

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Carina Alves Ferreira

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS  
EXTRATOS DE *Acosmium dasycarpum* (VOGEL) YAKOVLEV (FABACEAE) E  
*Croton antisiphiliticus* MART. (EUPHORBIACEAE)**

**Diamantina-MG  
2020**



Carina Alves Ferreira

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS  
EXTRATOS DE *Acosmium dasycarpum* (VOGEL) YAKOVLEV (FABACEAE) E  
*Croton antisiphiliticus* MART. (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Fernanda Fuzer Grael

Co-orientadora: Profa Dra. Ana Paula Rodrigues

**Diamantina- MG  
2020**



Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F383

Ferreira, Carina Alves.

Estudo fitoquímico e ensaios da atividade antioxidante dos extratos de *Acosmium dasycarpum* (Vogel) yakovlev (Fabaceae) e *Croton antisyphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) / Carina Alves Ferreira, 2020.

115 p.: il.

Orientadora: Cristiane Fernanda Fuzer Grael

Dissertação (Mestrado– Programa de Pós-

Graduação em

Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal dos Vales

**CDD**

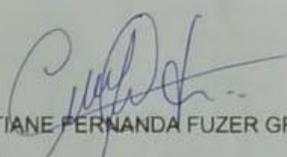
CARINA ALVES FERREIRA

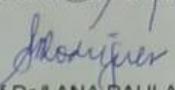
**Estudo Fitoquímico e Ensaio da Atividade Antioxidante dos  
Extratos de *Acosmium dasycarpum* (Vogel) Yakovlev (Fabaceae) e  
*Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae)**

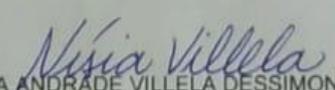
Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS, nível de  
MESTRADO como parte dos requisitos  
para obtenção do título de MESTRA  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

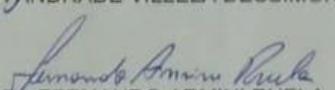
Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane  
Fernanda Fuzer Grael  
Co-orientadora: Prof. Dr. Ana Paula  
Rodrigues

Data da aprovação : 18/02/2020

  
Prof.Dr.<sup>a</sup> CRISTIANE FERNANDA FUZER GRAEL - UFVJM

  
Prof.Dr.<sup>a</sup> ANA PAULA RODRIGUES - UFVJM

  
Prof.Dr.<sup>a</sup> NISIA ANDRADE VILLELA DESSIMONI PINTO - UFVJM

  
Prof.Dr. FERNANDO ARMINI RUELA - UFVJM

DIAMANTINA



**Projeto de pesquisa financiado pela FAPEMIG: processo CDS-APQ-02459-15**  
**Projeto de pesquisa registrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio**  
Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob números: A5BF4A9 (*Croton*  
*antisyphiliticus*) e A70895D (*Acosmium dasycarpum*)



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma conquista, e por me dar forças e coragem para mais uma etapa.

Agradeço a meus pais Neide e Joaquim e minha irmã Sara pelo suporte, apoio, companheirismo, amor e paciência.

À minha orientadora, Dra. Cristiane Fernanda Fuzer Graef, pela dedicação, confiança, incentivo e aprendizado.

Agradeço a minha co-orientadora Ana Paula Rodrigues pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço especialmente a Dayana Barbosa da Cruz por me ajudar e orientar e pela paciência, pelas valiosas discussões para a realização dos ensaios.

Agradeço aos colegas e amigos do mestrado Malu, Thaís Arteniá, Felipe, Aventino, pela ajuda e apoio.

Agradeço a Kelly Kato pelo auxílio e pelas dicas durante a realização dos ensaios.

A todos os técnicos que me ajudaram e auxiliaram durante os experimentos, principalmente à Patrícia Guimarães, Poliana Barroso.

Agradeço a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Departamento de Farmácia), pela disponibilização dos recursos e infraestrutura para a realização da pesquisa.

