

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS  
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

**BRUNO HENRIQUE FONTOURA**

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DAS FOLHAS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ottonia*  
*corcovadensis***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PATO BRANCO**

**2023**

**BRUNO HENRIQUE FONTOURA**

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS  
FOLHAS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ottonia corcovadensis***

**STUDY OF THE CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF THE LEAVES AND ESSENTIAL OIL OF *Ottonia corcovadensis***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito final para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes  
Coorientadora: Dra. Ellen Cristina Perin

**PATO BRANCO**

**2023**



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.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Pato Branco



BRUNO HENRIQUE FONTOURA

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FOLHAS E DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE OTTONIA CORCOVADENSIS**

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: 31 de Julho de 2023

Dra. Solange Teresinha Carpes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Camila Diedrich, Doutorado - University Of Texas Southwestern Medical Center

Dra. Edenes Maria Schroll Loss, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Ellen Cristina Perin, Doutorado - Qualisan Consultoria

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 31/07/2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, familiares, amigos (ponto de apoio em diversos momentos), colegas (principalmente do grupo de pesquisa), professores do departamento de química e PPGTP – UTFPR pelo auxílio em diversos momentos dessa etapa, em especial ao Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima pela disposição em sempre auxiliar, minha orientadora Prof. Dra. Solange Teresinha Carpes por todos ensinamentos, auxílio, e paciência nesse trajeto e a minha coorientadora Dra. Ellen Cristina Perin pelos ensinamentos, auxílio e apoio incondicional em diversos momentos dessa jornada.

Obrigado a todos que fizeram parte desse momento de crescimento e aprendizado que foram esses dois anos de mestrado.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento mais  
evidente fica nossa ignorância”  
(John F. Kennedy)*

## RESUMO

A *Ottonia corcovadensis* é uma planta nativa do Brasil, bastante utilizada na medicina popular, conhecida popularmente como “João brandinho”. O objetivo desse trabalho foi otimizar as condições de extração e desenvolver um modelo quimiométrico preditivo utilizando imagens digitais para determinação da atividade antioxidante, antimicrobiana, citotoxicidade celular, estresse oxidativo do extrato etanoico e também do óleo essencial, assim como a sua composição química. Combinação dos fatores concentração de solvente, temperatura e tempo de extração foram realizadas e os resultados tratados pelo modelo linear generalizado (MLG), avaliado quanto ao teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP), atividade antimicrobiana (MIC e MBC), viabilidade celular (MTT), marcadores bioquímicos de estresse oxidativo. O modelo quimiométrico foi desenvolvido com a utilização do algoritmo Floresta Randômica (FR), utilizando as análises de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante DPPH. A melhor condição de extração foi a proporção 80/20% de etanol/água, a 80 °C em banho maria durante 120 min, a qual obteve resultado de 11,64 mg EAG g<sup>-1</sup> e 21,27 mg Trolox g<sup>-1</sup> para CFT e DPPH . O extrato não apresentou citotoxicidade celular e atividade antitumoral, nem alteração nos marcadores de estresse oxidativo e não apresentou atividade antimicrobiana. Para o óleo essencial foi possível identificar 38 compostos, sendo os majoritários foram *E*-sesquisabineno hidrato, *E*-cariofileno, β-pineno, *E*-β-farneseno, os quais apresentaram atividade antioxidante por ABTS e DPPH com valores de 2,88 e 6,26 mg Trolox g<sup>-1</sup> respectivamente, e CFT de 5,41 mg EAG g<sup>-1</sup>, também não apresentou citotoxicidade celular e apresentou atividade antitumoral nas concentrações de 62,50 e 250 µg mL<sup>-1</sup>, não foi identificada alterações dos marcadores de estresse oxidativo e apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* nas concentrações 10,46 e 2,61 µg mL<sup>-1</sup> testadas. Desta forma o extrato etanoico e óleo essencial pode ser considerado com potencial antioxidante, antimicrobiano não citotóxico e o óleo essencial apresenta potencial antitumoral.

Palavras chaves: *Ottonia corcovadensis*, Otimização de extração, atividade antioxidante, viabilidade celular, atividade antimicrobiana

## ABSTRACT

*Ottonia corcovadensis* is a plant native to Brazil, widely used in folk medicine, popularly known as “João brandinho”. The objective of this work was to optimize the extraction conditions and develop a predictive chemometric model using digital images to determine the antioxidant, antimicrobial, cellular cytotoxicity, oxidative stress of the ethanolic extract and also of the essential oil, as well as its chemical composition. a combination of the factors solvent concentration, temperature and extraction time were performed and the results treated by the generalized linear model (MLG), evaluated for the content of total phenolic compounds, antioxidant activity (ABTS, DPPH and FRAP), antimicrobial activity (MIC and MBC), cell viability (MTT), biochemical markers of oxidative stress. The chemometric model was developed using the random forest (RF) algorithm, using the analysis of total phenolic compounds (CFT) and DPPH antioxidant activity. The best extraction condition was the 80/20% ethanol/water ratio, at 80 °c in a water bath for 120 min, which obtained a result of 11.64 mg EAG g<sup>-1</sup> and 21.27 mg Trolox g<sup>-1</sup> for CFT and DPPH. the extract did not show cellular cytotoxicity and antitumor activity, nor change in oxidative stress markers and did not show antimicrobial activity. For the essential oil, it was possible to identify 38 compounds, the majority of which were *E*-sesquibabinene hydrate, *E*-caryophyllene, β-pinene, *E*-β-farnesene, which showed antioxidant activity by abts and dpph with values of 2.88 and 6 .26 mg trolox g<sup>-1</sup> respectively, and cft of 5.41 mg EAG g<sup>-1</sup>, also did not show cell cytotoxicity and showed antitumor activity at concentrations of 62.50 and 250 µg mL<sup>-1</sup>, no alterations in the markers of oxidative stress and showed antimicrobial activity against the microorganisms *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* at the concentrations 10.46 and 2.61 ug mL<sup>-1</sup> tested. In this way, the ethanolic extract and essential oil can be considered with antioxidant, non-cytotoxic antimicrobial potential and the essential oil has antitumor potential.

Keywords: *Ottonia corcovadensis*, extraction optimization, antioxidant activity, cell viability, antimicrobial activity

## LISTA DE FÍGURAS

Figura 1 - Estrutura química da quercetina, pertencente ao grupo dos flavonoides..	15
Figura 2 - Estrutura química da ácido gálico, pertencente ao grupo dos ácidos fenólicos .....	16
Figura 3 - Análise importância para o modelo utilizando imagens e análise de compostos fenólicos totais .....	43
Figura 4 - Análise importância para o modelo utilizando imagens e análise de atividade antioxidante pelo método DPPH .....	44
Figura 5 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para compostos fenólicos totais utilizando o algoritmo FR (Floresta Randômica).....	45
Figura 6 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para compostos fenólicos totais utilizando o algoritmo LKS (Lazy KStar) .....	46
Figura 7 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando o algoritmo FR (Floresta Randômica)....	47
Figura 8 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando o algoritmo RNA (Rede Neural Artificial) .....	47
Figura 9 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando o algoritmo MVS (Máquina de Vetor de Suporte) .....	48
Figura 10 - Viabilidade celular em células saudáveis de sangue periférico PBMCs tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado <i>Ottonia corcovadensis</i>	50
Figura 11 - Viabilidade celular em células tumorais SK-MEL-28 (melanoma cutâneo) tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado <i>Ottonia corcovadensis</i>	51



Figura 12 - Detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROS) tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	53
Figura 13 - Detecção de óxido nítrico (NOX) tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	54
Figura 14 - Níveis de tióis totais (PSH) (A) e tióis não proteicos (NPSH) (B) em células tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado <i>Ottonia corcovadensis</i>	55
Figura 15 - Viabilidade celular em células saudáveis de sangue periférico PBMCs .	65
Figura 16 - Viabilidade celular em células tumorais SK-MEL-28 (melanoma cutâneo) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial <i>Ottonia corcovadensis</i> ....	66
Figura 17 - Detecção de espécies reativas de oxigênio EROS (A) e detecção de óxido nítrico NOX (B) frente ao tratamento com óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> ..	68
Figura 18 - Níveis de tióis totais (PSH) (A) e tióis não proteicos (NPSH) (B) em células tratadas com diferentes concentrações de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Testes preliminares para determinar a melhor condição de extração .....	25
Tabela 2 – Tratamentos com as combinações dos fatores para otimização da extração dos compostos bioativos com potencial antioxidante em folhas de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	26
Tabela 3 - Condições de extração e resultados da otimização da extração de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante pelo método DPPH de folhas de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	37
Tabela 4 - Atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP da condição otimizada de extração de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	41
Tabela 5 - Resultados da atividade antimicrobiana com extrato de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	56
Tabela 6 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	61
Tabela 7 - Atividade antioxidante pelo método de redução do reagente de Folin-Ciocalteu e pelos métodos ABTS e DPPH do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	64
Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	70

## LISTA DE CIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilssulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
CFT	Compostos fenólicos totais
ML	Machine Learning (Aprendizado de máquina)
MLG	Modelo linear generalizado
FR	Floresta randômica
NOX	Óxido nítrico
PBMCs	Células saudáveis de sangue periférico
SK-MEL-28	Células tumorais de melanoma cutâneo Humano
PHS	Tióis proteicos
NPSH	Tióis não proteicos
EAG	Equivalente ácido gálico
EA Trolox	Equivalente Trolox

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>DELIMITAÇÃO DO PROJETO</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
	4.1 Objetivo geral .....	10
	4.2 Objetivos específicos .....	10
	Objetivos específicos .....	10
<b>5</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
	5.1 Radicais livres e estresse oxidativo .....	12
	5.2 Antioxidantes.....	13
	5.3 Metabolismo especializado.....	13
	5.3.1 Compostos fenólicos .....	14
	5.3.2 Alcaloides.....	16
	5.3.3 Terpenos.....	17
	5.3.4 Glicosilatos .....	18
	5.4 Atividade antimicrobiana.....	18
	5.5 <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	19
	5.6 Otimização de experimentos .....	20
	5.7 Modelo linear generalizado – mlg .....	21
	5.8 Aprendizagem de máquina – <i>machine learning</i> (ml).....	22
	5.9 Modelos quimiométricos .....	22
	5.10 Viabilidade celular (citotoxicidade) e parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo .....	23
<b>6</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
	6.1 obtenção do extrato de folhas de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	25
	6.2 Obtenção do óleo essencial.....	26
	6.3 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante .....	27
	6.3.1 Compostos fenólicos totais .....	27
	6.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS.....	27
	6.3.3 Atividade antioxidante pelo método DPPH .....	28
	6.3.4 Atividade antioxidante pelo método frap.....	28
	6.4 Caracterização química do óleo essencial .....	28
	6.5 Construção do modelo quimiométrico preditivo utilizando imagens digitais .....	29
	6.5.1 Análise estatística do conjunto de dados por meio de um modelo linear generalizado da otimização utilizando MLG.....	29
	6.5.2 Construção de modelos preditivos para validação da otimização de extração por aprendizado de máquina (ML) utilizando os algoritmos computacionais.....	29
	6.5.3 Construção do modelo quimiométrico por imagens .....	30
	6.6 Viabilidade celular e parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo .....	30
	6.6.1 Cultivo celular de células de melanoma humano SK-MEL-28 .....	30

6.6.2 Células mononucleares do sangue periférico (PBMCS) dos extratos etanoicos, óleo essencial e nanopartículas .....	31
6.6.3 Viabilidade celular por ensaio MTT dos extratos etanoicos e óleo essencial .....	32
6.6.4 Ensaios de estresse oxidativo dos extratos etanoicos e óleo essencial .....	32
6.7 Atividade antimicrobiana dos extratos etanoicos e óleo essencial.....	34
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>35</b>
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO 1.....</b>	<b>36</b>
7.1 Otimização das condições de extração utilizando Modelo Linear Generalizado – MLG, utilizando como resposta compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante pelo método DPPH.....	36
7.2 Modelagem quimiométrica preditiva utilizando imagens digitais e algoritmos computacionais de Leitura de Máquina (LM). .....	42
7.3 Viabilidade celular e parâmetros bioquímicos .....	49
7.3.1 Citotoxicidade do extrato etanoico otimizado de <i>Ottonia corcovadensis</i> em células mononucleares de sangue periférico – PBMCs .....	49
7.3.2 Viabilidade celular do extrato etanoico otimizado de <i>Ottonia corcovadensis</i> em células de tumorais (SK-MEL-28) de melanoma cutâneo.....	50
7.3.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROS) testadas frente as concentrações do extrato etanoico otimizado de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	52
7.3.4 Detecção de óxido nítrico (NOX) testadas frente as concentrações do extrato etanoico otimizado de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	53
7.3.5 Níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH) testadas frente as concentrações do extrato etanoico otimizado de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	55
7.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanoico de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	56
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>58</b>
<b>8. RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO 2.....</b>	<b>59</b>
8.1 Identificação dos compostos químicos do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas .....	59
8.2 Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	63
8.3 Viabilidade celular e parâmetros bioquímicos .....	64
8.3.1 Citotoxicidade do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> em células mononucleares de sangue periférico – PBMCs .....	65
8.3.2 Viabilidade celular do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> em células tumorais (SK-MEL-28) de melanoma cutâneo.....	65
8.3.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROS) e óxido nítrico (NOX) testadas frente as concentrações do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	67
8.3.4 Níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH) testadas frente as concentrações do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	68
8.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Ottonia corcovadensis</i> .....	69
<b>9. CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Ottonia corcovadensis* é uma planta da família das Piperáceas, conhecida popularmente como João Brandinho, e é encontrada geralmente em regiões tropicais, mais especificamente nas regiões norte e nordeste do Brasil. É utilizada empiricamente no tratamento de gripes, resfriados e tosse e possui propriedades anestésicas. Essa planta também é utilizada no tratamento para aliviar a dor de dente (DA SILVA *et al.*, 2016).

O uso da planta na medicina popular por indígenas e ribeirinhos da Floresta Amazônica vem despertando interesse de pesquisadores e cientistas, uma vez que os dados de sua bioatividade e caracterização química são escassos.

De modo geral, a conhecida bioatividade dos compostos oriundos do metabolismo especializado é necessária para garantir a sobrevivência e perpetuação da espécie (MATSUURA *et al.*, 2018). Esses compostos podem ser classificados em compostos fenólicos, terpenos, alcaloides e glicosinolatos (DA HORA *et al.*, 2021).

Além das funções específicas de defesa nas plantas, esses compostos apresentam potencial antioxidante, capazes de inibir a ação dos radicais livres, reduzindo os efeitos ocasionados pelo estresse oxidativo (SIHAG *et al.*, 2022). Estudos comprovam que o desequilíbrio na produção de radicais livres pode ser o ponto de partida para o desenvolvimento de algumas doenças degenerativas e pode estar relacionado com o desenvolvimento de células tumorais (VASCONCELOS *et al.*, 2019).

Os compostos oriundos do metabolismo especializado das plantas podem ter atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana. Nesse último caso, os compostos podem agir como agente bacteriostático e até mesmo bactericida (CHIOCCHIO *et al.*, 2021; DURAZZO *et al.*, 2019).

A extração eficiente dos compostos bioativos é de grande importância em pesquisas nas áreas alimentícia e farmacêutica. De fato, a otimização das condições de extração dos compostos, como determinar a melhor forma de extração, com o melhor tempo, melhor temperatura e o melhor tipo de solvente é peça chave para obter extratos com uma maior disponibilidade de compostos de interesse (QIU *et al.*, 2022).

Neste sentido, os modelos de extração e tratamento de dados podem ser uma peça fundamental na pesquisa, trazendo maior confiabilidade nos dados obtidos. Modelos de tratamentos de dados como Modelo Linear Generalizado - MLG, ajudam a encontrar as melhores condições de tratamento de dados, enquanto o uso de algoritmos de Machine Learning - ML garante a validação mais precisa quanto aos dados obtidos (QIN *et al.*, 2015).

Modelos utilizando outras abordagens também podem ser desenvolvidos a partir dos dados obtidos. É possível desenvolver modelos quimiométricos utilizando imagens digitais, com o uso de um aparelho celular e de algoritmos computacionais, onde tempo e recursos podem ser poupados (TAHIR *et al.*, 2017).

Nesse sentido, essa dissertação foi realizada pela interação entre diversas ferramentas de análises químicas e biológicas realizadas em diferentes instituições posteriormente aqui descritas. O estudo se deu em função de se tratar de uma planta medicinal de uso empírico com pouco embasamento científico na literatura e que apresenta potencial antioxidante dentre outras propriedades aqui abordadas.

Para que as hipóteses (escritas a seguir) fossem testadas, inicialmente se fez necessário a realização de estudo para otimizar as condições de extração para obtenção de um extrato efetivo, capaz de quantificação de suas propriedades biológicas (antioxidantes, antimicrobiana)

Além disso, pensando em utilizar uma abordagem mais rápida na quantificação de compostos com potencial antioxidante, foi aqui estudado um modelo quimiométrico para tal utilizando diferentes ferramentas estatísticas.

Sendo assim, com extrato das folhas do modelo estudo e óleo essencial comumente utilizado da planta, ambas foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante, antimicrobiano, citotoxicidade e propriedade antitumoral, frente a células saudáveis de sangue periférico (PBMCs) e células tumorais de melanoma cutâneo humano (SK-MEL-28). Por fim, o óleo essencial foi também avaliado para identificação de metabólitos com tais propriedades.

## 2 DELIMITAÇÃO DO PROJETO

A crescente procura por produtos saudáveis e tecnologias adequadas na área de processamento de alimentos, fármacos e cosméticos fez alavancar o interesse em pesquisas científicas para descobrir biomoléculas a partir de plantas com potencial antioxidante com a finalidade de substituir os antioxidantes sintéticos comuns por antioxidantes naturais (FADIL *et al.*, 2022).

Compostos oriundos do metabolismo especializado das plantas apresentam atividade antioxidante que, além de inibir os radicais livres, são capazes de reduzir a oxidação lipídica, inibir a atividade microbiana e tumoral (CAKMAKCI *et al.*, 2015; HUANG; DUDAREVA, 2023). Dessa forma, se faz necessária a busca pela obtenção de extratos otimizados, com maior disponibilidade de compostos com potencial antioxidante biológico para posterior aplicação (JOVANOVIĆ *et al.*, 2023)

Deste modo, no presente trabalho foi realizada a otimização das condições de extração dos compostos fenólicos com potencial antioxidante, antimicrobiano e viabilidade de células saudáveis e tumorais do extrato etanoico e do óleo essencial das folhas da *Ottonia corcovadensis*, bem como a construção de modelo quimiométrico com a finalidade da construção de um modelo preditivo utilizando imagens digitais e algoritmos computacionais com a capacidade de prever a composição fenólica e atividade antioxidante dos extratos.



### 3 HIPÓTESES

- A otimização das condições de extração é capaz de obter um extrato eficiente, de rápida obtenção com disponibilidade de compostos das folhas de *Ottonia corcovadensis*,
- Utilizar abordagem preditiva possibilita uma rápida caracterização quantitativa dos compostos fenólicos e com potencial antioxidantes presentes nas folhas da planta, através de um modelo quimiométrico utilizando imagens digitais, com baixo custo operacional, ao contrário das abordagens antioxidantes tradicionais.
- Compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante das folhas e do óleo essencial da *Ottonia corcovadensis* apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana, citotoxicidade celular ausente, diminuição da viabilidade celular de células tumorais e melhora dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e defesa endógena intracelular.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Objetivo geral estudo 1: Realizar a obtenção de um extrato otimizado quanto as condições de extração e sugerir um modelo preditivo de quantificação de compostos antioxidantes nas folhas de *Ottonia corcovadensis*.

Objetivo geral estudo 1 parte 2: Avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano, citotoxicidade celular em células saudáveis, atividade antitumoral, marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e defesas antioxidantes endógenas do extrato etanoico otimizado de *Ottonia corcovadensis*.

Objetivo geral estudo 2: Avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano, toxicidade em células saudáveis, atividade antitumoral, marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e defesas antioxidantes endógenas do óleo essencial da *Ottonia corcovadensis*.

### 4.2 Objetivos específicos

Objetivos específicos

- Realizar combinações dos fatores tempo de extração, concentração de solvente (% etanol/água) e temperatura de extração para obter um extrato com maior disponibilidade de compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante dentre os fatores testados;
- Utilização de Modelo Linear Generalizado (MLG) para tratamento estatístico dos dados com a finalidade de obter como resposta qual dos tratamentos possui melhor resposta, em relação a compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH, e a identificação de diferenças significativas entre as respostas obtidas.
- Obtenção de um modelo preditivo com uso de imagens digitais, obtidas com a câmera de um smartphone, com baixo custo de operação com a finalidade de

prever de forma quantitativa os teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidantes dos extratos obtidos;

- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP do óleo essencial e quantificar a atividade antioxidante do extrato com maior disponibilidade por meio dos métodos ABTS e FRAP;
- Determinação na concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima frente aos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* do extrato otimizado e do óleo essencial;
- Realizar a análise de viabilidade celular (citotoxicidade) do extrato otimizado e do óleo essencial, com a utilização de células saudáveis (PBMCs) e células tumorais (SK-MEL-28);
- Avaliação dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo (EROS e NOX) e atividade antioxidante endógenas tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH);
- Caracterização química do óleo essencial por CG/EM.

## 5 REFERENCIAL TEÓRICO

### 5.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Radical livre é uma molécula com um elétron faltante, que pode prover grande reatividade. Na busca por estabilidade, os radicais livres são capazes de retirar elétrons de estruturas que estão próximas (WANG, X. Q. *et al.*, 2021). Os radicais livres são produzidos de forma natural pelas mitocôndrias, através do processo inacabado de oxidação do oxigênio em células aeróbias, o que é algo importante para a sobrevivência das espécies (REZAEI ZONOOZ *et al.*, 2021).

Porém, as espécies reativas de oxigênio (EROS) podem causar disfunções da cadeia respiratória, causando danos ao DNA mitocondrial, o que pode gerar um ciclo vicioso, causando danos em toda a célula. Essas mutações podem se acumular ao longo do tempo (BELENGUER-VAREA *et al.*, 2020), levando ao surgimento de diversas doenças.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) compreendem um grupo de moléculas compostas por radicais livres como: OH (hidroxila),  $O_2^-$  (superóxido),  $ONOO^-$  (peroxidonitrito) e moléculas não radicalares como o  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio), peroxila (ROO), ácido hipocloroso (HOCl), nitritos ( $NO_2^-$ ), ácido nitroso ( $N_2CO_3$ ) e nitratos ( $NO_3^-$ ) (LIN *et al.*, 2021; LOSADA-BARREIRO; BRAVO-DÍAZ, 2017).

O desequilíbrio entre a produção e a estabilização de EROS e ERN leva ao estresse oxidativo, onde fatores exógenos como poluição, radiação, dieta e estilo de vida (WEN *et al.*, 2021) podem desencadear esse processo. O estresse oxidativo leva ao acúmulo de moléculas radicalares que podem causar danos aos componentes celulares (lipídeos, proteínas, DNA), levando ao aparecimento de e doenças intestinais, cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (WANG *et al.*, 2020).

A estabilização dos radicais livres pelos organismos é realizada por sistemas antioxidantes endógenos, que podem ser sistemas não enzimáticos e enzimáticos. São mecanismos de controle celular positivo, fazendo com que haja concentração menor de radicais livres nas células (MAYA-CANO *et al.*, 2021).

## 5.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos capazes de inibir ou reduzir a ação dos radicais livres e do estresse oxidativo através de reações de oxirredução, isto é, doações de elétrons e hidrogênios. Essa doação de elétrons faz com que os radicais livres, que são moléculas com um elétron faltante, sejam estabilizados, diminuindo assim a sua reatividade (GULCIN, 2020). Os antioxidantes podem ser endógenos, produzidos pelo próprio organismo, ou exógenos, que são obtidos por meio da alimentação. Os antioxidantes endógenos são responsáveis, entre outras funções, por neutralizar os radicais livres (endógenos e exógenos), quando este sistema está em equilíbrio dinâmico (KIM *et al.*, 2021).

Os antioxidantes endógenos são principalmente constituídos por sistemas enzimáticos, como: superóxido dismutase, peroxidase, catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e tioredoxinas redutases (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA *et al.*, 2018). Esses compostos são capazes de proteger as células e tecidos (RAMOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2021).

Quando o sistema antioxidante endógeno não é capaz de estabilizar todos os radicais livres produzidos ou mesmo adquiridos, é preciso realizar a suplementação através de antioxidantes exógenos, que são sistemas na maioria não enzimáticos, obtidos através da alimentação (MEI *et al.*, 2020).

Os antioxidantes exógenos podem ser obtidos através do consumo diário de frutas, verduras e legumes, que são ricos majoritariamente em compostos oriundos do metabolismo especializado das plantas (DA HORA *et al.*, 2021). Dentre os compostos presentes no metabolismo especializado das plantas, podemos destacar os compostos fenólicos, associados à benefícios a saúde quando consumidos regularmente (TULADHAR *et al.*, 2021).

O consumo de vitaminas e minerais, também podem trazer benefícios à saúde, combatendo doenças degenerativas e crônicas causadas por radicais livres, além de regular as funções do organismo (CHIOCCHIO *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2021).

## 5.3 Metabolismo especializado

As plantas possuem dois tipos de metabolismo, o metabolismo primário e o especializado (anteriormente chamado de secundário), ambos são essenciais para a

existência da planta. O metabolismo primário é responsável pela biossíntese de amino ácidos, carboidratos, ácidos graxos, lipídeos e proteínas, moléculas essenciais para garantir a vida da própria planta (NAKABAYASHI; SAITO, 2020) .

Já o metabolismo especializado, tão importante quanto o primário, é essencial para garantir a sobrevivência da planta. Os metabólitos especializados são originados por meio metabolismo primário, os compostos especializados são responsáveis pelo bom funcionamento das funções dos metabólitos primários, como regulação de temperatura, disponibilidade de água, perpetuação da espécie etc. (COLINAS; FITZPATRICK, 2022).

