos que estão entre os antioxidantes mais potentes e abundantes em nossa dieta Arora; Itankar (2018). São sintetizados naturalmente nas plantas a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato (Dornas et al. (2007), possuindo uma estrutura composta por um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6. Esses compostos naturais podem ser diferenciados devido as suas características estruturais, com destaque para as flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas. Essa classe de compostos também se apresenta comumente ligada a um glicídio na posição 3 ou 7, sendo denominados flavonoides glicosilados ou heterosídeos (Março et al. (2008).

Atualmente, os benefícios dos flavonoides incorporados na dieta alimentar são reconhecidos. O consumo regular desses compostos foi associado à redução do declínio cognitivo, reduzindo os riscos de demência em idosos com idade acima de 65 anos (Jaeger et al. (2017). Arumugam et al. (2019), mostraram que derivados do flavonoide miricetina, purificados a partir do extrato das folhas de *S. malaccense*, apresentam atividade antioxidante exógena, além de estimularem a atividade antioxidante endógena, sugerindo que esses compostos são potenciais agentes terapêuticos no tratamento da retinopatia diabética.

A miricitrina é um flavonol glicosilado (miricetina-3-O-ramnosídeo) derivado de sua aglicona, a miricetina. Estudos indicam que a miricitrina possui inúmeros benefícios à saúde com destaque para as atividades antioxidante (Arumugam et al. (2016); Huang et al. (2014), antimutagênica (Edenharder; Grünhage (2003), antiglicêmica (Arumugam et al. (2014), anti-inflamatória (Domitrović et al. (2015), efeito antimaníaco e ação neuroprotetora em modelo experimental de doença de Parkinson (Kim et al. (2016). Meyer et al. (2017) propõem que a miricitrina aumenta a neurogênese hipocampal com múltiplos efeitos no sistema nervoso central, sugerindo que essa atividade complexa pode contribuir para o seu perfil farmacológico antipsicótico e antidepressivo.

4.3 Espécies reativas

As espécies reativas ocorrem no organismo oriundas naturalmente do metabolismo celular e também como resultado de estresse externo Sobeh et al. (2018). De acordo com Vasconcelos et al. (2007), a produção de espécies reativas é parte integrante do metabolismo humano e tem importante função biológica, como na fagocitose, onde essas espécies são

produzidas para eliminar o agente agressor. Em concentrações excedentes, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar os níveis dessas ER, restabelecendo o equilíbrio homeostático.

As espécies reativas mais estudadas nos sistemas biológicos, segundo Oliveira et al. (2009), incluem as espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), de derivados de tióis (RS), de cloro (ERCl), de carbono (ERC) e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr. Dentre essas espécies estão não apenas os radicais ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, NO^{\cdot}), mas também intermediários neutros ou carregados (H_2O_2 , $ONOO^-$) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano (O_3 , Fe, Cu).

Os processos metabólicos que originam as espécies reativas, de acordo com Oliveira et al. (2009), podem ser associados a fontes endógenas, com os processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, ou ainda, a fontes exógenas como consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico extremo, exposição à radiação ultravioleta, temperatura elevada, além de poluição ambiental, domiciliar e ocupacional. Patologias crônicas (*Diabetes mellitus*, hipertensão arterial, câncer, entre outras) e patologias degenerativas (Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson) também são associadas à formação desses radicais livres.

O desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e antioxidante, com aumento das espécies oxidantes, causa um fenômeno chamado de estresse redox ou estresse oxidativo Olszowy (2019)Valko et al. (2007). Segundo os autores, o estresse oxidativo pode causar danos às macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA, ocasionando assim mutações no DNA que prejudicam a funcionalidade celular, dando origem a vários distúrbios que afetam o fígado entre outros órgãos e sistemas, além de atuar diretamente nos processos de envelhecimento, transformação e morte das células, com consequências diretas em diversos processos patológicos.

Com o avanço no conhecimento sobre os mecanismos de ação dos radicais livres, há um crescente interesse em encontrar substâncias antioxidantes, especialmente de fontes naturais Oliveira et al. (2009), que sejam capazes de proteger organismos vivos da influência prejudicial das espécies reativas, seja prevenindo sua formação, estabilizando os radicais livres ou reparando os danos causados por esses radicais Olszowy (2019).

4.4 Antioxidantes

Substâncias antioxidantes são definidas por Halliwell (1990) como “qualquer

substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa ou impede significativamente a oxidação desse substrato”, podendo ser divididas em duas classes: enzimáticas e não-enzimáticas. Os antioxidantes têm grande importância na indústria, sendo largamente usados na preservação de alimentos e cosméticos, atuando no aumento de vida útil desses produtos através da redução dos processos de oxidação Kusumawati; Indrayanto (2013); Shahidi; Zhong (2015).

4.4.1 Ação antioxidante enzimática

O sistema de defesa enzimático é endógeno, ou seja, naturalmente gerado no organismo, formado por enzimas capazes de impedir e/ou controlar a formação de espécies reativas, sendo encarregadas de bloquear a iniciação das reações oxidantes em cadeia (PHAM-HUY et al., 2008). Dentre as principais enzimas antioxidantes diretamente envolvidas na neutralização de espécies radicalares, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), considerada como a linha de frente da defesa antioxidante, além da catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que reduzem peróxidos geradores de radicais $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{OR}$, respectivamente Barbosa et al. (2010) e Oliveira et al. (2009).

4.4.2 Ação antioxidante não-enzimática

Os antioxidantes não-enzimáticos são moléculas que interagem com as espécies reativas, sendo consumidas durante a reação Angelo; Jorge (2007), ou auxiliando indiretamente na ação antioxidante através da ativação de enzimas antioxidantes Attia et al. (2012). Essa classe de antioxidantes é representada por compostos endógenos e exógenos.

Pham-Huy et al. (2008) dividem esses compostos como antioxidantes metabólicos, que são substâncias endógenas produzidas naturalmente pelo organismo, como ácido lipóico, glutathione, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metal, transferrina e antioxidantes nutricionais como vitamina E, vitamina C, carotenoides, metais em nível traço (selênio, manganês, zinco) e flavonoides, que são compostos exógenos que não podem ser produzidos no corpo e devem ser fornecidos externamente, através de alimentos ou suplementos.

Antioxidante não-enzimáticos exógenos podem ser oriundos de fontes naturais ou produzidos sinteticamente. Oliveira et al. (2009) destacam os carotenoides, os flavonoides e outros polifenóis, além de vitaminas (C e E) como os principais antioxidantes naturais,

presentes em diferentes partes de plantas e seus derivados. Entre antioxidantes sintéticos mais utilizados, principalmente na indústria de alimentos, estão o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT), o galato de propila, a terc-butil-hidroquinona e os sorbatos (2,4-hexadienoatos).

4.5 Citotoxicidade e estresse oxidativo

A citotoxicidade está relacionada à capacidade de uma substância promover alteração metabólica em cultura de células, podendo culminar ou não na morte celular. Freshney (2005) ressalta a importância dos ensaios de citotoxicidade, utilizados tanto para avaliar compostos usados como produtos farmacêuticos ou cosméticos que devem ser comprovadamente atóxicos, quanto em substâncias com potencial anticâncer, sendo que a avaliação do efeito citotóxico pode ser crucial para sua bioatividade.

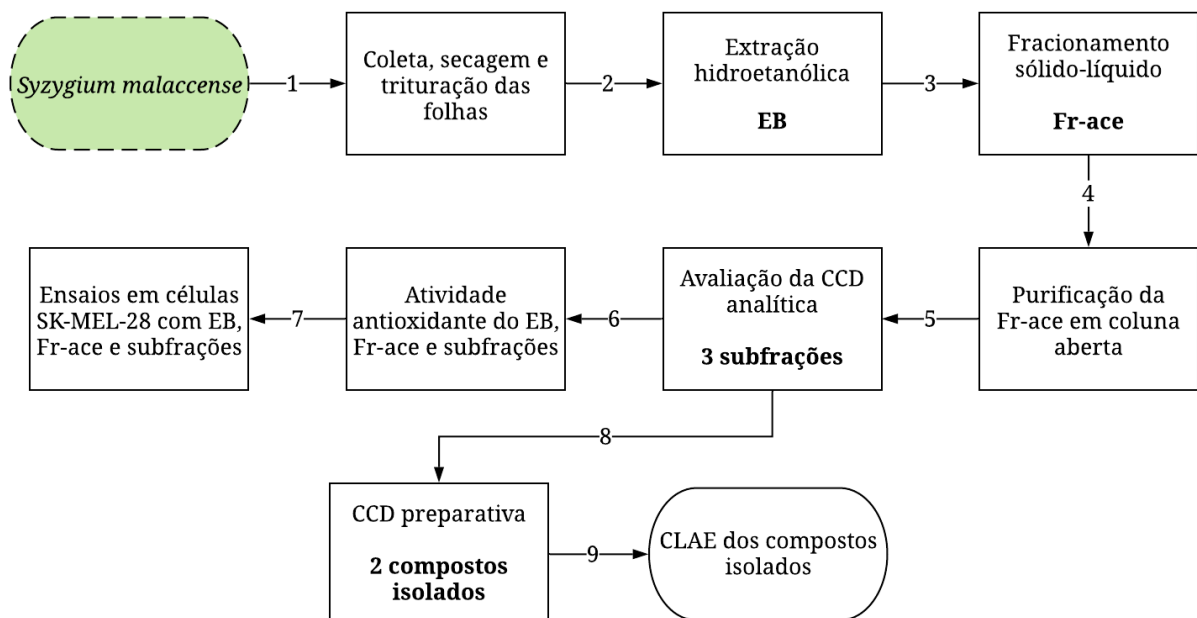
O estresse oxidativo tem um papel fisiológico importante, Ebrahimi et al. (2020) ressaltam que a inflamação crônica induzida por níveis desequilibrados de espécies reativas de oxigênio contribui para o desenvolvimento e evolução de diferentes tipos de câncer, além de outras doenças. Quando um antioxidante neutraliza um radical livre, o próprio antioxidante é oxidado, sendo necessária a reposição constante dos recursos antioxidantes no organismo. De acordo com Gupta et al. (2014), um antioxidante pode ser eficaz na estabilização dos radicais livres em um determinado sistema, mas em outros sistemas, o mesmo antioxidante pode se apresentar ineficaz. Em algumas circunstâncias, um antioxidante pode até atuar como pró-oxidante. Forester; Lambert (2011) relatam em seu trabalho de revisão que a capacidade de prevenção do câncer dos polifenóis presentes no chá verde pode estar associada também ao efeito pró-oxidante desses compostos.

Em um estudo de revisão realizado por Eghbaliferiz; Iranshahi (2016), os autores enfatizam que os compostos que atuam como pró-oxidantes podem aumentar os níveis celulares de espécies reativas de oxigênio para níveis citotóxicos em células cancerosas, mas não em células normais. Esse efeito pode ser explicado pela maior concentração de íons cobre e pela maior atividade metabólica encontrada nas células cancerosas em comparação com as células normais. Assim, a propriedade pró-oxidante dos compostos antioxidantes não é necessariamente prejudicial para os sistemas biológicos, podendo vir a ser utilizada no tratamento do câncer.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo seguiu um fluxo de trabalho de acordo com o apresentado na Figura 2. Primeiramente, foi realizado o preparo do extrato bruto (EB) e a partir do fracionamento sucessivo do extrato bruto liofilizado obteve-se a fração acetona (Fr-ace). A purificação dessa fração em coluna aberta de sílica gel resultou em 3 subfrações (Sub-1, Sub-2 e Sub-3) ricas em compostos fenólicos. Os ensaios de atividade antioxidante em radicais sintéticos, além da identificação e quantificação de compostos fenólicos do EB, Fr-ace e subfrações foram realizados no Laboratório Multiusuário Central de Análises da UTFPR – Campus Pato Branco. Posteriormente, foram realizados os estudos com células de melanoma cutâneo (SK-MEL-28) tratadas com EB, Fr-ace e subfrações, com auxílio do Grupo de Pesquisa de Estudos Biológicos e Clínicos em Patologias Humanas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – Campus Chapecó. Por fim, dois compostos (C1 e C2) foram isolados das subfrações por cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-p) e a pureza desses compostos foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no Laboratório Central de Análises.

Figura 2 – Fluxograma dos processos de purificação das folhas de *S. malaccense*.



5.1 Coleta das folhas e identificação da planta

As folhas de *S. malaccense* foram coletadas na cidade de Jacupiranga – SP em maio

de 2019 e secas em estufa com circulação de ar a 45 ± 5 °C durante 7 dias, trituradas em moinho de facas e armazenadas em congelador. Para identificação da planta uma exsicata do exemplar foi preparada e identificada pela botânica Dra. Giovana Faneco Pereira, permanecendo o exemplar depositado no Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, com a identificação HPB 1173.

5.2 Preparo do extrato bruto

O extrato bruto (EB) das folhas de *S. malaccense* foi preparado de acordo com o estudo de otimização para a extração de compostos fenólicos da planta (Savi et al. (2020). A extração foi realizada a partir de 900 g da planta seca e triturada em 16 L de solução água:etanol (60:40 v/v), sob aquecimento em banho térmico a 80 °C por 45 min. Em seguida, o EB hidroetanólico foi concentrado em evaporador rotativo para remoção do solvente orgânico, congelado e liofilizado para remoção da água.

5.3 Obtenção da fração acetona

A fração acetona (Fr-ace), previamente determinada por Prasniewski et al. (2021) como a fração mais bioativa obtida das folhas de *S. malaccense*, foi produzida a partir do fracionamento do EB de acordo com a metodologia descrita pela autora, com algumas modificações. Aproximadamente 150 g do EB liofilizado foram submetidos à extração sucessiva seguindo uma ordem crescente de polaridade dos solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e acetona, sob agitação constante (115 rpm) à temperatura ambiente. A extração foi realizada na proporção de 150 mL de solvente a cada 25 g de EB, sendo substituído o solvente a cada 24 h até haver uma redução de cor significativa da fração filtrada, sendo repetido o processo com todos os solventes. As porções coletadas da Fr-ace foram unidas e concentradas em evaporador rotativo. A fração final foi colocada em estufa com ventilação a 35 °C até completa remoção do solvente.

5.4 Purificação da fração acetona em coluna aberta

A coluna cromatográfica aberta com fase estacionária de sílica gel foi aplicada para purificar a Fr-ace obtida no fracionamento do extrato bruto das folhas de *S. malaccense*. A coluna de vidro com diâmetro interno de 2 cm foi preenchida com uma proporção de 60 g de

sílica (230-400 mesh) para 2 g de amostra, permanecendo com uma altura de aproximadamente 15 cm de fase estacionária. A coluna foi empacotada com a mistura de diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila na proporção de 20:80 (v/v), a mesma usada no primeiro gradiente, sendo feita a ambientação da fase estacionária com a passagem do solvente durante 3 h.

A Fr-ace foi dissolvida em volume mínimo de metanol e misturada com 1 g de sílica (proporção 2:1 m/m de amostra:sílica). Após a evaporação do solvente, a amostra seca pulverizada foi aplicada no leito superior da fase estacionária. A eluição foi realizada com 100 mL de cada gradiente composto por dois solventes diferentes seguindo uma ordem crescente de polaridade, iniciando com CH_2Cl_2 :acetato de etila (20:80 v/v) e seguindo com a adição gradual de acetona e acetato de etila até o gradiente final de acetona:metanol (95:5 v/v).

Aproximadamente 13 g de Fr-ace foram purificadas. As colunas foram eluidas com um fluxo aproximado de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ e as subfrações foram coletadas com volume fixo de 3 mL ou por observação de bandas visualizadas em luz visível e ultravioleta (365 nm), resultando em cerca de 160 subfrações cada coluna. O perfil cromatográfico das subfrações coletadas foi avaliado em placas analíticas de cromatografia em camada delgada (CCD) e as subfrações com perfil de eluição similar foram reunidas, resultando em 3 subfrações com composição fenólica significativa.