Agradeço ao professor Dr. Norberto Peporine Lopes do Núcleo de Pesquisas (FCFRP-USP) pela execução das análises cromatográficas (CG-EM)

Agradeço à Vanessa Luciene Siqueira por fornecer o material de *Croton antisiphiliticus* e a Marcela Santos Souza pela coleta de *Acosmium dasycarpum*.

Agradeço a FAPEMIG pelo aporte financeiro e pelo financiamento do projeto.



*“I just want to be more than a drop in the sea”*

Wanted- OneRepublic



## RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas pela humanidade desde os primórdios, para profilaxia ou tratamento das mais variadas patologias. Atualmente, cerca de 40% dos medicamentos utilizados são derivados de plantas. O Brasil destaca-se por sua biodiversidade, portanto tem um grande potencial para a descoberta de moléculas bioativas. Espécies radicalares são produzidas continuamente em processos metabólicos fisiológicos, no entanto o desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e defesas antioxidantes provoca o aumento de espécies reativas circulantes conduzindo ao estresse oxidativo relacionado a etiologia de diversas doenças. Para prevenir esse processo e as consequências ao organismo, tem-se aumentado a busca de compostos antioxidantes. Assim o presente trabalho teve o objetivo de realizar o estudo fitoquímico e avaliação de atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antisiphiliticus*. Com os extratos brutos dos dois vegetais foi realizada prospecção fitoquímica clássica, a quantificação do teor de compostos fenólicos totais e de flavonóides e ensaios antioxidantes como o da captura do radical DPPH e do radical ABTS. Foi realizado fracionamento dos extratos e com as frações diclorometânica e hexânica obtidas foi realizada a identificação de substâncias por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM); já com a fase hidroalcoólica foi feita a análise do perfil químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Como resultado da prospecção fitoquímica observou-se derivados antracênicos, flavonoides, taninos, esteroides e triterpenos no extrato de *A. dasycarpum*, e alcaloides, antocianidina, flavonoides, esteroides e triterpenos e taninos no extrato de *C. antisiphiliticus*. Os dois extratos obtiveram valores baixos para a captura dos radicais DPPH e ABTS assim como os teores de compostos fenólicos e flavonoides: *A. dasycarpum* (114,85 EAG/ g de extrato; 9,28 EQ/g de extrato; DPPH- EC<sub>50</sub> de 619,14; ABTS- EC<sub>50</sub> de 3097,03); *C. antisiphiliticus* (102,82 EAG/ g de extrato; 10,31 EQ/g de extrato; DPPH- EC<sub>50</sub> de 1110,93; ABTS- EC<sub>50</sub> de 8919,57). Na CG-EM para *A. dasycarpum* foram identificados a fitona, lupeol, acetato de lupeol e o ácido pentanóico e para *C. antisiphiliticus* foram identificados (-) - espatulenol, fitona,  $\gamma$ - sitosterol e o acetato de lupeol. Foi confirmada a presença de flavonoides nos extratos brutos das duas espécies vegetais através da análise dos espectros na região do UV-Vis obtidos a partir de CLAE-DAD. Os extratos analisados apresentam um baixo potencial antioxidante, porém foram identificadas diversas substâncias com ação anti-inflamatória, ação antioxidante, antibacteriana, antifúngicas, entre outras. Existe então a necessidade de mais estudos com esses vegetais para explorar o potencial dos mesmos utilizando-se outros modelos experimentais.