Estima-se que existam mais de 200.000 compostos diferentes façam parte do metabolismo especializado (KANSTRUP; NOUR-ELDIN, 2022). A biossíntese destes compostos é estimulada em situações de estresse, como alta e baixa temperatura, baixa ou alta incidência de luz, ataque de herbívoros e de patógenos (MURPHY; ZERBE, 2020). Além disso, os metabólitos especializados possuem outras funções, como a pigmentação, atração de agentes polinizadores, regulação de funções essenciais e sinalização de situações de estresse (WONG *et al.*, 2023; ZHOU; JANDER, 2021).

Situações de estresse aplicadas em plantas podem ser utilizadas para que sejam produzidos produtos com características químicas desejadas, sendo que a planta pode responder as situações de estresse com a biossíntese de compostos, moldando assim sua composição, crescimento e produção de sementes (ZENG *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos (CARRASCO-SANDOVAL *et al.*, 2021), os terpenos (HU, T. *et al.*, 2021), alcaloides (DUAN *et al.*, 2022) e glicosinolatos (GOHAIN *et al.*, 2021) são as principais classes de compostos oriundos do metabolismo especializado.

### 5.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos formam o grupo de metabólitos mais abundantes e sua estrutura é composta de um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxilas (AKOMENG; ADUSEI, 2021). Podem ser classificados em fenóis

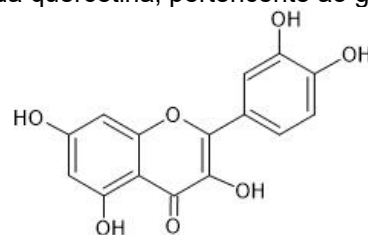
simples (ácidos fenólicos) e polifenóis (flavonoides) (CARRASCO-SANDOVAL *et al.*, 2021).

Este grupo pode ser constituído de moléculas simples como é o caso dos ácidos fenólicos até moléculas com alto grau de polimerização como os taninos, que podem ser encontrados de forma livre, ou ligados a açúcares e proteínas (SUO *et al.*, 2022).

A biossíntese dos compostos fenólicos pode ocorrer principalmente por três vias metabólicas como as vias dos ácidos chiquímico, malônico e cinâmico (WANG, W. *et al.*, 2022). A rota depende do composto envolvido, sendo que o mesmo pode ser sintetizado por uma rota ou por duas rotas em colaboração, como é o caso dos flavonoides, onde o anel A é biossintetizado pela via do ácido chiquímico e o anel B pela via do ácido malônico (COLINAS; FITZPATRICK, 2022; ROSENKRANZ *et al.*, 2021).

Os flavonoides (Figura 1) constituem um dos mais importantes e diversificados grupos de metabólitos do reino vegetal, com aproximadamente 9000 moléculas relatadas (IQBAL *et al.*, 2022; MANJESH *et al.*, 2022; YUAN *et al.*, 2024). Os flavonoides podem ser classificados em subgrupos como flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonóis, flavonóis e antiocianidinas (LONG *et al.*, 2023).

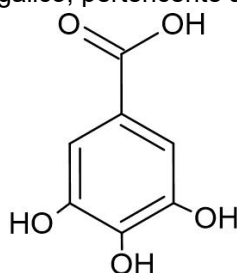
Figura 1 - Estrutura química da quercetina, pertencente ao grupo dos flavonoides



Fonte: Autoria própria, 2023.

Já os ácidos fenólicos (Figura 2), de estrutura mais simples que os flavonoides, podem ser classificados em outros dois subgrupos: ácidos hidrobenzóicos e ácidos hidrocínâmicos (WU *et al.*, 2022).

Figura 2 - Estrutura química da ácido gálico, pertencente ao grupo dos ácidos fenólicos



Fonte: Autoria própria, 2023.

Os taninos são compostos fenólicos que possuem de média a alta massa molecular e são classificados em dois subgrupos, os taninos condensados e os hidrolisáveis (VERA; URBANO, 2021). Os taninos hidrolisáveis são ésteres de polifenóis, ligados a hexoses e podem ser classificados de acordo com sua estrutura em galotaninos e elagitaninos (YANG *et al.*, 2023). Já os taninos condensados podem apresentar peso molecular variável, podendo ser polímeros de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Podem ser encontrados na forma livre e/ou ligados a proteínas e fibras (RIRA *et al.*, 2022).

As cumarinas são compostos que podem ser encontrados na natureza na forma livres e/ou ligados a outras estruturas, possuindo em torno de 3560 compostos relatados (AKWU *et al.*, 2023). Geralmente, as cumarinas são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico, são derivadas dos ácidos chiquimico e cinâmico e podem ser classificadas em quatro subclasses: cumarina simples, furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas substituídas no anel de lactona (TAVARES; LIMA, 2021).

### 5.3.2 Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos geralmente caracterizados pela presença de um átomo de nitrogênio em sua estrutura, anteriormente chamados de compostos nitrogenados (MORA-VÁSQUEZ *et al.*, 2022). Este átomo de nitrogênio pode ser oriundo de aminoácidos que em sua forma cíclica dá origem a estrutura fundamental dos alcaloides, mas também pode ser originado a partir de terpenóides e esteróides (SIVAKUMAR *et al.*, 2022).

Nas plantas, esses compostos podem desempenhar funções de proteção contra insetos, patógenos e fotoproteção. Esses compostos podem desempenhar



importante funções na farmacologia com o desenvolvimento de produtos para consumo humano (WANG, H. *et al.*, 2022).

### 5.3.3 Terpenos

Os terpenos são uma classe de metabólitos caracterizados por grandes estruturas orgânicas voláteis, os hidrocarbonetos (SORVARI; HARTIKAINEN, 2021). Podem ser classificados de acordo com seus números de carbonos: monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>) e de acordo com os elementos ligados em sua estrutura. São biossintetizados através do isopentenil difosfato (IPP) e do dimetilalil pirofostato (DMAPP) que são produzidos a partir da via do mevalonato (HU, T. *et al.*, 2021; ZHOU; PICHERSKY, 2020).

Nas plantas, os terpenos são de grande importância na defesa contra agentes bióticos e patógenos como fungos, vírus e bactérias, também na defesa contra o ataque de insetos herbívoros (KIM *et al.*, 2023). Os terpenos possuem grande importância na indústria para desenvolvimento de cosméticos, perfumes e óleos essenciais (DHANDAPANI *et al.*, 2020).

#### 5.3.3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos derivados do metabolismo especializado das plantas (JOSEPH *et al.*, 2023). A sua composição é bastante variada podendo conter terpenos (monoterpenos (C<sub>10</sub>) e sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) e diterpenos (C<sub>20</sub>), terpenóides (isoprenóides) e compostos aromáticos como aldeídos e álcoois (CALO *et al.*, 2015).

Estudos relacionam óleos essenciais com propriedades antioxidante (MAT SAAD *et al.*, 2021), antimicrobiana (MEENU *et al.*, 2023), antitumoral (YI *et al.*, 2022), inseticida (LI *et al.*, 2021), antifúngica e antidiabéticas (CHANDER *et al.*, 2022). Também é relatado uso para tratamentos de saúde e terapêuticas na medicina popular (AL-ABRI *et al.*, 2022). As propriedades do compostos presentes nos óleos essenciais das plantas têm sido atribuídas aos seus compostos terpenóides, carotenóides e fenólicos (BALAHBIB *et al.*, 2021; BRAGA *et al.*, 2021).

#### 5.3.4 Glicosilatonatos

Os glicosinolonatos são metabólitos geralmente encontrados nas hortaliças da família Brassicaceae (couve, brócolis, repolho, rúcula, rabanete) e consistem de um  $\beta$ -D-tioglicosideo ligado a um átomo de enxofre com uma cadeia lateral variada, geralmente derivada de um aminoácido (ALMUSHAYTI *et al.*, 2021).

Podem ser classificados de acordo com seu aminoácido precursor em três tipos: glicosinolonatos alifáticos, indólicos e aromáticos, que são derivadas dos aminoácidos metionina, triptofano e fenilalanina respectivamente (LI, Y. *et al.*, 2021).

Sua principal função nas plantas é a defesa contra herbívoros (CASAJÚS *et al.*, 2021) e podem ter funções anticancerígenas por conta da presença de sulfurafano, antioxidante e também antimicrobiana, sendo a capacidade de inibir ou agir como bactericida contra microrganismos (GOHAIN *et al.*, 2021).

#### 5.4 Atividade antimicrobiana

A presença de microrganismos faz com que haja um equilíbrio ecológico, sendo que são de grande importância para a saúde dos seres humanos e animais, tratamento de doenças, produção de alimentos e fixação de nutrientes nas plantas (CUI *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2022).

Podem degradar matéria orgânica como alimentos não consumidos e material fecal, mas também auxiliam na degradação de materiais inorgânicos como amônia, nitritos e materiais sulfurados (KHANJANI *et al.*, 2022).

Os principais grupos de microrganismos são os fungos (GEERS *et al.*, 2022), vírus (KOONIN *et al.*, 2022), protozoários (ATAKORAH *et al.*, 2022), microalgas (KHANRA *et al.*, 2022) e as bactérias (SHETTY; VARSHNEY, 2021).

As bactérias são seres unicelulares, procariontes, que pertencem ao reino monera (KOWALLIK; MARTIN, 2021). Estão presentes no ar (ZHONG; XIONG, 2021), água (MANOLI *et al.*, 2022), solo (DIN *et al.*, 2021), no organismo de seres humanos e animais (CABRAL *et al.*, 2022).

São classificadas quanto a espessura de sua parede celular, as gram-positivas tem a capacidade de reter o corante quando submetidas ao teste coloração de gram, sua parede celular é composta quase exclusivamente de uma camada espessa de peptidoglicano (20-80 nm), fazendo com que sua estrutura seja mais resistente,

diferentemente das gram-negativas que não retem o corante quando submetidas ao teste de gram, sua membrana celular é mais complexa, menos espessa (<10 nm) quanto a camada de peptidoglicano (VARGHESE; BALACHANDRAN, 2021).

Fato esse que tem se mostrado um diferencial no uso de substâncias como agente antimicrobianos frente a bactérias patogênicas e no uso de bactérias de interesse na indústria alimentícia (SHANMUGASUNDARASAMY *et al.*, 2022).

As bactérias também são usadas na produção de alimentos como iogurtes (BASHIR MIR *et al.*, 2021), queijos (LOPES *et al.*, 2021), carnes fermentadas (RAZAVIZADEH *et al.*, 2022) e vegetais fermentados (OKEKE *et al.*, 2021). Os alimentos fermentados auxiliam na digestibilidade, imunidade, nutrição (MALEKE *et al.*, 2021), além de trazer uma gama de características sensoriais como sabores e odores (ZHANG *et al.*, 2022).

Porem, existem bactérias causadoras de contaminações em alimentos que levam a doenças em seres humanos e animais, tais como *Salmonella typhimurium* (RAZA *et al.*, 2021), *Escherichia coli* (AWOSILE *et al.*, 2022), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, entre outras (RIU; GIUSSANI, 2020).

A capacidade antimicrobiana de um extrato é baseada na capacidade de proliferação do microrganismo, o qual pode ter sua atividade inibida ou barreira celular rompida pelo extrato causando morte celular. Entre as principais técnicas utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana pode-se citar difusão em disco, diluição em caldo ou ágar e microdiluição em caldo (CONSTANTE *et al.*, 2022).

Uma alternativa para o controle microbiano de patógenos em alimentos é a atualização de extratos de plantas, que além de atividade antioxidante, podem apresentar atividade antimicrobiana, auxiliando no controle de contaminações e na incidência de patologias alimentares (HEMEG *et al.*, 2020).

### 5.5 *Ottonia corcovadensis*

A *Ottonia corcovadensis* é uma planta encontrada em regiões de florestas tropicais no norte e nordeste do Brasil, bastante difundida em regiões cobertas pela floresta amazônica (FACUNDO *et al.*, 2004). É pertencente à família das Piperáceas, que possui mais de 4000 espécies distribuídas em 5 gêneros. A *Ottonia corcovadensis* pertence ao gênero Piper (*Piper Corcovadensis*), maior gênero da família das Piperáceas (DA SILVA *et al.*, 2016).

Conhecida popularmente como João Brandinho e Falso Jaborandi, é utilizada na medicina popular para tratamento de gripes, resfriados, tosses, reumatismo, insônia, e reconhecida por suas propriedades anestésicas, sendo usada para dor de dente (FERNANDEZ *et al.*, 2019).

Estudos realizados por Costa e Mors (1981) indicam que os gênero Piper é rico em amidas e que a função anestésica atribuída a *Ottonia corcovadensis* pode ser oriunda da amida piperovatina.

Pesquisas vêm sendo realizadas evidenciando uso desta planta para tratamento de tuberculose e função larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (DE LIRA PIMENTEL *et al.*, 2022; FERNANDEZ *et al.*, 2020).

Além disso, alguns compostos foram identificados no óleo essencial das folhas por Facundo *et al.*, (2004) entre os majoritários então *trans*-cariofileno (13,6%), Limoneno (12,7%), *epi*-biciclosesquifelandreno (10,3%), bibiclogermanocreno (7,9%) e felandreno (7,8%), entre outros compostos em menor quantidade.

Entretanto, a literatura ainda se encontra escassa em relação a caracterização química e testes biológicos quanto a *Ottonia corcovadensis*. Deste modo, pesquisas científicas por extrato etanoico e óleo essencial devem ser conduzidas para enriquecer a literatura e elucidar os benefícios desta planta para as indústrias de alimentos e farmacêutica.

Em estudos realizados por Albuquerque *et al.*, (2022), foi observada a necessidade da otimização das condições de extração para que haja uma melhor disponibilidade dos compostos para a realização de testes e caracterizações, também ainda é ausente na literatura estudo dos constituintes químicos presente nas folhas da *Ottonia corcovadensis*.

## 5.6 Otimização de experimentos

A otimização das condições de extração é peça chave em experimentos, sendo que ao encontrar as condições ideais, há maior disponibilidade dos compostos, trazendo melhores resultados nas análises que podem vir a ser realizadas (RAIS *et al.*, 2020; YUSUFF, 2021).

Na otimização de extratos, diferentes fatores podem ser otimizados para que sua influência e interação com outros fatores possam ser estudadas. Dependendo da matriz de estudo, fatores como pH, polaridade de solventes, temperatura, tempo de

extração, agitação por ultrassom, entre outros podem ser variados (VERA-CANDIOTI *et al.*, 2021).

De acordo com Chew *et al.*, (2011), os fatores que mais influenciam a extração de compostos bioativos são concentração de solvente, temperatura e tempo de extração. Aliado a influência e interação de fatores, ferramentas estatísticas são utilizadas para melhorar e validar os dados referentes à otimização. Podemos citar, por exemplo, planejamentos experimentais do composto central rotacional (GUALBERTO *et al.*, 2022), fatorial fracionado (BRUNO SIEWE *et al.*, 2021) e Box-Behnken (RAIS *et al.*, 2020). Além dos exemplos já citados, outras ferramentas estatísticas podem ser utilizadas com a finalidade de investigar as respostas obtidas em uma otimização, tais como o MGL (LIU *et al.*, 2022).

## 5.7 Modelo linear generalizado – MLG

O Modelo Linear Generalizado é um modelo de regressão onde pode haver uma flexibilidade de aceitação de dados, podendo estes não serem dados normais. É realizada uma generalização da regressão linear, permitindo que a amplitude da variância seja uma função de valor predito (LEE *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021).

O MLG difere do modelo linear clássico em dois aspectos principais: a resposta pode ser de origem exponencial (heterocedástica) ou estar linearmente relacionada às variáveis explicativas (ADESINA *et al.*, 2021; CARRIZOSA *et al.*, 2021).

Na classificação de dados, podemos citar a classificação de hidrocarbonetos (WANG, Y. *et al.*, 2021), previsão de risco epidemiológico (MUDELE *et al.*, 2021), previsões meteorológicas (CHANDLER, 2020) entre outras áreas do conhecimento. Entretanto, no tratamento de dados de pesquisa na área de alimentos a literatura ainda é escassa.

Além de abordagens de tratamento e classificação de dados, outros métodos podem ser utilizados, como o método de aprendizagem de máquina (*machine learning* - ML) para garantir maior confiabilidade dos resultados (TIAN *et al.*, 2022).

## 5.8 Aprendizagem de máquina – *Machine Learning* (ML)

A técnica de ML é uma ferramentas de inteligência artificial de investigação e obtenção de dados, onde um algoritmo computacional cria um modelo esperado a partir do treinamento de parte dos dados cedidos (OLDONI *et al.*, 2022). Com o restante dos dados, é criado um modelo de validação para o mesmo conjunto de dados (KUMBHAR *et al.*, 2021).

Cada conjunto de dados pode se ajustar de forma diferente, de acordo com o algoritmo utilizado para a análise de dados (YERLIKAYA; BAHTIYAR, 2022). A Floresta Randômica (FR) é um algoritmo onde são elaboradas árvores de decisão para regressão e classificação (MA *et al.*, 2023).

É construído através de subconjuntos de dados, formados aleatoriamente, com dados observados (experimental) e preditos (modelo desenvolvido pelo algoritmo), separados em dados de treinamento e validação (SAHA *et al.*, 2022; SIRCAR *et al.*, 2021). O algoritmo FR é capaz de melhorar a precisão preditiva de dados através da validação cruzada entre os dados preditos e observados do modelo de validação e treinamento (EL BOUCHEFRY; DE SOUZA, 2020).

Estudo anteriores já foram efetuados utilizado ML para predição de compostos oriundos do metabolismo especializado da planta *Bertholletia excelsa*, o qual apresentou resultados promissores, dentro dos padrões de avaliação dos modelos (RMSEC, RPD e  $R^2$ ) na utilização do algoritmo FR, garantindo um modelo preditivo seguro (FONTOURA *et al.*, 2023).

Assim como os modelos desenvolvidos por ML, a quimiometria é capaz de gerar modelos preditivos de baixo custo operacional e fácil aplicação, gerando dados confiáveis para aplicação nas diversas áreas do conhecimento.

## 5.9 Modelos quimiométricos

Os modelos quimiométricos buscam obter uma função matemática que relaciona os resultados químicos e espectrais (CHEN *et al.*, 2020). O modelo gerado é capaz de correlacionar os dados preditos pelo modelo com os observáveis obtidos experimentalmente, podendo sua precisão ser avaliada através do coeficiente de correlação e cálculos de erros (WANG, C. *et al.*, 2021).

Modelos quimiométricos podem ser utilizados na pesquisa de alimentos, na otimização da extração de compostos bioativos, sendo uma ferramenta de predição de compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante (RANAWEERA *et al.*, 2021), micronutrientes (HU, N. *et al.*, 2021), características sensoriais (LI, X. *et al.*, 2021), entre outros.

Também, é possível gerar modelos quimiométricos com uso de imagens digitais, onde os padrões de cores RGB são extraídos e a partir desses canais de cores é desenvolvido um modelo predito que pode ser correlacionado com dados observados experimentalmente (NGUYEN *et al.*, 2021; QIU *et al.*, 2021; SABZI *et al.*, 2021).

Pesquisas utilizando quimiometria por imagens já vem sendo realizadas com plantas, obtendo-se resultados promissores. O trabalho realizado com a planta *Calycophyllum spruceanum* (PERIN *et al.*, 2020a) otimizou a extração e o desenvolvimento de um modelo quimiométrico robusto e confiável e com reprodutibilidade para predizer teores de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidantes.

#### 5.10 Viabilidade celular (citotoxicidade) e parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo

A viabilidade celular é a capacidade de medir a quantidade de células viáveis presentes antes e após a aplicação de agentes de estudo (extratos e óleos essenciais por exemplo), através da alteração do metabolismo celular. Também pode ser chamada de citotoxicidade, é capaz de alterar o metabolismo de células saudáveis e ou doentes (tumerais), causando morte celular (ZHANG *et al.*, 2023).

Entre os métodos mais utilizados, estão o ensaio da sulforrodamina B (SRB), de liberação de lactato desidrogenase (LDH), que mede a liberação de enzimas celulares como resultado da perda da integridade da membrana, de exclusão de corante Azul de Tripán ou Iodeto de Propídio e de redução do composto MTT (brometo de 3-(4,50dimetil-2-tiazoli) -2,5-difenil-2H-tetrazólio). Neste último, o MTT é reduzido por meio da liberação de enzimas (oxidorreduzases e desidrogenases) pelas células quando expostas a ambientes tóxicos (ABEL; BAIRD, 2018).

O estresse oxidativo é o acúmulo exagerado de espécies radicalares que podem trazer danos oxidativos, entre elas podemos citar as espécies reativas de

oxigênio (ROS), que são heteromoléculas e espécies radicalares que estão bastante envolvidas em processos celulares normais (processos de imunidade imediata e defesa), quando sua produção está em equilíbrio com os processos de defesa celular endógenos (DIAZ; SHI, 2022).

Uma das principais fonte de ROS é cadeia transportadora de elétrons que ocorre a nível mitocondrial e são elevadas em células tumorais, o que evidencia que a produção elevada de ROS pode ser prejudicial ao organismo (HOLE *et al.*, 2013; RAY *et al.*, 2012; TRACHOOTHAM *et al.*, 2009).

As espécies reativas de nitrogênio (ERN) são todos os estados de oxidação dos produtos de óxido nítrico oxigenado (LI *et al.*, 2023). Sua síntese acontece devido a alguns cofatores como oxigênio e NADPH (oxidoredutase) (PITOCOCO *et al.*, 2009).

As ERN participam de diversas regulações fisiológicas (como homeostase), mas a elevações de ERN podem ser indicativos de início e progressão de diversas enfermidades, como inflações, disfunções hepáticas e câncer (ZHOU *et al.*, 2023).

Outro importante marcador bioquímico é o nível de tióis totais (PSH) tióis totais não proteicos (NPSH), os quais correspondem as defesas celulares e tecidos e também a diversas ações biológicas como reações enzimáticas, transporte molecular, biossíntese de proteínas, expressão gênica e proteção de células contra dano oxidativo (TABREZ *et al.*, 2012).

A glutatona, NPSH mais abundante, é um exemplo de antioxidante endógeno que protege células e tecidos contra o estresse oxidativo (DOS SANTOS NUNES *et al.*, 2019). Já os PSH são os principais antioxidantes extracelulares ligadas a proteção das proteínas plasmáticas, sendo responsáveis pelos processos de resposta em inflamações e infecções. A cisteína e cistina, seus principais compostos, são essenciais na síntese da glutatona (GIUSTARINI *et al.*, 2021).

Portanto, se faz necessário entender os mecanismos desses marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e suas atuações metabólicas frente a extrato de plantas e óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*.



## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de *Ottonia corcovadensis* foram obtidas na zona rural do município de Alto Paraíso – RO no mês de outubro de 2021, cedidas pela empresa Fonte Clara Industria e Comércio de Produtos Naturais LTDA com sede no município de Bom Sucesso do Sul – PR. A exsicata foi preparada e o material está depositado no herbário da Universidade Estadual do Centro Oeste – Campus Guarapuava sob número: ARAUCA1154 - *Ottonia corcovadensis* Miq.

### 6.1 Obtenção do extrato de folhas de *Ottonia corcovadensis*

Preliminarmente, o tipo de solvente e o método de extração em banho-maria ou ultrassom foram avaliados e os seus resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Testes preliminares para determinar a melhor condição de extração

Teste	Solvente (50% V/V)	Extração	CFT (mg EAG g <sup>-1</sup> )	DPPH (mM Trolox g <sup>-1</sup> )
1	Etanol/água	Banho-maria (50 °C)	2,74 <sup>a</sup>	5,46 <sup>a</sup>
2	Metanol/água	Banho-maria (50 °C)	2,27 <sup>b</sup>	5,24 <sup>ab</sup>
3	Etanol/água	Ultrassom (25 °C)	2,37 <sup>b</sup>	4,40 <sup>b</sup>
4	Metanol/água	Ultrassom (25 °C)	1,78 <sup>c</sup>	3,74 <sup>c</sup>

Média ± desvio padrão (n=2). Valores seguidos por letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05)

Fonte: Autoria própria, 2022.

Os testes preliminares foram desenvolvidos no intuito de reduzir o número de experimentos necessários para estabelecer as condições a serem testadas no método de extração em um planejamento experimental (concentração e polaridade do solvente, temperatura de extração), mantendo o tempo de extração fixado para ambos os testes em 30 min.

De acordo com os testes realizados, a melhor condição de extração para as condições testadas foi a utilização de Etanol e água como solvente, utilizando temperatura de 50 °C em banho-maria. Posteriormente, foi então realizada a acidificação do solvente contendo 0,1% HCl a fim de ajudar a romper a barreira celular e obter um extrato mais rico em compostos (SEKE *et al.*, 2021).

Os testes preliminares nos mostraram que as melhores condições a serem utilizadas para a otimização é a extração com etanol e água V/V, utilizando aquecimento em banho-maria.

De acordo com os testes, foram elaboradas combinações de fatores (concentração de solvente, tempo de extração e temperatura) para obtenção do extrato com maior disponibilidade de compostos fenólicos, as condições estão expressas na Tabela 2.

Tabela 2 – Tratamentos com as combinações dos fatores para otimização da extração dos compostos bioativos com potencial antioxidante em folhas de *Ottonia corcovadensis*.

Tratamento	Temperatura (°C)	Solvente (Etanol/Água %V/V)	Tempo (Min)
1	50	20/ 80	50
2	50	20/ 80	120
3	50	80/ 20	50
4	50	80/ 20	120
5	70	20/ 80	50
6	70	20/ 80	120
7	70	80/ 20	50
8	70	80/ 20	120
9	40	50/ 50	80
10	80	50/ 50	80
11	60	0/ 100	80
12	60	100/ 0	80
13	60	50/ 50	30
14	60	50/ 50	150
15	60	50/ 50	80

Fonte: Autoria própria, 2022.

## 6.2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial obtido de *Ottonia corcovadensis* foi extraído no mês de outubro de 2020, utilizando a técnica de extração por arraste de vapor, em planta industrial na empresa Fonte Clara Industria e Comércio de Produtos Naturais LTDA, localizada na comunidade de Alto Paraiso, zona rural, Bom Sucesso do Sul - PR.

Foram utilizadas na extração 1 tonelada de material vegetal (folhas, caule e raiz) com rendimento de 1 litro de óleo essencial.