5.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi utilizada para avaliar o perfil cromatográfico das 3 subfrações obtidas no processo de purificação da Fr-ace. A eluição em placas analíticas de sílica gel DC-Fertigfolien Alugram Xtra SIL G/UV₂₅₄ foi realizada com uma fase móvel (FM) otimizada para a melhor separação das bandas de interesse, em recipiente vedado. A composição da FM foi formada pela mistura dos solventes nas respectivas proporções: acetato de etila (55%), acetona (5%), ácido fórmico (15%) e tolueno (25%). A placa de CCD analítica foi revelada em luz visível e sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda longo (365 nm) e curto (254 nm).

5.6 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-p)

A CCD-p foi utilizada para isolar os compostos presentes nas subfrações com maior rendimento (Sub-2 e Sub-3) coletadas na purificação da Fr-ace. As placas foram preparadas de acordo com as sugestões apresentadas por Stahl (1969). Uma suspensão formada por 60 g

de sílica gel 60 (Macherey-Nagel – F254) e 100 mL de água destilada foi disposta uniformemente sobre placas de vidro (20x20 cm) devidamente higienizadas, com auxílio de um espalhador com espessura de 1,00 mm. Depois de secas em temperatura ambiente, as placas foram colocadas em estufa a 110 °C por 2 horas para ativação da sílica e usadas imediatamente ou armazenadas em dessecador.

As subfrações dissolvidas em volume mínimo de metanol, foram aplicadas na placa preparativa com auxílio de um tubo capilar de vidro. A subfração dissolvida foi distribuída em linha reta ao longo da placa, com reaplicação nos mesmos pontos até que toda a amostra, aproximadamente 35 mg, tivesse sido aplicada. A eluição foi realizada com a mesma FM utilizada na CCD analítica (acetato de etila:acetona:ácido fórmico:tolueno, 55:5:15:25 v/v), até que houvesse redução significativa da força de eluição da FM, o que ocorreu em uma distância de aproximadamente 14 cm da linha de aplicação. Cada placa foi eluída duas vezes, sendo substituída a FM em cada intervalo para reestabelecimento da força de eluição.

A placa cromatográfica foi revelada em luz visível e sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda longo (365 nm) e curto (254 nm). As bandas de interesse foram raspadas, coletadas e ressuspensas em uma mistura de clorofórmio:metanol (1:1 v/v). Após 50 min, a suspensão foi filtrada para separação da sílica e o solvente evaporado em estufa com circulação de ar a 35 °C. As substâncias coletadas na CCD-p foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência para análise da pureza e identificação por comparação com alguns padrões de compostos fenólicos.

5.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi utilizada para identificar e quantificar compostos fenólicos que compõem o extrato, a fração, as subfrações e os isolados, além de auxiliar na avaliação da pureza dos compostos isolados. O método cromatográfico de separação utilizado foi baseado na metodologia descrita por Rodríguez-Pérez et al. (2015) e Prasniewski et al. (2021) com algumas modificações.

A separação foi executada com a injeção de 10 µL de amostra (EB, Fr-ace, subfrações e isolados) em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-920 Varian®) com coluna de fase reversa (Promosil C-18, 250 mm x 4,6 mm; 5 µm, Agela Technologies®) e temperatura do forno ajustada para 30 °C. A eluição foi realizada em modo gradiente, sendo a fase móvel composta por água ultrapura acidificada (pH 2,7) com ácido acético PA (fase A) e

acetonitrila (fase B). O gradiente iniciou em 5% de B, passando para 30% aos 10 min; 38% de B aos 25 min 50% de B aos 28 min; 95% de B aos 32 min e retornando para 5% de B dos 35 aos 45 min, assim ambientando a coluna para as próximas injeções, sempre com fluxo contínuo de 1 mL min⁻¹.

Por se tratar da identificação de compostos fenólicos, os quais absorvem em comprimentos de onda na região do ultravioleta, o detector de arranjo de diodos foi utilizado, operando na faixa de 240 a 400 nm com dois canais de absorção específicos em 255 e 360 nm. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos sinais presentes nas amostras com os sinais de padrões analíticos, sendo avaliado o tempo de retenção (Tr) e o perfil de absorção no ultravioleta. Para a quantificação dos compostos identificados foi construída uma curva de calibração com concentrações variando de 2,5 a 50 mg L⁻¹ de compostos fenólicos padronizados.

5.8 Determinação da atividade antioxidante

5.8.1 Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu (FCR)

A avaliação da capacidade que as amostras têm em reduzir o reagente Folin-Ciocalteu foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Singleton et al. (1998) com algumas modificações. A análise consiste na reação dos fenóis presentes na amostra com o reagente Folin-Ciocalteu, que tem em sua composição complexos de molibdênio e tungstênio. De acordo com Shahidi; Zhong (2015), o Mo⁶⁺ apresenta cor amarela característica da solução, mas em meio básico o íon é reduzido para Mo⁵⁺ ao aceitar um elétron doado pelo antioxidante fenólico, alterando a coloração para azul. Assim, o ensaio de FCR é associado ao poder redutor dos antioxidantes fenólicos, contudo, a concentração de compostos fenólicos mensurada pelo ensaio também pode abranger outras substâncias redutoras que não sejam de natureza fenólica.

A reação ocorreu com a adição de 500 µL da amostra (EB, Fr-ace e subfrações em concentrações conhecidas) em 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10%. Depois de 5 minutos foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% e os tubos foram encubados por 2 horas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. O branco foi preparado substituindo-se o volume de amostra por igual volume de água destilada. Uma curva de referência foi realizada com ácido gálico e as absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 740 nm. Os resultados foram

expressos em mg equivalente de ácido gálico por g de amostra (mg EAG g⁻¹).

5.8.2 Sequestro do radical DPPH

Proposta por Brand-Williams et al. (1995) com algumas adaptações, a análise permite avaliar a capacidade da amostra em sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). O método espectroscópico baseia-se na redução do radical DPPH que possui uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. Na presença de um agente antioxidante ocorre a descoloração do reagente e, conseqüentemente, redução da absorbância. A interação de um potencial antioxidante com o DPPH depende de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis, contudo, Alves et al. (2010) reforçam que para muitas substâncias antioxidantes o mecanismo pode ser mais complexo.

A reação foi realizada com a mistura de 500 µL de amostra (EB, Fr-ace e subfrações em concentrações conhecidas), 3,0 mL de etanol 80% e 300 µL do radical sintético DPPH (0,5 mmol L⁻¹, dissolvido em etanol). A mistura reacional foi armazenada por 70 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 517 nm, utilizando etanol 80% como branco. A porcentagem de atividade antioxidante (% AA) foi calculada através da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH, de acordo com a equação: %AA = (A_{controle} - A_{amostra}) x 100/ A_{controle}. Uma curva com diferentes concentrações da amostra foi construída e os resultados foram expressos como EC₅₀, ou seja, a concentração da amostra capaz de reduzir 50% do radical DPPH, com a concentração expressa em mg L⁻¹.

5.8.3 Sequestro do radical ABTS

A análise antioxidante de sequestro do radical ABTS foi descrita por Re et al. (1999) e realizada com algumas modificações. O radical ABTS é formado por uma reação do ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] com persulfato de potássio. A atividade antioxidante é determinada pela mudança de coloração do radical ABTS. Ao reagir com os antioxidantes presentes na amostra, a mudança de coloração é medida pela absorbância em 734 nm.

Após a mistura do ABTS com o persulfato, a reação foi incubada em temperatura ambiente por 16 horas ao abrigo da luz. O radical formado foi diluído em etanol PA até obter-

se, a 734 nm, uma absorvância de aproximadamente 0,700. A reação foi realizada com a adição de 30 μL de amostra (EB, Fr-ace e subfrações em concentrações conhecidas) em 3 mL do radical diluído, tendo como branco o etanol PA. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm após 6 min de reação no escuro e à temperatura ambiente. Para a quantificação foi construída uma curva utilizando o antioxidante sintético trolox como padrão. O resultado foi expresso em μmol equivalente de trolox por g de amostra ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$).

5.8.4 Poder de redução do ferro (FRAP)

O ensaio de redução do ferro (FRAP, do inglês: *Ferric Reducing Antioxidant Power*), baseado na metodologia de Benzie; Strain (1996), é uma análise espectrofotométrica que consiste na determinação da capacidade da amostra de reduzir, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ) para formar Fe^{2+} , de cor azul intensa que apresenta absorção máxima em 593 nm.

O reagente FRAP foi preparado no momento da análise a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mmol L^{-1} ; pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mmol L^{-1} em HCl 40 mmol L^{-1}) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mmol L^{-1} em água). A reação foi realizada com a adição de 100 μL de amostra (EB, Fr-ace e subfrações em concentrações conhecidas) a 3,0 mL do reagente FRAP, permanecendo incubada por 45 minutos em banho térmico a 37 °C, ao abrigo da luz. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 593 nm, tendo como branco o reagente FRAP. A curva padrão foi realizada com sulfato ferroso e os resultados foram expressos em μmol de sulfato ferroso por g de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$).

5.9 Ensaios de citotoxicidade em células de melanoma cutâneo SK-MEL-28

As células de melanoma cutâneo SK-MEL-28 foram incubadas à 37 °C em garrafas para cultivo celular com meio de cultura DMEM – High Glucose, soro fetal bovino (10%) e antibiótico (1%) filtrados com auxílio de pressão reduzida em microfiltro de 0,22 μm . Após o crescimento, o meio foi descartado e as células foram lavadas com solução salina. Para desprender as células da parede do frasco de cultivo, foi adicionado uma solução contendo a enzima tripsina. Em seguida as células foram ressuspensas em meio e contadas em câmara de Neubauer para se obter uma concentração de aproximadamente 1×10^6 células em volume de meio suficiente para realização das análises.

As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque dissolvida em solução

salina no ultrassom. Depois de filtrada em microfiltro de 0,22 μm , a solução estoque do EB e da Fr-ace foi diluída com meio de cultura para as concentrações de 25, 50, 100, 250 e 500 mg L^{-1} , enquanto as soluções das subfrações foram diluídas para concentrações de 5, 25, 50, 100 e 250 mg L^{-1} . As amostras foram então submetidas aos ensaios de migração e viabilidade celular, além dos ensaios de estresse oxidativo que avaliaram a peroxidação lipídica, a presença da enzima mieloperoxidase e de nitrito orgânico, além do conteúdo de ácido ascórbico nas células de melanoma cutâneo tratadas com as diferentes concentrações de EB, Fr-ace, Sub-1, Sub-2 e Sub-3.

5.9.1 Migração celular

O ensaio de migração celular foi baseado no protocolo sugerido por Justus et al. (2014). A avaliação da migração foi feita por imagem com o auxílio de um microscópio antes da adição dos tratamentos (t_0) e após a incubação por 24 h (t_{24}) com os tratamentos propostos. Inicialmente, em placas de 6 poços foram acrescentados 500 μL da suspensão com 1×10^6 células e 1 mL de meio de cultura em cada poço. As placas foram incubadas à 37 °C até que as células apresentassem 100% de confluência, ou seja, até que as células atingissem o seu desenvolvimento máximo, condição alcançada em aproximadamente 24 h. Após descarte do meio e lavagem das células com solução salina, um risco fino foi desenhado em cada poço para formação da ferida (local que deve ficar sem células). Depois de tirar a fotografia do t_0 , o tratamento foi realizado com a adição de 1,5 mL de meio e 500 μL de amostra (EB, Fr-ace e subfrações nas diferentes concentrações) em cada poço, então as placas foram incubadas para obtenção das fotografias no tempo definido para o estudo de comparação.

5.9.2 Viabilidade celular: ensaio do MTT

O ensaio de viabilidade em células de melanoma cutâneo na presença de EB, Fr-ace e subfrações foi realizado pelo método descrito por Fukui et al. (2010) com modificações. Em microplacas as células tratadas foram ressuspensas com 180 μL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês: *Phosphate Buffered Saline*, pH 7,38) e 20 μL de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, do inglês: *(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium)*) 12 mmol L^{-1} . Após uma hora de incubação à 37 °C, as microplacas foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min e 150 μL do sobrenadante foi descartado. Em seguida o MTT formazan gerado foi solubilizado com 150 μL de

dimetilsulfóxido (DMSO) PA, as placas foram homogeneizadas e centrifugadas nas mesmas condições novamente. O sobrenadante foi coletado e transferido para uma nova microplaca e a leitura da absorbância foi realizada a 560 nm em leitor microplacas. O resultado foi expresso em porcentagem [$\% = (Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{controle}$] e comparado com o controle negativo.

5.9.3 Marcadores oxidativos e inflamatórios

5.9.3.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês: *thiobarbituric acid reactive substances*) foi estimado pelo método descrito por Ohkawa et al. (1979), com algumas adaptações. A amostra foi preparada com 300 μ L de suspensão celular com tratamento e sem tratamento (controle) em solução salina, 100 μ L de PBS, 50 μ L de BHT (do inglês: *Butylated Hydroxytoluene*) 10 mmol L⁻¹ e 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA, do inglês: *Trichloroacetic Acid*) 20%, a mistura foi homogeneizada e centrifugada por 5 min a 2000 rpm.

A indução da peroxidação lipídica nas células SK-MEL-28 foi realizada pela reação de 225 μ L de amostra, 35 μ L de água destilada, 15 μ L de H₃PO₄ 10%, e 75 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês: *Thiobarbituric Acid*) 1,2%. A reação foi incubada por 1 hora em banho térmico a 95 °C e, depois de atingirem temperatura ambiente, leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 532 nm. Uma curva padrão de malondialdeído (MDA, do inglês: *malondialdehyde*) foi realizada para se obter o fator de calibração ($FC_{\text{médio}} = \text{concentração de MDA} / \text{absorbância}$). O resultado foi expresso em nmol de MDA por mL de amostra (nmol MDA mL⁻¹).

5.9.3.2 Óxido nítrico

A presença de nitrito orgânico foi detectada a partir do método utilizado por Choi et al. (2012) com algumas modificações. O óxido nítrico produzido no sobrenadante da cultura celular foi medido usando o reagente de Griess, formado pela mistura 1:1 (v/v) de sulfanilamida 1% com dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%, ambas as soluções foram dissolvidas em ácido fosfórico 5%. Em microplacas, 100 μ L do reagente de Griess com igual volume do sobrenadante das células tratadas foram adicionados aos poços. A reação foi

incubada à temperatura ambiente por 15 min e a absorbância foi aferida em 540 nm. O resultado foi expresso em porcentagem [$\% = (Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{controle}$] e comparado com o controle negativo.

5.9.3.3 Mieloperoxidase

A presença de mieloperoxidase (MPO) foi determinada colorimetricamente utilizando-se a metodologia de Metcalf et al. (1986) com adaptações. O ensaio foi realizado em microplacas com a reação de 12 μL de suspensão celular, 148 μL de aminoantipiridina 2,5 mmol L^{-1} e 170 μL de H_2O_2 1,7 mmol L^{-1} , com um branco contendo água no lugar da amostra. Após a adição do peróxido de hidrogênio, o cronômetro foi acionado e a reação foi incubada à 37 °C por 30 min, sendo feita a leitura da absorbância em 492 nm. As absorbâncias obtidas foram multiplicadas pelo fator de correção da técnica (14,0) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol L}^{-1}$ de quinoneimina produzida em 30 min.

5.9.3.4 Conteúdo de ácido ascórbico (Vitamina C)

A quantificação de vitamina C foi realizada com base na metodologia descrita por Jacques-Silva et al. (2001). À suspensão celular foi adicionado TCA 10% para precipitação das proteínas, então a mistura foi agitada e centrifugada por 15 min a 3500 rpm. Em microplacas foram adicionados 100 μL de amostra, 25 μL de TCA 13,3% e por último 20 μL do reagente colorimétrico, formado por 2 g de 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH), 230 mg de tiourea e 270 mg de sulfato de cobre dissolvidos em 49 mL de H_2SO_4 PA, com o volume final aferido para 100 mL com água destilada. Após a adição do reagente colorimétrico, as placas foram incubadas imediatamente à 37 °C por 2 h e lidas posteriormente em 520 nm. Uma curva padrão de vitamina C foi preparada para se obter o fator de calibração médio (68,26), que multiplicado pela absorbância resulta no teor em g L^{-1} de ácido ascórbico na amostra.