**Palavras chave:** Antioxidante, Análise cromatográfica, Triagem fitoquímica



## ABSTRACT

Currently, about 40% of the medicines used are derived from plants. Brazil offers itself for its biodiversity, therefore, it has great potential for the discovery of bioactive molecules. Radical species are produced with physiological metabolic processes, however, imbalance between pro-oxidant agents and antioxidant defenses caused by the increase in circulating reactive species caused by oxidative stress related to the etiology of several diseases. To prevent this process and as consequences for the organism, it increases the search for antioxidant compounds. Thus, the present work aimed to carry out a phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of the ethanolic extracts of the leaves of *Acosmium dasycarpum* and *Croton antisiphiliticus*. With the crude extracts of the two plants, classical phytochemical prospecting was performed, quantification of the content of total phenolic compounds and flavonoids and antioxidant tests, such as the capture of radical DPPH and radical ABTS. Extraction fractionation was carried out and with the dichloromethane and hexane fractions, with the identification of substances by Gas Chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS); with a hydroalcoholic phase, an analysis of the chemical profile was performed by High Performance Liquid Chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). As a result of phytochemical prospecting for anthracene substances, flavonoids, tannins, steroids and triterpenes without *A. dasycarpum* extract, and alkaloids, anthocyanins, flavonoids, steroids and triterpenes and tannins without *C. antisiphiliticus* extract. The two extracts obtained low values for capture of the radicals DPPH and ABTS, as well as the contents of phenolic and flavonoid compounds: *A. dasycarpum* (114.85 EAG / g of extract; 9.28 EQ / g of extract; DPPH-EC50 of 619.14; ABTS-EC50 of 3097.03); *C. antisiphiliticus* (102.82 EAG / g extract; 10.31 EQ / g extract; DPPH-EC50 of 1110.93; ABTS-EC50 of 8919.57). In GC-MS, *A. dasycarpum* was used for phytone, lupeol, lupeol acetate and pentanoic acid and for *C. antisiphiliticus* (-) - spatulenol, phytone,  $\gamma$ -sitosterol and lupeol acetate. The presence of flavonoids in the crude extracts of the two plant species was confirmed through the analysis of spectra in the UV-Vis region obtained from the HPLC-DAD. The analyzed extracts have a low antioxidant potential, but several substances have been identified with anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antifungal action, among others. There is therefore a need for further studies with these plants to explore their potential using other experimental models.

**KEYWORDS:** Antioxidant, Chromatography analysis, Phytochemical screening



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários .....	35
<b>Figura 2:</b> Estrutura do esqueleto do flavonoide.....	39
<b>Figura 3:</b> Classificação dos compostos fenólicos.....	39
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da ação do flavonoide como quelante de metais.....	40
<b>Figura 5:</b> Representação da reação do radical DPPH• com um antioxidante.....	41
<b>Figura 6:</b> Representação da estabilização do radical ABTS e a formação do radical pelo persulfato de potássio.....	42
<b>Figura 7:</b> <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	45
<b>Figura 8:</b> <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	51
<b>Figura 9:</b> Esquema de testes de triagem fitoquímica realizados com os extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	56
<b>Figura 10:</b> Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para determinar o teor de compostos fenólicos nos extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	57
<b>Figura 11:</b> Complexação entre o flavonoide quercetina e o cloreto de alumínio, formando um complexo estável.....	58
<b>Figura 12 :</b> Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para quantificar flavonóides totais nos extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	59
<b>Figura 13:</b> Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para verificar a capacidade dos extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> em capturar o radical DPPH.....	62
<b>Figura 14:</b> Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para verificar a capacidade dos extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> em capturar o radical ABTS.....	63
<b>Figura 15:</b> Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase diclorometânica obtida do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	74
<b>Figura 16:</b> Espectro do Lupeol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	76
<b>Figura 17:</b> Espectro do Acetato de Lupeol Espectro do Acetato de Lupeol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	77
<b>Figura 18 :</b> Proposta de fragmentação do Lupeol.....	77
<b>Figura 19:</b> Espectro Genkivanina obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	78