### 6.3 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

#### 6.3.1 Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos foi realizada através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência, descrito por Singleton et al. (1999). Uma alíquota de 0,5 mL de extrato e 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) foram colocados em tubos de ensaio. Após 5 minutos em repouso, foram adicionados 2,0 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%. A mistura foi mantida ao abrigo da luz por 2 horas à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (UV-Vis Bel Photonics, 2000 Piracicaba, Brasil) e os resultados foram expressos em  $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  EAG (Equivalente em ácido gálico).

#### 6.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi realizada de acordo com método descrito por Re et al. (1999). Uma solução de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM foi mantida por 12-16 h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para produzir o radical ABTS<sup>•+</sup>. Passado o tempo de incubação, o radical foi diluído em etanol absoluto em quantidade suficiente para obter um valor de absorvância de 0,7 em espectrofotômetro a 734 nm. As leituras posteriores também foram realizadas na mesma faixa espectral. O Trolox, um antioxidante sintético análogo a vitamina E, foi utilizado como padrão. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mM TEAC  $\text{g}^{-1}$  (TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

### 6.3.3 Atividade antioxidante pelo método DPPH

A medida da atividade do sequestrante do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Öztürk e Kolayli, (2016). Para avaliação da atividade antioxidante, os extratos foram reagidos com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (STANKEVIČIUS et al., 2010). A mistura foi constituída da adição de 0,5 mL de extrato, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,3 mM em etanol. O antioxidante sintético Trolox foi utilizado para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em mM TEAC g<sup>-1</sup>.

### 6.3.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP

O ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) ocorreu de acordo com metodologia descrita por Singleton *et al.*, (1999) e baseia-se na capacidade do antioxidante reduzir o Fe<sup>+3</sup> em Fe<sup>+2</sup>, na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, formando-se um complexo de coloração azul intensa com o Fe<sup>+2</sup>. A análise foi realizada em ambiente escuro, transferindo-se uma alíquota de 90 µL de extrato diluído e 2,7 mL de reagente FRAP. Após homogeneização, manteve-se as amostras em banho-maria à 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro em 595 nm. Uma curva padrão de sulfato ferroso foi preparada e os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mM Fe<sup>+2</sup> g<sup>-1</sup>.

## 6.4 Caracterização química do óleo essencial

A análise foi realizada com a injeção de 1 µL em CG-EM (Shimadzu, modelo GC-2010 Plus) acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo (TQ8040) e injetor automático (AOC-5000 Plus).

Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida, modelo RTX-5MS (5% difenil + 95% dimetil polissiloxano) com dimensões de: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Fluxo de gás de arraste: 1,02 mL min<sup>-1</sup> (gás hélio), modo split 1:90, Temperatura do injetor: 250 °C,

Rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 °C até 250 °C com aquecimento de 3 °C min<sup>-1</sup> e Sistema de ionização: 70 eV.

Os componentes das amostras de óleo essencial foram identificados com base no índice aritmético (IA), determinado por meio da utilização de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados contendo de C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub> átomos de carbono, injetados nas mesmas condições cromatográficas. Os índices aritméticos foram calculados com base nos tempos de retenção obtidos e comparados aos índices aritméticos da literatura (ADAMS, 2007) e seus respectivos espectros de massa. A análise foi realizada na Universidade Federal do Paraná na cidade de Curitiba – PR, no mês de junho de 2022

## 6.5 Construção do modelo quimiométrico preditivo utilizando imagens digitais

### 6.5.1 Análise estatística do conjunto de dados por meio de um modelo linear generalizado da otimização utilizando MLG

A análise estatística foi realizada utilizando modelo linear generalizado (MLG), através do software R e R Studio (R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL).

Foram realizados os testes de Médias Marginais Estimadas, Comparações de Pares e teste de Bonferroni.

### 6.5.2 Construção de modelos preditivos para validação da otimização de extração por aprendizado de máquina (ML) utilizando os algoritmos computacionais

A construção dos modelos preditivos foi realizada por aprendizagem de máquina ML, utilizando o software WEKA® 3.8.5. Para tal, os dados obtidos da triplicata foram divididos em dois conjuntos: modelo e validação, de acordo com já estuda por Fontoura *et al.*, (2023).

O conjunto modelo foi formado por duas repetições e o conjunto validação foi formado pela repetição restante, ambas escolhidas de modo aleatório. Essa divisão dos dados em dois conjuntos ocorreu a fim de o conjunto modelo ser treinando pelo algoritmo e pelo conjunto validação ser o responsável pela validação propriamente

dita do modelo pelo algoritmo. Nesta etapa, diversos algoritmos foram testados e os que apresentaram melhor adaptação ao modelo foram utilizados.

### 6.5.3 Construção do modelo quimiométrico por imagens

Os extratos obtidos e os ensaios realizados na otimização (CFT e DPPH) tiveram suas imagens registradas em estúdio fotográfico (56 leds Evodobox 60 cm plus – Evodobox plus) utilizando uma câmera de celular, Apple iPhone, modelo SE (câmera 12 MP) em condições padronizadas, de acordo com metodologia proposta por Perin *et al.*, (2020b).

As imagens digitais (8 bits) foram recortadas em condições apropriadas para cada ensaio utilizando o software GIMP (versão 2.10.18) (software livre). Foram extraídos os canais de cores RGB (Vermelho, verde e azul), os padrões HSL (tom, saturação e luminosidade) e os padrões V e I (vórtice cromático e intensidade ou brilho)

Foram construídos os modelos utilizando as imagens da vista superior das análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH.

Para a extração dos canais de cores foi utilizado o software Chemostat® V e a regressão realizada utilizando o software WEKA® 3.8.5. os gráficos preditos x observados serão desenvolvidos utilizando o software OriginPro 8.5 (OriginLab Massachusetts, EUA).

A avaliação da precisão e desempenho dos modelos gerados foram obtidos por meio do erro quadrático médio de calibração (RMSEC), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e valor preditivo residual (RPD).

## 6.6 Viabilidade celular e parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo

### 6.6.1 Cultivo celular de células de melanoma humano SK-MEL-28

As linhagens celulares de melanoma humano SK-MEL-28 (ATCC HTB-72D) foram obtidas no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil. As células foram cultivadas em frascos de cultivo celular com meio DMEM – Alta

glicose – L-glutamina, contendo antibiótico e antifúngico com concentração de 1% (penicilina/estreptomicina) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram cultivadas em condições adequadas com atmosfera umidificada e controlada com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 37 °C. O extrato liofilizado e o óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,2% e meio de cultura apropriado para obtenção de diferentes concentrações. As células foram tratadas por 24 horas com as soluções nas concentrações de 15,63, 62,5 e 250 µg mL<sup>-1</sup> do extrato liofilizado e do óleo essencial. As células do grupo controle negativo (CT) receberam apenas o meio de cultivo.

#### 6.6.2 Células mononucleares do sangue periférico (PBMCS) dos extratos etanoicos, óleo essencial e nanopartículas

Células PBMCS foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade de compostos em células normais. O sangue periférico foi coletado por punção venosa de um indivíduo saudável, usando tubos de coleta de sangue BD Vacutainer® (BD Biosciences San Diego, CA, EUA) com anticoagulante K2-EDTA (1,8 mg mL<sup>-1</sup>). Para isolamento de PBMCS, 20 mL de amostra de sangue foram transferidas e separadas em tubos de 15 mL contendo Histopaque®-1077 Meio Gradiente de Densidade Celular (1,077 g mL<sup>-1</sup>) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) (2:1). Para coleta interfásica, os tubos foram centrifugados por 30 min a 1800 rpm e os PBMCS foram coletados e transferidos para um novo tubo, lavados com solução salina (0,9%) e centrifugados por 10 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 5 mL de tampão hemolítico para remover os remanescentes de hemácias. As células foram novamente centrifugadas por 10 min a 1500 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado e as células foram lavadas com solução salina (0,9%). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco™ Thermo Fischer Scientific Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de FBS suplementados com penicilina/estreptomicina e anfotericina B em concentração de 1% e cultivadas em placas de 96 poços com densidade celular de 1x10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>. As células foram mantidas em um incubadora de atmosfera modificada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 6.6.3 Viabilidade celular por ensaio MTT dos extratos etanoicos e óleo essencial

A citotoxicidade sobre células SK-MEL-28 (Linhagem celular de melanoma humano) foi realizado através do ensaio de redução do sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), descrito por Mosmann, (1983).

As células foram semeadas em placas de 96 poços, em 8 repetições, em densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/poço e tratadas com as concentrações de 15,63, 62,5 e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato liofilizado e óleo essencial. Após os tempos de exposição (24 horas), o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0,1 M e pH 7,4) para evitar qualquer interferência do composto utilizado no tratamento. O reagente MTT (Sigma-Aldrich, EUA) ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) dissolvido em PBS foi adicionado e as placas foram incubadas por 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ .

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e  $200 \mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de Formazan gerados pela redução do sal MTT pelas células viáveis. A absorbância foi medida a  $570 \text{ nm}$  usando um leitor de microplacas (Multiskan GO Thermo Scientific™, Thermo Scientific, EUA).

### 6.6.4 Ensaios de estresse oxidativo dos extratos etanoicos e óleo essencial

Para os ensaios de estresse oxidativo, células de melanoma foram semeadas em placas de 6 poços, em densidades de  $1 \times 10^6$  célula/poço, e tratadas com as concentrações de extrato liofilizado e óleo essencial já citados anteriormente. Após os tempos de exposição (24 horas), o sobrenadante foi coletado para realizar as análises de Detecção de óxido nítrico (NOX), níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH), as análises foram realizadas em triplicata.

#### 6.6.4.1 Detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS)

Para as determinações dos níveis de ROS, foi utilizado o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H2DCF-DA), uma substância não fluorescente permeável às células, é oxidada em uma molécula fluorescente a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). A análise consiste na aplicação de  $100 \mu\text{M}$  de uma solução de H2DCF-DA por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  nas células cultivadas (PBMCs) anteriormente e o produto da reação



fluorimétrica é proporcional a quantidade de ROS presente. As amostras foram medidas em excitação em 485 nm e emissão em 525 nm em Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX. Os resultados foram expressos como porcentagem de ROS (%) em relação ao controle.

#### 6.6.4.2 Detecção de óxido nítrico (NOX)

A detecção do ácido nítrico foi realizada pelo método de Griess modificado pelas reduções de nitrato e nitrito conforme relatado na literatura por Tatsch *et al.*, (2011). Primeiramente, o reagente de Griess foi preparado pela adição de sulfanilamida 2% e N-1-naftil-etilendimina-dicloridrato (NED) 0,2% em meio de ácido ortofosfórico (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 5%. Em seguida, 100 µL das amostras foram misturadas a 100 µL de reagente de Griess e incubados a 37 °C por 20 minutos. A sulfanilamida reage com o nitrito para formar um sal de diazônio, que reage com NED para produzir como produto o corante azo púrpura medido a 540 nm. Uma curva de calibração foi preparada de azo púrpura e os resultados foram expressos em µM.

#### 6.6.4.3 Níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH)

Ambos os níveis de tióis foram determinados de acordo com Ellman., (1959). com adaptações. Este método consiste na redução de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e medido em comprimento de onda de 412 nm. Para o ensaio de tiol, 30 µL de sobrenadante foram adicionados em placa de 96 poços a 260 µL de tampão fosfato de potássio (PPB) (1M, pH 6,8) e 15 µL de DTNB com leitura imediata.

O mesmo procedimento experimental foi realizado para o ensaio de tióis não proteicos, as amostras foram desproteïnadas com a adição do ácido tricloroacético (TCA) a 10% antes da realização da análise. Os resultados colorimétricos foram determinados usando uma curva padrão de cisteína e expressos em µmol/L.

As análises biológicas foram realizadas no laboratório de cultivo celular da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, campus Chapecó – SC.

## 6.7 Atividade antimicrobiana dos extratos etanoicos e óleo essencial

O potencial antimicrobiano do extrato etanoico e do óleo essencial foram avaliados pelos métodos da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (MBC) de acordo com protocolo experimental CLSI, (2006).

O potencial antimicrobiano foi avaliado frente aos microrganismos *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 0028). As cepas foram fornecidas e as análises realizadas por meio do Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Pato Branco – PR.

As cepas foram reativadas por 12 horas a 37 °C em ágar nutriente. Após a reativação, as colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de solução fisiológica estéril (0,9%) e padronizada em 660 nm pela escala McFarland (0,5) até uma concentração final de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de solução fisiológica. Dessa suspensão bacteriana, 50 µL foram utilizados para inocular 50 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*).

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e do óleo essencial foi determinada pelo método de microdiluição utilizando placas de 96 poços. Foram realizadas diluições seriadas partindo da concentração de extração do óleo essencial e de 0,01 mg mL<sup>-1</sup> para o extrato etanoico.

O caldo de cultura sem cultura microbiana foi utilizado como controle de crescimento e como controle positivo cloranfenicol (1,2 mg mL<sup>-1</sup>). Para o crescimento microbiano, foram incubadas em agitador de microplacas a 37 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, para interromper a reação foram adicionados 30 µL de resazurina (0,1 mg mL<sup>-1</sup>). Os poços onde houve mudança de cor de azul para vermelho foram considerados negativos, ou seja, não houve crescimento microbiano (ARAUJO; LONGO, 2016).

A concentração bactericida mínima foi avaliada em resultados positivos de CIM. Realizadas em placa de Petri contendo ágar nutriente, para avaliar se houve além de bacteriostático o extrato e o óleo essencial podem ser considerados bactericidas, ou seja, que causam a morte celular de micro-organismos. As análises foram realizados em triplicata e expressos em mg mL<sup>-1</sup> para o extrato etanoico e µg mL<sup>-1</sup> para o óleo essencial.

## **CAPÍTULO 1**

*Otimização e validação quimiométrica da extração de compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante das folhas de Ottonia corcovadensis. Atividade antitumoral, citotoxicidade celular em células saudáveis e estresse oxidativo.*

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO 1

### 7.1 Otimização das condições de extração utilizando Modelo Linear Generalizado – MLG, utilizando como resposta compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante pelo método DPPH

Para a obtenção de extratos de plantas com boa disponibilidade de compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante, é necessário que pesquisas voltadas para a extração sejam realizadas.

São diversos os fatores que podem influenciar na extração de compostos de interesse como tipo da matriz de extração (folhas, caule ou raiz), sazonalidade, pH e polaridade do solvente extrator, entre outros (KASHYAP *et al.*, 2022).

Porém, de acordo com CHEW *et al.*, (2011) os fatores que devem ser observados por apresentarem maior influência na extração são: concentração do solvente extrator, temperatura e tempo de extração.

Desta forma, para a realização da otimização da extração dos compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidantes das folhas de *Ottonia corcovadensis* foram considerados os fatores concentração de etanol/água, temperatura de extração em banho-maria e tempo em que o material vegetal ficou exposto aos demais fatores (solvente e temperatura).

A otimização foi realizada em 15 corridas (Tabela 2), com a combinação dos fatores escolhidos para que otimização fosse realizada (concentração de solvente, temperatura e tempo de extração). Após o preparo dos extratos, foram realizados os ensaios de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante pelo método DPPH de todas as 15 corridas e os dados foram tratados por meio do Modelo Linear Generalizado (MLG).

Dentre os métodos mais usuais de atividade antioxidante foram escolhidas: compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante pelo método DPPH para a otimização e construção de modelos, que serão abordados nos próximos tópicos, pelos mecanismos de reações, sendo que a extração com etanol visa compostos fenólicos e que são em sua maioria de natureza polar, o qual o mecanismo de reação DPPH é mais adequado.

Também para a construção de modelos, foi levado em conta a estabilidade das reações considerando o tempo necessário entre a leitura e a obtenção das imagens dos ensaios.

Tabela 3 - Condições de extração e resultados da otimização da extração de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante pelo método DPPH de folhas de *Ottonia corcovadensis*

Tratamento	Solvente (% etanol/água)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	CFT (mg EAG* g <sup>-1</sup> )	DPPH (mM ET** g <sup>-1</sup> )
T1	20/80	50	50	7,48±0,007 <sup>d***</sup>	15,42±0,733 <sup>e</sup>
T2	20/80	50	120	7,34±0,060 <sup>d</sup>	15,37±0,192 <sup>e</sup>
T3	80/20	50	50	9,52±0,066 <sup>b</sup>	19,13±0,176 <sup>b</sup>
T4	80/20	50	120	10,25±0,307 <sup>a</sup>	19,79±0,195 <sup>b</sup>
T5	20/80	70	50	8,30±0,044 <sup>c</sup>	15,80±0,282 <sup>e</sup>
T6	20/80	70	120	8,65±0,073 <sup>c</sup>	17,20±0,242 <sup>d</sup>
T7	80/20	70	50	10,86±0,00 <sup>a</sup>	21,01±0,230 <sup>a</sup>
T8	80/20	70	120	11,64±0,044 <sup>a</sup>	21,27±0,535 <sup>a</sup>
T9	50/50	40	80	9,42±0,207 <sup>b</sup>	18,76±0,402 <sup>c</sup>
T10	50/50	80	80	10,98±0,095 <sup>a</sup>	20,52±0,634 <sup>a</sup>
T11	0/100	60	80	6,53±0,074 <sup>d</sup>	13,89±0,297 <sup>f</sup>
T12	100/0	60	80	7,29±0,142 <sup>d</sup>	19,56±0,188 <sup>b</sup>
T13	50/50	60	30	9,80±0,051 <sup>b</sup>	18,77±0,492 <sup>c</sup>
T14	50/50	60	150	10,52±0,051 <sup>a</sup>	19,50±0,449 <sup>b</sup>
T15 (C)	50/50	60	80	10,24±0,247 <sup>a</sup>	18,27±0,348 <sup>c</sup>

\*EAG: Equivalente ácido gálico

Fonte: Autoria própria, 2023.

\*\*ET: Equivalente Trolox.

\*\*\* Letras iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa entre os tratamentos e letras diferentes representam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com teste de Bonferroni ( $p>0,05$ )

Pode-se observar por meio da Tabela 3 e por meio da estimativa das médias marginais, com intervalo de confiança de 95%, que o tratamento que obteve mais extração de compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante foi o T8 com valores de 11,64±0,044 mg EAG g<sup>-1</sup> e 21,27±0,535 mg Trolox g<sup>-1</sup> respectivamente. O T8 corresponde ao tratamento em que foi utilizado 80/20% de etanol/água, temperatura de 80 °C e 120 min de tempo de extração.

Ao analisar a diferença entre as médias dos tratamentos para CFT, pelo teste de Bonferroni, pode-se verificar que não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre

T8 e os tratamentos 4, 7, 10, 14 e 15. Já entre os demais tratamentos podemos observar que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Podemos observar que o fator concentração do solvente se mostrou fundamental na extração dos compostos fenólicos, em que a interação entre os solventes utilizados (água/etanol) foi essencial para uma melhor extração, como podemos observar que os tratamentos em que houve uma interação entre os solventes houve uma melhor extração. Já os ensaios T11 e T12, onde foram utilizados 100% água e 100% etanol respectivamente, foram os tratamentos com níveis menores de compostos fenólicos  $6,53 \pm 0,074$  e  $7,29 \pm 0,142$  mg EAG  $g^{-1}$  respectivamente.

Já os demais tratamentos 1,2, 3, 5, 6, 8, 9 correspondem aos tratamentos em que o teor de etanol foi menor no solvente extrator, pode-se observar que em tratamentos onde houve teor maior que 50% de etanol houve uma melhor resposta na extração de compostos bioativos.

Para a quantificação de compostos com potencial antioxidante foi utilizado o método DPPH, pode-se observar na Tabela 3 que o tratamento T8 foi o que obteve melhor resposta para o ensaio, com teor de  $21,27 \pm 0,535$  mM Trolox  $g^{-1}$ , isto é, maior teor de compostos com potencial antioxidante. Além disso o tratamento 8 foi o que obteve melhor resposta para os dois métodos analisados, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH, garantindo assim um mesmo extrato com disponibilidade de compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante.

O fato de obter um mesmo extrato para os dois métodos é essencial para aplicações voltadas para a tecnologia de alimentos, onde se faz necessário extratos com bom potencial antioxidante, para que possa haver uma substituição eficaz de antioxidante sintéticos com antioxidantes naturais, garantindo assim uma melhor segurança a saúde da população e uma redução na oxidação lipídica dos alimentos (Hadidi *et al.*, 2022).

Ao analisar o teste de Bonferroni para o ensaio DPPH pode-se verificar que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre T8 e os tratamentos 7 e 10 com teores de  $21,01 \pm 0,230$  e  $20,52 \pm 0,634$  mM Trolox  $g^{-1}$  respectivamente. Já ao analisar T8 com os demais tratamentos observa-se que houve diferença estatística significativa entre si ( $p < 0,05$ ).

Assim como para a análise de, para o ensaio DPPH os extratos com teores maiores da mistura de solvente, mais que que 50% de etanol/água, apresentam uma melhor extração de compostos com potencial antioxidante, os demais tratamentos com quantidades menores de etanol, abaixo de 50% de etanol/água, apresentaram menores teores.

Também pode-se observar por meio do tratamento 11, o qual corresponde a concentração de solvente de 0% de etanol e 100% água, que não havendo a interação entre solventes resultou em uma diminuição na extração dos compostos, sendo que T11, ao ser analisado pelo teste das médias marginais, indicou o menor teor de compostos bioativos entre todas as corridas.

Também pode-se observar na Tabela 3 que, conforme a porcentagem de etanol vai sendo diminuída, o teor de compostos bioativos nos extratos também sofre um decréscimo. Mas ao observar T12, que corresponde a concentração de solvente de 100% etanol, também houve um decréscimo no teor de compostos bioativos no extrato, em relação a T8, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

A utilização de solventes de alta e intermediária polaridade, como a água e o etanol, é eficaz na extração de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis, devido as suas interações intermoleculares (dipolo-dipolo e forças de dispersão de London e ligações de hidrogênio), porém a adição de determinadas porcentagens de etanol no solvente extrator é capaz de dissolver compostos de menor polaridade, aumentando o espectro de compostos bioativos presente no extrato (Galanakis *et al.*, 2013).

O efeito da temperatura tanto na extração de compostos fenólicos como compostos com potencial antioxidante não se mostrou determinante na extração. Para compostos fenólicos totais, como já citados anteriormente, nos tratamentos em que não apresentaram diferença estatística significativa, T8, T4, T7, T10, T14 e T15, foram utilizadas faixas de temperatura diferentes, variando entre 50 e 80 °C.

Também no ensaio DPPH, a mesma faixa de temperatura de extração foi utilizada e mais uma vez não se mostrou como fator determinante na extração. De fato, em extrações a temperatura utilizada envolve a taxa de agitação do material, o que acaba enfraquecendo a membrana celular e os tecidos, aumenta a difusão celular quando diminui a viscosidade do solvente e aumenta a transferência de massa dos

tecidos vegetais para o solvente, dessa forma levando a uma maior disponibilidade de compostos nos extratos (Song *et al.*, 2019).

Porem deve-se levar em conta que, por mais que a temperatura como citado anteriormente tenha efeito benéficos na extração, altas temperaturas podem acabar por degradar compostos fenólicos e compostos com potencial antioxidante, também temperaturas elevadas podem influenciar na concentração de solvente, pois o etanol atinge seu ponto de ebulição em torno de 78 °C, sendo preciso para extração em temperaturas mais elevadas, obter uma mistura eutética de solventes e frascos extratores que evitem a perda de massa (Sari *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2021).

Com relação ao tempo de extração, não se mostrou ser fator determinante na disponibilidade de compostos bioativos nos extratos, como podemos observar em T8 que para ambos os ensaios, CFT e DPPH, obteve-se os maiores teores de compostos bioativos, a tempo de extração foi de 50 min, já para os tratamentos em que não houve diferença estatística significativa os tempos de extração foram diferentes e superiores a 50 min.

Para CFT, os tratamentos T4, T7, T10, T14 e T15, que não apresentaram diferença estatística significativa, foram conduzidos nos tempos de 120, 50, 80, 150 e 80 min respectivamente e para o ensaio DPPH os tratamentos T7 e T10 que não apresentaram diferença estatística significativa, foram conduzidos nos tempos de 120 e 80 min respectivamente.

Apesar do tempo de extração representar o tempo em que o material vegetal está em contato com o solvente, e ser de grande importância na extração, pode ser considerado fator não determinante em extração de compostos fenólicos e compostos com potencia antioxidante, sendo que o fator que apresenta maior importância é polaridade e concentração de solvente, seguida pela temperatura de extração (Chamali *et al.*, 2023; Vergara-Salinas *et al.*, 2012) .

Após realizada a otimização das condições de extração, foi realizada a atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP do extrato otimizado (T8), ou seja, o extrato que apresentou a maior teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH.

Ao realizar-se as análises pelos métodos ABTS e FRAP (Tabela ) obtiveram-se valores de  $33,15 \pm 11,66$  mMol Trolox  $g^{-1}$  e  $13,47 \pm 1,37$  mMol  $Fe^{2+}$   $g^{-1}$ , sendo essas análises complementares na determinação de atividade antioxidante.



Tabela 4 - Atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP da condição otimizada de extração de *Ottonia corcovadensis*

Tratamento	ABTS (mMol Trolox g <sup>-1</sup> )	FRAP (mMol Fe <sup>2+</sup> g <sup>-1</sup> )
T8	33,15±11,66	13,47 ± 1,37

Fonte: Aatoria própria, 2023.

É necessário que em pesquisas científicas onde é determinada a atividade antioxidante que esta seja medida por diferentes métodos uma vez que cada metodologia possui um mecanismo de reação específico que é capaz de determinar a atividade antioxidantes de determinada gama de compostos com diferentes polaridades (Munteanu; Apetrei, 2021).

O estudo dos extratos de folhas de *Ottonia corcovadensis* ainda é escasso na literatura para fins de comparação, podendo ser considerado inovador esse trabalho nesse quesito, porém é possível a comparação de resultados entre plantas da mesma espécie e gênero.

Em trabalhos realizados com plantas da região amazônica por Lizcano *et al.*, (2010), foram realizadas extrações com água (infusão) sob agitação constante por 15 min e adicionalmente 10 min sob repouso, o estudo foi realizado com 19 plantas entre elas *Piper glandulosissimum*, *Piper Krukoffii*, *Piper putumayoense*, sendo que para os extratos das folhas dessas plantas foram determinados teores de 10,62±0,02, 16,84±0,07, 22,20±0,11 mg EAG g<sup>-1</sup>, podendo ser considerado que os teores de CFT encontrados no presente trabalho estão de acordo as plantas estudadas pelos autores.