5.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão dos ensaios realizados em triplicata ou em duplicata. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism versão 7.0. As concentrações de uma mesma amostra foram comparadas pela análise de

variância de um critério (ANOVA one-way) e a para avaliar se houve diferença estatística entre as amostras em suas respectivas concentrações utilizou-se a análise de variância de dois critérios (ANOVA two-way), ambas as análises foram realizadas com um nível de confiança de 95%. Nos grupos com diferença estatística significativa, aplicou-se o teste *post-hoc* de Tukey ou Sidak de acordo com a sugestão do software e as diferenças foram consideradas significativas entre os grupos com $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

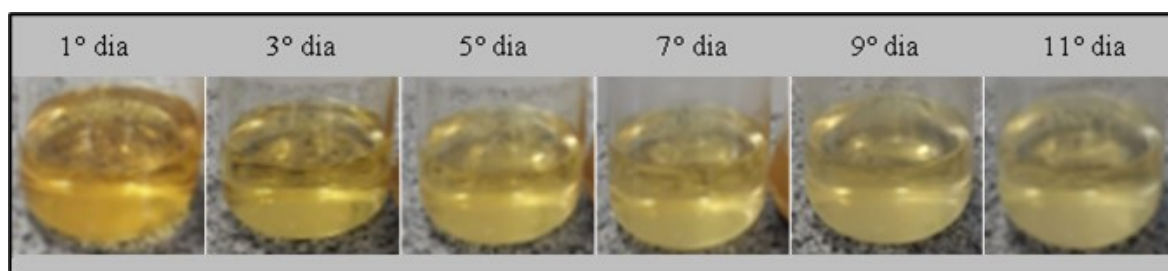
6.1 Extração e purificação das folhas de *S. malaccense*

O processo de extração de compostos bioativos das folhas de *S. malaccense* foi realizado, primeiramente, em solução hidroetanólica a 80 °C, com o objetivo de extrair compostos da classe dos fenólicos, conhecidos por apresentarem boa atividade antioxidante. Um estudo de otimização do processo de extração realizado por Savi et al. (2020) demonstrou que as condições de maior temperatura e maior teor de água na solução extratora maximizaram o teor de compostos fenólicos extraídos e a atividade antioxidante mensurada pela análise com o radical DPPH, em função disso, optou-se por usar tais condições nesse trabalho.

O rendimento do EB liofilizado foi de aproximadamente 18% da massa inicial de folhas secas (900 g de folhas secas produziram 160 g de EB seco). Arumugam et al. (2014) realizaram a extração de folhas de *S. malaccense* coletadas na Malásia com etanol PA à temperatura de 37 °C, obtendo um rendimento de 8,87%. Prasniewski et al. (2021) apresentaram 20% de rendimento no extrato bruto das folhas de *S. malaccense* coletadas em 2017 também em Jacupiranga-SP, utilizando as mesmas condições desse estudo.

O processo seguinte de purificação foi o fracionamento sólido-líquido do EB, com solventes de polaridade crescente: hexano (1 dia), diclorometano (1 dia), acetato de etila (7 dias) e acetona (11 dias), respectivamente. Para obter um bom rendimento e a melhor purificação possível, o fracionamento foi realizado com extração exaustiva, dessa forma cada solvente foi substituído pelo solvente seguinte de acordo com a cor do filtrado. Na Figura 3 é possível observar como a redução da cor foi visivelmente perceptível ao longo da extração com o solvente acetona.

Figura 3 – Filtrados resultantes da extração no 1º, 3º, 5º, 7º, 9º e 11º dia de fracionamento com acetona.



Fonte: autoria própria.

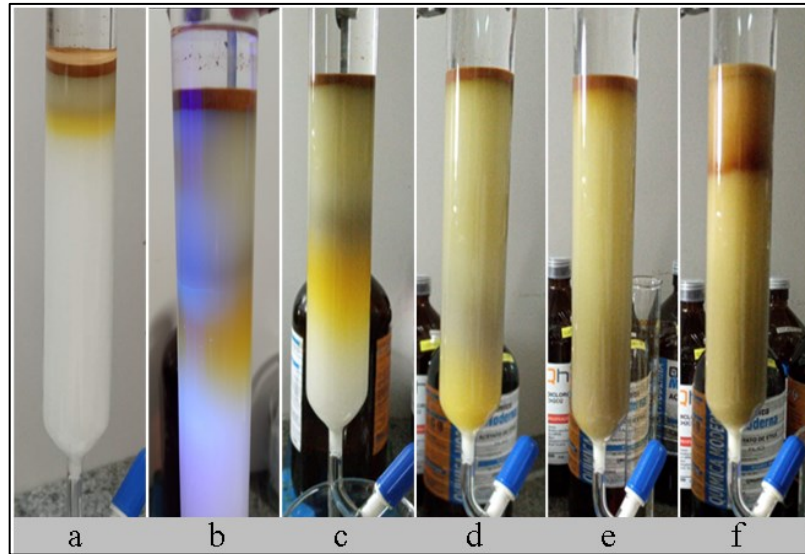
Avaliando as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, etanol PA e etanol:água (40:60 v/v) na purificação do extrato bruto hidroetanólico de folhas de *S. malaccense*, Prasniewski et al. (2021) observaram que a fração em acetona apresentou boa atividade antioxidante e bom rendimento. Além disso, essa fração foi capaz de concentrar os maiores teores dos compostos majoritários presentes no extrato bruto. Dessa forma, a fração obtida com o solvente acetona também foi selecionada nesse trabalho para seguir com o processo de purificação. A fração acetona (Fr-ace) obtida nesse estudo apresentou um rendimento de aproximadamente 17% do EB (150 g de EB liofilizado produziram 26 g de Fr-ace) em 11 dias de extração.

6.1.1 Purificação da fração acetona em coluna aberta

A Fr-ace, escolhida para seguir no processo de purificação, foi submetida ao fracionamento em coluna aberta com fase estacionária de sílica gel 230-400 mesh. Não foi necessário usar pressão para eluir a coluna, apesar da sílica ter tamanho de poro menor, pois a largura da coluna foi suficiente para permitir o escoamento do solvente sob pressão atmosférica.

A eluição da coluna foi realizada com gradientes de polaridade intermediária, aumentando sucessivamente no decorrer da purificação, pois os perfis de absorção no UV dos sinais majoritários presentes no cromatograma da Fr-ace indicam a presença de compostos da classe dos flavonoides, os quais são normalmente extraídos com solventes de média e alta polaridade, de acordo com Mandal et al. (2001). As etapas de eluição da coluna para purificação da Fr-ace estão apresentadas na Figura 4.

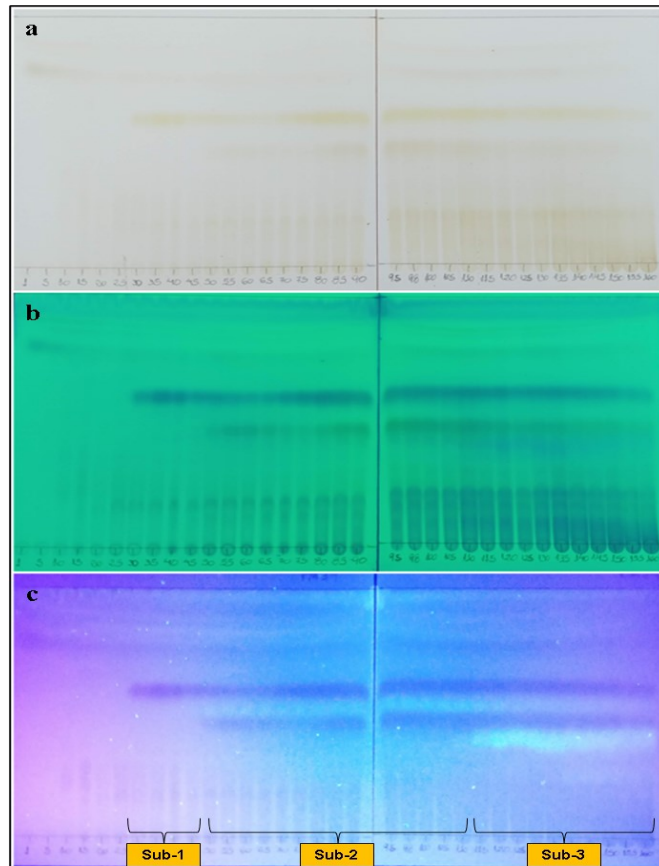
Figura 4 – Purificação da Fr-ace em coluna aberta de sílica gel: (a) início da eluição em luz visível, (b) irradiada com luz UV a 365 nm, (c-e) aumento da polaridade do gradiente em luz visível e (f) final da eluição em luz visível.



Fonte: autoria própria.

Foram coletadas aproximadamente 160 subfrações em cada coluna, as quais foram unidas de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico, que pode ser observado na Figura 5. Ao serem reveladas em luz visível e em luz ultravioleta, as placas apresentaram predominantemente bandas com cores de diferentes tons de amarelo no visível, azuis escuras em 254 nm e algumas bandas fluorescentes azuis e rosas em 365 nm.

Figura 5 – CCD das subfrações coletadas na purificação da Fr-ace (a) em luz visível, (b) irradiada com luz UV em 254 nm e (c) irradiada com luz UV em 365 nm.



FM: acetato de etila:acetona:ácido fórmico: tolueno (55:5:15:25 v/v).
Fonte: autoria própria.

Os flavonoides, de acordo com Mandal et al. (2001), apresentam cor azul escura em bandas que são amarelas sob luz visível. Dependendo da estrutura do flavonoide, também podem apresentar fluorescência amarela, azul ou verde quando irradiados com luz UV em 365 nm. Outros compostos que normalmente estão presentes em extratos com flavonoides como as cumarinas, por exemplo, também podem apresentar bandas fluorescentes azuis.

Após a purificação, a Fr-ace resultou em 3 subfrações denominadas Sub-1, Sub-2 e Sub-3, unidas conforme a similaridade das bandas reveladas na CCD (Figura 5). As coletas que deram origem a Sub-1 foram realizadas com o gradiente em acetato de etila:acetona (50:50 v/v). Com o aumento da proporção de acetona, a Sub-2 foi coletada com o gradiente em acetato de etila:acetona (30:70 v/v), seguindo com a coleta da Sub-3 no gradiente acetato de etila:acetona (10:90 v/v) até a finalização da eluição da coluna com acetona:metanol (95:5 v/v).

O processo de purificação em coluna aberta resultou em uma recuperação total de aproximadamente 26% da Fr-ace, distribuída em Sub-1 (~2%), Sub-2 (~11%) e Sub-3 (~13%). Nas três subfrações, as duas bandas mais intensas apresentam fator de retenção (R_f) similar de 0,47 e 0,60, além de cores características de flavonoides tanto no visível quanto ao serem

reveladas em luz UV, sinalizando que essas bandas são equivalentes aos dois sinais mais intensos observados no cromatograma da Fr-ace, os quais apresentam perfil cromatográfico com máximos de absorção no UV característicos de flavonoides.

6.2 Investigação da composição química do extrato, fração e subfrações por CLAE

A caracterização química dos produtos da extração e purificação das folhas de *S. malaccense* foi realizada, inicialmente, com a análise da composição fenólica desses produtos por CLAE em modo reverso (C18) com detector de arranjo de diodos. A técnica permitiu detectar e quantificar compostos fenólicos presentes no EB, Fr-ace e subfrações, auxiliando no monitoramento da eficiência dos processos de purificação empregados.

O método utilizado foi otimizado para a separação de nove compostos fenólicos (Figura 6), dos quais dois são ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido clorogênico) e os demais são flavonoides glicosilados (rutina, miricitrina, isoquercetina e astragalina) ou agliconas (miricetina, quercetina e canferol). As figuras de mérito do método cromatográfico obtidas para os compostos fenólicos utilizados como padrão são descritas na

Tabela 1 e estão de acordo com as orientações apresentadas pela Conferência Internacional de Harmonização - ICH (2005).

Tabela 1 – Figuras de mérito dos padrões de compostos fenólicos separados por CLAE-DAD.

Composto fenólico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)	Curva de calibração	R ²	-LD (mg L ⁻¹)	-LQ (mg L ⁻¹)
ácido gálico	3,8	270	$y = 0,1261x - 0,0472$	0,9972	0,024	0,080
ácido clorogênico	7,6	325	$y = 0,144x + 0,0352$	0,9997	0,067	0,224
rutina	10,4	255, 353	$y = 0,237x + 0,0025$	0,9993	0,091	0,305
miricitrina	10,8	258, 349	$y = 0,656x - 0,0352$	0,9992	0,037	0,124
isoquercetina	11,0	255, 353	$y = 0,3126x - 0,0453$	0,9992	0,055	0,182
astragalina	12,0	263, 346	$y = 0,2711x + 0,0074$	0,9994	0,068	0,228
miricetina	13,4	252, 372	$y = 0,3202x - 0,024$	0,9992	0,075	0,250
quercetina	16,1	254, 370	$y = 0,4309x - 0,008$	0,9993	0,066	0,221
canferol	19,9	262, 365	$y = 0,3483x - 0,0536$	0,9992	2,129	7,097

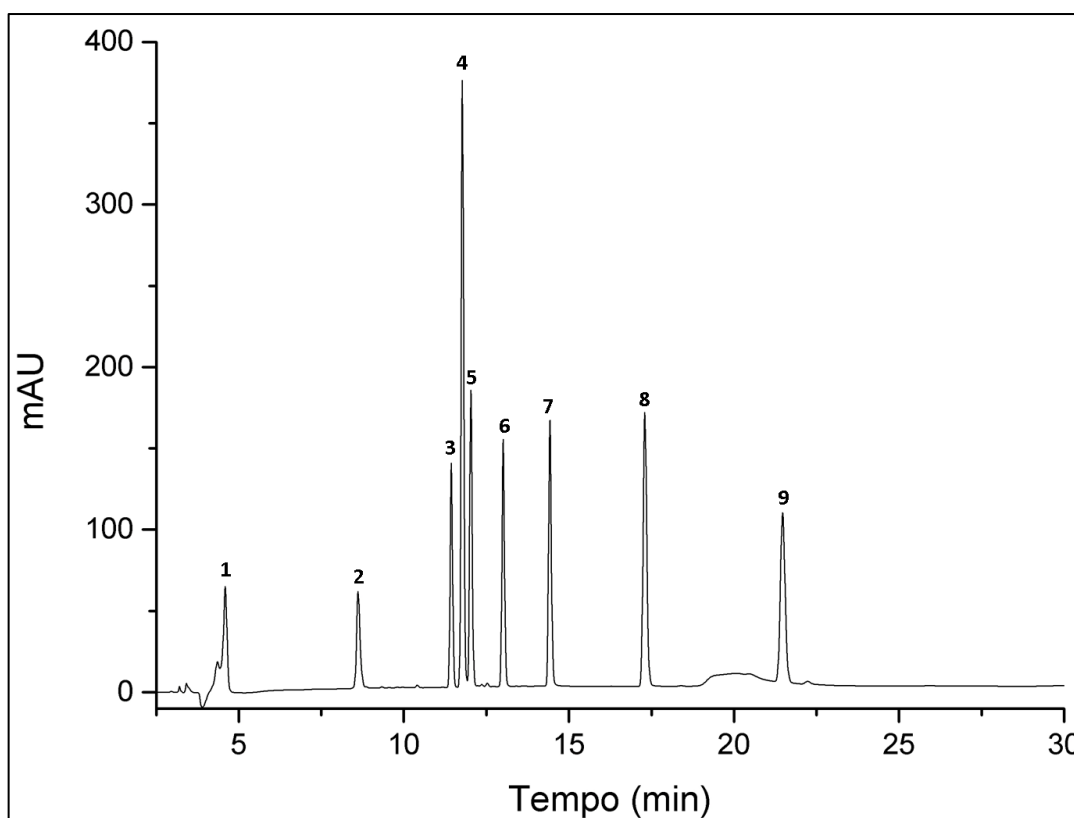
Fonte: Dados experimentais.

Tr: tempo de retenção; λ_{\max} : máximos de absorção; LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação.