<b>Figura 20:</b> Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase diclorometânica obtida do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	79
<b>Figura 21:</b> Espectro do (-) - Epatulenol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	81
<b>Figura 22:</b> Proposta de fragmentação do espatulenol.....	81
<b>Figura 23:</b> Espectro do $\gamma$ - Sitosterol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	82
<b>Figura 24:</b> Proposta de fragmentação do $\gamma$ - Sitosterol.....	83
<b>Figura 25:</b> Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	84
<b>Figura 26:</b> Espectro do Ácido pentanóico obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase hexânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	85
<b>Figura 27:</b> Esquema do Rearranjo de McLafferty.....	86
<b>Figura 28:</b> Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	87
<b>Figura 29:</b> Espectro do Acetato de Lupeol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase hexânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	88
<b>Figura 30:</b> Cromatograma obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	89
<b>Figura 31:</b> Espectro obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) do componente eluído no tempo 3,19 min, presente na fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	89
<b>Figura 32:</b> Cromatograma obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	90
<b>Figura 33:</b> Espectro obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) do componente eluído no tempo 5,23 min, presente na fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	91



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espécies vegetais do Cerrado utilizadas na medicina popular no Vale do Jequitinhonha (Minas Gerais).....	32
<b>Tabela 2:</b> Classe de compostos fenólicos em vegetais.....	38
<b>Tabela 3:</b> Uso popular e Metabólitos encontrados em duas espécies do gênero <i>Acosmium</i> .....	43
<b>Tabela 4:</b> Ensaios realizados com espécies de <i>Acosmium</i> .....	44
<b>Tabela 5:</b> Alguns ensaios realizados com espécies do gênero <i>Croton</i> .....	48
<b>Tabela 6:</b> Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE/DAD da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	61
<b>Tabela 7 :</b> Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE/DAD da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	61
<b>Tabela 8:</b> Resultados da triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	65
<b>Tabela 9:</b> Resultados da triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	66
<b>Tabela 10:</b> Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase diclorometânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	75
<b>Tabela 11:</b> Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase diclorometânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	79
<b>Tabela 12:</b> Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos constituintes presentes na fase hexânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	85
<b>Tabela 13:</b> Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos constituintes presentes na fase hexânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	87
<b>Tabela 14:</b> Relação entre os resultados obtidos para a captura dos Radicais DPPH e ABTS, teores de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> .....	96



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Curva analítica do padrão ácido gálico ( n=3).....	68
<b>Gráfico 2:</b> Teor de Fenólicos Totais ( FT) ( $\pm$ DP) em EAG/g (equivalente de ácido gálico por grama) de Extrato Etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> (n=3).....	69
<b>Gráfico 3:</b> Curva analítica do padrão de Quercetina (n=3).....	71
<b>Gráfico 4:</b> Teor de Flavonoides Totais (QT) expresso em EQ/g (equivalente de ácido gálico por grama) de Extrato Etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i> (n=3).....	72
<b>Gráfico 5:</b> Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> medida através do valor da Concentração Eficiente para captura de 50% do radical DPPH• (EC <sub>50</sub> ).....	92
<b>Gráfico 6:</b> Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> medida através do valor da Concentração Eficiente para captura de 50% do radical ABTS • <sup>+</sup> (EC <sub>50</sub> ).....	94



## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3T3**- Fibroblastos normais de embriões de camundongos
- ABTS**- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
- AD**- *Acosmium dasycarpum*
- ATP**- Adenosina Trifosfato
- B-16**- Melanoma de murinho
- BHA**- Butil-4-hidroxianisol
- BHT**- Hidroxitolueno butilado
- CA**- *Croton antisiphiliticus*
- Caco-2** -Adenocarcinoma colorretal
- CCDC**- Cromatografia em camada delgada comparativa
- CG/EM** -Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas
- CIM**- Concentração Inibitória Mínima
- CLAE/DAD** - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos
- DPPH**- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- EAG/g de extrato**- Equivalente em ácido Gálico/g de extrato
- EC<sub>50</sub>**- Concentração Eficiente para a captura de 50% do radical
- ERN**- Espécie Reativa de Nitrogênio
- ERO's**- Espécies Reativas de Oxigênio
- EQ/g de extrato** - Equivalente em quercetina/ g de extrato
- HeLa**- Carcinoma cervical humano
- IBGE**- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IL-6**- Interleucina 6 / **IL-10**- Interleucina 10 / **IL-17**- Interleucina 17
- K562**- Leucemia
- MCF-7** -Câncer de mama
- MPO**- Mieloperoxidase
- NCI-H460**- Câncer de Pulmão
- SNC**- Sistema nervoso central
- AG**- Ácido Gálico
- Q**- Quercetina
- TBHQ**- terc-butil-hidroquinona
- TNF-  $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$
- MG**- Minas Gerais
- U251**- Glioma
- UFVJM**- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
- UVA**- Ultravioleta A / **UV-VIS** – Ultravioleta Visível



## SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	29
2-OBJETIVOS.....	31
3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	32
3.1 Cerrado Brasileiro.....	32
3.2 Metabolismo Vegetal.....	34
3.3 Triagem fitoquímica.....	35
3.4 Antioxidante.....	36
3.5 Compostos Fenólicos, Flavonoides e Metodologias para Avaliação Antioxidante.....	37
3.6 Família Fabaceae.....	42
3.6.1 Sub-Família Papilionoideae .....	43
3.6.2 Gênero <i>Acosmium</i> .....	43
3.6.3 <i>Acosmium dasycarpum</i> .....	45
3.7 Família Euphorbiaceae .....	46
3.7.1 Gênero <i>Croton</i> .....	47
3.7.2 <i>Croton antisyphiliticus</i> .....	50
4-METODOLOGIA .....	53
4.1 Equipamentos .....	53
4.2 Preparo de Reagentes e Soluções para ensaios antioxidantes, teor de fenólicos totais e teor de flavonoides .....	53
4.3 Coleta e Identificação do Material Botânico.....	54
4.4 Preparo dos extratos Vegetais.....	55
4.5 Estudo Fitoquímico.....	55
4.6 Ensaio Antioxidantes.....	62
4.6.4 Análise Estatística.....	64
5- RESULTADO E DISCUSSÃO .....	65
5.1 Triagem Fitoquímica.....	65
5.2 Quantificação de Compostos Fenólicos.....	68
5.3 Quantificação de Flavonoides.....	71
5.4 Cromatografia Gasosa das fases Diclorometânicas.....	74
5.5 Cromatografia Gasosa das fases Hexânicas.....	84
5.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD) das frações hidroalcoólicas.....	89
5.7 Ensaio antioxidantes.....	92
6-CONCLUSÃO.....	98
7- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	99



## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais tem sido a fonte com potencial para o descobrimento de novos medicamentos. É estimado que cerca de 40% dos medicamentos atuais foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, 25% provenientes de plantas, 13% provenientes de microrganismos e 3% de origem animal. Aproximadamente 140 mil metabólitos secundários já foram isolados e identificados, porém ainda não foram realizados testes biológicos para todos, sendo que esses compostos já identificados e caracterizados correspondem a estudos realizados com apenas 10% da biodiversidade mundial. (CALIXTO, 2003; DIAS *et al.*, 2012)

Os produtos naturais ainda podem fornecer compostos com diversidade estrutural única e com um imenso potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e outros produtos de uso cosmético, veterinário, agrônômico, alimentício. (CALIXTO, 2003; DIAS *et al.*, 2012; LAHLOU, 2013)

A química de produtos naturais hoje está no auge e é indiscutível a importância dos produtos naturais na sociedade moderna. Há uma busca por medicamentos em que os efeitos colaterais sejam menores, por produtos que façam bem para o organismo como um todo. Estão sendo resgatados os valores da medicina tradicional, como a medicina tradicional chinesa, medicina tradicional indiana, assim como terapias complementares, usos de chás e garrafadas também estão sendo muito comuns. (NEWMAN & CRAGG, 2012; BERLINK *et al.*, 2017)