Em estudos dirigidos por Noor *et al.*, (2022) em folhas de *Piper betle*, também da família das piperáceas, com extração realizada com 70/20% de etanol/água pelo tempo de 4 horas, foi possível identificar por cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa, a presença dos compostos epigalocatequina, ácido ascórbico, ácido gálico, taxifolina, naringina, quercetina, cloreto de pelargodina, luteolina, apigenina, alilo anisole, eugenol, varfarina.

Os compostos encontrados podem ser responsáveis pelas atividades antioxidantes obtidas no trabalho, pelos métodos ABTS e DPPH, sendo que foi obtido teores de 84,1 mg EAG g<sup>-1</sup> de polifenóis totais, devemos levar em consideração que compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidante (Chamali *et al.*, 2023).

As plantas do gênero *Piper* são ricas em lignanas, que são metabólitos especializados característicos desse gênero e que possuem atividade antioxidante dentre as diversas atividades farmacológicas que estes metabólitos apresentam (Parmar *et al.*, 1997). Estudos conduzidos por Fan *et al.*, (2023) avaliam a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS de diversas lignanas obtidas de plantas do gênero *Piper*, comprovando assim que esses compostos estão presentes em plantas desse gênero e que podem ser também responsáveis pela atividade antioxidante encontrada.

É preciso levar em consideração os fatores que podem influenciar nos teores de CFT e compostos com potencial antioxidante, como já citados anteriormente, além de fatores como polaridade de solvente, temperatura e tempo de extração, fatores ambientais como localização, sazonalidade e espécie de estudo podem ser fatores determinantes nos resultados (Wang., *et al.*, 2022).

## 7.2 Modelagem quimiométrica preditiva utilizando imagens digitais e algoritmos computacionais de Leitura de Máquina (LM).

Com objetivo da construção de um modelo preditivo utilizando imagens digitais, foram utilizadas as análises de resposta obtidas na otimização das condições de extração, que foram: compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante pelo método DPPH.

Após a realização das análises e leitura em espectrofotômetro, os frascos contendo as soluções que foram analisadas foram fotografadas, recortadas em tamanho específico e foram extraídos os padrões de cores R, G e B (Vermelho, verde e azul) (LIU *et al.*, 2021), os padrões HSL (tom, saturação e luminosidade) (PIEPRZYK *et al.*, 2022) e os padrões V e I (vórtice cromático e intensidade ou brilho) (ZHANG *et al.*, 2021).

Ao realizar o teste de VIF, quando  $VIF > 10$  representa que há multicolinearidade, logo estas variáveis com  $VIF > 10$  devem ser retiradas do modelo de regressão com a finalidade de obter uma melhor resposta (GÓMEZ *et al.*, 2020).

Desta forma, somente os valores de  $VIF < 10$  foram mantidos no modelo, para as imagens do ensaio de CFT com os valores reais obtidos as variáveis que foram mantidas no modelo foram R (VIF: 2,64) G (VIF: 5,23) e V (VIF:3,83). Para o modelo

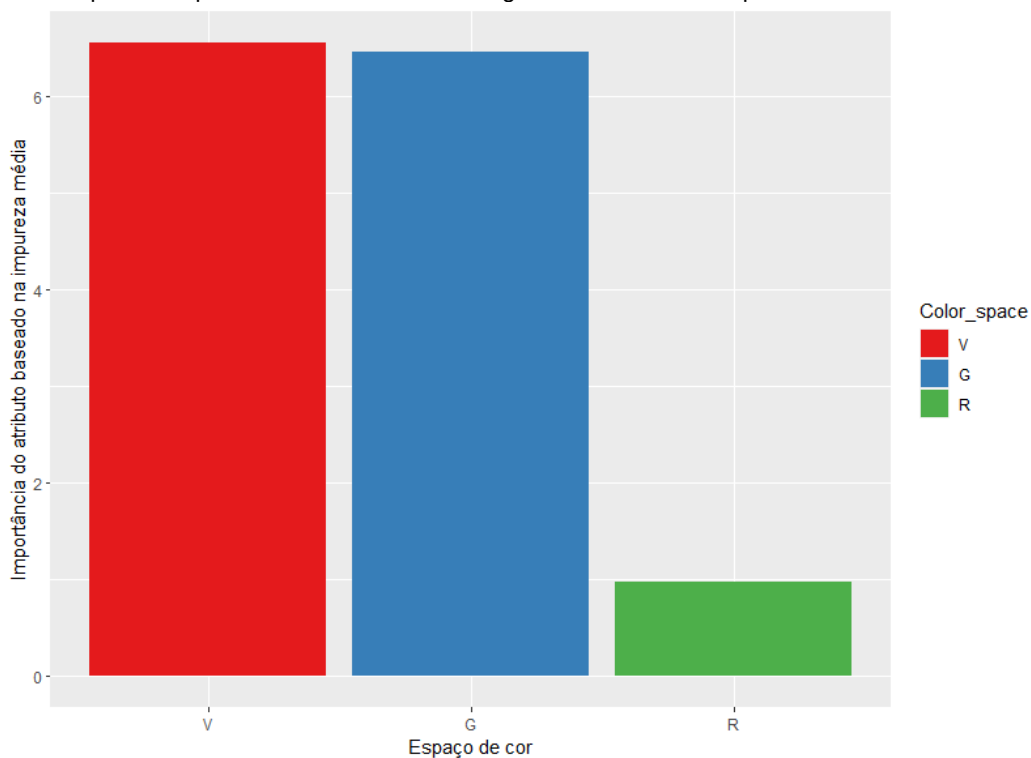
construído com a imagens do ensaio de atividade antioxidante pelo método DPPH com os valores reais obtidos no ensaio as variáveis mantidas fora H (VIF: 2,22), S (VIF:1,14) e V (VIF:2,02).

Posteriormente, realizou-se também a análise de importância, com o objetivo de avaliar a influência das variáveis de entrada sobre o resultado do modelo, podendo assim definir qual das variáveis utilizadas no modelo de regressão mais tiveram influência no resultado final obtido para o modelo quimiométrico construído (ZAITSEVA *et al.*, 2023).

Para o modelo construído para CFT, entre as variáveis que construíram o modelo após o teste VIF (R,G e V), a que mais mostrou influência sobre o modelo foi V (vórtice cromático), com valor de importância de 7,52, seguido de G (verde) com valor de importância de 5,65 e por fim R (vermelho) com valor de 0,91, conforme descrito na Figura 3.

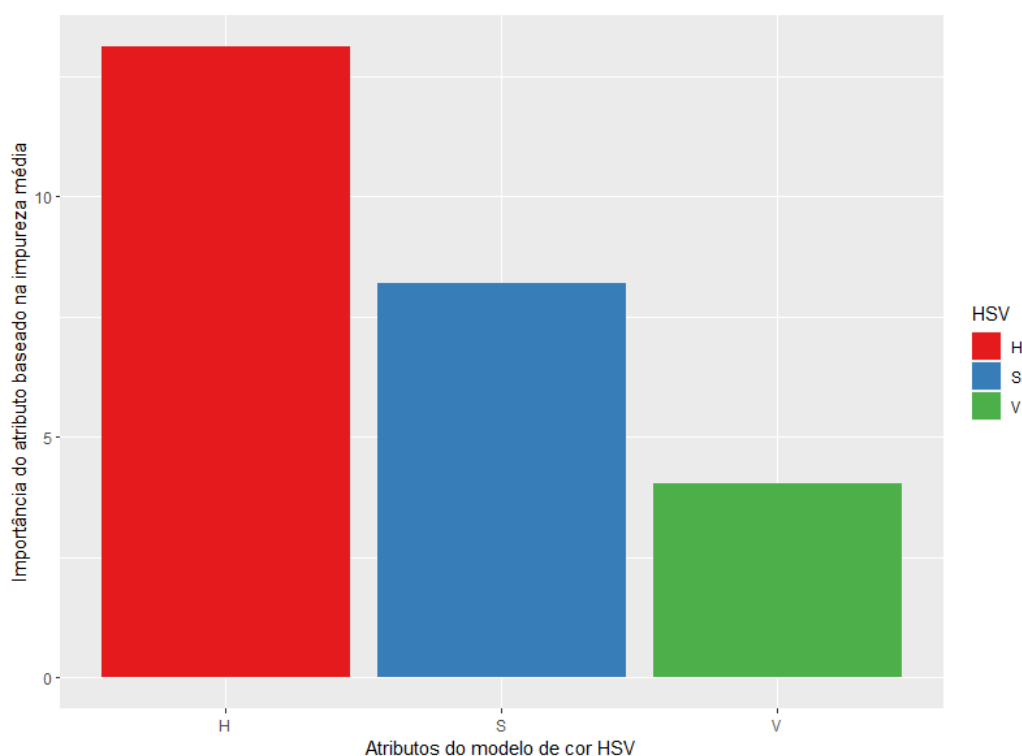
Para o modelo DPPH, entre as variáveis selecionadas após o teste VIF para construção do modelo, as variáveis que apresentaram maior influência foram H, S e V, com valores de atributo de influência de 13,12, 8,21 e 4,04 respectivamente, a análise de importância está representada na Figura 4.

Figura 3 - Análise importância para o modelo utilizando imagens e análise de compostos fenólicos totais



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura 4 - Análise importância para o modelo utilizando imagens e análise de atividade antioxidante pelo método DPPH



Fonte: Autoria própria, 2023.

Posteriormente, realizou-se a regressão entre os dados obtidos experimentalmente (observados) e os dados extraídos das imagens dos ensaios (predito). Nesta etapa, foram testados diversos algoritmos computacionais de classificação de dados para a construção do modelo, sendo apresentado neste trabalho apenas os algoritmos em que se obtiveram resultados satisfatórios dentro dos parâmetros de avaliação.

Os dados foram divididos em dois grupos: o grupo de construção do modelo, onde foram utilizados 80% dos dados, e 20% dos dados foram utilizados para validação do modelo.

Os parâmetros utilizados para verificar a eficiência dos modelos foram coeficiente de determinação ( $R^2$ ) onde  $R^2=1$  indica uma predição perfeita e quanto menor o valor de  $R^2$ , pior é o desempenho do modelo (SHIH *et al.*, 2022). De acordo com Andrés *et al.*, (2007), valores de  $R^2 \geq 0,80$  já podem ser considerados confiáveis. A raiz do erro quadrado médio de validação e calibração (RMSEC) indica o ajuste para

o modelo, logo maiores valores indicam que o modelo necessita de maior ajuste e menores valores indicam uma menor necessidade de ajuste (GROOTEN *et al.*, 2023).

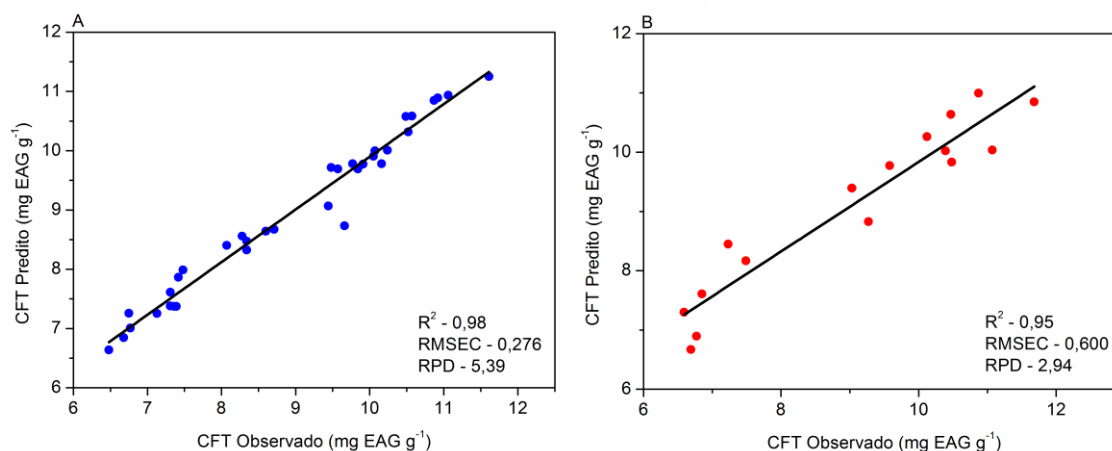
Outro parâmetro utilizado para avaliar o desempenho do modelo foi a razão de desempenho para desvio (RPD), que compara o desvio padrão (D.P) dos valores observados com o D.P dos valores do erro quadrado médio residual, para o RPD, os valores obtidos podem ser interpretados de 3 formas: Predição fraca ( $RPD < 1,4$ ), predição razoável ( $1,4 \leq RPD \leq 2,0$ ) e predição forte ( $RPD > 2,0$ ) (LU *et al.*, 2023).

Para o modelo das imagens e os resultados para a análise de compostos fenólicos totais, foram utilizados os algoritmos FR (Floresta Randômica) e LKS (Lazy Kstar). A regressão utilizando o algoritmo FR está representado na Figura 5.

A Figura 5A representa os dados de construção do modelo, onde pode-se observar que o  $R^2$  para o modelo foi 0,98, sendo este um valor próximo a 1, indicando que o modelo está apropriado. Ainda, podemos observar que o valor de RMSEC foi de 0,276 e o valor de RPD foi de 5,39. Como citado anteriormente, valores baixos de RMSEC indicam menor necessidade de ajustes para o modelo e  $RPD > 2,0$  indica uma predição forte. De acordo com os parâmetros de desempenho citados anteriormente, a construção do modelo utilizando o algoritmo FR pode ser considerada boa.

A Figura 5B representa a validação do modelo a qual apresenta  $R^2$  de 0,95, sendo considerado por este parâmetro adequado, valor de RMSEC de 600 e RPD de 2,94, sendo considerada assim uma predição forte.

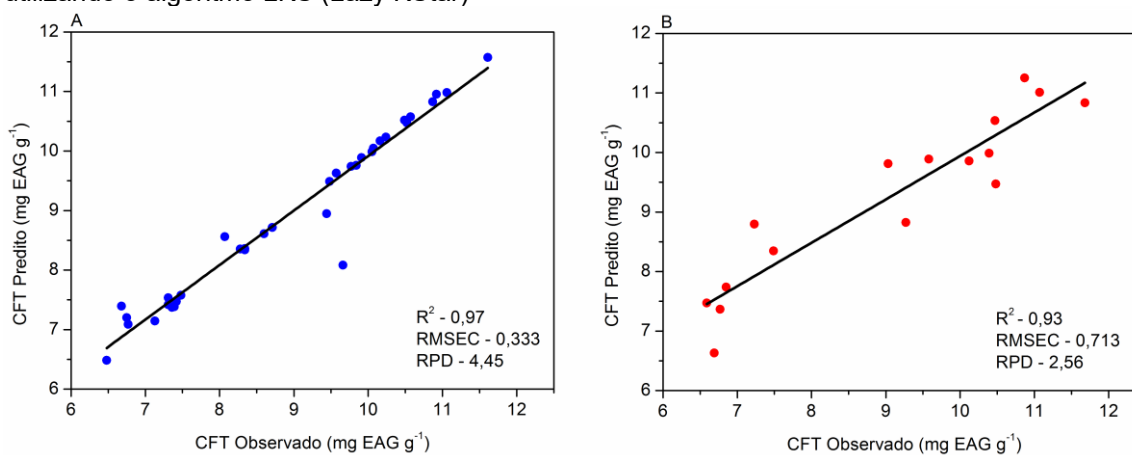
Figura 5 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para compostos fenólicos totais utilizando o algoritmo FR (Floresta Randômica)



Autoria própria, 2023.

Na Figura 6A pode-se observar o modelo construído utilizando o algoritmo LKS, onde os parâmetros para a construção do modelo, onde obteve-se um  $R^2$  de 0,97, com valor de RMSEC de 0,333 e RPD de 4,45, valores esses que podem considerar a construção do modelo como forte e confiável. Na Figura 6B temos a validação do modelo com  $R^2$  de 0,93, RMSEC de 0,713 e RPD de 2,56 o que indica uma predição forte e uma validação confiável

Figura 6 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para compostos fenólicos totais utilizando o algoritmo LKS (Lazy KStar)



Autoria própria, 2023.

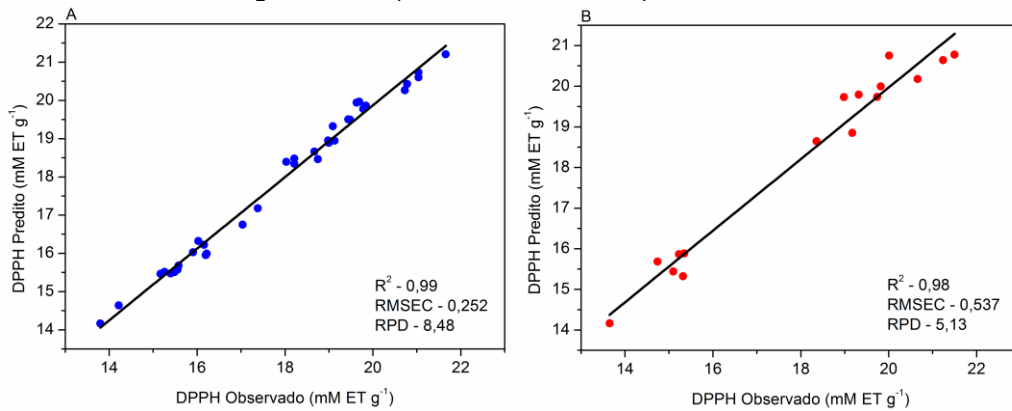
A construção de um modelo preditivo e validação do modelo utilizando as imagens da análise de compostos fenólicos totais e os valores observados da análise a utilização do algoritmo FR se mostrou, por meio dos parâmetros avaliativos para o modelo e validação, capaz de gerar um modelo de previsão de dados mais robusto e confiável, em comparação com o algoritmo LKS.

Na construção do modelo preditivo utilizando as imagens da análise de atividade antioxidante pelo método DPPH foram utilizados 3 algoritmos: FR (Floresta Randômica), RNA (Rede Neural Artificial) e MVS (Máquina de Vetor de Suporte).

A Figura 7A mostra o modelo e validação dos dados utilizando o algoritmo FR, onde obteve-se um valor de  $R^2$  de 0,99, sendo considerado uma boa regressão pela proximidade de 1. Os valores de RMSEC e RPD foram 0,252 e 8,48 respectivamente o podendo-se considerar a regressão forte e com baixa necessidade de ajustes.

Para a validação do modelo, podemos observar na Figura 7B, que o valor de  $R^2$  foi de 0,98, enquanto RMSEC foi 0,537 e o valor do RPD foi de 5,13, valores esses que fazem com que a validação para o modelo de regressão seja considerado confiável e forte.

Figura 7 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando o algoritmo FR (Floresta Randômica)

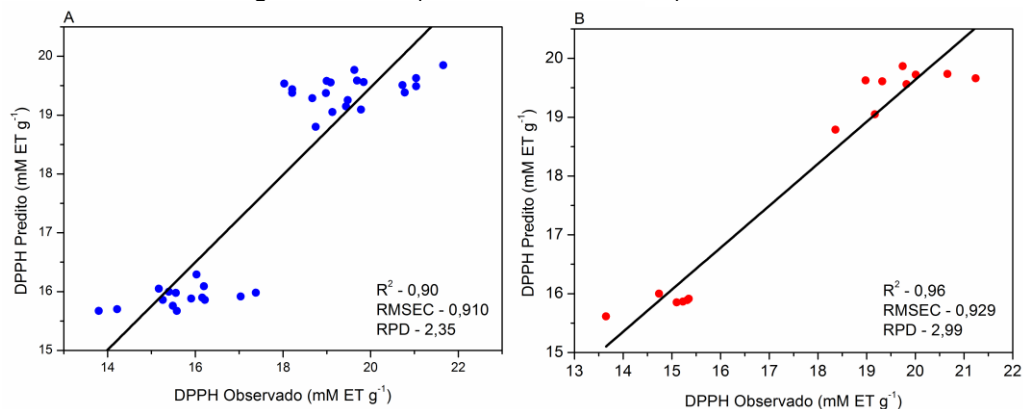


Autoria própria, 2023.

A regressão utilizando o algoritmo RNA está representada na Figura 8A para os dados do modelo e Figura 8B para os dados de validação do modelo. Para o modelo obteve-se um valor de R<sup>2</sup> de 0,90, RMSEC de 0,910 e RPD de 2,35 todos os valores obtidos nos parâmetros de avaliação do modelo mostram que a construção do modelo é forte e confiável.

Para dos dados da validação do modelo obteve-se um valor de R<sup>2</sup> de 0,96, RMSEC de 0,929 e RPD de 2,99, ambos os parâmetros nos indicam que a validação do modelo é confiável e possui regressão forte, porém com valor de RMSEC, que simboliza a necessidade de ajuste, ligeiramente elevada em comparação com o modelo obtido através do FR. Mesmo assim, o modelo e validação ainda pode ser considerado bons para o algoritmo RNA

Figura 8 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando o algoritmo RNA (Rede Neural Artificial)

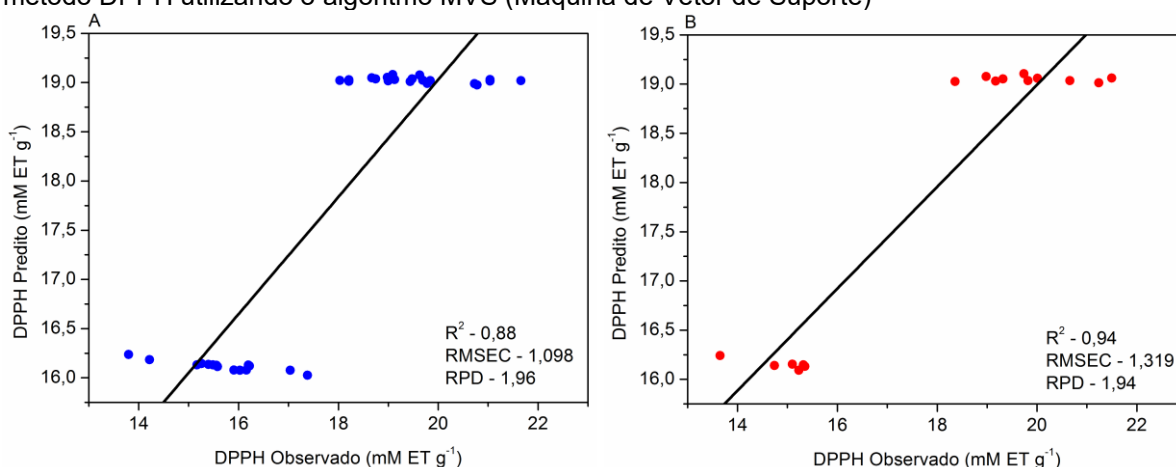


Autoria própria, 2023.

O modelo e a validação com a utilização do algoritmo MVS está representado na Figura 9A para a construção do modelo de Figura 9B para a validação do modelo. Para o modelo, obteve-se um valor de  $R^2$  de 0,88, RMSEC de 1,098 e RPD de 1,96, de acordo com a literatura citados anteriormente o valor de RMSEC obtidos representam uma necessidade grande de ajuste do modelo e também o valor do RPD indica que a predição foi razoável, sendo assim necessário ajuste para adequar os valores observados com os preditos pelo modelo.

Desta forma, a validação do modelo apresentou  $R^2$  0,94, com RMSEC de 1,319 e RPD de 1,94, pode-se concluir então que apesar dos valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos foram maiores de 0,80. A análise dos demais parâmetros indicam necessidade de ajuste no modelo construído, fato esse que pode também ser observado por meio da Figura 9, em que os pontos da regressão se encontram mais dispersos e com distancia considerada da linha de tendencia.

Figura 9 - Regressão preditiva do modelo (fig. A) e validação (fig. B) para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando o algoritmo MVS (Máquina de Vetor de Suporte)



Autoria própria, 2023.

Nos dois modelos construídos (CFT e atividade antioxidante DPPH), o algoritmo FR (Floresta Randômica) foi o que mais se adequou aos dados dentre os algoritmos testados e apresentados no presente trabalho, sendo possível verificar que os parâmetros de avaliação para o modelo e avaliação do modelo FR podem ser considerados confiáveis na predição de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, nas condições de extração testadas no presente trabalho, para extratos de folhas de *Ottonia corcovadensis*.



### 7.3 Viabilidade celular e parâmetros bioquímicos

Foram realizadas as análises de citotoxicidade em células saudáveis mononucleares de sangue periférico - PBMCs), viabilidade celular em células tumorais (SK-MEL-28, células de melanoma cutâneo metastático). Posteriormente, foi avaliado os níveis de estresse oxidativo por meio de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (NOX). E por fim, foi avaliado as defesas celulares por meio das análises de tióis não proteicos (NPSH) e tióis totais (PSH).

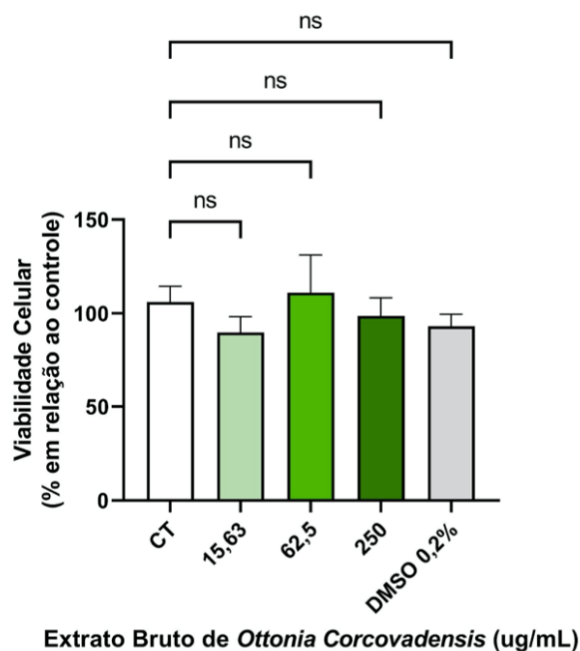
O extrato que teve seu melhor resultado na otimização para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH (T8, 80/20% de etanol/água, 80 °C e 120 min) foi utilizado para a realização dos testes. O extrato teve o etanol evaporado em evaporador rotativo e água resultante retirada por liofilização, com a finalidade dos solventes não causarem interferências nos resultados dos testes. O sólido resultante foi utilizado e ressuspendido em meio específico para cada análise realizada. As concentrações utilizadas de extrato foram 15,63, 62,50 e 250 µg mL<sup>-1</sup>.