Os flavonoides agliconas miricetina, quercetina e canferol são menos polares,

portanto, apresentam tempos de retenção maiores que os flavonoides glicosilados rutina, miricitrina, isoquercetina e astragalina que têm maior polaridade por apresentarem um maior número de grupamentos hidroxila. Os ácidos fenólicos, mais polares que os flavonoides, não têm interação forte com a coluna de fase reversa, mas sim com a fase móvel, por isso eluem no início da corrida cromatográfica. O cromatograma dos compostos fenólicos utilizados para construir a curva de calibração está apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Cromatograma da mistura de padrões (50 mg L⁻¹) utilizada na identificação e quantificação por CLAE-DAD: (1) ácido gálico, (2) ácido clorogênico, (3) rutina, (4) miricitrina, (5) isoquercetina, (6) astragalina, (7) miricetina, (8) quercetina, (9) canferol.



Fonte: dados da pesquisa.

A eficiência dos processos de fracionamento do EB foi monitorada com a identificação e quantificação do teor de compostos fenólicos por CLAE-DAD. O perfil de absorção no UV foi avaliado para detecção desses compostos, pois grande parte da composição de matrizes vegetais apresenta estruturas com grupos cromóforos que exibem comportamento característico nessa região.

A Tabela 2 apresenta as quantificações dos ácidos fenólicos e flavonoides identificados nos produtos de cada processo de purificação, sendo possível observar que o

fracionamento potencializou a concentração dos compostos identificados, que foram ácido gálico, miricitrina, miricetina e quercetina.

Tabela 2 – Teores dos compostos fenólicos identificados por CLAE-DAD no extrato, fração e subfrações das folhas de *S. malaccense*.

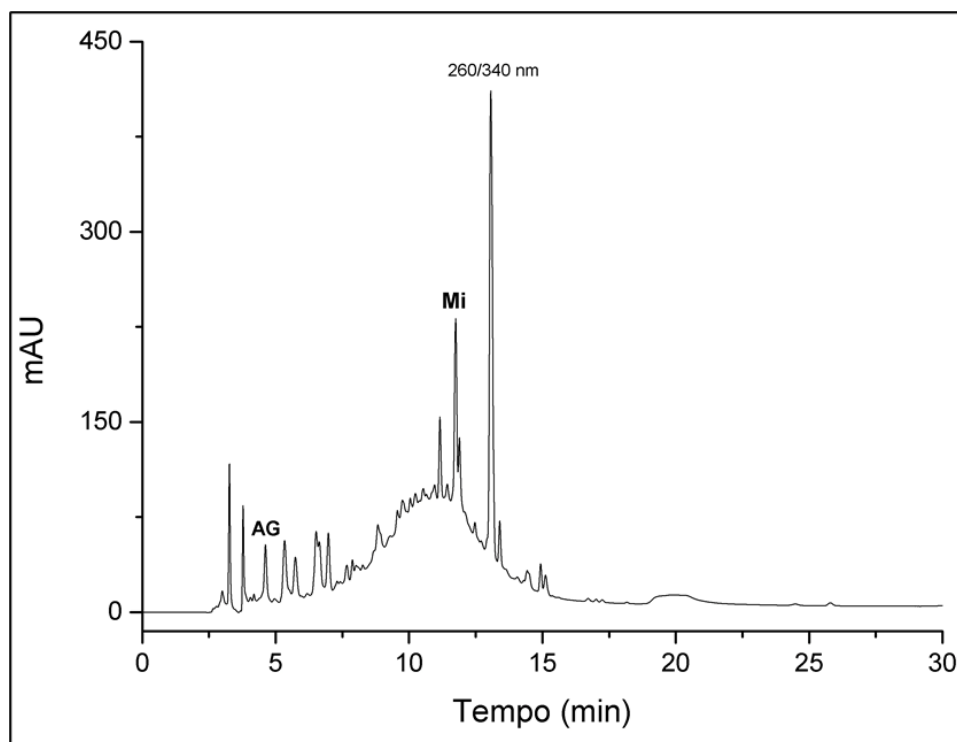
Amostra	Ácido gálico	Miricitrina	Miricetina	Quercetina
	(mg g ⁻¹)			
EB	3,00 ± 0,13 ^c	1,50 ± 0,03 ^d	< LD	< LD
Fr-ace	5,83 ± 0,34 ^b	3,72 ± 0,07 ^c	< LD	1,17 ± 0,06 ^c
Sub-1	10,68 ± 0,79 ^a	< LD	15,69 ± 0,62	6,13 ± 0,67 ^a
Sub-2	11,21 ± 0,46 ^a	20,58 ± 0,54 ^a	< LD	3,04 ± 0,23 ^b
Sub-3	6,72 ± 1,12 ^b	9,96 ± 0,30 ^b	< LD	1,49 ± 0,35 ^c

Fonte: dados experimentais.

< LD – abaixo do Limite de Detecção. Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O EB é resultado do primeiro processo de extração aplicado nas folhas de *S. malaccense*. A partir dele foi possível obter a Fr-ace e as subfrações. O cromatograma do EB, apresentado na Figura 7, permitiu a identificação de dois compostos fenólicos, o ácido gálico e a miricitrina com 3,0 mg g⁻¹ e 1,5 mg g⁻¹, respectivamente. Miricetina e quercetina não foram identificadas por estarem abaixo do limite de detecção.

Figura 7 – Cromatograma do EB hidroetanólico das folhas de *S. malaccense*.

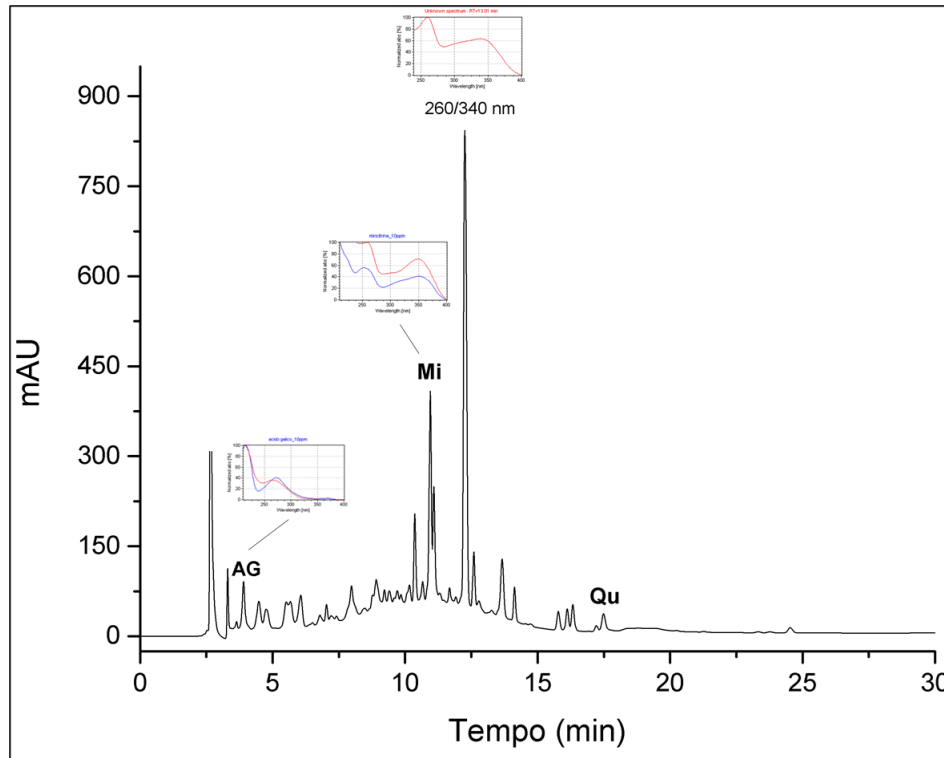


AG: ácido gálico; Mi: miricitrina.
Fonte: dados da pesquisa.

Na Fr-ace (Figura 8) foram identificados três compostos fenólicos, dos quais o ácido gálico ($5,8 \text{ mg g}^{-1}$) e a miricitrina ($3,7 \text{ mg g}^{-1}$) apresentaram concentração cerca de duas vezes maior que a concentração dos mesmos no EB. A quercetina que estava abaixo do LD no extrato, foi identificada na Fr-ace com um teor de $1,2 \text{ mg g}^{-1}$. Arumugam et al. (2014) identificaram o flavonoide glicosilado miricitrina na fração mais bioativa coletada do extrato etanólico em CLAE preparativa. Os demais compostos que os autores identificaram também eram, predominantemente, derivados da aglicona miricetina.

Em estudo publicado por Prasniewski et al. (2021), os autores realizaram a identificação dos compostos presentes na fração acetona do *S. malaccense* por LC-MS/MS e verificaram que os flavonoides e seus derivados foram o grupo mais abundante nessa fração, identificando mearnsetina, mearnsitrina, miricetina, miricitrina, guajaverin, afzelina, florizina e floretina, entre outros. Os compostos fenólicos miricitrina ($14,12 \text{ mg g}^{-1}$), quercetina ($0,88 \text{ mg g}^{-1}$), catequina ($0,84 \text{ mg g}^{-1}$) e ácido gálico ($3,57 \text{ mg g}^{-1}$) também foram quantificados pelos autores.

Figura 8 – Cromatograma da Fr-ace e os perfis de absorção no UV de alguns compostos identificados com biblioteca do software.

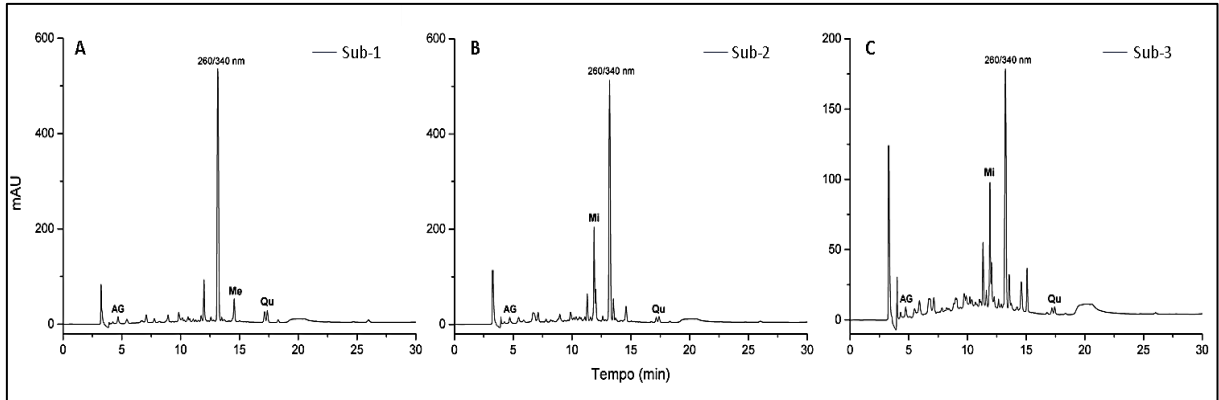


AG: ácido gálico; Mi: miricitrina; Qu: quercetina.
Fonte: dados da pesquisa.

As subfrações resultantes da purificação da Fr-ace estão apresentadas com os seus cromatogramas na Figura 9. A miricitrina foi o composto que mais acentuou a sua concentração ao longo dos processos de purificação, principalmente na Sub-2, que apresentou um teor de 20,6 mg de miricitrina por g de subfração. Na Sub-3 quantificou-se aproximadamente 10 mg g⁻¹ do flavonoide glicosilado, no entanto, na Sub-1 esse composto não foi detectado, reforçando assim a relevância da miricitrina na composição da Sub-2.

Na Sub-1 observou-se maior concentração de miricetina, que é a aglicona da miricitrina, apresentando um teor de 15,7 mg desse composto por g de subfração. Com polaridade menor que do seu glicosilado, é possível sugerir que a miricetina presente na Fr-ace foi completamente eluída antes da miricitrina, não sendo detectada nas subfrações seguintes à Sub-1. Os teores de ácido gálico e quercetina também aumentaram nas três subfrações, quando comparados aos teores obtidos no extrato e na fração, principalmente na Sub-1 (10,68 mg g⁻¹ de ácido gálico e 6,13 mg g⁻¹ de quercetina).

Figura 9 – Cromatogramas das subfrações obtidas na purificação da Fr-ace em coluna aberta: (a) Sub-1, (b) Sub-2 e (c) Sub-3 com concentração de 1000 mg L⁻¹.



AG: ácido gálico; Mi: miricitrina; Me: miricetina; Qu: quercetina.
 Fonte: dados da pesquisa.

Um sinal de maior intensidade pode ser observado em todos os produtos das purificações, sendo este o sinal majoritário no EB, na Fr-ace e em todas as subfrações. Como o tempo de retenção e o perfil de absorvância no UV são muito parecidos em todas as amostras, provavelmente esse sinal corresponde a um mesmo composto com polaridade intermediária entre a miricitrina e a miricetina, pois elui entre esses dois sinais.

Esse sinal majoritário detectado apresentou um perfil com máximos de absorção em torno de 260 e 340 nm, sendo esse perfil de absorvância um indicativo de que a substância pertence à classe dos flavonoides. A quantificação não pode ser realizada, uma vez que as características do sinal não são equivalentes a nenhum dos compostos fenólicos utilizados na curva de calibração, mas a partir da área ocupada por esse sinal nas subfrações com concentração de 1000 mg L^{-1} é possível perceber que esse composto foi concentrado nas subfrações 1 e 2 com área de 74,45 mAU.min e 63,67 mAU.min, respectivamente e apresentou-se com menor área na Sub-3 (23,17 mAU.min).

6.3 Determinação da capacidade antioxidante do extrato, fração e subfrações

A capacidade antioxidante foi utilizada nesse estudo para avaliar o fracionamento. Os ensaios com radicais sintéticos e a determinação de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu e CLAE foram avaliados, simultaneamente, para indicar se o processo de purificação viabilizou ou não um aumento da concentração de compostos bioativos, permitindo compreender como a purificação interfere na bioatividade da planta.

Para detectar o potencial antioxidante de uma maneira mais abrangente, a caracterização desta atividade deve ser realizada com métodos baseados em diferentes mecanismos antioxidantes, como as reações que envolvem a transferência de átomos de

hidrogênio (HAT, do inglês: Hydrogen Atom Transfer) e a transferência de um elétron (SET, do inglês: Single Electron Transfer) Tan; Lim (2015). Em função disso, os ensaios antioxidantes utilizados avaliaram a capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu (FCR) e o poder de redução do ferro (FRAP), baseados no mecanismo SET, além dos ensaios de sequestro dos radicais DPPH e ABTS baseados em ambos os mecanismos HAT e SET. Os resultados desses ensaios realizados no EB, Fr-ace e subfrações estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados das análises de atividade antioxidante pelos métodos FCR, DPPH, ABTS e FRAP para o extrato, fração e subfrações.

Amostra	FCR (mg EAG g ⁻¹)	DPPH EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	ABTS (μmol ET g ⁻¹)	FRAP (μmol FeSO ₄ g ⁻¹)
EB	335,20 ± 2,90 ^b	33,20 ± 0,21 ^c	3342 ± 35 ^b	6864 ± 265 ^b
Fr-ace	319,60 ± 2,39 ^c	33,26 ± 0,28 ^c	3217 ± 165 ^c	6502 ± 490 ^b
Sub-1	328,30 ± 1,92 ^{b, c}	37,35 ± 0,43 ^d	3127 ± 51 ^c	7564 ± 119 ^b
Sub-2	409,10 ± 3,37 ^a	27,14 ± 0,15 ^b	3777 ± 10 ^a	9343 ± 242 ^a
Sub-3	401,30 ± 6,29 ^a	26,15 ± 0,31 ^a	3838 ± 29 ^a	8635 ± 355 ^a

Fonte: Dados experimentais.

EAG: equivalente de ácido gálico; ET: equivalente de trolox; Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

As amostras que apresentaram maior capacidade de reduzir o reagente Folin-Ciocalteu foram as subfrações 2 e 3 com 409,1 e 401,3 mg EAG g⁻¹, respectivamente, enquanto a Sub-1 exibiu uma concentração de 328,3 mg EAG g⁻¹, não diferindo do extrato e da fração. Esses teores de compostos fenólicos são similares aos mensurados por Prasniewski et al. (2021) no extrato hidroetanólico e na fração em acetona das folhas de *S. malaccense*. Arumugam et al. (2014) obtiveram uma atividade menor ao estudarem o extrato etanólico da planta coletada na Malásia, com 125,81 mg EAG por g de extrato.