Algumas das doenças mais temidas e atualmente prevalentes tem um fator comum para seu desenvolvimento ou manutenção: os radicais livres, que desencadeiam o estresse oxidativo. Os radicais livres estão envolvidos por exemplo, na aterosclerose, no diabetes, na obesidade, no Parkinson, no Alzheimer, em alguns tipos de câncer, nos danos ao DNA, no envelhecimento precoce, nas inflamações, entre outras doenças, por isso a pesquisa por produtos naturais que tenham um potencial antioxidante é crescente. (LEMES *et al.*, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2018)

Os antioxidantes são utilizados em diversas indústrias como a farmacêutica, cosmética, alimentícia. São utilizados em formulações que contenham óleos vegetais e gorduras para evitar a rancificação das mesmas, para aumentar a validade dos produtos, evitar a autoxidação. Na indústria de alimentos tem uma importância grande, pois a rancificação leva a formação de produtos tóxicos e antinutricionais, além de mudança na cor, sabor e textura dos alimentos. Na indústria de cosméticos são utilizados principalmente em produtos *anti-aging* para evitar o envelhecimento precoce. (ROQUE *et al.*, 2019)

O Brasil detém 20% da biodiversidade mundial, ou seja, temos uma infinidade de metabólitos secundários ainda não estudados. O Cerrado é um dos biomas brasileiros de maior biodiversidade, aliado a isso há o conhecimento popular sobre as plantas medicinais que nos direciona para os estudos sobre produtos naturais. Os vegetais utilizados para o presente estudo são utilizados pela população para o tratamento de diversas doenças. (CALIXTO, 2003)

*Acosmium dasycarpum*, conhecida como pau-para-tudo/ perobinha do campo, é utilizada como tranquilizante, hipotensor, antineoplásico, diurético e para doenças de pele. (SOUSA- JÚNIOR *et a.*, 2009)

*Croton antisiphiliticus*, conhecida como canela-de-perdiz/ curraleira, é utilizada no tratamento de infecções sexualmente transmissíveis como a sífilis, inflamação, lesões ulcerativas, eczemas e reumatismos. (SIQUEIRA, 2019)

É muito importante o estudo de plantas utilizadas popularmente pela população, pois é possível verificar se há substâncias tóxicas ou se os efeitos alegados são confirmados ou não pela presença de alguns compostos; os resultados obtidos servem também como base para pesquisas futuras e para se verificar outras aplicações de produtos obtidos desses vegetais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo fitoquímico dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e *Croton antisiphiliticus*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Coletar os vegetais e preparar os extratos.
- Realizar a triagem fitoquímica dos extratos, para a detecção das principais classes de metabólitos secundários.
- Fracionar os extratos através de partição líquido-líquido, obtendo fases hexânica, diclorometânica e hidroetanólica.
- Analisar as fases hexânica e diclorometânica através de CG/EM (cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas) e a fase hidroalcoólica através de CLAE/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos) para a detecção do perfil químico.
- Realizar ensaios para a quantificação de compostos fenólicos totais e de flavonoides.
- Realizar ensaios antioxidantes com os extratos, utilizando as metodologias de captura dos radicais DPPH e ABTS.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cerrado Brasileiro

O Cerrado é um Bioma brasileiro constituído por três formações: florestal, savânica e campestre. Florestal: com predomínio de espécies arbóreas; Savânica: áreas com árvores e arbustos espalhados sobre um estrato gramíneo; Campestre: áreas com predomínio de espécies herbáceas e arbustivas sem árvores. (SANO *et al.*, 2007)

É um dos maiores biomas brasileiros ocupando uma área de 2.036.448 km<sup>2</sup> (IBGE 2008). É encontrado nos estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Piauí, Rondônia, São Paulo, tendo ainda resquícios nos estados do Amapá, Amazonas e Roraima, representando 22% do território nacional. (BAYMAN-SILVA *et al.*, 2017; MOREIRA-ARAÚJO *et al.*, 2019)