#### 7.3.1 Citotoxicidade do extrato etanoico otimizado de *Ottonia corcovadensis* em células mononucleares de sangue periférico – PBMCs

As células foram tratadas com o extrato de *Ottonia corcovadensis* pelo tempo de 24 horas e os resultados podem ser observados na Figura 10. Foram testadas as células com ausência de extrato, o qual foi chamado de controle (CT), e as três concentrações definidas para o estudo (15,63, 62,50 e 250 µg mL<sup>-1</sup>) e por fim foi testada a viabilidade celular frente ao solvente dimetilsulfóxido (DMSO) no qual o extrato foi ressuspensão, com dissolução de 80% em DMSO a 0,2%.

Podemos observar que em comparação com o controle (CT) ( $p < 0,0001$ ) o extrato liofilizado de *Ottonia corcovadensis* não foi capaz de reduzir a viabilidade celular das células saudáveis (PBMCs). Desta forma pode-se dizer que o extrato nas concentrações testadas não apresenta toxicidade a nível celular no organismo humano.

Figura 10 - Viabilidade celular em células saudáveis de sangue periférico PBMCs tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado *Ottonia corcovadensis*



Fonte: Autoria própria, 2023.

Assim como para a atividade antioxidante, a citotoxicidade celular de *Ottonia corcovadensis* ainda carece de estudos. Desta forma, esse trabalho pode ser considerado inovador, uma vez que a planta em estudo é utilizada na medicina popular de povos da região norte do Brasil (FACUNDO *et al.*, 2004).

Estudos realizados por WOLFF *et al.*, (2019) utilizando extrato de *Piper cernuun vell*, coletadas no estado de Santa Catarina, Brasil, nas concentrações de 50, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não mostrou potencial para reduzir a viabilidade celular em células PBMCs, evidenciando assim que nessas concentrações o extrato não é considerado tóxico a nível celular.

Estudos realizados com linfócitos normais de sangue humano, células não tumorais, com duas plantas do gênero piper, *Piper decumanum* e *Piper aduncum* apresentaram baixa citotoxicidade, sendo assim os extratos dessas plantas de estudo sendo consideradas de baixo de nível de toxicidade a nível celular (DAPAR *et al.*, 2020).

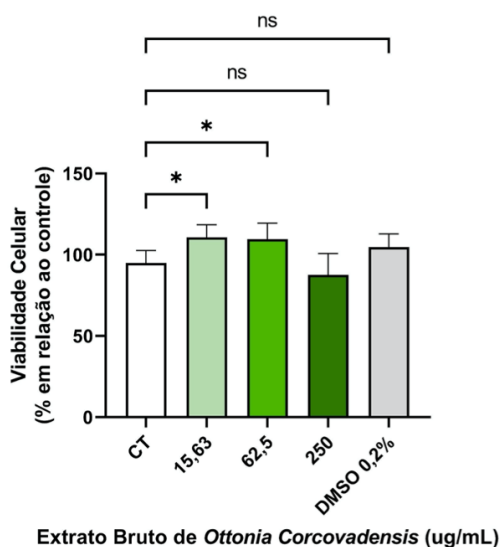
### 7.3.2 Viabilidade celular do extrato etanólico otimizado de *Ottonia corcovadensis* em células de tumorais (SK-MEL-28) de melanoma cutâneo

Na busca por tratamentos e formas de prevenção para o câncer, diversos produtos naturais vêm se destacando como possíveis anticancerígenos. Desta forma, se fazem necessários testes para determinar esse possível potencial para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Compostos fenólicos tem sido associados a modulação de processos carcinogênicos, alterando a proliferação celular, podendo assim ser considerados com potencial anticancerígeno (GALLON *et al.*, 2022).

No presente trabalho, foram testadas 3 concentrações do extrato liofilizado de *Ottonia corcovadensis*, sendo os resultados expressos na Figura 11. Observa-se que nas concentrações de 15,63 e 62,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não houve potencial para diminuir a viabilidade celular em comparação com o controle (CT) ( $p < 0,0001$ ), houve um aumento na viabilidade celular nestas concentrações, enquanto que na concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pode-se notar que há uma pequena diminuição na viabilidade celular, porém a mesma não pode ser considerada significativa quando em comparação com o controle (CT) ( $p > 0,0001$ ).

Figura 11 - Viabilidade celular em células tumorais SK-MEL-28 (melanoma cutâneo) tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado *Ottonia corcovadensis*



Fonte: Autoria própria, 2023.

Fatores como concentrações utilizadas nos testes podem ter influenciado no resultado da atividade antitumoral. Deve se levar em conta que quanto maior for a concentração mais é a disponibilidade de compostos fenólicos no meio. Mas também

deve ser levar em conta que a disponibilidade de compostos fenólicos no extrato pode não conter compostos com potencial a diminuir a viabilidade de células tumorais.

Em estudos conduzidos por YANG *et al.*,(2022) utilizando a planta *Piper hancei* em concentrações de 0,14 g mL<sup>-1</sup>, extraídas com etanol 95%, frente a células MGC-803 (linha celular de câncer gástrico humano), HepG2 (linha celular de câncer hepático humano), SKOV-3 (linha celular de câncer de ovário humano), T24 (linha celular de câncer de bexiga humano), HELA (linhagem celular de câncer humano cervical), apresentou atividade antitumoral moderada, indicando que compostos presentes nesta planta pertencente ao gênero piper pode ter potencial antitumoral.

Um estudo com compostos isolados presentes no extrato metanoico de *Piper kadsura*, onde foram identificados e isolados 14 compostos, avaliou a citotoxicidade do extrato frente a células SK-MEL-2 (melanoma cutâneo), A549 (células de adenocarcinoma pulmonar), SK-OV-3 (células de câncer de ovário) e HCT-15 (células de câncer de colón). Dos 14 compostos testados, 10 apresentaram inibição da viabilidade celular maior que 50%, indicando que maior parte dos compostos encontrados tem potencial antitumoral referencia.

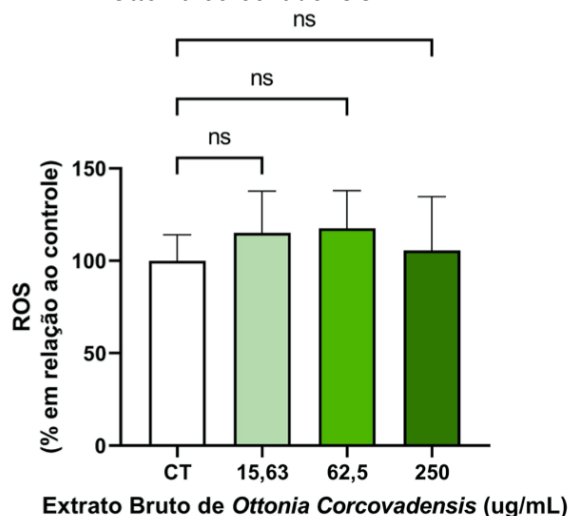
### 7.3.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROS) testadas frente as concentrações do extrato etanoico otimizado de *Ottonia corcovadensis*

As ERO são espécies pró oxidantes que são capazes de causar estresse oxidativo quando ocorre o desbalanceamento dos níveis de radicais livres e as defesas antioxidantes das células (SUN *et al.*, 2021), sendo também precursores de danos ao DNA, o que está relacionado a diversas doenças, até mesmo ao câncer (SALEH *et al.*, 2023).

A análise de detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular foi conduzida frente a aplicação das concentrações de 15,63, 62,50 e 250 µg mL<sup>-1</sup> do extrato liofilizado de *Ottonia corcovadensis* e está representada na

Figura 12.

Figura 12 - Detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROS) tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado *Ottonia corcovadensis*



Fonte: Autoria própria, 2023.

As concentrações testadas em comparação com o controle (CT) não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,0001$ ), não sendo capaz de diminuir os níveis de EROS intracelulares. A concentração do extrato pode estar relacionada com a não diminuição dos níveis de EROS sendo que em concentrações maiores pode haver uma maior disponibilidade de compostos fenólicos capazes de doar elétrons e estabilizar os EROS (BAUNTHIYAL *et al.*, 2017).

Deve-se levar em conta que foi possível diluir apenas 80% do extrato liofilizado, uma diluição completa garantiria uma maior disponibilidade de compostos fenólicos, o que poderia garantir melhores resultados.

Levando em consideração as análises de atividade antioxidante do extrato e compostos fenólicos totais, também pode estar relacionado aos resultados de EROS, uma vez que a atividade antioxidante mede a capacidade do extrato em doar elétrons e estabilizar os EROS.

#### 7.3.4 Detecção de óxido nítrico (NOX) testadas frente as concentrações do extrato etanoico otimizado de *Ottonia corcovadensis*

O óxido nítrico (NOX), assim como EROS, é um marcador de estresse oxidativo, que pode estar relacionado com diversas doenças causadas pelo estresse oxidativo, pois age em diversos processos fisiológicos dos sistemas cardiovascular, imunológico e nervoso (ARNAU DEL VALLE *et al.*, 2022).

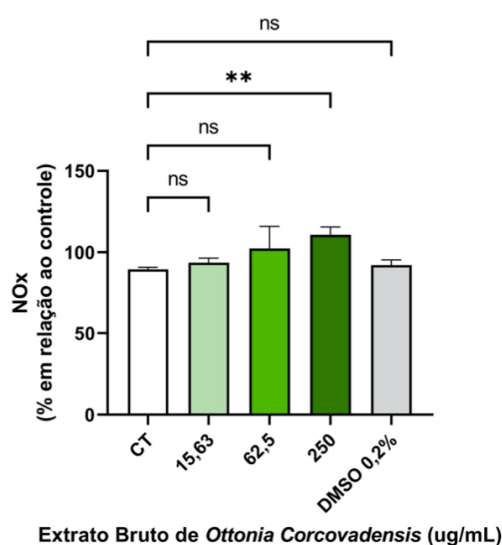
Foram testadas as concentrações 15,63, 62,50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o resultado na análise está representada na Figura 13. Nas concentrações de 15,63 e 62,50 não houve diferença significativa em comparação com o controle (CT) ( $p>0,0001$ ) o que significa que nessas duas concentrações não foi possível diminuir os níveis de óxido nítrico (NOX) intracelular.

Porém ao observar a concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  verificamos que há um aumento nos níveis de óxido nítrico (NOX) quando comparadas com o controle (CT) ( $p<0,0001$ ). Nesta concentração houve um estímulo na produção de NOX o que pode ser interpretado como os compostos presentes no extrato terem atuado como pró oxidantes, que são compostos em que favorecem a produção de marcadores de estresse oxidativo (IWASAKI *et al.*, 2011).

Compostos fenólicos em sua maioria possuem atividade antioxidante, porem na presença de metais de transição, como ferro e cobre, podem apresentar natureza pró oxidante (SPIEGEL *et al.*, 2023).

A atividade pró oxidante pode estar relacionada com o número de hidroxilas ligadas aos compostos fenólicos, como é o caso dos flavonoides, o maior e mais importantes grupo de compostos fenólicos (DONG *et al.*, 2023). Quanto maior o número de hidroxilas, mais propenso a ser um composto pró oxidante ele pode ser (ABOU SAMRA *et al.*, 2011).

Figura 13 - Detecção de óxido nítrico (NOX) tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado *Ottonia corcovadensis*



Fonte: Autoria própria, 2023.

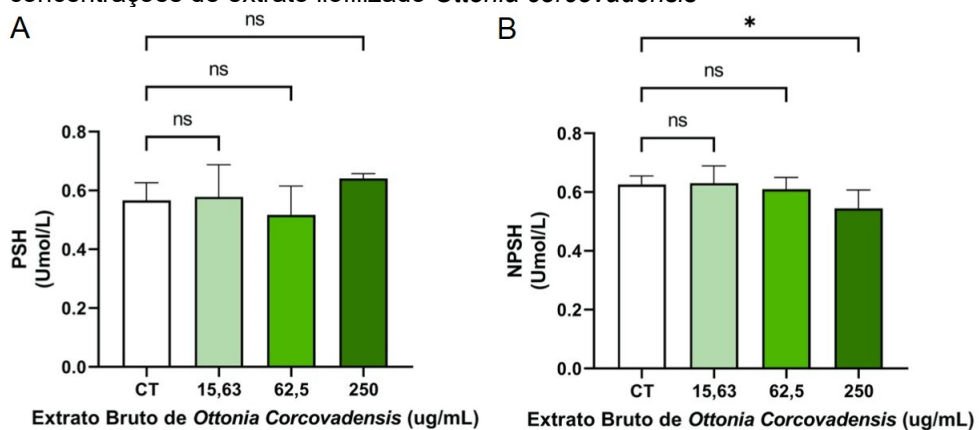
### 7.3.5 Níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH) testadas frente as concentrações do extrato etanólico otimizado de *Ottonia corcovadensis*

Os tióis são compostos que possuem um átomo de enxofre ligado a um átomo de hidrogênio (-SH). Os tióis compreendem importante sistema de defesa antioxidante endógeno no organismo humano, dos quais podemos citar a glutathiona (tiol mais abundante) e a cisteína/cistina. Além disso, os tióis estão envolvidos em diversas reações biológicas, tais como reações enzimáticas, transporte molecular, biossíntese de proteínas, expressão gênica e proteção de células contra o estresse oxidativo (FIDELIS *et al.*, 2021).

Extratos de plantas, com disponibilidade de metabolitos especializados, podem ter potencial em alterar os níveis de tióis, o que pode perturbar as reações antioxidantes intracelulares, mobilizando as defesas antioxidantes endógenas (GIANNERINI *et al.*, 2001).

As Figura 14A e 14B representam as análises de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH). Pode-se verificar que nas concentrações testadas (15,63, 62,50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) não houve diferença significativa entre os níveis de tióis totais (PSH) ( $p > 0,0001$ ), contudo, na concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  houve uma diminuição nos níveis de NPSH quando tratados com os extratos em relação ao controle ( $p < 0,0001$ ), indicando assim que o extrato de *Ottonia corcovadensis* não foi capaz de mobilizar as defesas antioxidantes a nível intracelular PSH e que no teste NPSH o extrato atuou como pró-oxidante diminuindo os níveis de potencial antioxidante endógeno.

Figura 14 - Níveis de tióis totais (PSH) (A) e tióis não proteicos (NPSH) (B) em células tratadas com diferentes concentrações de extrato liofilizado *Ottonia corcovadensis*



Fonte: Autoria própria, 2023.

#### 7.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanoico de *Ottonia corcovadensis*

A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços, sendo avaliada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima, frente aos micro-organismos *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 0028).

Foram utilizadas diluições seriadas a partir da concentração inicial do extrato (0,01 g mL<sup>-1</sup>), como controle positivo (ausência de viabilidade celular) foi utilizada solução de cloranfenicol 0,12% m/v, e o meio inoculado sem tratamento com extrato como controle negativo (células viáveis), adicionalmente foi realizado em triplicata o tratamento das células microbianas com o solvente extrator (etanol 80/20% etanol/água, com acidificação de 0,1% com HCl).

Os resultados estão expressos na Tabela 3, podemos verificar que em nenhuma concentração testada de extrato houve alteração no metabolismo celular, sendo assim o extrato nas concentrações testadas não podem ser consideradas bacteriostáticos ou bactericida.

Tabela 3 - Resultados da atividade antimicrobiana com extrato de *Ottonia corcovadensis*

Microrganismos	CIM (µg mL <sup>-1</sup> )	CBM (µg mL <sup>-1</sup> )
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 19659) (+)	>5,00	>5,00
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19911) (+)	>5,00	>5,00
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) (-)	>5,00	>5,00
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 0028) (-)	>5,00	>5,00

(+) micro-organismos gram-positivo

Fonte: Autoria própria, 2023.

(-) micro-organismo gram-negativo

Concentrações acima de 5 µg mL<sup>-1</sup> devem ser testadas para verificar a possibilidade de morte celular em concentrações maiores, o que resultaria em uma maior disponibilidade de compostos fenólicos, facilitando o rompimento da barreira celular de peptídeo glicano, causando morte celular (ALI *et al.*, 2018).



Levando em conta que a extração foi realizada na concentração de  $0,01 \text{ g mL}^{-1}$ , uma nova extração com maior quantidade de material vegetal deve ser realizada, o que resultaria em nova otimização das condições de extração.

Outra possibilidade é realizar a análise com extrato liofilizado e ressuspender com maior concentração, porém deve-se levar em conta que o teste foi realizado com extrato etanoico a qual estava na concentração de  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  baixa concentração para causar morte celular tratando-se da planta *Ottonia corcovadensis*.

Em estudos realizados com *Piper nigrum* com diferentes solventes extratores, fica evidenciado que o solvente etanol é mais eficiente na atividade antimicrobiana para microrganismos gram-positivos e gram-negativos, Também é possível verificar em que a CIM e CBM para microrganismos gram-positivos foi de  $1250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e gram-negativo  $156,25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Ressaltando que em concentrações maiores podem facilitar o rompimento da barreira celular, causando morte celular (ZARAI *et al.*, 2013)

## **CAPÍTULO 2**

*Análises de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas, Atividade antitumoral, citotoxicidade celular em células saudáveis e estresse oxidativo do óleo essencial de Ottonia corcovadensis*

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO CAPÍTULO 2

### 8.1 Identificação dos compostos químicos do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Com a utilização da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foi possível identificar um total de 38 compostos químicos, com auxílio da literatura e banco de dados de espectros de massas, totalizando 86,34% do total de compostos encontrado no óleo essencial, os resultados podem ser observados na Tabela 4.

A maioria dos compostos encontrados no óleo essencial foram sesquiterpenos (C15) e monoterpenos (C10). Os compostos majoritários no óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* foram *E*-sesquisabineno hidrato (24,91%), *E*-cariofileno (10,75%),  $\beta$ -pineno (5,61%), *E*- $\beta$ -farneseno (5,22%), 14-hidroxicariofileno (4,63%), limoneno (3,76%), e *p*-cimeno (3,62%).

Até o momento e levando em consideração os dados disponíveis na literatura, é a primeira vez que o composto *E*-sesquisabineno hidrato é relatado em óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*. É relatado na literatura a presença de sesquiterpenóides, inclusive em óleos essenciais de plantas do gênero piper, com atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (BRAGA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Neste trabalho, os compostos *E*- $\beta$ -farneseno e *p*-cimeno foram encontrados em quantidades mais significativas do que as observadas por DA SILVA *et al.*, (2016) em óleo essencial de plantas coletadas em Recife (PB, Brasil).

Os compostos *E*-cariofileno e  $\beta$ -pineno foram identificados e quantificados, com teores de 4,41% e 6,96% em óleo essencial de *Piper corcovadensis* coletadas em Recife (PE, Brasil) (DE LIRA PIMENTEL *et al.*, 2022). Além disso, o composto limoneno foi encontrado em óleo essencial de *Piper corcovadensis* de Recife (PE, Brasil) e Rio de Janeiro (RJ, Brasil) (DA SILVA *et al.*, 2016; FACUNDO *et al.*, 2004).

Deve-se levar em conta que fatores ambientais são decisivos na composição química dos metabólitos produzidos pelas plantas, onde ela é capaz de sintetizar compostos específicos de acordo com sua necessidade (SÁ FILHO *et al.*, 2022). A

planta da qual foi extraído o óleo essencial para o presente trabalho foi obtida na região norte do Brasil, região de floresta tropical úmida.

Em trabalhos presentes na literatura com *Ottonia corcovadensis*, foram utilizadas técnicas de extração por hidrodestilação, maceração, fluido supercrítico, headspace, destilação a vapor e ultrassom. Dentre as técnicas citadas, hidrodestilação de headspace obtiveram os melhores rendimentos extrativos, enquanto as demais técnicas tiveram baixo rendimento, sendo que a técnica por fluido supercrítico teve os menores teores de óleo essencial na extração (ALBUQUERQUE *et al.*, 2022).

Em estudos com plantas do gênero piper, pode-se encontrar em sua maioria compostos semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Pode-se citar os compostos obtidos por meio da planta *Piper marginatum* na qual foram encontrados  $\beta$ -pineno, limoneno e *p*-cimeno ambos compostos majoritários neste estudo citado e no presente trabalho. Compostos minoritários em comum também puderam ser encontrados como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -cubebeno, ciclosativeno,  $\beta$ -elemeno and  $\gamma$ -gurjuneno (BRÚ; GUZMAN, 2016).

No enteando, em trabalhos com *Piper nigrum*, foi possível observar a presença de isômeros dos compostos limoneno e *E*-cariofileno, compostos esses que foram encontrados de forma majoritária em *Piper nigrum*, também o composto *p*-cimeno foi encontrado, porém em menores quantidade. O compostos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\beta$ -elemeno também foram encontrado porem podem ser classificados como compostos minoritários em razão de sua quantidade (BASTOS *et al.*, 2020).

Os compostos *E*-sesquisabineno hidrato, *E*-cariofileno foram encontradas em *Piper aduncum* (Jaborandi do mato) coletadas no sul do Brasil, ambos os compostos foram em encontrados em níveis mais elevados do que os obtidos no presente estudo. Estes compostos também foram encontrados em outros duas espécies de plantas do gênero piper, *Piper arboreum* e *Piper gaudichaudianum* (SILVA *et al.*, 2019).

Tabela 4 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

	<b>Composto*</b>	<b>IA</b> (Determinado) <sup>a</sup>	<b>IA</b> (Literatura) <sup>b</sup>	<b>Níveis</b> (% no óleo) <sup>*</sup>	<b>Estrutura</b> <b>química<sup>b</sup></b>
1	$\alpha$ -pineno	923	932	2.52	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
2	$\beta$ -pineno	967	974	5.61	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
3	Mircene	978	988	0.13	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
4	$\alpha$ -felandreno	997	1002	0.33	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
5	$\delta$ -3-Carene	1000	1008	0.40	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
6	<i>p</i> -cimeno	1015	1020	3.62	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>
7	Limoneno	1019	1024	3.76	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
8	<i>cis</i> -piperitol acetato	1323	1332	0.28	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
9	$\alpha$ -cubebeno	1335	1345	1.32	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
10	Ciclosativeno	1358	1369	0.39	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
11	$\alpha$ -ilongeno	1364	1373	3.98	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
12	$\beta$ -elemeno	1378	1389	0.51	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
13	3-dodecanona	1387	1389	0.15	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O
14	7- <i>epi</i> -sesquitujeno	1390	1390	0.12	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
15	Sibereno	1395	1400	0.27	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
16	Sesquitujeno	1400	1405	0.17	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
17	<i>E</i> -cariofileno	1411	1417	10.75	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
18	$\beta$ -copaeno	1426	1430	0.92	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
19	<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1430	1432	2.29	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
20	Aromadendreno	1439	1439	0.87	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
21	<i>E</i> - $\beta$ -farneseno	1457	1454	5.22	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
22	Linalil isovalerato	1463	1466	1.10	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
23	$\gamma$ -gurjuneno	1470	1475	0.40	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>

24	$\alpha$ -amorfenol	1491	1495	1.09	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
25	$\beta$ -himachaleno	1499	1500	2.61	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
26	$\beta$ -bisaboleno	1506	1505	0.26	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
27	10- <i>epi</i> -cubebol	1534	1533	0.53	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
28	hidrato de <i>E</i> -sesquisabineno	1583	1577	24.91	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
29	Guaiol	1601	1600	1.13	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
30	2,(7Z)-bisaboladien-4-ol	1614	1618	0.67	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
31	2- <i>epi</i> - $\beta$ -cedren-3-ona	1647	1643	0.97	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
32	14-hidroxicariofileno	1667	1666	4.63	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
33	<i>epi</i> -zizanona	1671	1668	2.99	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
34	5- <i>neo</i> -cedranol	1676	1684	0.17	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
35	eudesm-7(11)-em-4-ol	1704	1700	0.37	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
36	Curcufenol	1727	1717	0.22	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
37	Guaiol acetato	1731	1725	0.15	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O
38	8- $\alpha$ -11-elemodiol	1746	1746	1.13	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
					16.37% (7)
Monoterpenos					
Monoterpenos oxigenados					0.28% (1)
Sesquiterpenos					30.57% (16)
Sesquiterpenos Oxigenados					38.97% (13)
Outros					0.15% (1)
<b>Total</b>					<b>86.35% (38)</b>

Fonte: Autoria própria, 2023.

\* Picos listados em ordem de eluição em uma coluna capilar Rtx-5MS de 30 m, detector TQ8040;

<sup>a</sup> Índices aritméticos (IA) calculados em relação a uma série de n-alcanos C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>;

<sup>b</sup> Índices aritméticos (IA) encontrados na literatura (ADAMS, 2007).

De forma geral o óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* é composto de forma majoritária por monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, os quais podem ter potencial antioxidante, antitumoral, atividade biológicas e atividade antimicrobiana.

## 8.2 Atividade antioxidante do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*

Para avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial foram utilizados diferentes métodos, levando em consideração que cada método possui especificidades em relação aos mecanismos de ação envolvidos. Levando em consideração a matriz analisada (óleo essencial), o objetivo foi estimar os antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, utilizando métodos baseados na transferência de elétrons e na transferência de átomos de hidrogênio. Sendo assim, foram utilizados os métodos da capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu (CFT) e os métodos de sequestro dos radicais ABTS e DPPH.

Os resultados da atividade antioxidante estão expressos na Tabela 5. Pode-se observar que o valor encontrado para a análise da capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu (CFT) foi de  $5,41 \pm 0,17$  mg EAG  $g^{-1}$ . Os óleos essenciais são compostos por monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), terpenóides (isoprenóides) e por compostos aromáticos como aldeídos, álcoois, entre outros (CALO *et al.*, 2015). O método de quantificação utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu além de quantificar compostos fenólicos pode interagir com grupos hidroxilas de outras estruturas presentes no óleo essencial como as já citadas acima (TORRES; CHOW, 2017).