A análise de FCR é capaz de quantificar a capacidade redutora de uma amostra a partir da reação de redução do reagente Folin-Ciocalteu, reduzindo o molibdênio do estado de oxidação IV para o V e mudando a cor do meio reacional de amarela para azul. No entanto, segundo Huang et al. (2005) e Shahidi; Zhong (2015), essa reação não é específica para compostos fenólicos, como é historicamente conhecida, uma vez que o molibdênio do reagente pode ser reduzido também por diversos compostos não fenólicos. Assim, de modo

geral o método permite quantificar os constituintes da amostra capazes de reduzir o Folin-Ciocalteu, mas que não são necessariamente substâncias fenólicas.

A análise de atividade antioxidante baseada na redução do radical DPPH foi expressada em EC₅₀. A concentração capaz de inibir 50% do radical variou de 26,1 a 37,3 mg L⁻¹, sendo menor na Sub-2 e Sub-3, enquanto o EB, a Fr-ace e a Sub-1 precisaram de concentrações mais elevadas para alcançar o mesmo nível de inibição. Arumugam et al. (2014) observaram a inibição de 50% do radical com 16.6 mg L⁻¹ do extrato etanólico das folhas de *S. malaccense*, enquanto Batista et al. (2016) mensuraram uma EC₅₀ de 670 mg L⁻¹ para o extrato em metanol das folhas dessa planta.

O ensaio com o radical ABTS mensura a capacidade antioxidante equivalente ao trolox, que é um antioxidante solúvel em água análogo à vitamina E comumente utilizado como padrão na reação com esse radical. Nessa análise, as subfrações 2 e 3 também apresentaram melhor atividade que as demais amostras, sem diferença estatística significativa entre as duas. A capacidade das amostras variou entre 3838 e 3342 μmol de trolox por g de extrato, fração ou subfração.

Uma das vias biológicas de proteção antioxidante ocorre através da quelação de metais de transição, uma vez que esses metais são capazes de catalisar as reações de Fenton e Harber-Weiss (Barreiros et al. (2006)). A análise de FRAP sugere uma bioatividade dos compostos relacionada a essa propriedade quelante importante para os organismos biológicos, mensurando a capacidade que a amostra tem em reduzir o Fe. Analisando a Tabela 3, observa-se elevados teores de FRAP para todas as amostras, variando de 9343 μmol FeSO₄ g⁻¹ para a Sub-2, até 6502 μmol FeSO₄ g⁻¹ para a Fr-ace. Batista et al. (2016) quantificaram FRAP em extrato metanoico de folhas de *S. malaccense* coletadas no Brasil, obtendo teores de 1100 μmol equivalente de trolox por g de extrato.

Em todos os ensaios antioxidantes avaliados, os radicais foram estabilizados com maior facilidade pelas subfrações 2 e 3, as quais apresentaram bioatividade estatisticamente similar. O perfil químico dessas duas subfrações é semelhante, ambas caracterizadas por concentrarem o flavonoide glicosilado miricitrina e o composto de sinal majoritário que elui logo após este, porém, todas as substâncias quantificadas na Sub-2 (11,21 mg g⁻¹ de ácido gálico; 20,58 mg g⁻¹ de miricitrina e 3,04 mg g⁻¹ de quercetina) apresentaram aproximadamente o dobro das concentrações quantificadas para os mesmos compostos na Sub-3 (6,72 mg g⁻¹ de ácido gálico; 9,96 mg g⁻¹ de miricitrina e 1,49 mg g⁻¹ de quercetina). Dessa forma é possível sugerir que o sinergismo entre dois ou mais compostos presentes nessas amostras tem maior influência na capacidade antioxidante dessas duas subfrações.

6.4 Avaliação da citotoxicidade do extrato, fração e subfrações em células de melanoma cutâneo SK-MEL-28

Ensaio de citotoxicidade são importantes para avaliar compostos usados tanto como produtos farmacêuticos ou cosméticos que devem ser comprovadamente atóxicos, quanto em substâncias com potencial anticâncer (FRESHNEY, 2005). O efeito de compostos com atividade antioxidante pode ser também pró-oxidante em determinadas situações. Eghbaliferiz; Iranshahi (2016) enfatizam que a propriedade pró-oxidante desses compostos nem sempre é prejudicial para os sistemas biológicos, podendo ter efeito positivo no tratamento do câncer.

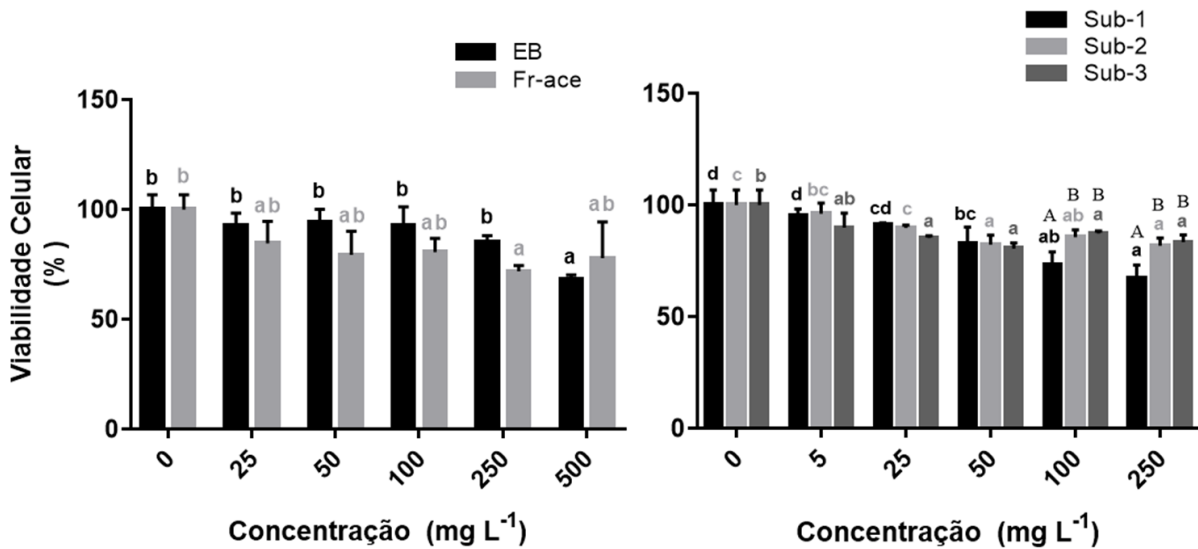
Nesse sentido, conhecendo a capacidade antioxidante do extrato, da fração e das subfrações das folhas de *S. malaccense*, assim como a sua composição química que é constituída principalmente por diferentes estruturas de compostos fenólicos, foram realizados ensaios para avaliar a citotoxicidade e o estresse oxidativo em células de melanoma cutâneo SK-MEL-28, os quais permitiram avaliar o efeito citotóxico do EB, Fr-ace, Sub-1, Sub-2 e Sub-3 nas células cancerígenas através dos ensaios de viabilidade e migração celular, além de avaliar o estresse oxidativo nas células com as análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidase (MPO) e a determinação do conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C).

6.4.1 Viabilidade celular

A viabilidade das células cancerígenas SK-MEL-28 tratadas com extrato, fração e subfrações foi avaliada com o teste colorimétrico do MTT. De acordo com Fukui et al. (2010), o sal tetrazólio hidrossolúvel de cor amarela, quando incubado com células vivas, é reduzido por enzimas mitocondriais e convertido em corante formazan de coloração violeta. Insolúvel em água, o formazan fica armazenado no citoplasma celular, sendo solubilizado por DMSO para quantificação colorimétrica, onde a intensidade da cor violeta na solução é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

As células de melanoma cutâneo foram tratadas com o EB e a Fr-ace nas concentrações 25, 50, 100, 250 e 500 mg L⁻¹, enquanto as subfrações foram adicionadas em concentrações menores de 5, 25, 50, 100 e 250 mg L⁻¹, para determinação da sua citotoxicidade. Os resultados da viabilidade celular após 1 hora de incubação com o MTT estão apresentados na Figura 10.

Figura 10 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de *S. malaccense* na viabilidade de células de melanoma cutâneo.



Letras minúsculas diferentes com a mesma cor indicam que houve diferença estatística entre as concentrações de uma amostra pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam que houve diferença estatística entre as amostras na mesma concentração pelo teste de Tukey ou Sidak ($p < 0,05$).

Na Figura 10A, estão apresentados os resultados da atividade citotóxica do extrato e da fração de *S. malaccense*. O EB diferiu significativamente do controle em 500 mg L⁻¹, reduzindo cerca de 31% da viabilidade, enquanto a Fr-ace apresentou redução similar (29%) na concentração de 250 mg L⁻¹, sendo que o aumento da viabilidade observado na maior concentração da fração não foi estatisticamente significativo em relação à concentração de 250 mg L⁻¹. Quando comparados, EB e Fr-ace não diferiram significativamente em nenhuma das concentrações testadas no ensaio de viabilidade.

A redução da viabilidade das células cancerígenas tratadas com as subfrações ocorreu em concentrações menores que as concentrações do extrato e da fração. Na Figura 10B é possível observar que a Sub-1 apresentou redução significativa de células viáveis em 50 mg L⁻¹, com inibição de 18% em relação ao controle. As concentrações de 100 e 250 mg L⁻¹ reduziram cerca de 30% da viabilidade, com efeito similar ao obtido em 500 mg L⁻¹ do EB e em 250 mg L⁻¹ da Fr-ace.

A Sub-1 tem em sua composição, predominantemente, o sinal de maior intensidade que não foi identificado, o flavonol miricetina, além de teores significativos de ácido gálico e quercetina. Zeng et al. (2014) avaliaram a viabilidade de células SK-MEL-28 tratadas com dihidromiricetina, um flavanonol com estrutura similar à da miricetina, suprimindo cerca de 30% da proliferação das células cancerígenas após 48 e 72 horas de tratamento com 200 μmol L⁻¹ do composto, porém nenhum efeito significativo foi observado em 24 horas de tratamento.

A Sub-2 também apresentou redução significativa na quantidade de células viáveis a partir de 50 mg L⁻¹, com redução em torno de 17% nas concentrações de 50, 100 e 250 mg L⁻¹, as quais não foram estatisticamente diferentes entre si. A Sub-3 reduziu 15% da viabilidade na concentração de 25 mg L⁻¹, permanecendo com atividade sem diferir significativamente nas maiores concentrações que foram testadas. As subfrações 2 e 3 apresentaram resultados similares nas concentrações de 100 e 250 mg L⁻¹, diferindo significativamente da Sub-1 nessas mesmas concentrações.

As três subfrações apresentaram redução significativa de células viáveis em concentrações mais baixas que as do EB e da Fr-ace, contudo, Sub-2 e Sub-3 inibiram menos de 20% da viabilidade das células cancerígenas mesmo na maior concentração testada, sendo que apenas a Sub-1 foi capaz de reduzir cerca de 30% da viabilidade assim como observado no tratamento com o extrato e com a fração.

Kato et al. (2021) avaliaram o efeito de extratos e frações de diferentes plantas brasileiras sobre a viabilidade de linhagens de células de melanoma SK-MEL-28 e SK-MEL-103, escolhidas por apresentarem elevada resistência e capacidade metastática. Os autores avaliaram que flavonoides, derivados galoilquínicos e diterpenos, estão positivamente correlacionados com a inibição das linhagens celulares resistentes, elencando esses compostos como potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de melanoma.

No mesmo estudo, os autores observaram que as frações obtidas a partir de solventes de média e baixa polaridade (compostas por polifenóis e derivados de terpenos) foram mais ativas do que as frações obtidas a partir de solventes de alta polaridade (compostas por metabólitos secundários ligados a glicosídeos ou grupos com grande quantidade de hidroxilas). Esses compostos mais polares podem ter baixa interação com a membrana plasmática, diminuindo os efeitos nas células tumorais, contudo, os autores destacam que ensaios *in vitro* não mimetizam um sistema biológico completo, portanto os compostos não sofrem todos os processos farmacocinéticos e podem ter diferentes respostas nas células, como por exemplo, a presença de enzimas glicosidases que atuam na clivagem de açúcares, melhorando a permeabilidade de compostos glicosilados na membrana celular.

6.4.2 Migração celular

A migração de células, segundo Justus et al. (2014), é um importante processo que está envolvido tanto no desenvolvimento normal das células, quanto na resposta imunológica

e em processos patológicos. Cicatrização, inflamação e metástase tumoral são alguns dos processos em que a migração celular ocorre. Na análise do fechamento de feridas em cultura de células que crescem aderidas, um arranhão é gerado em uma monocamada de células confluentes, sendo possível avaliar o efeito de substâncias que possam estar envolvidas no mecanismo de migração das células, as quais em condições normais tendem a se mover para o fechamento da abertura, reestabelecendo as interações celulares.

No ensaio de migração realizado com células de melanoma cutâneo SK-MEL-28 a ação do EB, Fr-ace, Sub-1, Sub-2 e Sub-3 pode ser observada na Figura 11, no tempo inicial (0 horas) e final (24 horas) de incubação. Todas as amostras apresentaram interferência na capacidade das células migrarem quando comparadas com o controle negativo (sem tratamento). Após 24 horas, observa-se que no controle ocorreu o fechamento do filme celular, enquanto nos poços com tratamento houve a redução do processo de locomoção celular proporcional à concentração na maioria das amostras testadas.

Figura 11 – Estudo da migração celular de células SK-MEL-28 tratadas com extrato, fração e subfrações das folhas de *S. malaccense*.

	Controle	EB 25 mg L ⁻¹	EB 50 mg L ⁻¹	EB 100 mg L ⁻¹	EB 250 mg L ⁻¹	EB 500 mg L ⁻¹
0 h	739,15 ↔	811,27 ↔	754,93 ↔	667,04 ↔	703,10 ↔	640,00 ↔
24 h	0,0 	380,42 ↔	335,77 ↔	597,18 ↔	597,18 ↔	707,61 ↔
	Controle	Fr-ace 25 mg L ⁻¹	Fr-ace 50 mg L ⁻¹	Fr-ace 100 mg L ⁻¹	Fr-ace 250 mg L ⁻¹	Fr-ace 500 mg L ⁻¹
0 h	625,49 ↔	752,68 ↔	818,03 ↔	730,14 ↔	745,92 ↔	606,2 ↔
24 h	0,0 	653,52 ↔	585,92 ↔	590,42 ↔	703,10 ↔	552,11 ↔
	Controle	Sub-1 5 mg L ⁻¹	Sub-1 25 mg L ⁻¹	Sub-1 50 mg L ⁻¹	Sub-1 100 mg L ⁻¹	Sub-1 250 mg L ⁻¹
0 h	625,49 ↔	752,68 ↔	818,03 ↔	730,14 ↔	745,92 ↔	606,2 ↔
24 h	0,0 	653,52 ↔	585,92 ↔	590,42 ↔	703,10 ↔	552,11 ↔
	Controle	Sub-2 5 mg L ⁻¹	Sub-2 25 mg L ⁻¹	Sub-2 50 mg L ⁻¹	Sub-2 100 mg L ⁻¹	Sub-2 250 mg L ⁻¹
0 h	707,61 ↔	590,42 ↔	665,92 ↔	671,55 ↔	525,07 ↔	793,15 ↔
24 h	0,0 	450,70 ↔	502,54 ↔	493,52 ↔	504,79 ↔	547,61 ↔
	Controle	Sub-3 5 mg L ⁻¹	Sub-3 25 mg L ⁻¹	Sub-3 50 mg L ⁻¹	Sub-3 100 mg L ⁻¹	Sub-3 250 mg L ⁻¹
0 h	707,61 ↔	786,48 ↔	653,52 ↔	536,34 ↔	759,44 ↔	770,70 ↔
24 h	0,0 	923,94 ↔	594,93 ↔	518,31 ↔	770,70 ↔	840,56 ↔

As medidas estão apresentadas em μm . Controle contém células sem o tratamento com amostras.
Fonte: dados da pesquisa.

Nas imagens do ensaio de migração com o EB e a Fr-ace (Figura 11) observa-se a alteração do formato das células nos tratamentos com 250 e 500 mg L⁻¹ de EB e com 500 mg L⁻¹ de Fr-ace, o que indica que essas amostras em concentrações mais elevadas podem ser

tóxicas às células. Uma inibição significativa das células SK-MEL-28 foi observada para a maior concentração de ambas as amostras no ensaio do MTT. Nesse sentido, é importante que sejam realizados outros estudos relacionados à toxicidade do extrato hidroetanólico e da fração acetona de *S. malaccense*, para que seja possível sugerir um mecanismo de ação dessa amostra em células vivas.

Uma redução significativa da migração celular é observada nos poços tratados com a Sub-3 em todas as concentrações testadas. Na análise com MTT, a Sub-3 apresentou redução significativa da viabilidade já na concentração de 25 mg L⁻¹. As subfrações 2 e 3, que também apresentaram resultados relevantes no ensaio de viabilidade, reduziram a capacidade de locomoção das células cancerígenas proporcionalmente ao aumento da concentração dos tratamentos.

Nesse sentido, é possível sugerir que o processo de purificação da Fr-ace foi capaz de produzir subfrações mais eficientes em conter o crescimento de células de melanoma cutâneo nos ensaios *in vitro*. Isso pode ser justificado pela concentração dos compostos bioativos nessas subfrações, uma vez que os teores de ácido gálico, miricetina, miricitrina e quercetina foram maiores nas subfrações do que no EB e na Fr-ace.

Estudos relatam ação importante de diversos compostos fenólicos na inibição da migração de células cancerígenas como, por exemplo, o ácido gálico (Lo et al. (2011) e a quercetina (Pradhan et al. (2010). Em uma revisão sistemática, Alqathama; Prieto (2015) apresentaram estudos que sugerem efeitos relevantes de compostos fenólicos sobre células cancerígenas, além de ganhos significativos no tratamento de melanomas com a aplicação de terapias combinadas baseadas em produtos naturais e drogas aprovadas como a dacarbazina.

6.4.3 Análise dos marcadores oxidativos e inflamatórios

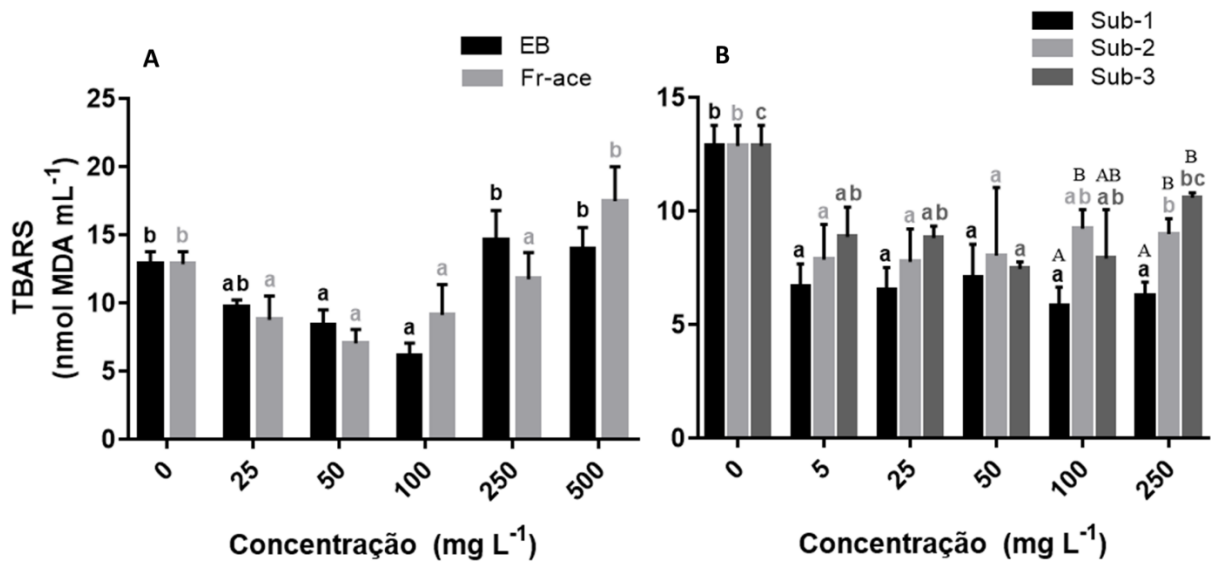
A lipoperoxidação ocorre com diversos eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, provocando graves alterações nas suas propriedades físico-químicas. De acordo com Abdalla; Sena (2008), os produtos derivados da peroxidação podem ser mensurados e os mais estudados são os isoprostanos, os hidroperóxidos lipídicos, os aldeídos, os fosfolípidos oxidados e aqueles produzidos durante os processos bioquímicos de oxidação do colesterol. Dentre esses produtos, o malondialdeído (MDA) é aceito como um biomarcador da peroxidação lipídica. Por ser uma substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, o ensaio de TBARS foi utilizado para determinar o grau de peroxidação lipídica nas células.

No ensaio para avaliar a formação de MDA (Figura 12), o controle sem tratamento apresentou um teor de 12,85 nmol de MDA mL⁻¹. O EB apresentou redução significativa da peroxidação lipídica nas concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹, com 8,38 e 6,11 nmol de MDA mL⁻¹ respectivamente, uma redução de aproximadamente 35% em 50 mg L⁻¹ e 52% em 100 mg L⁻¹ quando comparados ao controle. Com o aumento da concentração do EB, verificou-se um aumento significativo da peroxidação na camada lipídica das células, contudo os teores de MDA nas concentrações 250 e 500 mg L⁻¹ não diferiram estatisticamente do controle.

A Fr-ace apresentou comportamento similar ao do extrato, porém a redução da peroxidação já foi significativa em 25 mg L⁻¹, alcançando uma redução de 46% em 50 mg L⁻¹ comparado ao controle, com um teor de 7,02 nmol de MDA mL⁻¹. O aumento da concentração de fração também elevou a quantificação de substâncias reativas ao TBA, porém, apenas a concentração de 500 mg L⁻¹ foi estatisticamente igual ao controle, as demais concentrações (25, 50, 100 e 250 mg L⁻¹) não diferiram significativamente entre si. A comparação entre o EB e a Fr-ace demonstrou que não houve diferença estatística no teor de TBARS entre as duas amostras em cada uma das concentrações avaliadas.

Nos ensaios com as subfrações, ocorreu uma redução importante nos níveis de peroxidação lipídica já na menor concentração testada (5 mg L⁻¹), com destaque para a Sub-1, que reduziu o teor de TBARS em todas as concentrações à aproximadamente metade do teor observado no controle. Sub-2 e Sub-3 reduziram cerca de 40% da peroxidação lipídica nas menores concentrações, apresentando aumento do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico proporcional ao aumento da concentração de cada amostra. A Sub-2 foi estatisticamente igual ao controle a partir de 100 mg L⁻¹, enquanto a Sub-3 apresentou esse comportamento apenas em 250 mg L⁻¹. Apenas a Sub-1 apresentou diferença estatística significativa da Sub-2 e Sub-3 nas duas maiores concentrações avaliadas, as quais aumentaram a peroxidação a níveis similares ao do controle.

Figura 12 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de *S. malaccense* na peroxidação lipídica avaliado pelo ensaio de TBARS em células de melanoma cutâneo.



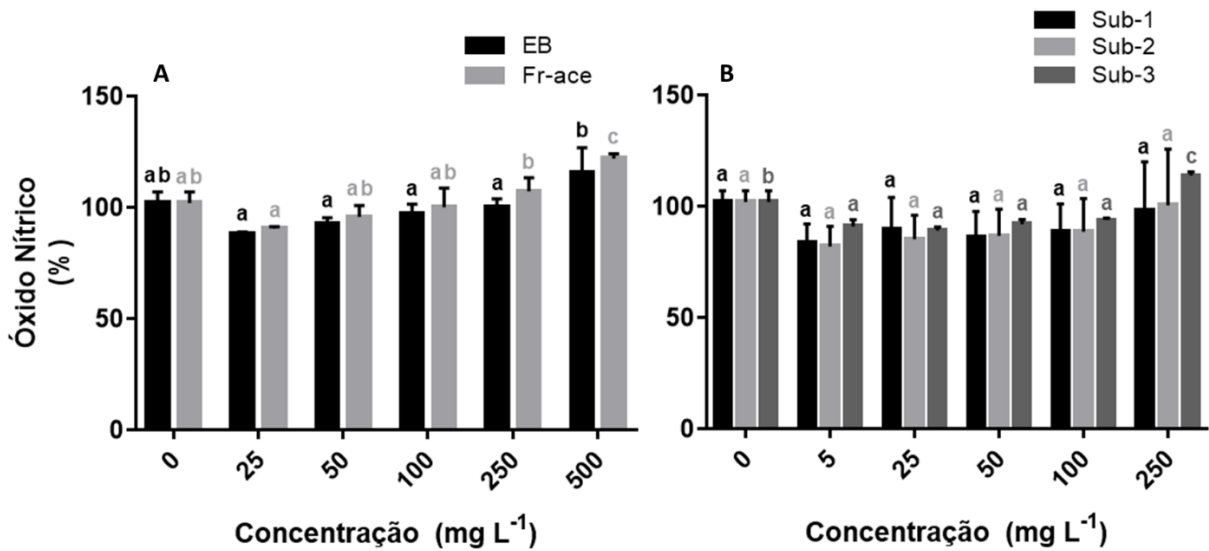
Letras minúsculas diferentes com a mesma cor indicam que houve diferença estatística entre as concentrações de uma amostra pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam que houve diferença estatística entre as amostras na mesma concentração pelo teste de Tukey ou Sidak ($p < 0,05$).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre produzido pelo metabolismo do aminoácido arginina, com grande importância na mediação de processos intra e extracelulares, apresentando um papel que pode benéfico em alguns casos e prejudicial em outros. Segundo Dusse et al. (2003), o NO é capaz de destruir patógenos e células tumorais, sendo um importante mediador citotóxico. O teste do óxido nítrico detecta a presença de nitrito orgânico na amostra, analisado pela coloração rosada da solução quando está em contato com o reagente de Griess, que reage com o nitrito formando os sais de diazônio.

O teor de nitrito orgânico gerado no sobrenadante do cultivo celular (Figura 13) não foi reduzido significativamente em nenhuma das concentrações de extrato, fração e subfrações 1 e 2, apenas na Sub-3. Contudo, um aumento considerável na quantificação de óxido nítrico (NO) ocorreu no tratamento de 500 mg L⁻¹ da Fr-ace, com um teor aproximadamente 20% maior que o do controle.

Um comportamento similar ocorreu na Sub-3, com aumento de 13% no teor de nitrito orgânico em 250 mg L⁻¹ em comparação com o controle, porém, as concentrações menores dessa subfração reduziram significativamente os níveis de NO. Dessa forma, é possível sugerir que a composição química da Sub-3 e da Fr-ace tem maior capacidade de interferir no mecanismo de produção e atuação do óxido nítrico nas células cancerígenas.

Figura 13 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de *S. malaccense* no teor de óxido nítrico produzido no sobrenadante de células de melanoma cutâneo.



Letras minúsculas diferentes com a mesma cor indicam que houve diferença estatística entre as concentrações de uma amostra pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

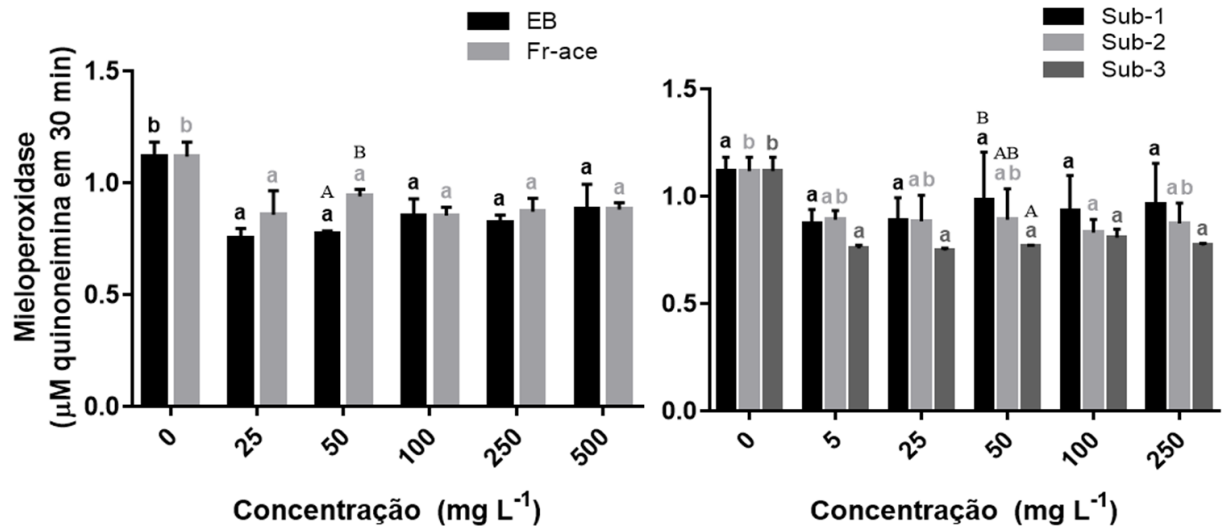
A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos (glóbulos brancos do sistema imune) que tem papel fundamental na produção de espécies reativas, capaz de catalisar a reação de íons cloreto com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando assim o ácido hipocloroso (HOCl) que gera oxigênio singlete e radical hidroxil. Por refletir a ativação do sistema imune, a MPO é um conhecido marcador inflamatório. Na reação com H_2O_2 como agente oxidante, a enzima catalisa o acoplamento oxidativo de fenol e aminoantipirina (reagentes presentes na análise) originando um produto colorido, a quinoneimina, permitindo a quantificação da MPO.

A quantificação da enzima nas células de melanoma cutâneo tratadas com EB, fração e subfrações foi expressa pela concentração em $\mu\text{mol L}^{-1}$ de quinoneimina gerada em 30 min de reação e os resultados estão apresentados na Figura 14. No EB e na Fr-ace, a quantificação de MPO nas células foi significativamente diferente do controle em todas as concentrações testadas, as quais apresentaram um teor similar de quinoneimina mesmo com o aumento das concentrações de ambas as amostras.

Nas subfrações, a quantificação da MPO não variou significativamente do controle na maioria das concentrações testadas. A Sub-1 apresentou teores similares de MPO em todas as concentrações, sem diferir estatisticamente do controle ($1,117 \mu\text{M}$ de quinoneimina em 30 min). Na Sub-2 os resultados foram semelhantes aos observados para a subfração 1, havendo redução significativa da enzima apenas na concentração de 100 mg L^{-1} , com teor de $0,830 \mu\text{M}$ de quinoneimina em 30 min. A Sub-3 apresentou um comportamento similar ao do extrato e da fração, reduzindo cerca de 30% dos níveis da enzima em todas as concentrações avaliadas

quando comparadas ao controle, sem variação estatística entre estas.

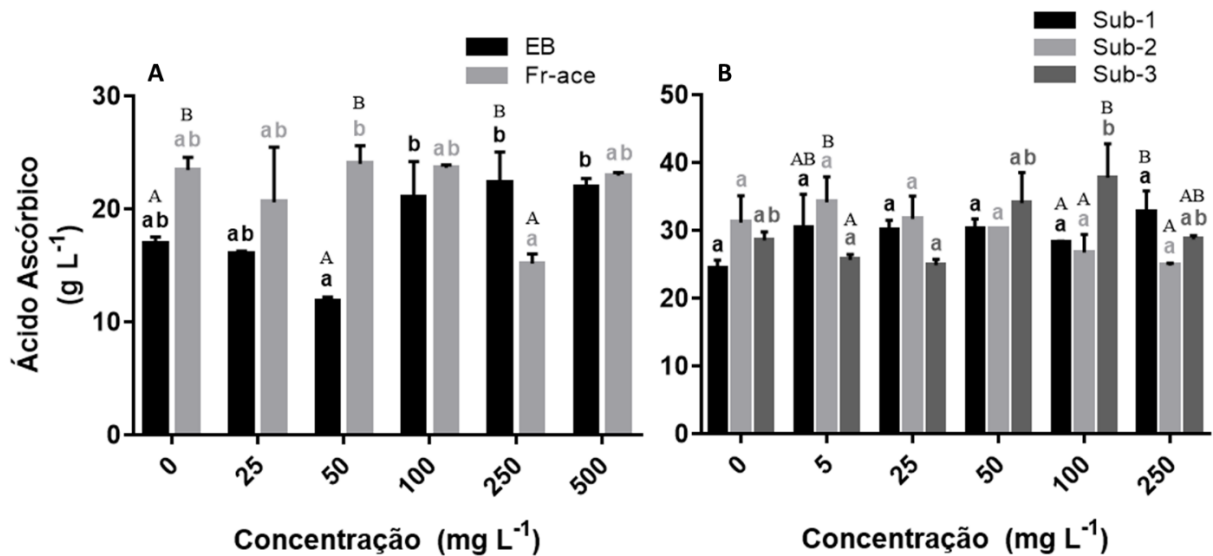
Figura 14 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de *S. malaccense* no teor de mieloperoxidase presente em células de melanoma cutâneo.