Na Tabela 4 pode-se observar que dentre os compostos listados temos os sesquiterpenos oxigenados (33,76%) que também podem ser classificados como álcool sesquiterpeno, devido à presença do grupo hidroxila na estrutura, nesta classificação encontra-se o composto majoritário identificado *E*-sesquisabineno hidrato (24,91%).

A atividade antioxidante pelo método DPPH obteve o valor de  $2,88 \pm 0,17$   $\mu\text{mol ET mL}^{-1}$  e para o ensaio ABTS  $6,26 \pm 0,02$   $\mu\text{mol ET mL}^{-1}$ . A principal diferença entre os valores obtidos nesses dois métodos de avaliação da atividade antioxidante pode ser explicada pelo fato do radical ABTS ter maior afinidade com compostos hidrofílicos e

lipofílicos (afinidade por lipídeos) enquanto o DPPH tem afinidade com compostos hidrofílicos (FLOEGEL *et al.*, 2011; SRIDHAR; CHARLES, 2019).

Os compostos *p*-cimeno, limoneno e  $\beta$ -pineno, identificados neste trabalho como majoritários com níveis de 3,62%, 3,76% e 5,61%, foram avaliados separadamente por Sharopov *et al.*, (2015) pelos métodos ABTS e DPPH e apresentaram potencial antioxidante.

Um isômero dos compostos *E*-sesquisabineno hidrato foi relatado em trabalhos com *Cynometra cauliflora L.* No óleo essencial dos ramos da planta foi quantificado em 58,77% de *trans*-sabineno, o qual foi relatado como composto majoritário. Este trabalho relata que a atividade antioxidante do óleo essencial dos ramos é superior a das folhas e raízes (SAMLING *et al.*, 2021).

Outros compostos identificados neste trabalho e seus isômeros são relatados na literatura com potencial antioxidante como é caso dos compostos *E*-cariofileno extraídos de sementes de *Carum nigrum* (SINGH *et al.*, 2006),  $\beta$ -pineno extraído de *Hyssopus officinalis* (GHARAKHANI-BENI *et al.*, 2022), *E*- $\beta$ -farneseno (composto isolado) (LATEEF *et al.*, 2013), limoneno (SANTA *et al.*, 2022) composto esse bastante utilizado na indústria cosmética e alimentícia (RAVICHANDRAN *et al.*, 2018) e por fim o composto *p*-cimeno também tem atividade antioxidante relatada na literatura (BALAHBIB *et al.*, 2021).

Tabela 5 - Atividade antioxidante pelo método de redução do reagente de Folin-Ciocalteu e pelos métodos ABTS e DPPH do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*

CFT (mg EAG mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	DPPH ( $\mu$ mol ET mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	ABTS ( $\mu$ mol ET mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
5,41 $\pm$ 0,170*	2,88 $\pm$ 0,170	6,26 $\pm$ 0,021

Fonte: Autoria própria, 2023.

\*média e desvio padrão das replicatas

<sup>a</sup>EAG: Equivalente ácido gálico

<sup>b</sup>ET: Equivalente Trolox

### 8.3 Viabilidade celular e parâmetros bioquímicos

Foram realizadas as análises de viabilidade celular e parâmetros bioquímicos nas concentrações 15,63, 62,50 e 250  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. foram realizadas as análises de citotoxicidade (em células saudáveis, não tumorais, célula mononucleares de sangue periférico - PBMCs), viabilidade celular em células tumorais (SK-MEL-28 células de melanoma cutâneo). Para as variáveis bioquímicas foram testadas as concentrações

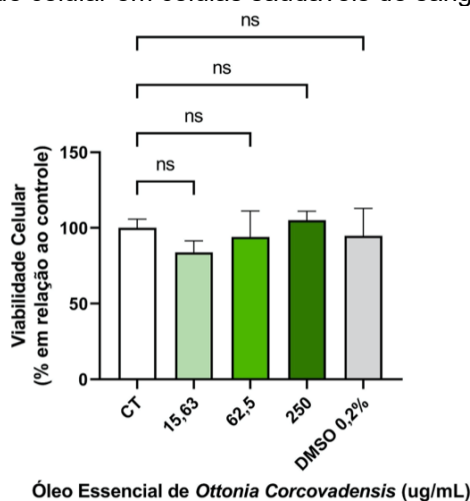


do óleo essencial frente os níveis de estresse oxidativo por meio de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (NOX). E por fim foi avaliado as defesas celulares por meio das análises de tióis não proteicos (NPSH) e tióis totais (PSH).

### 8.3.1 Citotoxicidade do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* em células mononucleares de sangue periférico – PBMCs

Os resultados da citotoxicidade do óleo essencial estão representados na Figura 15 é possível verificar que em nenhuma das concentrações testadas houve diminuição da viabilidade celular das células PBMCs em comparação com o controle (CT) ( $p > 0,0001$ ). Esse resultado indica que as células saudáveis do organismo humano não são afetadas pelos compostos presentes no óleo essencial nas concentrações estudadas, garantindo assim uma maior segurança para aplicações futuras em produtos farmacológicos, alimentares ou cosméticos.

Figura 15 - Viabilidade celular em células saudáveis de sangue periférico PBMCs



Fonte: Autoria própria, 2023

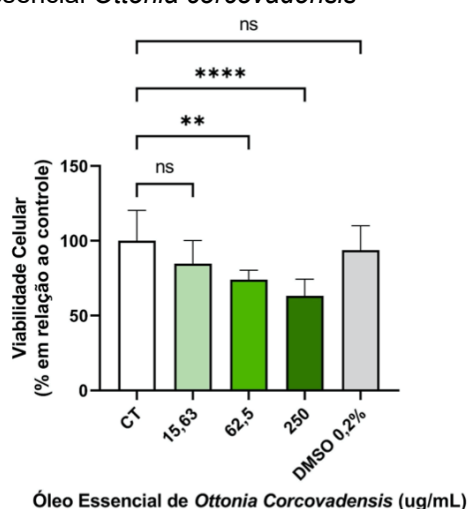
### 8.3.2 Viabilidade celular do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* em células tumorais (SK-MEL-28) de melanoma cutâneo

Foram realizados estudos da viabilidade celular frente a células SK-MEL-28 células de melanoma cutâneo humano e os resultados estão expressos na Figura 17,

foram testadas 3 concentrações de óleo essencial (15,63, 62,50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com diluição em DMSO 0,2%.

Pode-se observar a primeira concentração testada de 15,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não teve diferença significativa na viabilidade celular em comparação com o controle (CT) ( $p>0,0001$ ). Porém as demais concentrações testadas 62,50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram diminuição na viabilidade celular das células tumorais quando comparadas com o controle (CT) ( $p<0,0001$ ).

Figura 16 - Viabilidade celular em células tumorais SK-MEL-28 (melanoma cutâneo) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial *Ottonia corcovadensis*



É possível também verificar que conforme a concentração em que as células foram tratadas maior foi a inibição da viabilidade celular, indicando que conforme a concentração é aumentada mais sensíveis as células ficam ao óleo essencial. Fato que esse que pode se considerar que o óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* possui atividade antitumoral *in vitro*.

Essa atividade antitumoral pode ser explicada por meio dos compostos que compõem o óleo essencial, alguns dos compostos que foram identificados no presente trabalho tem sido relatado na literatura com potencial antitumoral.

O composto *E*-sesquisabineno hidrato, composto majoritário no óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* neste estudo (24,91%), já tem sido relatado como antitumoral frente a células MCF-7 (célula de câncer de mama humano) (SAMLING *et al.*, 2021).

Além disso, outro composto majoritário encontrado neste trabalho, *E*- $\beta$ -farneseno (5,22%), apresentou atividade antitumoral frente as células de tumorais de mieloma, câncer pancreático, carcinoma de mama e próstata e linhagens celulares de leucemia (HYUCK *et al.*, 2015).

O composto também majoritário *p*-cimeno (3,62%) também apresentou atividade antitumoral frente as células MCF-7 (células de câncer de mama humano) (KALU *et al.*, 2015).

Um fato importante que pode ser observado neste trabalho é que na avaliação da viabilidade celular frente as células saudáveis PBMCs, não houve diminuição na viabilidade celular, conforme já relatado anteriormente, já nas células tumorais houve diminuição na viabilidade celular, o resultado obtido pode ser considerado promissor do ponto de vista farmacológico tendo em vista o citado anteriormente.

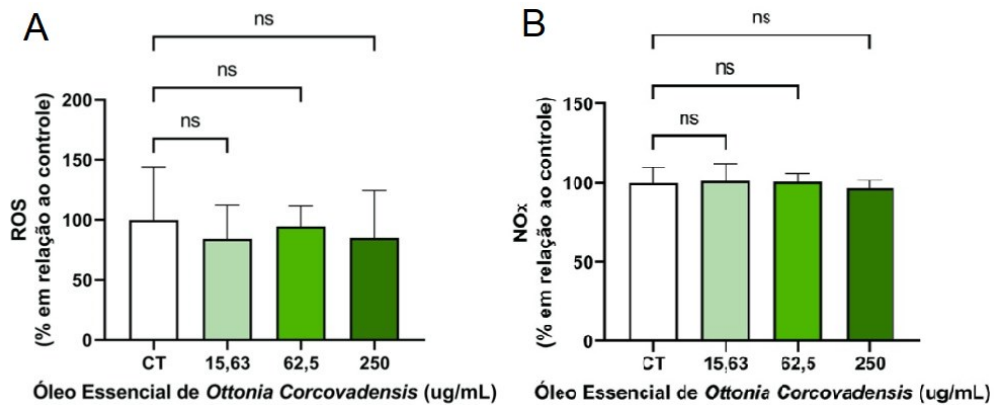
### 8.3.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROS) e óxido nítrico (NOX) testadas frente as concentrações do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*

As espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio são compostos altamente reativos que podem originar em grande acúmulo no organismo humano o estresse oxidativo, desta forma são importantes marcadores biológicos quando podem ser ponto de partida para diversas doenças (MAKRIS *et al.*, 2023).

As Figura 17A e 17B representam os resultados para análises EROS e NOX respectivamente. Pode se observar que não houve diferença estatística significativa entre os níveis de EROS e NOX do controle (CT) com os tratamentos com as concentrações de óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*.

Pode-se então dizer que o óleo essencial nas concentrações testadas não foi capaz de diminuir os níveis de estresse oxidativo frente aos marcadores EROS e NOX, porém pode-se observar também que as concentrações testadas impediram o aumento de dos níveis de EROS e NOX, desta forma o óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* pode ser considerado com potencial antioxidante (WU *et al.*, 2015), afirmação essa que pode ser corroborada por meio dos resultados de atividade antioxidante citadas anteriormente neste trabalho.

Figura 17 - Detecção de espécies reativas de oxigênio EROS (A) e detecção de óxido nítrico NOX (B) frente ao tratamento com óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*



Fonte: Autoria própria, 2023

#### 8.3.4 Níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH) testadas frente as concentrações do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*

Os níveis de tióis totais (PSH) e tióis não proteicos (NPSH) são marcadores bioquímicos dos sistemas antioxidantes endógenos de grande importância para o organismo humano, onde os tecidos compensam o dano oxidativo causado por radicais livres com a produção de antioxidantes endógenos (SIES, 2015).

Nas F

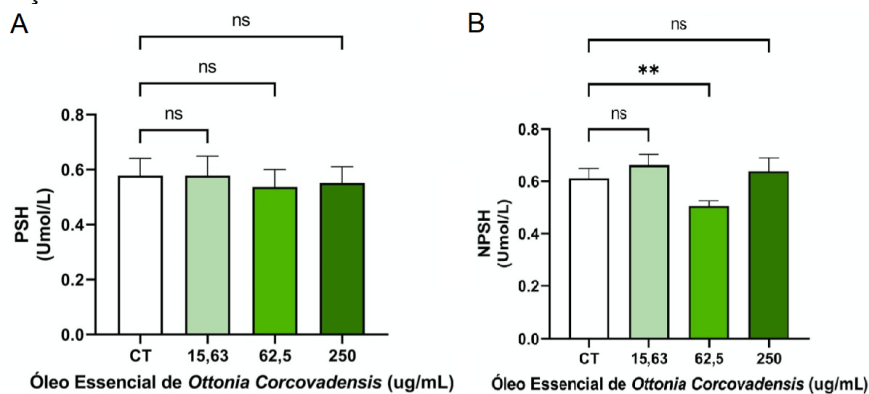
Figura 18A e 18B podemos verificar os resultados das análises de PSH e NPSH. Os níveis de PSH não foram alterados durante a análise, isto quer dizer que o óleo essencial não foi capaz de mover as células de defesa, em comparação com o controle (CT) ( $p > 0,0001$ ). Porém, ao analisar os resultados para NPSH, é possível verificar que nas concentrações de 15,63 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não houve diferença significativa entre os níveis de NPSH do controle (CT) ( $p > 0,0001$ ).

Na concentração de 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  houve uma diminuição nos níveis de NPSH em comparação ao controle, com diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ), pode-se entender que nessa concentração houve uma inibição dos sistemas antioxidantes endógenos NPSH da qual a glutathiona corresponde a 90% dos níveis de NPSH intracelular (NASSAR *et al.*, 2014).

Visto o citado acima, é possível interpretar os resultados como se nas concentrações de 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  houve um desestímulo dos níveis de NPSH, porém com aumento da concentração há novamente uma estímulo dos sistemas antioxidantes endógenos, desta forma, não foi possível concluir se a diminuição da

viabilidade celular das células SK-MEL-28 foi pela via do estresse oxidativo, necessitando assim que mais estudos para conhecer qual foi a vida responsável pelo resultado.

Figura 18 - Níveis de tióis totais (PSH) (A) e tióis não proteicos (NPSH) (B) em células tratadas com diferentes concentrações de *Ottonia corcovadensis*



Fonte: Autoria própria, 2023

#### 8.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*

A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi testada frente aos microrganismos *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 0028).

Diluições seriadas foram realizadas partindo do óleo ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), até a concentração final de  $0,163 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Foram realizados controle positivo com uso de cloranfenicol 0,12% m/v e controle negativo meio de cultura inoculado (com viabilidade celular). O solvente para diluição foi água destilada esterilizada a qual foi testada como controle.

Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6, para os microrganismos *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* os valores de CIM e CBM foram  $\geq 10,46 \mu\text{g mL}^{-1}$  (extrato bruto, sem diluição), sendo que nesta concentração o óleo é considerado bacteriostático (diminuição da atividade celular) e bactericida (causando morte celular).

Já para os testes frente ao microrganismo *Escherichia coli* os valores para CIM e CBM foram  $\geq 2,61 \mu\text{g mL}^{-1}$  sendo que nessa concentração houve uma maior sensibilidade da parede celular causando a morte celular, sendo que o óleo nessa concentração pode ser considerado bacteriostático e bactericida.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*

Bactéria	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	MBC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>Bacillus subtilis</i>	$\geq 10,46$	$\geq 10,46$
<i>Listeria monocytogenes</i>	$\geq 10,46$	$\geq 10,46$
<i>Escherichia coli</i>	$\geq 2,61$	$\geq 2,61$
<i>Salmonella typhimurium</i>	$\geq 10,46$	$\geq 10,46$

Fonte: Autoria própria, 2023

Entre os compostos químicos que compõem o óleo essencial de *Ottonia corcovadensis*, é relatado na literatura atividade antimicrobiana, o que pode explicar os resultados obtidos no presente trabalho.

O composto *E*-cariofileno, um dos compostos majoritários desse trabalho, é relatado com potencial antimicrobiano em estudos conduzidos por SABULAL *et al.*, (2006) em óleo essencial de *Zingiber nimmonii*. O composto  $\beta$ -pineno e seu enantiômero  $\alpha$ -pineno também foram relatados com atividade antimicrobiana em estudos de (SILVA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2019).

Os compostos *E*- $\beta$ -farneseno, *p*-cimeno e limoneno também tem atividade antimicrobiana relatada na literatura (LATEEF *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2022), todos os compostos citados são majoritários no óleo essencial de *Ottonia corcovadensis* identificados neste trabalho.

## 9. CONCLUSÃO

Foi possível obter um único extrato para otimizado para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante DPPH, fato esse considerado bom para possíveis aplicações futuras evitando que se tenha duas respostas diferentes para cada análise realizada, posteriormente o extrato otimizado (T8) teve sua atividade antioxidante analisada pelos métodos ABTS e FRAP os quais apresentaram também potencial antioxidante.

A construção do modelo quimiométrico por imagem também foi possível, obtendo-se um modelo robusto e confiável obtido pela utilização do algoritmo Floresta Randômica (RF), que apresentou melhores respostas dentre os demais algoritmos testados.

O teste de citotoxicidade mostrou que o extrato liofilizado de *Ottonia corcovadensis* não apresenta toxicidade frente as células PBMCs (células saudáveis de sangue periférico), porém nas concentrações testadas o extrato não apresentou atividade antitumoral frente as células SK-MEL-28 (células de melanoma cutâneo humano) e células bacterianas e nem foi capaz de alterar os marcadores de estresse oxidativo EROS, NOX, PSH e NPSH.

Este trabalho foi dividido em duas partes, sendo que a parte dois refere-se ao estudo do óleo essencial, obtido por arraste de vapor, de *Ottonia corcovadensis*, através de CG-EM foi possível identificar 38 compostos (86,35% do total de compostos encontrados), sendo que os majoritários foram *E*-sesquisabineno hidrato (24,91%), *E*-cariofileno (10,75%),  $\beta$ -pineno (5,61%), *E*- $\beta$ -farneseno (5,22%), 14-hidroxicariofileno (4,63%), limoneno (3,76%), e *p*-cimeno (3,62%).

A atividade antioxidante do extrato foi determinada, sendo que os melhores resultados foram obtidos pelo método ABTS o qual quantifica compostos hidrofílicos e lipofílicos, levando em consideração que os óleos essenciais são ricos em compostos lipofílicos.

Quanto as análises de citotoxicidade e viabilidade celular das células tumorais pode-se observar que o óleo essencial não apresentou citotoxicidade celular em células saudáveis, porém diminuiu a viabilidade celular em duas das 3 concentrações testadas 62,50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , podendo ser considerado como potencial antitumoral.

Quanto aos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo EROS, NOX, PSH e NPSH não houve diferença significativas entre o controle e as células tratadas com as concentrações de óleo essencial, não podendo garantir qual a via metabólica em que houve a morte celular das células tumorais.

A atividade antimicrobiana teve resultados positivos (CIM e CBM) para todos os microrganismos testados, sendo que apenas o microrganismo *E. coli* apresentou atividade antimicrobiana (CIM e CBM) quando testada suas diluições.

Estudos futuros com outras técnicas extrativas e outras condições de extração tanto para o extrato etanoico quanto para o óleo essencial podem ser realizadas no futuro, para que se possam potencializar as atividades já encontradas, no caso do óleo essencial, e obter um extrato etanoico com maior disponibilidade de compostos fenólicos o que pode trazer novos e melhores resultados as análises.



## 10. REFERÊNCIAS

ABEL, S. D. A.; BAIRD, S. K. Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: Considerations for the choice of cell viability assay. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 241, n. April 2017, p. 70–78, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.083>.

ABOU SAMRA, M.; CHEDEA, V. S.; ECONOMOU, A.; CALOKERINOS, A.; KEFALAS, P. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 622–629, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.076>.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4<sup>a</sup>ed. Carol Stream: Allured Publishing Comporation, 2007. 2007.

ADESINA, O. S.; AGUNBIADE, D. A.; OGUNTUNDE, P. E. Flexible Bayesian Dirichlet mixtures of generalized linear mixed models for count data. **Scientific African**, [s. l.], v. 13, p. e00963, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00963>.

AKOMENG, N.; ADUSEI, S. Organic solvent extraction and spectrophotometric quantification of total phenolic content of soil. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. e08388, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08388>.

AKWU, N. A.; LEKHOAA, M.; DEQIANG, D.; AREMU, A. O. Antidepressant effects of coumarins and their derivatives: A critical analysis of research advances. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 956, n. July, p. 175958, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175958>.

AL-ABRI, S. S.; SAID, S. A.; TOUBY, S. S. AI; HOSSAIN, M. A.; AL-SABAHI, J. N. Composition analysis and antimicrobial activity of essential oil from leaves of *Laurus*

nobilis grown in Oman. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 328–334, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2022.09.003>.

ALBUQUERQUE, B. N. de L.; DA SILVA, M. F. R.; DA SILVA, P. C. B.; DE LIRA PIMENTEL, C. S.; LINO DA ROCHA, S. K.; FARIAS DE AGUIAR, J. C. R. de O.; NETO, A. C. A.; PAIVA, P. M. G.; GOMES, M. G. M.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F.; AMARAL FERRAZ NAVARRO, D. M. do. Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of  $\beta$ -germacrene-D-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 182, n. March, 2022.

ALI, A.; LIM, X. Y.; WAHIDA, P. F. The fundamental study of antimicrobial activity of Piper betle extract in commercial toothpastes. **Journal of Herbal Medicine**, [s. l.], v. 14, n. August, p. 29–34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.08.001>.

ALMUSHAYTI, A. Y.; BRANDT, K.; CARROLL, M. A.; SCOTTER, M. J. Current analytical methods for determination of glucosinolates in vegetables and human tissues. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1643, p. 462060, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462060>.

ANDRÉS, S.; MURRAY, I.; NAVAJAS, E. A.; FISHER, A. V.; LAMBE, N. R.; BÜNGER, L. Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 509–516, 2007.

ARAUJO, M. M. de; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 83, n. 0, p. 1–7, 2016.

ARNAU DEL VALLE, C.; WILLIAMS, L.; THOMAS, P.; JOHNSON, R.; RAVEENTHIRARAJ, S.; WARREN, D.; SOBOLEWSKI, A.; MUÑOZ, M. P.; GALINDO, F.; MARÍN, M. J. A highly photostable and versatile two-photon fluorescent probe for the detection of a wide range of intracellular nitric oxide concentrations in macrophages

and endothelial cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 234, n. June, 2022.

ATAKORAH, E. A.; AFRANIE, B. O.; ADDY, K. D.; SARFO, A. D.; OKYERE, B. A. Assessment of intestinal and blood protozoan infections among pregnant women visiting ante-natal care at Tafo Hospital, Ghana. **Heliyon**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. e09968, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09968>.

AWOSILE, B. B.; RAHMAN, M. K.; WILLIAMS, R.; LONERAGAN, G. Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporins in Escherichia Coli and Salmonella Enterica Isolated from Food-Producing Animals: Ecological Study from Selected National Surveillance Programs. **SSRN Electronic Journal**, [s. l.], v. 206, n. April, p. 105710, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105710>.

BALAHBIB, A.; EL, Nasreddine; EL, Naoufal; LAKHDAR, F.; EL, Naoual; SALHI, N.; NACEIRI, H.; BAKRIM, S.; ZENGIN, G.; BOUYAHYA, A. Health beneficial and pharmacological properties of p -cymene. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 153, n. March, p. 112259, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112259>.

BASHIR MIR, M.; RASTOGI, S.; HARIPRIYA, S. Optimization of process variables for the preparation of almond gum incorporated set-yogurt using Box-Behnken response surface model. **Applied Food Research**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 100016, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2021.100016>.

BASTOS, L. P. H.; DOS SANTOS, C. H. C.; DE CARVALHO, M. G.; GARCIA-ROJAS, E. E. Encapsulation of the black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil by lactoferrin-sodium alginate complex coacervates: Structural characterization and simulated gastrointestinal conditions. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 316, n. August 2019, p. 126345, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126345>.

BAUNTHIYAL, M.; SINGH, V.; DWIVEDI, S. Insights of antioxidants as molecules for drug discovery. **International Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 874–889, 2017.

BELENGUER-VAREA, Á.; TARAZONA-SANTABALBINA, F. J.; AVELLANA-ZARAGOZA, J. A.; MARTÍNEZ-REIG, M.; MAS-BARGUES, C.; INGLÉS, M. Oxidative stress and exceptional human longevity: Systematic review. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 149, p. 51–63, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.019>.

BRAGA, A. L.; DA CRUZ, R. P.; CARNEIRO, J. N. P.; DOS SANTOS, A. T. L.; SALES, D. L.; BEZERRA, C. F.; FONSECA, V. J. A.; ROCHA, J. E.; DE FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; COSTA, M. do S.; AMARAL, W. do; REBELO, R. A.; DA SILVA, L. E.; RIBEIRO-FILHO, J.; COUTINHO, H. D. M.; RODRIGUES, F. F. G.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.: Chemical composition, antimicrobial effects, and modulation of antimicrobial resistance. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 142, p. 495–501, 2021.

BRÚ, J.; GUZMAN, J. D. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *piper marginatum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 767–779, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.014>.

BRUNO SIEWE, F.; KUDRE, T. G.; NARAYAN, B. Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction conditions of umami compounds from fish by-products using the combination of fractional factorial design and central composite design. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 334, p. 127498, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127498>.

CABRAL, L.; PERSINOTI, G. F.; PAIXÃO, D. A. A.; MARTINS, M. P.; MORAIS, M. A. B.; CHINAGLIA, M.; DOMINGUES, M. N.; SFORCA, M. L.; PIROLLA, R. A. S.; GENEROSO, W. C.; SANTOS, C. A.; MACIEL, L. F.; TERRAPON, N.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B.; MURAKAMI, M. T. Gut microbiome of the largest living rodent harbors unprecedented enzymatic systems to degrade plant polysaccharides. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–16, 2022.

CAKMAKCI, S.; TOPDAŞ, E. F.; KALIN, P.; HAN, H.; ŞEKERCI, P.; P. KÖSE, L.; GÜLÇİN, I. Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 472–481, 2015.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, [s. l.], v. 54, p. 111–119, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>.

CARRASCO-SANDOVAL, J.; ARANDA-BUSTOS, M.; HENRÍQUEZ-AEDO, K.; LÓPEZ-RUBIO, A.; FABRA, M. J. Bioaccessibility of different types of phenolic compounds co-encapsulated in alginate/chitosan-coated zein nanoparticles. **Lwt**, [s. l.], v. 149, n. April, p. 4–11, 2021.

CARRIZOSA, E.; GALVIS RESTREPO, M.; ROMERO MORALES, D. On clustering categories of categorical predictors in generalized linear models. **Expert Systems with Applications**, [s. l.], v. 182, p. 115245, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957417421006771>.