Letras minúsculas diferentes com a mesma cor indicam que houve diferença estatística entre as concentrações de uma amostra pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam que houve diferença estatística entre as amostras na mesma concentração pelo teste de Tukey ou Sidak ($p < 0,05$).

O ácido ascórbico (vitamina C) é um agente antioxidante amplamente conhecido, participando de diversos processos biológicos importantes no organismo. Porém, os tratamentos com extrato, fração e subfrações do *S. malaccense* aplicados nas células de melanoma cutâneo não alteraram de maneira significativa os níveis de ácido ascórbico em nenhuma das concentrações avaliadas, não diferindo do teor observado no controle (Figura 15). Van Gorkom et al. (2019), em um estudo de revisão concluíram que não há relatos de efeitos relevantes e clinicamente positivos da suplementação de vitamina C em pacientes com câncer.

Figura 15 – Efeito do extrato e da fração (A); e das subfrações (B) de *S. malaccense* no conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C) em células de melanoma cutâneo.



Letras minúsculas diferentes com a mesma cor indicam que houve diferença estatística entre as concentrações de uma amostra pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam que houve diferença estatística entre as amostras na mesma concentração pelo teste de Tukey ou Sidak ($p < 0,05$).

Em resumo, foi possível avaliar através dos ensaios de estresse oxidativo em células de melanoma cutâneo que em concentrações maiores de EB e Fr-ace houve uma redução significativa da viabilidade celular, bem como aumento nos níveis de peroxidação lipídica e de óxido nítrico, ocorrendo, nessas concentrações, uma aparente toxicidade às células no ensaio de migração. O teor de MPO com tratamento de extrato e fração foi significativamente menor que o teor do controle, enquanto o conteúdo de ácido ascórbico não apresentou variação relevante em relação ao controle nas concentrações avaliadas de ambas as amostras.

Em todas as subfrações a quantidade de células viáveis também foi reduzida nas concentrações maiores, contudo, concentrações mais baixas das subfrações também apresentaram capacidade de reduzir a viabilidade das células, a Sub-1 em proporções similares ao extrato e à fração. As subfrações apresentaram também melhor atuação ao reduzir a migração das células cancerígenas. Nas subfrações 2 e 3 ocorreu um aumento dos níveis de TBARS nas maiores concentrações, porém a Sub-1 manteve os mesmos teores de peroxidação em todas as concentrações avaliadas.

É importante destacar que as subfrações apresentaram os maiores teores de quercetina, miricetina e ácido gálico, além do composto referente ao sinal não identificado. Soll et al. (2020) demonstram propriedades anticâncer da quercetina em modelo *in vitro* com células de melanoma B16. Os autores avaliaram a viabilidade celular usando a técnica de fotomicroscopia e observaram que a quercetina em $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu a viabilidade por meio de apoptose, ou seja, induziu a morte programada das células. Nesse sentido, os autores

sugerem que a indução de apoptose pela quercetina é o principal mecanismo de redução da viabilidade das células de melanoma.

Varela-Rodríguez et al. (2020) avaliaram a atividade biológica do ácido gálico e da miricetina em linhagens de células de adenocarcinoma ovariano (SKOV-3 e OVCAR-3). Os autores observaram que houve redução da viabilidade celular no tratamento com ácido gálico e miricetina nas células SKOV-3 (50 e 166 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e OVCAR-3 (43 e 94 $\mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente, bem como alterações morfológicas, parada do ciclo celular e indução de apoptose devido à geração de ERO.

Um estudo de Khorsandi et al. (2020) com linhagens de células de câncer de mama (MDA-MB-231) e de melanoma (A375) observaram que o tratamento de irradiação de baixo nível por si só não é capaz de matar células cancerosas de mama e melanoma, contudo a combinação da pré-irradiação seguida do tratamento com ácido gálico pode melhorar a absorção celular desse composto fenólico e, conseqüentemente, melhorar seus efeitos anticâncer em decorrência da indução de apoptose e ferroptose, principalmente via produção de ERO, diminuindo a atividade da glutatona peroxidase e aumentando a peroxidação lipídica.

Os teores de NO e de MPO não sofreram variação significativa nas células tratadas com as subfrações 1 e 2, apresentando alteração em seus níveis apenas com o tratamento de Sub-3, a qual reduziu o teor de NO nas menores concentrações e aumentou-o na concentração mais elevada, além de apresentar uma redução constante nos níveis da enzima em todas as concentrações. O conteúdo de ácido ascórbico não apresentou variação relevante em relação ao controle nas concentrações avaliadas das três subfrações.

A atuação de um flavonoide como antioxidante ou pró-oxidante em sistema biológico depende de sua dose, tipo de célula e também das condições de cultura Xu et al. (2011) Ao avaliar a capacidade de geração de H_2O_2 , Miura et al. (1998) identificaram que 7 dos 14 flavonoides testados produziram H_2O_2 em tampão acetato. Segundo os autores, a capacidade dos flavonoides de produzir H_2O_2 segue a ordem decrescente miricetina > baicalein > quercetina > (-)-epicatequina > (+)-catequina > fisetina = 7,8-dihidroxi-flavona e sugerem que a estrutura do pirogalol ou do catecol esteja envolvida na geração dessa ERO, a partir da doação de hidrogênio do pirogalol ou do catecol para o oxigênio de um radical ânion superóxido.

Dessa forma, sabendo que o EB, a Fr-ace e as subfrações 1, 2 e 3 apresentam quantidade significativa de flavonoides em sua composição, o aumento das ERO nas células tratadas, observado principalmente nos ensaios de TBARS e NO, pode ser explicado pela

capacidade de geração de ERO que os flavonoides apresentam em determinadas condições. Em estudo realizado por Silva et al. (2021) com células de câncer de mama (MCF-7) tratadas com extrato de semente de açaí, os autores observaram que os flavonoides com alta atividade sequestradora de radicais presentes no extrato também promoveram um efeito citotóxico nas células cancerígenas devido à geração de ERO. Os autores ainda sugerem que o aumento das ERO induz a autofagia em células tratadas com o extrato da semente de açaí.

6.5 Isolamento dos compostos majoritários do *S. malaccense*

As plantas medicinais apresentam matriz química bastante complexa e a partir de estudos fitoquímicos é possível isolar e identificar inúmeras substâncias químicas de interesse farmacológico Brusotti et al. (2014 e Simões et al. (2017). De acordo com Oldoni et al. (2016) e Simões et al. (2017), a purificação é uma maneira eficiente de isolar os compostos responsáveis por atividades biológicas, além de possibilitar a obtenção de frações enriquecidas que concentram a bioatividade de interesse ou que reduzam os teores de compostos com potencial toxicidade.

Nesse sentido, as subfrações foram submetidas a mais um processo de purificação para se obter compostos com a maior pureza possível a partir da eluição das subfrações em placas de CCD-p. Nesse processo, optou-se por recuperar as bandas com maior intensidade, considerando a possibilidade de isolar dessa forma os compostos majoritários da planta, os quais provavelmente sejam importantes marcadores químicos do *S. malaccense*. Marcadores químicos, de acordo com a ANVISA (2014), são as substâncias utilizadas como um padrão de referência composição vegetal dos fitoterápicos, tendo correlação com o efeito terapêutico promovido por estes.

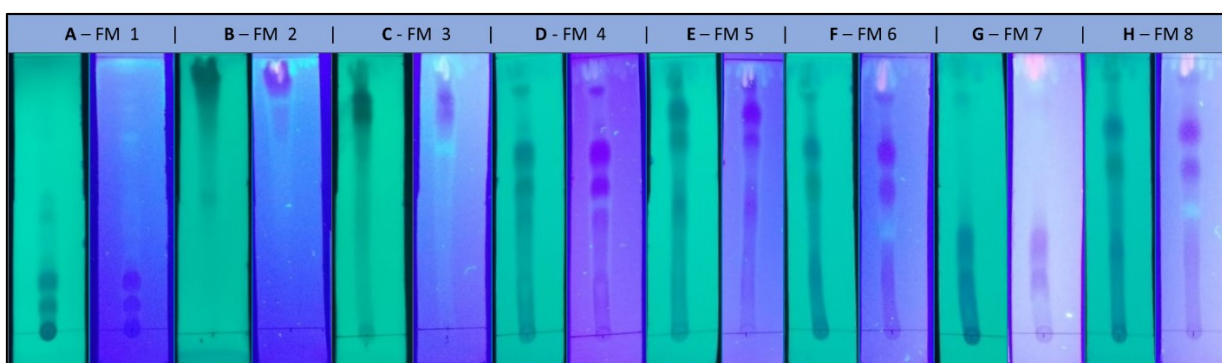
Estudos prévios de purificação do *S. malaccense* já foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa. Esses estudos revelaram a presença de duas bandas intensas presentes nas subfrações mais bioativas da planta, quando estas eram eluídas em placas de CCD analítica. Essa eluição foi inicialmente realizada com uma FM de característica bastante apolar (Figura 16-A), composta por benzeno (65%), acetato de etila (21%), metanol (9%) e ácido fórmico (5%), sendo visível a necessidade de aumentar a força dessa FM, uma vez que as bandas intensas apresentavam um Rf muito abaixo do ideal e com compostos ainda retidos no ponto de aplicação.

Dessa forma, buscou-se otimizar uma FM capaz de elevar o Rf das bandas de interesse, a fim de aumentar a separação entre elas e evitar a coeluição de diferentes

substâncias com um mesmo Rf. Tanto os sinais majoritários dos cromatogramas, quanto as bandas mais intensas das subfrações apresentam perfil de absorção no UV característico de flavonoides, sendo assim, fases móveis específicas para separação de compostos mais polares como os flavonoides foram testadas e avaliadas.

Diversos materiais trazem sugestões para compor uma FM capaz de separar compostos de maior polaridade, contudo, a complexidade da composição química das plantas, mesmo que em subfrações purificadas, exige um gradiente de FM específico para cada matriz vegetal. Com base no livro de Reichardt (2003), a força eluotrópica (ϵ°) dada pela série de Snyder para sílica como adsorvente foi utilizada como parâmetro para compor os gradientes na otimização de uma FM eficaz em separar as bandas de interesse presentes nas subfrações (Figura 16).

Figura 16 – Otimização da fase móvel para eluição das subfrações de *S. malaccense* em placas de CCD analítica irradiadas com luz UV em 254 e 365 nm.



A – FM 1 → benzeno : acetato de etila : metanol : ácido fórmico (65:21:9:5); **B** – FM 2 → acetato de etila : acetona : ácido fórmico : água (50:30:10:10); **C** – FM 3 → acetato de etila : metanol : ácido fórmico (80:10:10); **D** – FM 4 → acetato de etila : tolueno : metanol : ácido fórmico (65:20:10:5); **E** – FM 5 → acetato de etila : tolueno : metanol : ácido fórmico (45:30:20:5); **F** – FM 6 → acetato de etila : tolueno : metanol : ácido fórmico (58:25:2:15); **G** – FM 7 → acetato de etila : tolueno : acetona : ácido acético (55:25:5:15); **H** – FM 8 → acetato de etila : tolueno : acetona : ácido fórmico (55:25:5:15). A Sub-2 foi escolhida para otimização da FM por apresentar as duas bandas de interesse em sua composição.

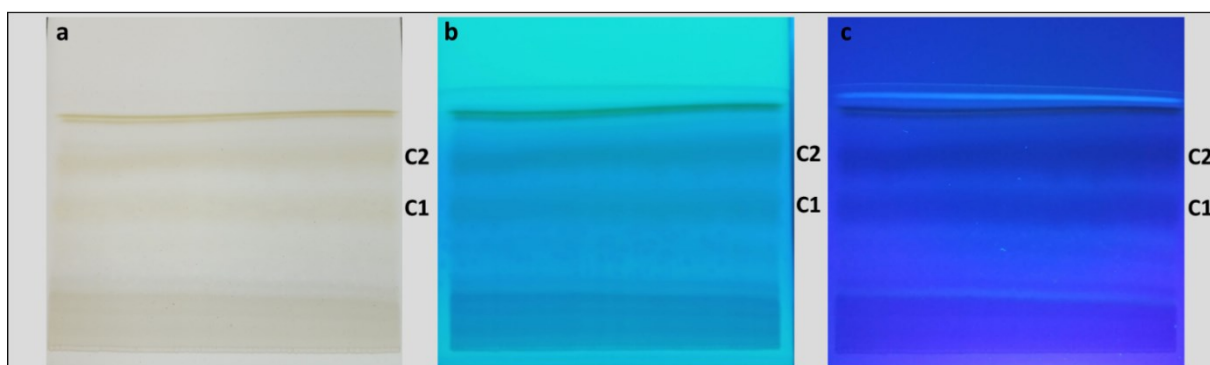
Fonte: autoria própria.

A composição do gradiente escolhida para ser usada na separação das bandas nas subfrações foi a FM 8 (Figura 16-H), formada por acetato de etila (55%, $\epsilon^\circ = 0,58$), tolueno (25%, $\epsilon^\circ = 0,29$), acetona (5%, $\epsilon^\circ = 0,56$) e ácido fórmico (15%, $\epsilon^\circ = >1$), por apresentar um bom Rf (0,59 e 0,72) para as duas bandas de maior intensidade com boa separação entre elas, menor arraste ao longo da placa e menor retenção da amostra no ponto de aplicação.

Com a FM otimizada, as subfrações foram aplicadas nas placas de CCD-p (Figura 17) para obtenção dos compostos isolados. De acordo com Rabel; Sherma (2017), o

isolamento de compostos em placas de cromatografia preparativa continua sendo um método muito aplicado devido à facilidade de acesso, simplicidade, velocidade, baixo custo e razoável poder de separação em comparação com métodos instrumentais. As bandas mais intensas e com melhor resolução foram coletadas após duas eluições da placa preparativa. A Sub-2 (214 mg) e a Sub-3 (36 mg) foram aplicadas para eluição em CCD-p por apresentarem as duas bandas mais intensas, além de maior rendimento que a Sub-1.

Figura 17 – Eluição da Sub-2 em placa de CCD preparativa revelada em luz visível (a), irradiada com luz UV a 254 nm (b) e 365 nm (c).

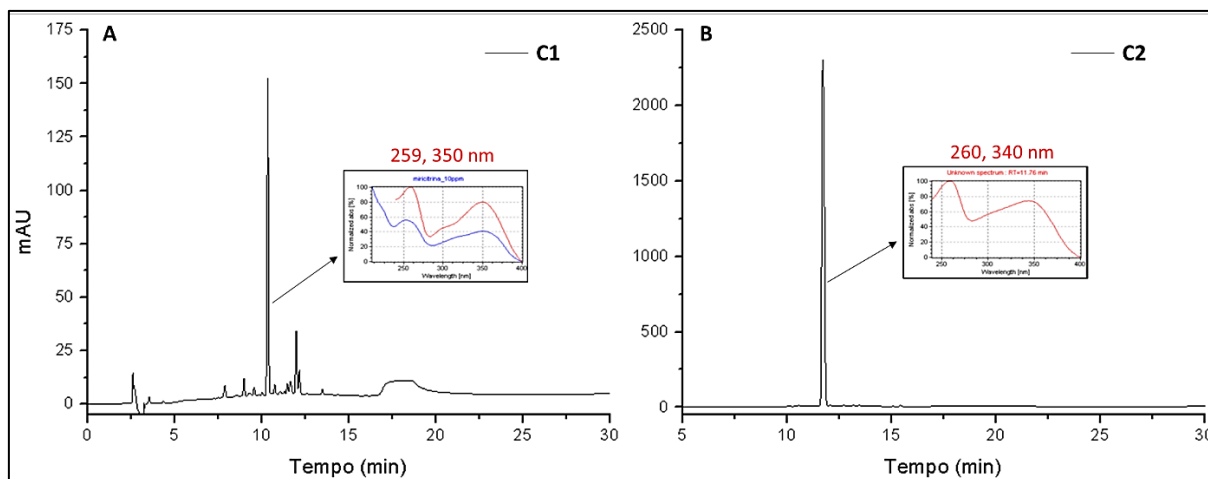


FM: Acetato de etila:acetona:ácido fórmico: tolueno (55:5:15:25 v/v). A placa foi eluída duas vezes com a mesma composição de FM.