CASAJÚS, V.; CIVELLO, P.; MARTÍNEZ, G.; HOWE, K.; FISH, T.; YANG, Y.; THANNHAUSER, T.; LI, L.; GÓMEZ LOBATO, M. Effect of continuous white light illumination on glucosinolate metabolism during postharvest storage of broccoli. **Lwt**, [s. l.], v. 145, n. August 2020, 2021.

CHAMALI, S.; BENDAOU, H.; BOUAJILA, J.; CAMY, S.; SAADAoui, E.; CONDORET, J.-S.; ROMDHANE, M. Optimization of accelerated solvent extraction of bioactive compounds from *Eucalyptus intertexta* using response surface methodology and evaluation of its phenolic composition and biological activities. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [s. l.], v. 35, n. January, p. 100464, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2023.100464>.

CHANDER, R.; MAURYA, A. K.; KUMAR, K.; KUMARI, S.; KUMAR, R.; AGNIHOTRI, V. K. In vitro antidiabetic and antimicrobial activity of *Dracocephalum heterophyllum*

Benth. essential oil from different sites of North-western Himalayas India. **Natural Product Research**, [s. l.], p. 1–4, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147864192207005X>.

CHANDLER, R. E. Multisite, multivariate weather generation based on generalised linear models. **Environmental Modelling and Software**, [s. l.], v. 134, p. 104867, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2020.104867>.

CHEN, F.; CHEN, Cheng; CHEN, Chen; YAN, Z.; GAO, R.; HAN, H.; LI, W.; LV, X. Application of PLSR in rapid detection of glucose in sheep serum. **Optik**, [s. l.], v. 224, p. 165734, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003040262031562X>.

CHEW, K. K.; NG, S. Y.; THOO, Y. Y.; KHOO, M. Z.; WAN MUSTAPHA, W.; CHUN WAI, H. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 18, p. 571–578, 2011.

CHIOCCHIO, I.; MANDRONE, M.; TOMASI, P.; MARINCICH, L.; POLI, F. Plant secondary metabolites: An opportunity for circular economy. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 2, 2021.

CLSI, W. Clinical and laboratory standards institute methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approve Standard M7-A7, CLSI, seventh ed, PA, USA**, [s. l.], 2006.

COLINAS, M.; FITZPATRICK, T. B. Coenzymes and the primary and specialized metabolism interface. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 66, p. 102170, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102170>.

CONSTANTE, C. K.; RODRÍGUEZ, J.; SONNENHOLZNER, S.; DOMÍNGUEZ-BORBOR, C. Adaptation of the methyl thiazole tetrazolium (MTT) reduction assay to measure cell viability in *Vibrio* spp. **Aquaculture**, [s. l.], v. 560, n. July, p. 1–6, 2022.

COSTA, S. S.; MORS, W. B. Amides of *Ottonia corcovadensis*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1305–1307, 1981. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942281800271>.

CUI, D.; KONG, L.; WANG, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, C. In situ identification of environmental microorganisms with Raman spectroscopy. **Environmental Science and Ecotechnology**, [s. l.], v. 11, p. 100187, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ese.2022.100187>.

DA HORA, N. R. S.; SANTANA, L. F.; DA SILVA, V. D. A.; COSTA, S. L.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; COLEPICOLO, P.; FERRAZ, C. G.; RIBEIRO, P. R. Identification of bioactive metabolites from corn silk extracts by a combination of metabolite profiling, univariate statistical analysis and chemometrics. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 365, n. June, p. 130479, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130479>.

DA SILVA, M. F. R.; BEZERRA-SILVA, P. C.; DE LIRA, C. S.; DE LIMA ALBUQUERQUE, B. N.; AGRA NETO, A. C.; PONTUAL, E. V.; MACIEL, J. R.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. do A. F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 165, p. 64–70, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.017>.

DAPAR, M. L. G.; DEMAYO, C. G.; MEVE, U.; LIEDE-SCHUMANN, S.; ALEJANDRO, G. J. D. Molecular confirmation, constituents and cytotoxicity evaluation of two medicinal *Piper* species used by the Manobo tribe of Agusan del Sur, Philippines. **Phytochemistry Letters**, [s. l.], v. 36, n. December 2019, p. 24–31, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.01.017>.

DE LIRA PIMENTEL, C. S.; ALBUQUERQUE, B. N. de L.; DA ROCHA, S. K. L.; DA SILVA, A. S.; DA SILVA, A. B. V.; BELLON, R.; AGRA-NETO, A. C.; DE AGUIAR, J. C. R. de O. F.; PAIVA, P. M. G.; PRINCIVAL, J. L.; NAPOLEÃO, T. H.; NAVARRO, D. M. do A. F. Insecticidal activity of the essential oil of *Piper corcovadensis* leaves and

its major compound (1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene) against the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 1008–1017, 2022.

DHANDAPANI, S.; TJHANG, J. G.; JANG, I. C. Production of multiple terpenes of different chain lengths by subcellular targeting of multi-substrate terpene synthase in plants. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 61, n. January, p. 397–405, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.08.002>.

DIAZ, J. M.; SHI, X. NOX-like ROS production by glutathione reductase. **iScience**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 105093, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105093>.

DIN, I.; KHAN, H.; AHMAD KHAN, N.; KHIL, A. Inoculation of nitrogen fixing bacteria in conjugation with integrated nitrogen sources induced changes in phenology, growth, nitrogen assimilation and productivity of wheat crop. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 459–466, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.05.008>.

DONG, X.; LI, X.; RUAN, X.; KONG, L.; WANG, N.; GAO, W.; WANG, R.; SUN, Y.; JIN, M. A deep insight into the structure-solubility relationship and molecular interaction mechanism of diverse flavonoids in molecular solvents, ionic liquids, and molecular solvent/ionic liquid mixtures. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 385, n. June, p. 122359, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122359>.

DOS SANTOS NUNES, R. G.; PEREIRA, P. S.; ELEKOFEHINTI, O. O.; FIDELIS, K. R.; DA SILVA, C. S.; IBRAHIM, M.; BARROS, L. M.; DA CUNHA, F. A. B.; LUKONG, K. E.; DE MENEZES, I. R. A.; TSOPMO, A.; DUARTE, A. E.; KAMDEM, J. P. Possible involvement of transcriptional activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in the protective effect of caffeic acid on paraquat-induced oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 157, n. March, p. 161–168, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.017>.



DUAN, H.; ER-BU, A. G. A.; DONGZHI, Z.; XIE, H.; YE, B.; HE, J. Alkaloids from *Dendrobium* and their biosynthetic pathway, biological activity and total synthesis. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 102, p. 154132, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711322002112>.

DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SOUTO, E. B.; CICALA, C.; CAIAZZO, E.; IZZO, A. A.; NOVELLINO, E.; SANTINI, A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 2221–2243, 2019.

EL BOUCHEFRY, K.; DE SOUZA, R. S. Chapter 12 - Learning in Big Data: Introduction to Machine Learning. *In*: ŠKODA, Petr; ADAM, Fathalrahman B T - Knowledge Discovery in Big Data from Astronomy and Earth Observation (org.). [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 225–249. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128191545000230>.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s. l.], v. 82, p. 70–77, 1959.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos de *ottonia corcovadensis* miq. da floresta amazônica - Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 79–83, 2004.

FADIL, M.; LEBRAZI, S.; ABOULGHAZI, A.; GUAOUGUAOU, F. E.; RAIS, C.; SLIMANI, C.; ES-SAFI, N. E. Multi-response optimization of extraction yield, total phenols-flavonoids contents, and antioxidant activity of extracts from moroccan *Lavandula stoechas* leaves: Predictive modeling using simplex-centroid design. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 43, n. April, p. 102430, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102430>.

FAN, D.; ZHOU, C.; CHEN, C.; LI, X.; MA, J.; HU, Y.; LI, G.; RUAN, J.; WU, A.; LI, L.; GONG, X. Lignans from the genus *Piper* L. and their pharmacological activities: An

updated review. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 165, n. December 2022, p. 105403, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105403>.

FERNANDEZ, C. M. M.; BALDIN, V. P.; IEQUE, A. L.; BERNUCI, K. Z.; ALMEIDA, R. T.; VALONE, L. M.; FONSECA, D. P.; MAKIMORI, R. Y.; ANDRADE, J. P. P.; PILAU, E. J.; ROMAGNOLO, M. B.; NAKAMURA, T. U.; CARDOSO, R. F.; CORTEZ, D. A. G.; GAZIM, Z. C.; SCODRO, R. B. L.; DIAS FILHO, B. P. Anti-Mycobacterium tuberculosis activity of dichloromethane extract of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. roots and isolated compounds. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 131, n. January, p. 341–347, 2019.

FERNANDEZ, C. M. M.; LORENZETTI, F. B.; LIMA, M. M. de S.; KLEINUBING, S. A.; BORTOLUCCI, W. de C.; DE ANDRADE, J. P. P.; ROMAGNOLO, M. B.; CORTEZ, D. A. G.; GAZIM, Z. C.; FILHO, B. P. D. Larvicidal activity of piperovatine and dichloromethane extract from *piper corcovadensis* roots against mosquitoes *aedes aegypti* l. **Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 142–148, 2020.

FIDELIS, K. R.; DOS SANTOS NUNES, R. G.; DA SILVA, C. S.; OLIVEIRA, C. V. B.; COSTA, A. R.; DE LIMA SILVA, J. R.; DOS SANTOS, L. B.; DE OLIVEIRA, E. E. S.; PEREIRA, P. S.; DE MENEZES, I. R. A.; KAMDEM, J. P.; DUARTE, A. E.; PINHO, A. I.; BARROS, L. M. Evaluation of the neuroprotective effect of rutin on *Drosophila melanogaster* about behavioral and biochemical aspects induced by mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 249, n. February, 2021.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.

GALANAKIS, C. M.; GOULAS, V.; TSAKONA, S.; MANGANARIS, G. A.; GEKAS, V. A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 382–396, 2013.

Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942912.2010.522750>.  
GALLON, M.; CORTÉS, M.; GIL GONZALEZ, J.; LAHLOU, A.; GUIL-GUERRERO, J. L. Influence of Storage Variables on the Antioxidant and Antitumor Activities, Phenolic Compounds and Vitamin C of an Agglomerate of Andean Berries. **SSRN Electronic Journal**, [s. l.], v. 9, n. March, 2022.

GEERS, A. U.; BUIJS, Y.; STRUBE, M. L.; GRAM, L.; BENTZON-TILIA, M. The natural product biosynthesis potential of the microbiomes of Earth – Bioprospecting for novel anti-microbial agents in the meta-omics era. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 20, p. 343–352, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.024>.

GHARAKHANI-BENI, A.; GHASEMI PIRBALOUTI, A.; JAVANMARD, H.; SOLEYMANI, A.; GOLPARVAR, A. Chemical compositions, yield and antioxidant activity of the essential oil of hyssop ( *Hyssopus officinalis* L.) under intercropping with fenugreek ( *Trigonella foenum-graecum* L.). **Natural Product Research**, [s. l.], p. 1–6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2078971>.

GIANNERINI, F.; GIUSTARINI, D.; LUSINI, L.; ROSSI, R.; DI SIMPLICIO, P. Responses of thiols to an oxidant challenge: Differences between blood and tissues in the rat. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 134, n. 1, p. 73–85, 2001.

GIUSTARINI, D.; SANTUCCI, A.; BARTOLINI, D.; GALLI, F.; ROSSI, R. The age-dependent decline of the extracellular thiol-disulfide balance and its role in SARS-CoV-2 infection. **Redox Biology**, [s. l.], v. 41, n. November 2020, 2021.

GOHAIN, B.; KUMAR, P.; MALHOTRA, B.; AUGUSTINE, R.; PRADHAN, A. K.; BISHT, N. C. A comprehensive Vis-NIRS equation for rapid quantification of seed glucosinolate content and composition across diverse Brassica oilseed chemotypes. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 354, n. October 2020, 2021.

GÓMEZ, R. S.; SÁNCHEZ, A. R.; GARCÍA, C. G.; PÉREZ, J. G. The VIF and MSE in raise regression. **Mathematics**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1–28, 2020.

GROOTEN, Y.; MANGELINGS, D.; VANDER HEYDEN, Y. Comparison of supercritical fluid chromatographic methods to predict the skin permeability of pharmaceutical and cosmetic compounds. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1692, p. 463855, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463855>.

GUALBERTO, N. C.; NOGUEIRA, J. P.; SILVA, A. de S. da; BARBOSA, P. F.; SANTANA MATOS, C. M.; RAJAN, M.; SANTOS LEITE NETA, M. T.; NARAIN, N. Optimization of the biotechnological process using *Rhodotorula mucilaginosa* and acerola (*Malpighia emarginata* L.) seeds for the production of bioactive compounds. **Lwt**, [s. l.], v. 160, n. January, p. 113190, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113190>.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 651–715, 2020. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-020-02689-3>.

HADIDI, M.; ORELLANA-PALACIOS, J. C.; AGHABABAEI, F.; GONZALEZ-SERRANO, D. J.; MORENO, A.; LORENZO, J. M. Plant by-product antioxidants: Control of protein-lipid oxidation in meat and meat products. **LWT**, [s. l.], v. 169, p. 114003, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643822009380>.

HE, Y.; LAN, Y.; ZHANG, H.; YE, S. Research characteristics and hotspots of the relationship between soil microorganisms and vegetation: A bibliometric analysis. **Ecological Indicators**, [s. l.], v. 141, n. December 2021, p. 109145, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109145>.

HEMEG, H. A.; MOUSSA, I. M.; IBRAHIM, S.; DAWOUD, T. M.; ALHAJI, J. H.; MUBARAK, A. S.; KABLI, S. A.; ALSUBKI, R. A.; TAWFIK, A. M.; MAROUF, S. A. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 3221–3227,

2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.015>.

HENRIQUE FONTOURA, B.; CRISTINA PERIN, E.; DIAS TEIXEIRA, S.; APARECIDO DE LIMA, V.; TERESINHA CARPES, S. Multivariate and machine learning approaches for prediction of antioxidant potential in *Bertholletia excelsa* barks. **Journal of King Saud University - Science**, [s. l.], p. 102792, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102792>.

HOLE, P. S.; ZABKIEWICZ, J.; MUNJE, C.; NEWTON, Z.; PEARN, L.; WHITE, P.; MARQUEZ, N.; HILLS, R. K.; BURNETT, A. K.; TONKS, A.; DARLEY, R. L. Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling. **Blood**, [s. l.], v. 122, n. 9, p. 3322–3330, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-04-491944>.

HU, T.; FENG, H.; ZHAO, Y.; YANG, W.; LIU, R.; LI, G. Biochemical and functional characterization of two microbial type terpene synthases from moss *Stereodon subimponens*. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 166, n. February, p. 750–760, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.047>.

HU, N.; LI, W.; DU, C.; ZHANG, Z.; GAO, Y.; SUN, Z.; YANG, L.; YU, K.; ZHANG, Y.; WANG, Z. Predicting micronutrients of wheat using hyperspectral imaging. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 343, p. 128473, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128473>.

HUANG, X. Q.; DUDAREVA, N. Plant specialized metabolism. **Current Biology**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. R473–R478, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2023.01.057>.

HYUCK, J.; UEDA, E.; BORTNER, C. D.; YANG, X.; LIAO, G.; JETTEN, A. M. Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 256–268, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.086>.

IQBAL, S.; BAI, Y.; HAYAT, F.; COULIBALY, D. Genomics Comprehensive transcriptomic and metabolomic analysis revealed distinct flavonoid biosynthesis regulation during abnormal pistil development in Japanese apricot. **Genomics**, [s. l.], v. 114, n. 5, p. 110451, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110451>.

IWASAKI, Y.; NOMOTO, M.; ODA, M.; MOCHIZUKI, K.; NAKANO, Y.; ISHII, Y.; ITO, R.; SAITO, K.; UMEMURA, T.; NISHIKAWA, A.; NAKAZAWA, H. Characterization of nitrated phenolic compounds for their anti-oxidant, pro-oxidant, and nitration activities. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 513, n. 1, p. 10–18, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.06.009>.

JOSEPH, S. M.; DEV, A. R. A.; A, K. Unveiling the volatile chemical variations of Annona essential oils and its associated pharmacological activities. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1292, n. June, p. 136082, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.136082>.

JOVANOVIĆ, M. S.; MILUTINOVIĆ, M.; LAZAREVIĆ, Z.; MUDRIĆ, J.; MATEJIĆ, J.; KITIĆ, D.; ŠAVIKIN, K. Heat- and microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Gentiana asclepiadea* L. underground parts: Optimization and comparative assessment using response surface methodology. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [s. l.], v. 34, n. April, 2023.

KALU, G. N.; KRAJNOVI, T.; MOMCILOVIC, M.; STOSIC-GRUJICIC, S.; MIJATOVI, S.; MAKSIMOVI, D.; HEY-HAWKINS, E. Ruthenium ( II ) p -cymene complex bearing 2 , 2 ' -dipyridylamine targets caspase 3 de fi cient MCF-7 breast cancer cells without disruption of antitumor immune response ☆. [s. l.], v. 153, p. 315–321, 2015.

KANSTRUP, C.; NOUR-ELDIN, H. H. The emerging role of the nitrate and peptide transporter family: NPF in plant specialized metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 68, p. 102243, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102243>.

KASHYAP, P.; RIAR, C. S.; JINDAL, N. Effect of extraction methods and simulated in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compound profile, bio-accessibility, and antioxidant activity of Meghalayan cherry (*Prunus nepalensis*) pomace extracts. **Lwt**, [s. l.], v. 153, p. 112570, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112570>.

KHANJANI, M. H.; MOHAMMADI, A.; EMERENCIANO, M. G. C. Microorganisms in biofloc aquaculture system. **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 26, n. August, p. 101300, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101300>.

KHANRA, A.; VASISTHA, S.; RAI, M. P.; CHEAH, W. Y.; KHOO, K. S.; CHEW, K. W.; CHUAH, L. F.; SHOW, P. L. Green bioprocessing and applications of microalgae-derived biopolymers as a renewable feedstock: Circular bioeconomy approach. **Environmental Technology & Innovation**, [s. l.], v. 28, p. 102872, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102872>.

KIM, Hyo Jin; HERATH, K. H. I. N. M.; DINH, D. T. T.; KIM, H. S.; JEON, Y. J.; KIM, Hyun Jung; JEE, Y. Sargassum horneri ethanol extract containing polyphenols attenuates PM-induced oxidative stress via ROS scavenging and transition metal chelation. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 79, n. August 2020, p. 104401, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104401>.

KIM, P. G.; LEE, A.; SHIN, J.; SONG, E.; KOO, Y.; MOHAMED, D. F. M. S.; CHOI, S.; HONG, Y.; SONG, S.; NOH, I.; KWON, J. H. Determination of terpene levels after the use of essential oil diffusers in vehicles and studio apartments using passive sampling. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 879, n. February, p. 163071, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163071>.

KOONIN, E. V; DOLJA, V. V; KRUPOVIC, M. The logic of virus evolution. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 917–929, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312822003134>.

KOWALLIK, K. V.; MARTIN, W. F. The origin of symbiogenesis: An annotated English translation of Mereschkowky's 1910 paper on the theory of two plasma lineages. **BioSystems**, [s. l.], v. 199, p. 104281, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2020.104281>.

KUMBHAR, A.; DHAWALE, P. G.; KUMBHAR, S.; PATIL, U.; MAGDUM, P. A comprehensive review: Machine learning and its application in integrated power system. **Energy Reports**, [s. l.], v. 7, p. 5467–5474, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.08.133>.

LATEEF, A.; REHMAN, M. U.; TAHIR, M.; KHAN, R.; KHAN, A. Q.; QAMAR, W.; SULTANA, S. Farnesol protects against intratracheally instilled cigarette smoke extract-induced histological alterations and oxidative stress in prostate of wistar rats. **Toxicology international**, Indiav. 20, n. 1, p. 35–42, 2013.

LEE, J.; SCHIFANO, E. D.; WANG, H. Fast Optimal Subsampling Probability Approximation for Generalized Linear Models. **Econometrics and Statistics**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452306221000290>.

LI, Y.; LI, R.; SAWADA, Y.; BOERZHIJIN, S.; KUWAHARA, A.; SATO, M.; HIRAI, M. Y. Abscisic acid-mediated induction of FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 2 leads to reduced accumulation of methylthioalkyl glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, [s. l.], v. 303, p. 110764, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110764>.

LI, M. X.; MA, Y. P.; ZHANG, H. X.; SUN, H. Z.; SU, H. H.; PEI, S. J.; DU, Z. Z. Repellent, larvicidal and adulticidal activities of essential oil from Dai medicinal plant *Zingiber cassumunar* against *Aedes albopictus*. **Plant Diversity**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 317–323, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.11.008>.



LI, X.; TSUTA, M.; HAYAKAWA, F.; NAKANO, Y.; KAZAMI, Y.; IKEHATA, A. Estimating the sensory qualities of tomatoes using visible and near-infrared spectroscopy and interpretation based on gas chromatography–mass spectrometry metabolomics. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 343, n. xxxx, 2021.

LI, W.; WU, M.; LI, Y.; SHEN, J. Reactive nitrogen species as therapeutic targets for autophagy/mitophagy modulation to relieve neurodegeneration in multiple sclerosis: Potential application for drug discovery. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 208, n. July, p. 37–51, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.07.032>.

LIN, Yixiong; LIN, Yifen; LIN, M.; FAN, Z.; LIN, H. Influence of hydrogen peroxide on the ROS metabolism and its relationship to pulp breakdown of fresh longan during storage. **Food Chemistry: X**, [s. l.], v. 12, p. 100159, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100159>.

LIU, X.; DIVANI, A. A.; PETERSEN, A. Truncated estimation in functional generalized linear regression models. **Computational Statistics & Data Analysis**, [s. l.], v. 169, p. 107421, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167947322000019>.

LIU, X.; ZHANG, D.; LIU, J.; WANG, L.; LI, S. RGB Color Model Analysis for a Simple Structured Polydimethylsiloxane Pneumatic Micromixer. **SLAS Technology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 510–518, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/24726303211008868>.

LIZCANO, L. J.; BAKKALI, F.; BEGOÑA RUIZ-LARREA, M.; IGNACIO RUIZ-SANZ, J. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 119, n. 4, p. 1566–1570, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.043>.

LONG, L.; ZHAO, X.-T.; FENG, Y.-M.; FAN, Z.-H.; ZHAO, J.-R.; WU, J.-F.; XU, F.-C.; YUAN, M.; GAO, W. Profile of cotton flavonoids: Their composition and important roles

in development and adaptation to adverse environments. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 201, n. January, p. 107866, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107866>.

LOPES, L. A. A.; PIMENTEL, T. C.; CARVALHO, R. de S. F.; MADRUGA, M. S.; GALVÃO, M. de S.; BEZERRA, T. K. A.; BARÃO, C. E.; MAGNANI, M.; STAMFORD, T. C. M. Spreadable goat Ricotta cheese added with *Lactobacillus acidophilus* La-05: Can microencapsulation improve the probiotic survival and the quality parameters?. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 346, n. December 2020, 2021.

LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 133, p. 379–402, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.061>.

LU, Q.; TIAN, S.; WEI, L. Digital mapping of soil pH and carbonates at the European scale using environmental variables and machine learning. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 856, n. September 2022, p. 159171, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159171>.

MA, X.; ZHANG, J.; WANG, P.; ZHOU, L.; SUN, Y. Estimating the nonlinear response of landscape patterns to ecological resilience using a random forest algorithm: Evidence from the Yangtze River Delta. **Ecological Indicators**, [s. l.], v. 153, n. May, p. 110409, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.110409>.

MAKRIS, K. C.; HEIBATI, B.; ZIENOLDDINY NARUI, S. Chrono-modulated effects of external stressors on oxidative stress and damage in humans: a scoping review on night shift work. **Environment International**, [s. l.], p. 108048, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108048>.

MALEKE, M. S.; ADEFISOYE, M. A.; DOORSAMY, W.; ADEBO, O. A. Processing, nutritional composition and microbiology of amasi: A Southern African fermented milk product. **Scientific African**, [s. l.], v. 12, p. e00795, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00795>.

MANJESH, G. N.; KAIPA, H.; UPRETI, K. K.; SHARMA, D.; PUTTEGOWDA, M. G. A.; MANJUNATHAGOWDA, D. C.; CHINAPOLAI AH, A.; KASHINATH SHEWALE, M.; KUSUMA, D. K. Diversity of flavonoids profile in sexually dimorphic clones of betle vine [Piper betle L.] genotypes based on liquid chromatography-mass spectrometry [LCMS/MS]. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 187, p. 115363, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669022008469>.

MANOLI, K.; NAZIRI, A.; TTOFI, I.; MICHAEL, C.; ALLAN, I. J.; FATTA-KASSINOS, D. Investigation of the effect of microplastics on the UV inactivation of antibiotic-resistant bacteria in water. **Water Research**, [s. l.], v. 222, n. May, p. 118906, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118906>.

MAT SAAD, H.; SYED ABDUL RAHMAN, S. N.; NAVANESAN, S.; TAN, C. H.; MANICKAM, S.; ABD MALEK, S. N.; SIM, K. S. Evaluation of antioxidant activity and phytochemical composition of *Baeckea frutescens* and *Leptospermum javanicum* essential oils. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 141, p. 474–479, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.005>.

MATSUURA, H. N.; MALIK, S.; DE COSTA, F.; YOUSEFZADI, M.; MIRJALILI, M. H.; ARROO, R.; BHAMBRA, A. S.; STRNAD, M.; BONFILL, M.; FETT-NETO, A. G. Specialized Plant Metabolism Characteristics and Impact on Target Molecule Biotechnological Production. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 169–183, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0056-1>.

MAYA-CANO, D. A.; ARANGO-VARELA, S.; SANTA-GONZALEZ, G. A. Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. e06297, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06297>.

MEENU, M.; PADHAN, B.; PATEL, M.; PATEL, R.; XU, B. Antibacterial activity of essential oils from different parts of plants against *Salmonella* and *Listeria* spp. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 404, n. PB, p. 134723, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134723>.

MEI, Y.; SUN, H.; DU, G.; WANG, X.; LYU, D. Exogenous chlorogenic acid alleviates oxidative stress in apple leaves by enhancing antioxidant capacity. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 274, n. August, p. 109676, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109676>.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.

MORA-VÁSQUEZ, S.; WELLS-ABASCAL, G. G.; ESPINOSA-LEAL, C.; CARDINEAU, G. A.; GARCÍA-LARA, S. Application of metabolic engineering to enhance the content of alkaloids in medicinal plants. **Metabolic Engineering Communications**, [s. l.], v. 14, n. December 2021, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Netherlandsv. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUDELE, O.; FRERY, A. C.; ZANANDREZ, L. F. R.; EIRAS, A. E.; GAMBA, P. Modeling dengue vector population with earth observation data and a generalized linear model. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 215, n. December 2020, p. 105809, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105809>.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity : A Review. [s. l.], 2021.

MURPHY, K. M.; ZERBE, P. Specialized diterpenoid metabolism in monocot crops: Biosynthesis and chemical diversity. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 172, n. February, p.

112289, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112289>.

NAKABAYASHI, R.; SAITO, K. Higher dimensional metabolomics using stable isotope labeling for identifying the missing specialized metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 55, p. 84–92, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.009>.

NASSAR, M.; HIRAISHI, N.; SHIMOKAWA, H.; TAMURA, Y.; OTSUKI, M.; KASUGAI, S.; OHYA, K.; TAGAMI, J. The inhibition effect of non-protein thiols on dentinal matrix metalloproteinase activity and HEMA cytotoxicity. **Journal of Dentistry**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 312–318, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2013.11.023>.  
NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NGUYEN, L. L. P.; BARANYAI, L.; NAGY, D.; MAHAJAN, P. V.; ZSOM-MUHA, V.; ZSOM, T. Color analysis of horticultural produces using hue spectra fingerprinting. **MethodsX**, [s. l.], v. 8, n. February, p. 101594, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215016121003848>.

NOOR, A.; AL MURAD, M.; JAYA CHITRA, A.; BABU, S. N.; GOVINDARAJAN, S. Alginate based encapsulation of polyphenols of Piper betelleaves: Development, stability, bio-accessibility and biological activities. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 47, n. April, p. 101715, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101715>.

OKEKE, E. S.; ITA, R. E.; EGONG, E. J.; UDOFIA, L. E.; MGBECHIDINMA, C. L.; AKAN, O. D. Metaproteomics insights into fermented fish and vegetable products and associated microbes. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, [s. l.], v. 3, n. August, p. 100045, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100045>.

OLDONI, T. L. C.; DOS SANTOS, S.; MITTERER-DALTOÉ, M. L.; PIZONE, L. H. I.; LIMA, V. A. De. Moringa oleifera leaves from Brazil: Influence of seasonality, regrowth age and, region in biochemical markers and antioxidant potential. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 104206, 2022. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535222005226>.

ÖZTÜRK, F.; KOLAYLI, S. Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. **Turkish Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 194–202, 2016.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 597–673, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942297003282>.

PERIN, E. C.; FONTOURA, B. H.; LIMA, V. A.; CARPES, S. T. RGB pattern of images allows rapid and efficient prediction of antioxidant potential in Calycophyllum spruceanum barks. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 7104–7114, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.07.015>.

PERIN, E. C.; FONTOURA, B. H.; LIMA, V. A.; CARPES, S. T. RGB pattern of images allows rapid and efficient prediction of antioxidant potential in Calycophyllum spruceanum barks. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 7104–7114, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.07.015>.

PIEPRZYK, S.; YEVCHENKO, T.; DARDAS, D.; BRAŃKA, A. C. Phase transitions and physical properties by a color texture analysis: Results for liquid crystals. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 362, 2022.

PITOCCO, D.; ZACCARDI, F.; DI STASIO, E.; ROMITELLI, F.; MARTINI, F.; SCAGLIONE, G. L.; SPERANZA, D.; SANTINI, S.; ZUPPI, C.; GHIRLANDA, G. Role of asymmetric-dimethyl-L-arginine (ADMA) and nitrite/nitrate (NOx) in the pathogenesis of oxidative stress in female subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 173–176, 2009.

QIN, J.; XIE, L.; YING, Y. Determination of tetracycline hydrochloride by terahertz spectroscopy with PLSR model. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 170, p. 415–422, 2015.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.050>.

QIU, Z.; MA, F.; LI, Z.; XU, X.; GE, H.; DU, C. Estimation of nitrogen nutrition index in rice from UAV RGB images coupled with machine learning algorithms. **Computers and Electronics in Agriculture**, [s. l.], v. 189, n. August, p. 106421, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2021.106421>.

QIU, L.; ZHANG, M.; MUJUMDAR, A. S.; CHANG, L. Convenient use of near-infrared spectroscopy to indirectly predict the antioxidant activity of edible rose (*Rose chinensis* Jacq “Crimsin Glory” H.T.) petals during infrared drying. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 369, n. August 2021, p. 130951, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130951>.

RAIS, S.; ISLAM, A.; AHMAD, I.; KUMAR, S.; CHAUHAN, A.; JAVED, H. Preparation of a new magnetic ion-imprinted polymer and optimization using Box-Behnken design for selective removal and determination of Cu(II) in food and wastewater samples. **Food Chemistry**, [s. l.], n. li, p. 127563, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127563>.

RAMOS-GONZÁLEZ, E. J.; BITZER-QUINTERO, O. K.; ORTIZ, G.; HERNÁNDEZ-CRUZ, J. J.; RAMÍREZ-JIRANO, L. J. Relationship between inflammation and oxidative stress and its effect on multiple sclerosis. **Neurologia**, [s. l.], n. xxxx, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2021.10.003>.

RANAWEERA, R. K. R.; GILMORE, A. M.; CAPONE, D. L.; BASTIAN, S. E. P.; JEFFERY, D. W. Spectrofluorometric analysis combined with machine learning for geographical and varietal authentication, and prediction of phenolic compound concentrations in red wine. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 361, n. May, p. 130149, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130149>.

RAVICHANDRAN, C.; BADGUJAR, P. C.; GUNDEV, P.; UPADHYAY, A. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 120, n. February, p. 668–680, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.052>.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.

RAZA, J.; ASMAT, T. M.; MUSTAFA, M. Z.; ISHTIAQ, H.; MUMTAZ, K.; JALEES, M. M.; SAMAD, A.; SHAH, A. A.; KHALID, S.; REHMAN, H. ur. Contamination of ready-to-eat street food in Pakistan with *Salmonella* spp.: Implications for consumers and food safety. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 106, p. 123–127, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.03.062>.

RAZAVIZADEH, S.; ALENCIKIENE, G.; VAICIULYTE-FUNK, L.; ERTBJERG, P.; SALASEVICIENE, A. Utilization of fermented and enzymatically hydrolyzed soy press cake as ingredient for meat analogues. **LWT**, [s. l.], v. 165, n. April, p. 113736, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113736>.

REZAEI ZONOOZ, S.; HASANI, M.; MORVARIDZADEH, M.; BEATRIZ PIZARRO, A.; HEYDARI, H.; YOSAEI, S.; REZAMAND, G.; HESHMATI, J. Effect of alpha-lipoic acid on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 87, n. July, p. 104774, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104774>.

RIRA, M.; MORGAVI, D. P.; POPOVA, M.; MAXIN, G.; DOREAU, M. Animal The international journal of animal biosciences Microbial colonisation of tannin-rich tropical plants: Interplay between degradability , methane production and tannin disappearance in the rumen. **animal**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 100589, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100589>.

RIU, J.; GIUSSANI, B. Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 126, p. 115863, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115863>.



ROSENKRANZ, T.; OBURGER, E.; BAUNE, M.; WEBER, G.; PUSCHENREITER, M. Root exudation of coumarins from soil-grown *Arabidopsis thaliana* in response to iron deficiency. **Rhizosphere**, [s. l.], v. 17, n. December 2020, p. 100296, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100296>.

SÁ FILHO, J. C. F. de; NIZIO, D. A. de C.; OLIVEIRA, A. M. S. de; ALVES, M. F.; OLIVEIRA, R. C. de; LUZ, J. M. Q.; NOGUEIRA, P. C. de L.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; BLANK, A. F. Geographic location and seasonality affect the chemical composition of essential oils of *Lippia alba* accessions. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 188, n. August, 2022.

SABULAL, B.; DAN, M.; J, A. J.; KURUP, R.; PRADEEP, N. S.; VALSAMMA, R. K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 22, p. 2469–2473, 2006.

SABZI, S.; POURDARBANI, R.; ROHBAN, M. H.; GARCÍA-MATEOS, G.; ARRIBAS, J. I. Estimation of nitrogen content in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) leaves using hyperspectral imaging data with neural network and partial least squares regressions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 217, n. August, p. 104404, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169743921001726>.

SAHA, S.; CHANGDAR, S.; DE, S. Prediction of the stability number of conventional rubble-mound breakwaters using machine learning algorithms. **Journal of Ocean Engineering and Science**, [s. l.], n. xxxx, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joes.2022.06.030>.

SALEH, E. A. M.; AL-DOLAIMY, F.; QASIM ALMAJIDI, Y.; BAYMAKOV, S.; KADER M, M. A.; ULLAH, M. I.; ABBAS, A. hussien R.; KHLEWEE, I. H.; BISHT, Y. S.; ALSAALAMY, A. H. Oxidative stress affects the beginning of the growth of cancer cells through a variety of routes. **Pathology - Research and Practice**, [s. l.], p. 154664, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131234>.

SAMLING, B. A.; ASSIM, Z.; TONG, W. Y.; LEONG, C. R.; AB RASHID, S.; NIK MOHAMED KAMAL, N. N. S.; MUHAMAD, M.; TAN, W. N. *Cynometra cauliflora* L.: An indigenous tropical fruit tree in Malaysia bearing essential oils and their biological activities. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 103302, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103302>.

SANTA, H.; SANTANA, R.; OLIVEIRA, F.; CARVALHO, D.; MENEZES, D.; AIAN, E.; SILVA, R.; SHANMUGAM, S.; HEIMFARTH, L.; SANTOS, P.; MARA, A.; OLIVEIRA, D.; DE, A. A.; ARAÚJO, S.; LUIZ, R.; ALBUQUERQUE, C. De. Phytomedicine Plus Inhaled D-Limonene minimizes acute lung injury and reduces oxidative stress induced by smoke in rats. [s. l.], v. 2, n. June, 2022.

SARI, R.; CONTERNO, P.; DA SILVA, L. D.; DE LIMA, V. A.; CADORIN OLDONI, T. L.; THOMÉ, G. R.; CARPES, S. T. Extraction of phenolic compounds from *tabernaemontana catharinensis* leaves and their effect on oxidative stress markers in diabetic rats. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 10, 2020.

SEKE, F.; MANHIVI, V. E.; SHOKO, T.; SLABBERT, R. M.; SULTANBAWA, Y.; SIVAKUMAR, D. Extraction optimisation, hydrolysis, antioxidant properties and bioaccessibility of phenolic compounds in Natal plum fruit (*Carissa Macrocarpa*). **Food Bioscience**, [s. l.], v. 44, n. PA, p. 101425, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101425>.

SHANMUGASUNDARASAMY, T.; KARAIYAGOWDER GOVINDARAJAN, D.; KANDASWAMY, K. A review on pilus assembly mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **The Cell Surface**, [s. l.], v. 8, n. April, p. 100077, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2022.100077>.

SHAROPOV, F. S.; WINK, M.; SETZER, W. N. Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Essential Oil Components – An Experimental and Computational Investigation. **Natural Product Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p.

1934578X1501000, 2015. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1501000135>.

SHETTY, S.; VARSHNEY, U. Regulation of translation by one-carbon metabolism in bacteria and eukaryotic organelles. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 296, n. 20, p. 100088, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011985>.

SHIH, Y. T.; SHI, Y.; HUANG, L. Predicting glass properties by using physics- and chemistry-informed machine learning models. **Journal of Non-Crystalline Solids**, [s. l.], v. 584, n. February, p. 121511, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2022.121511>.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, [s. l.], v. 4, p. 180–183, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.

SIHAG, S.; PAL, A.; RAVIKANT; SAHARAN, V. Antioxidant properties and free radicals scavenging activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels: An in-vitro study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 42, n. September 2021, p. 102368, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102368>.

SILVA, A. C. A.; DIODATO, J. S.; CASTRO, J. W.; MATIAS, E. F. F.; SILVA, L. E.; DO AMARAL, W.; MAIA, B. H. L. N. S.; FERRIANI, A. P.; SOUZA, A. K.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; COUTINHO, H. D. M. Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against mdr bacterial strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 199, n. May, p. 111604, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111604>.

SILVA, A. C. R. da; LOPES, P. M.; AZEVEDO, M. M. B. de; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. **Molecules**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 6305–6316, 2012. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/6/6305>.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P.; DE HELUANI, C. S.; CATALAN, C. A. N. Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 174–181, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0518610>.

SINGLETON, V.; LIBBEY, L. M.; WALRADT, J. P. analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means Of Folin-Ciocalteu Reagent. **Lipids**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 561, 1999.

SIRCAR, A.; YADAV, K.; RAYAVARAPU, K.; BIST, N.; OZA, H. Application of machine learning and artificial intelligence in oil and gas industry. **Petroleum Research**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 379–391, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ptlrs.2021.05.009>.  
SIVAKUMAR, H. P.; SUNDARARAJAN, S.; RAJENDRAN, V.; RAMALINGAM, S. Genome wide survey, and expression analysis of Ornithine decarboxylase gene associated with alkaloid biosynthesis in plants. **Genomics**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 84–94, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.11.029>.

SONG, X.; ZHANG, R.; XIE, T.; WANG, S.; CAO, J. Deep Eutectic Solvent Micro-Functionalized Graphene Assisted Dispersive Micro Solid-Phase Extraction of Pyrethroid Insecticides in Natural Products. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. August, p. 1–10, 2019.

SORVARI, J.; HARTIKAINEN, S. Terpenes and fungal biomass in the nest mounds of *Formica aquilonia* wood ants. **European Journal of Soil Biology**, [s. l.], v. 105, p. 103336, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103336>.

SOUZA, A. E. C.; CERQUEIRA, D. A.; SOUSA, N. G.; CARDOSO, C. R. Simulação do processo de destilação extrativa para produção de etanol anidro utilizando etilenoglicol como agente de separação. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e45610414228, 2021.

SPIEGEL, M.; CEL, K.; SROKA, Z. The mechanistic insights into the role of pH and solvent on antiradical and prooxidant properties of polyphenols — Nine compounds

case study. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 407, n. October 2022, p. 134677, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814622026395>.

SRIDHAR, K.; CHARLES, A. L. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 275, p. 41–49, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461831608X>.

STANKEVIČIUS, M.; MARUŠKA, A.; JAKOBSONE, I.; AKUNECA, I. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activities of spice plants extracts. [s. l.], n. 2, p. 85–91, 2010.

SUN, W.; SHEN, Y.; XIAO, H.; LI, H. Resveratrol attenuates rotenone-induced inflammation and oxidative stress via STAT1 and Nrf2/Keap1/SLC7A11 pathway in a microglia cell line. **Pathology Research and Practice**, [s. l.], v. 225, n. April, p. 153576, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153576>.

SUO, H.; PENG, Z.; GUO, Z.; WU, C.; LIU, J.; WANG, L.; XIAO, J.; LI, X. Deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from different potato genotypes: Comparison of free and bound phenolic profiles and antioxidant activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 388, p. 133058, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622010202>.

TABREZ, S.; R. JABIR, N.; SHAKIL, S.; H. GREIG, N.; ALAM, Q.; M. ABUZENADAH, A.; A. DAMANHOURI, G.; A. KAMAL, M. **A Synopsis on the Role of Tyrosine Hydroxylase in Parkinson's Disease**. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/article/43338>.

TAHIR, H. E.; XIAOBO, Z.; ZHIHUA, L.; JIYONG, S.; ZHAI, X.; WANG, S.; MARIOD, A. A. Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 226, p. 202–211, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.024>.

TATSCH, E.; BOCHI, G. V.; PEREIRA, R. da S.; KOBER, H.; AGERTT, V. A.; ANRAKU DE CAMPOS, M. M.; GOMES, P.; DUARTE, M. M. M. F.; MORESCO, R. N. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 348–350, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.12.011>.

TAVARES, S. J. S.; LIMA, V. Bone anti-resorptive effects of coumarins on RANKL downstream cellular signaling: a systematic review of the literature. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 150, n. December 2020, p. 104842, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104842>.

TEREZINHA DE OLIVEIRA, C.; LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA, B. H.; PORTES FERRIANI, A.; APARECIDA QUEIROZ SANTOS, V.; ANTÔNIO ALVES DA CUNHA, M.; DIAS TEIXEIRA, S. Chemical Characterization, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Potential of Essential Oil from the Leaves of *Baccharis oreophila* Malme. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. e1800372, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201800372>.

TIAN, X.; SONG, S.; CHEN, F.; QI, X.; WANG, Y.; ZHANG, Q. Machine learning-guided property prediction of energetic materials: Recent advances, challenges, and perspectives. **Energetic Materials Frontiers**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666647222000628>.

TIAN, F.; YOUNG, S.; SANG, W.; LEE, Y. p -Cymene and its derivatives exhibit antiaflatoxigenic activities against *Aspergillus flavus* through multiple modes of action. **Applied Biological Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 489–497, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0382-4>.

TORRES, P.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. [s. l.], n. January, p. 1–6, 2017.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 579–591, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd2803>.

TULADHAR, P.; SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. 17 - Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. *In*: JOGAI AH, Sudisha B T - Biocontrol Agents and Secondary Metabolites (org.). [S. l.]: Woodhead Publishing, 2021. p. 419–441. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012822919400017X>.

VARGHESE, M.; BALACHANDRAN, M. Antibacterial efficiency of carbon dots against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 106821, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106821>.

VASCONCELOS, N. R. I. de; DÁTILLO, G. M. P. de A.; CHIES, A. B.; CHAGAS, E. F. B.; VASCONCELOS, T. J. Q. de; BARBOSA, P. M. K. **Oxidative stress among informal caregivers**. [S. l.: s. n.], 2019.

VERA-CANDIOTI, L.; LEIVA, P. M. L.; VALLI, F.; BERNAL, C. A.; PIÑA, C. I.; SIMONCINI, M. S.; GONZÁLEZ, M. A. Optimization of oil extraction from caiman fat. Characterization for use as food supplement. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 357, n. October 2020, 2021.

VERA, M.; URBANO, B. F. Tannin polymerization: an overview. **Polymer Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 30, p. 4272–4290, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1759995422014450>.

VERGARA-SALINAS, J. R.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; TORRES, J. L.; AGOSIN, E.; PÉREZ-CORREA, J. R. Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 44,

p. 10920–10929, 2012.

WANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; LU, Y.; CHEN, H. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 75, n. June, p. 104248, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104248>.

WANG, S.; LI, Y.; HE, L.; YANG, J.; FERNIE, A. R.; LUO, J. Natural variance at the interface of plant primary and specialized metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 67, p. 102201, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102201>.

WANG, C.; SUN, Y.; ZHOU, Y.; CUI, Y.; YAO, W.; YU, H.; GUO, Y.; XIE, Y. Dynamic monitoring oxidation process of nut oils through Raman technology combined with PLSR and RF-PLSR model. **Lwt**, [s. l.], v. 146, n. November 2020, p. 111290, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111290>.

WANG, X. Q.; WANG, W.; PENG, M.; ZHANG, X. Z. Free radicals for cancer theranostics. **Biomaterials**, [s. l.], v. 266, p. 120474, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120474>.

WANG, Y.; WEI, W.; ZHANG, Y.; HANSON, R. K. A new strategy of characterizing hydrocarbon fuels using FTIR spectra and generalized linear model with grouped-Lasso regularization. **Fuel**, [s. l.], v. 287, n. December 2020, p. 119419, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119419>.

WANG, Y.; WU, C.; ZHANG, Q.; SHAN, Y.; GU, W.; WANG, S. Design, synthesis and biological evaluation of novel  $\beta$ -pinene-based thiazole derivatives as potential anticancer agents via mitochondrial-mediated apoptosis pathway. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 84, n. September 2018, p. 468–477, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.12.010>.

WANG, H.; XU, X.; WANG, X.; GUO, W.; JIA, W.; ZHANG, F. An analytical strategy



for discovering structural analogues of alkaloids in plant food using characteristic structural fragments extraction by high resolution orbitrap mass spectrometry. **Lwt**, [s. l.], v. 154, n. August 2021, p. 112329, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112329>.

WANG, W.; ZHANG, C.; SHANG, M.; LV, H.; LIANG, B.; LI, J.; ZHOU, W. Hydrogen peroxide regulates the biosynthesis of phenolic compounds and antioxidant quality enhancement in lettuce under low nitrogen condition. **Food Chemistry: X**, [s. l.], v. 16, n. October, p. 100481, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100481>.

WEN, C.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; DUAN, Y.; MA, H. Study on the structure–activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular simulations. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 364, n. June, p. 130432, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130432>.

WOLFF, F. R.; BROERING, M. F.; JURCEVIC, J. D.; ZERMIANI, T.; BRAMORSKI, A.; DE CARVALHO VITORINO, J.; MALHEIROS, A.; SANTIN, J. R. Safety assessment of Piper cernuum Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 230, n. August 2018, p. 109–116, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.035>.

WONG, D. C. J.; PICHERSKY, E.; PEAKALL, R. Many different flowers make a bouquet: Lessons from specialized metabolite diversity in plant–pollinator interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 73, 2023.

WU, C. F.; HONG, C.; KLAUCK, S. M.; LIN, Y. L.; EFFERTH, T. Molecular mechanisms of rosmarinic acid from *Salvia miltiorrhiza* in acute lymphoblastic leukemia cells. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 176, p. 55–68, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.020>.

WU, J.; MA, K.; LI, H.; ZHANG, Yifan; WANG, X.; ABBAS, N.; YIN, C.; ZHANG, Yinglao. Stability assessment of lutein under the existence of different phenolic acids.

**Lwt**, [s. l.], v. 165, n. March, p. 113700, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113700>.

YANG, Q.; CHEN, X.; LI, J.; PEI, Z.; CHEN, Y.; LIU, P.; YU, Z.; LIU, Y.; LI, G. HB26, a member of HD-Zip I subfamily, is involved in the regulation of hydrolysable tannin biosynthesis in the cupules of *Quercus variabilis* by transactivation of UGT84A13. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 200, n. PA, p. 116866, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116866>.

YANG, F.; LI, H.; YANG, Y. Q.; HOU, Y.; LIANG, D. Lignanamides from the stems of *Piper hancei* maxim. and their anti-inflammatory and cytotoxic activities. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 161, n. June, p. 105231, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105231>.

YERLIKAYA, F. A.; BAHTIYAR, Ş. Data poisoning attacks against machine learning algorithms. **Expert Systems with Applications**, [s. l.], v. 208, p. 118101, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957417422012933>.

YI, G.; YIN, C.; LAO, Y.; SHI, Z.; HE, X.; WU, J.; JIANG, Y.; GONG, L. Antibacterial and antitumor activities of chitosan/polyvinyl alcohol films containing microemulsion of papaya seed essential oil. **Materials Today Communications**, [s. l.], v. 31, n. October 2021, p. 103475, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103475>.

YU, H.; LIN, Z.; XIANG, W.; HUANG, M.; TANG, J.; LU, Y.; ZHAO, Q. Antifungal activity and mechanism of D -limonene against foodborne opportunistic pathogen *Candida tropicalis*. **LWT**, [s. l.], v. 159, p. 113144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113144>.

YUAN, D.; GUO, Y.; PU, F.; YANG, C.; XIAO, X.; DU, H.; HE, J.; LU, S. Opportunities and challenges in enhancing the bioavailability and bioactivity of dietary flavonoids: A novel delivery system perspective. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 430, n. July 2023, p.

137115, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137115>.

YUSUFF, A. S. Parametric optimization of solvent extraction of *Jatropha curcas* seed oil using design of experiment and its quality characterization. **South African Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 35, n. October 2020, p. 60–68, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.11.006>.

ZAITSEVA, E.; RABCAN, J.; LEVASHENKO, V.; KVASSAY, M. Importance analysis of decision making factors based on fuzzy decision trees. **Applied Soft Computing**, [s. l.], v. 134, p. 109988, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2023.109988>.

ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; BEN SALEM, N.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **Lwt**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 634–641, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.036>.

ZENG, L.; ZHOU, X.; LIAO, Y.; YANG, Z. Roles of specialized metabolites in biological function and environmental adaptability of tea plant (*Camellia sinensis*) as a metabolite studying model. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], v. 34, n. 723, p. 159–171, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.11.004>.

ZHANG, Y.; GUO, H.; QIU, X.; LU, X.; REN, X.; CHEN, L. LED-based chromatic and white-light vortices of fractional topological charges. **Optics Communications**, [s. l.], v. 485, n. December 2020, p. 126732, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2020.126732>.

ZHANG, Z.; GUO, S.; WU, T.; YANG, Y.; YU, X.; YAO, S. Inoculum size of co-fermentative culture affects the sensory quality and volatile metabolome of fermented milk over storage. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 105, n. 7, p. 5654–5668, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2021-21733>.

ZHANG, Y.; WEI, M.; ZHANG, F.; GUO, J. High-accuracy gastric cancer cell viability

evaluation based on multi-impedance spectrum characteristics. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e14966, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14966>.

ZHONG, C.; XIONG, X. Preparation of a composite coating film via vapor induced phase separation for air purification and real-time bacteria photocatalytic inactivation. **Progress in Organic Coatings**, [s. l.], v. 161, n. August, p. 106486, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2021.106486>.

ZHOU, S.; JANDER, G. Engineering insect resistance using plant specialized metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 70, p. 115–121, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.03.005>.

ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 55, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.01.005>.

ZHOU, Y.; YANG, X.; ZHANG, J.; XU, S.; LI, J.; WANG, W.; YAN, M. Small molecule fluorescent probes for the detection of reactive nitrogen species in biological systems. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 493, n. June, p. 215258, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215258>.

ZHOU, P.; YU, Z.; MA, J.; TIAN, M.; FAN, Y. Communication-efficient distributed estimator for generalized linear models with a diverging number of covariates. **Computational Statistics & Data Analysis**, [s. l.], v. 157, p. 107154, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167947320302450>.

ZHU, S.; YANG, W.; LIN, Y.; DU, C.; HUANG, D.; CHEN, S.; YU, T.; CONG, X. Antioxidant and anti-fatigue activities of selenium-enriched peptides isolated from Cardamine violifolia protein hydrolysate. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 79, p. 104412, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104412>.