Fonte: autoria própria.

As bandas coletadas foram separadas da sílica, concentradas, redissolvidas em metanol e centrifugadas. O sobrenadante foi coletado e injetado em cromatógrafo líquido para avaliação da pureza. Duas bandas apresentaram pureza significativa, com maior concentração do sinal majoritário, a partir das quais foram obtidos o composto 1 (C1) e o composto 2 (C2), com um rendimento final de 11,3 mg e 59,8 mg, respectivamente. Os cromatogramas dos compostos isolados estão apresentados na **Figura 18**.

Figura 18 – Cromatograma dos compostos isolados C1 (a) e C2 (b) e perfil de absorção no ultravioleta.



Fonte: autoria própria.

O C1 (Figura 18-A) apresentou Tr em 10,3 min e máximos de absorção no UV em 259 e 350 nm, sendo muito similar ao Tr e perfil de absorção da miricitrina (10,8 min; 258 e 349 nm). Dessa forma, é possível sugerir que o C1 é o flavonoide glicosilado miricitrina, que já foi identificada por Arumugam et al. (2014) como o composto majoritário presente nas folhas de *S. malaccense* coletadas na Malásia.

O C2 (Figura 18-B) apresentou Tr de 11,7 min e λ_{\max} em torno de 260 e 340 nm, características iguais às observadas no sinal majoritário do EB, da Fr-ace e das três subfrações. Esse perfil de absorbância é um indicativo de que essa substância pertence à classe dos flavonoides. De acordo com Simões et al. (2017), os flavonoides possuem um comportamento espectral no UV determinado pelo núcleo comum da benzopirona, apresentando dois máximos de absorção: o primeiro ocorrendo entre 240 e 285 nm, relacionado ao anel A; e o segundo entre 300 e 400 nm, relacionado ao anel B.

Noreen et al. (1998) realizou um fracionamento em folhas de *S. malaccense* e isolou os flavonoides glicosilados miricitrina, quercitrina e mearnsitrina. A quercitrina apresenta máximos de absorção em 259 e 348 nm, enquanto a mearnsitrina absorve no UV com λ_{\max} de 263 e 347 nm. Ambos os máximos de absorção desses compostos são semelhantes aos λ_{\max} de 260 e 340 nm, característicos do sinal majoritário observado no EB, fração e subfrações.

Segundo Tsimogiannis et al. (2007), a absorção na faixa de 310 a 350 nm referente ao anel B é característica para flavonas, contudo, a absorção referente ao anel A, entre 250 e 290 nm, é praticamente a mesma em todos os subgrupos dos flavonoides, o que dificulta a caracterização desses compostos apenas com o perfil de absorção no UV.

Nesse sentido, os compostos isolados C1 e C2 foram enviados à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo para realização das análises de

ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/MS) com ionização em modo negativo e positivo, para identificação desses compostos.

7 CONCLUSÃO

Embora as folhas de *S. malaccense* ainda sejam pouco estudadas, os resultados obtidos nesse estudo trazem evidências importantes sobre a bioatividade dessa planta. A purificação do extrato hidroetanólico potencializou a atividade antioxidante e aumentou o teor dos compostos majoritários do extrato nas subfrações. A caracterização da composição química das folhas por CLAE-DAD permitiu a identificação e quantificação de quatro compostos fenólicos: ácido gálico, miricitrina, miricetina e quercetina, além de apresentar um sinal majoritário que foi sendo concentrado no decorrer da purificação.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade sugerem que as subfrações foram mais eficientes em conter o crescimento das células cancerígenas de melanoma cutâneo em concentrações menores que o extrato e a fração, os quais, em concentrações maiores apresentaram uma aparente toxicidade às células no ensaio de migração, o que não foi observado nas subfrações. Prosseguir com os estudos de citotoxicidade *in vitro* dessas amostras é essencial para avaliar sua seletividade em células saudáveis e compreender os mecanismos que afetam as células cancerígenas.

Esse estudo também viabilizou o isolamento em placa de CCD preparativa dos dois compostos majoritários (C1 e C2) das subfrações mais bioativas (Sub-2 e Sub-3) das folhas de *S. malaccense*, os quais apresentaram elevada pureza. Um dos compostos isolados foi identificado por CLAE-DAD como o flavonoide glicosilado miricitrina, contudo o sinal mais intenso dos cromatogramas desde o extrato até as subfrações ainda não foi identificado. As técnicas de LC-MS/MS e RMN ^1H e ^{13}C serão utilizadas para confirmação da estrutura do C1 e identificação do C2.

De modo geral, esse estudo demonstrou que as subfrações das folhas de *S. malaccense* coletadas no Brasil apresentaram atividade citotóxica relevante em células de melanoma cutâneo, bem como elevada atividade antioxidante e uma composição rica em compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonoides. Esses resultados inéditos sobre a toxicidade da planta respaldam futuros estudos de citotoxicidade com o *S. malaccense* em outras linhagens de células. Nesse sentido, a planta é uma fonte potencial de compostos fenólicos com atividade antioxidante e citotóxica *in vitro*, apresentando-se como uma possibilidade para as indústrias cosmética e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. DE. **Lipid peroxidation biomarkers in atherosclerosis**. 2008.

ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 8, p. 1170–1182, 2015. Royal Society of Chemistry.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010. SBQ.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANVISA. RDC N. 26 de 13 de maio de 2014, Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.

ARORA, S.; ITANKAR, P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Chenopodium album* aerial parts. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 2018. Elsevier.

ARUMUGAM, B.; MANAHARAN, T.; HENG, C. K.; KUPPUSAMY, U. R.; PALANISAMY, U. D. Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 707–712, 2014.

ARUMUGAM, B.; PALANISAMY, U. D.; CHUA, K. H.; KUPPUSAMY, U. R. Potential antihyperglycaemic effect of myricetin derivatives from *Syzygium malaccense*. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 325–336, 2016. Elsevier Ltd.

ARUMUGAM, B.; PALANISAMY, U. D.; CHUA, K. H.; KUPPUSAMY, U. R. Protective effect of myricetin derivatives from *Syzygium malaccense* against hydrogen peroxide-induced stress in ARPE-19 cells, p. 47–59, 2019.

ATTIA, A. A.; ELMAZOU DY, R. H.; EL-SHENAWY, N. S. Antioxidant role of propolis extract against oxidative damage of testicular tissue induced by insecticide chlorpyrifos in rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 2, p. 87–93, 2012. Elsevier Inc.

BAIRY, K. L.; SHARMA, A.; SHALINI, A. Evaluation of the hypoglycemic, hypolipidemic and hepatic glycogen raising effects of *Syzygium malaccense* upon streptozotocin induced diabetic rats, v. 5, n. 1, p. 46–51, 2005.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. DE C. G.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. 2006.

BATISTA, Â. G.; DA SILVA, J. K.; BETIM CAZARIN, C. B.; et al. Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 284–291, 2016. Academic Press.

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, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218–228, 2014. Elsevier B.V.

CHOI, W. S.; SHIN, P. G.; LEE, J. H.; KIM, G. DO. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 2, p. 164–170, 2012.

DOMITROVIĆ, R.; RASHED, K.; CVIJANOVIĆ, O.; et al. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 230, p. 21–29, 2015.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo, n. 31, p. 3559–1367, 2007.

DUNSTAN, C. A.; NOREEN, Y.; SERRANO, G.; et al. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 35–56, 1997.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. **Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision**. 2003.

EBRAHIMI, S. O.; REIISI, S.; SHAREEF, S. miRNAs, oxidative stress, and cancer: A comprehensive and updated review. **Journal of Cellular Physiology**, 1. Nov. 2020. Wiley-Liss Inc.

EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 1, p. 1–18, 2003.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**, v. 1391, n. April, p. 1379–1391, 2016.

ESPINO, M.; FERNÁNDEZ, M. DE LOS Á.; GOMEZ, F. J. V.; BOITEUX, J.; SILVA, M. F. Green analytical chemistry metrics: Towards a sustainable phenolics extraction from medicinal plants. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 438–443, 2018. Elsevier B.V.

FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Jambo — *Syzygium malaccense*. **Exotic Fruits Reference Guide**. p.245–249, 2018. Elsevier Inc.

FORESTER, S. C.; LAMBERT, J. D. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. **Molecular Nutrition and Food Research**, Jun. 2011.

FRESHNEY, R. I. II - Cytotoxicity. **Culture of Animal Cells (A Manual of Basic Technique)**. p.359–373, 2005.

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882–1891, 2010.

VAN GORKOM, G. N. Y.; LOOKERMANS, E. L.; VAN ELSEN, C. H. M. J.; BOS, G. M. J. The effect of vitamin C (Ascorbic acid) in the treatment of patients with cancer: A systematic review. **Nutrients**, 1. May 2019. MDPI AG.

GUPTA, R. K.; PATEL, A. K.; SHAH, N.; et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2014. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research**, v. 9, n. 1, p. 1–32, 1990.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 23. Mar. 2005.

HUANG, Q.; GAO, B.; WANG, L.; et al. Protective effects of myricitrin against osteoporosis via reducing reactive oxygen species and bone-resorbing cytokines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 280, n. 3, p. 550–560, 2014. Elsevier Inc.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005.

JACQUES-SILVA, M. C.; NOGUEIRA, C. W.; BROCH, L. C.; et al. Diphenyl Diselenide and Ascorbic Acid Changes Deposition of Selenium and Ascorbic Acid in Liver and Brain of Mice. **C Pharmacology & Toxicology**, v. 88, p. 119–125, 2001.

JAEGER, B. N.; PARYLAK, S. L.; GAGE, F. H. Molecular Aspects of Medicine Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation. **Molecular Aspects of Medicine**, 2017. Elsevier Ltd.

JUSTUS, C. R.; LEFFLER, N.; RUIZ-ECHEVARRIA, M.; YANG, L. V. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, 2014. Journal of Visualized Experiments.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013. Elsevier.

KATO, N. N.; STAVIS, V. K.; BOARETTO, A. G.; et al. Application of the metabolomics approach to the discovery of active compounds from Brazilian trees against resistant human melanoma cells. **Phytochemical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 992–1002, 2021. John Wiley and Sons Ltd.

KHORSANDI, K.; KIANMEHR, Z.; HOSSEINMARDI, Z.; HOSSEINZADEH, R. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, 2020. BioMed Central Ltd.

KIM, H. D.; JEONG, K. H.; JUNG, U. J.; KIM, S. R. Myricitrin Ameliorates 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Neuronal Loss in the Substantia Nigra of Mouse Brain. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 4, p. 374–382, 2016.

KUSUMAWATI, I.; INDRAYANTO, G. Natural antioxidants in cosmetics. **Studies in Natural Products Chemistry**. 1st ed., v. 40, p.485–505, 2013. Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

LO, C.; LAI, T. Y.; YANG, J. S.; et al. Gallic acid inhibits the migration and invasion of A375.S2 human melanoma cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and Ras. **Melanoma Research**, v. 21, n. 4, p. 267–273, 2011.

MANDAL, S. C.; MANDAL, V.; DAS, A. K. **Essentials of botanical extraction : principles and applications**. 2001.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MESSIAS, M. C. T. B.; MENEGATTO, M. F.; PRADO, A. C. C.; SANTOS, B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: Um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76–104, 2015.

METCALF, J. A.; GALLIN, J. I.; NAUSEEF, W. M.; ROOT, R. K. Myeloperoxidase functional assays. **Laboratory manual of neutrophil function**, 1986.

MEYER, E.; MORI, M. A.; CAMPOS, A. C.; et al. Myricitrin induces antidepressant-like effects and facilitates adult neurogenesis in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 59–65, 2017. Elsevier B.V.

MIURA, Y. H.; TOMITA, I.; WATANABE, T.; HIRAYAMA, T.; FUKUI, S. Active Oxigens Generation by Flavonoids. **Biol. Pharm. Bull.**, p. 93–96, 1998.

NOREEN, Y.; SERRANO, G.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 520–524, 1998.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues Thiobarbituric Acid Reaction, v. 358, p. 351–358, 1979.

OLDONI, T. L. C.; MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; et al. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 192, p. 306–312, 2016.

OLIVEIRA, A. C. DE; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiology and Biochemistry**, 1. Nov. 2019. Elsevier Masson SAS.

ORŠOLIĆ, N.; SKURIĆ, J.; CROSED D SIGNIKIĆ, D.; STANIĆ, G. Inhibitory effect of a propolis on Di-n-Propyl Disulfide or n-Hexyl salicylate-induced skin irritation, oxidative stress and inflammatory responses in mice. **Fitoterapia**, v. 93, p. 18–30, 2014.

PELINSON, L. P.; ASSMANN, C. E.; PALMA, T. V.; et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 2, p. 2085–2092, 2019. Springer Netherlands.

PHAM-HUY, L.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2008.

PRADHAN, S. J.; MISHRA, R.; SHARMA, P.; KUNDU, G. C. Quercetin and sulforaphane in combination suppress the progression of melanoma through the down-regulation of matrix metalloproteinase-9. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 6, p. 915–920, 2010.

PRASNIEWSKI, A.; DA SILVA, C.; AYRES, B. R. B.; et al. Characterization of phenolic compounds by UHPLC-QTOF-MS/MS and functional properties of *Syzygium malaccense* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 418–426, 2021.

RABEL, F.; SHERMA, J. Review of the state of the art of preparative thin-layer chromatography. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 25. Feb. 2017. Taylor and Francis Inc.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. **Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay**. 1999.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**. Wiley-VCH, 2003.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; QUIRANTES-PINÉ, R.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 246–254, 2015. Elsevier.

SAVI, A.; CALEGARI, M. A.; CALEGARI, G. C.; et al. Bioactive compounds from *syzygium malaccense* leaves: Optimization of the extraction process, biological and chemical characterization. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 42, n. 1, 2020. Eduem - Editora da Universidade Estadual de Maringá.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, p. 1–25, 2015.

SILVA, M. A. C. N. DA; COSTA, J. H.; PACHECO-FILL, T.; et al. Açai (*Euterpe oleracea* mart.) seed extract induces ROS production and cell death in mcf-7 breast cancer cell line. **Molecules**, v. 26, n. 12, 2021. MDPI AG.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

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

SOBEH, M.; ESMAT, A.; PETRUK, G.; et al. Phenolic compounds from *Syzygium jambos* (Myrtaceae) exhibit distinct antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 41, n. June 2017, p. 223–231, 2018. Elsevier.

SOLL, F.; TERNENT, C.; BERRY, I. M.; KUMARI, D.; MOORE, T. C. Quercetin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of B16 Melanoma Cells in Vitro. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 18, n. 6, p. 261–268, 2020. Mary Ann Liebert Inc.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook**. 1969.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015. Elsevier Ltd.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 593–606, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VARELA-RODRÍGUEZ, L.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V. I.; et al. Effect of gallic acid and myricetin on ovarian cancer models: A possible alternative antitumoral treatment. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, 2020. BioMed Central Ltd.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. DE F.; BENFATO, V. M. E M. DA S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

XU, Y.; XIN, Y.; DIAO, Y.; et al. Synergistic effects of apigenin and paclitaxel on apoptosis of cancer cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

YANG, B.; LIU, H.; YANG, J.; GUPTA, V. K.; JIANG, Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, n. March, p. 116–124, 2018. Elsevier.

ZENG, G.; LIU, J.; CHEN, H.; et al. Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells. **Oncology Reports**, v. 31, n. 6, p. 2713–2719, 2014. Spandidos Publications.