O Cerrado Brasileiro é considerado a Savana mais rica do mundo, devido a sua diversidade biológica contendo uma quantidade enorme de espécies endêmicas. Abriga aproximadamente 11.627 espécies de vegetais nativos, cerca de 199 espécies de mamíferos, 837 espécies de pássaros, 1200 espécies de peixes, 180 espécies de répteis e 150 espécies de anfíbios. (MOREIRA-ARAÚJO *et al.*, 2019)

A tabela 1 apresenta algumas das espécies vegetais mais utilizadas medicinalmente pela população do Vale do Jequitinhonha, sendo espécies encontradas no Cerrado.

**Tabela 1: Espécies vegetais do Cerrado utilizadas na medicina popular no Vale do Jequitinhonha (Minas Gerais)**

<b>Espécie</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Indicação popular</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<i>Ageratum fastigiatum</i>	Exota, mata-pasto	Emplasto para feridas, antiinflamatório tópico, antimicrobiana.	CAMPOS & FREITAS, 2018;
<i>Annona spp.</i>	Araticum	Úlcera, reumatismo, distúrbios digestivos	BRANDÃO, 2015
<i>Baccharis myriocephala</i>	Carqueja	Febre, reumatismo, pedra na vesícula, colagoga, diabetes, obesidade, obstrução do fígado, vermes e doenças do couro cabeludo	OTONI, 2018

<i>Bixa orellana</i>	Urucum	Doenças respiratórias, inflamação de garganta, asma	BRANDÃO, 2015 ; OTONI, 2018
<i>Caryocar brasiliense</i>	Pequi	Asma, bronquite, coqueluche, resfriado, afrodisíaco e tônico	BRANDÃO, 2015
<i>Cissampelos ovalifolia</i>	Orelha-de-onça	Diurética, antifebril	BRANDÃO, 2015
<i>Eriosema campestre</i>	Pustemeira	Anti-inflamatório	CAMPOS & FREITAS, 2018
<i>Euphorbia tirucalli</i>	Árvore-lápis/ Pecado-pelado	Tratamento de câncer, analgésico, angiogênico, antimicrobiano, antimutagênico, anti-reumática, imunomodulador	CAMPOS & FREITAS, 2018); OTONI, 2018
<i>Gomphrena officinalis</i>	Para tudo/ perpétua	Dismenorréia	BRANDÃO, 2015
<i>Hancornia speciosa</i>	Mangaba	Cólica e luxações	BRANDÃO, 2015
<i>Lafoensia pacari</i>	Pacari	Cicatrizante, gastrite, úlcera	BRANDÃO, 2015
<i>Lippia spp.</i>	Chá-de-pedestre/ capitão-do-mato	Tosse, resfriados	BRANDÃO, 2015
<i>Lychnophora spp.</i>	Arnica/Candeia	Contusões, pancadas, torções e hematoma	BRANDÃO, 2015
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira-santa	Gastrite, dispepsia, laxativa, diurética	OTONI, 2018
<i>Miconia ferruginata</i>	Pixiricado-campo	Tratamento de doenças de pele de origem inflamatória, infecciosa	CAMPOS & FREITAS, 2018
<i>Oxalis repens</i>	Azedinha/ Frero	Febres malignas ou tifoídes	BRANDÃO, 2015
<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	Arnica do campo/ arnica	Contusões, pancadas, torções e hematoma	CAMPOS & FREITAS, 2018
<i>Smilax spp.</i>	Japacanga/ salsaparrilha	Afecções da pele, antissifilítico, antirreumático, depurativo, contra gota, diurética e sudorífica	BRANDÃO, 2015
<i>Vernonanthura sp.</i>	Assapeixe	Debilidade geral, tosse	(OTONI, 2018)

### 3.2 Metabolismo Vegetal

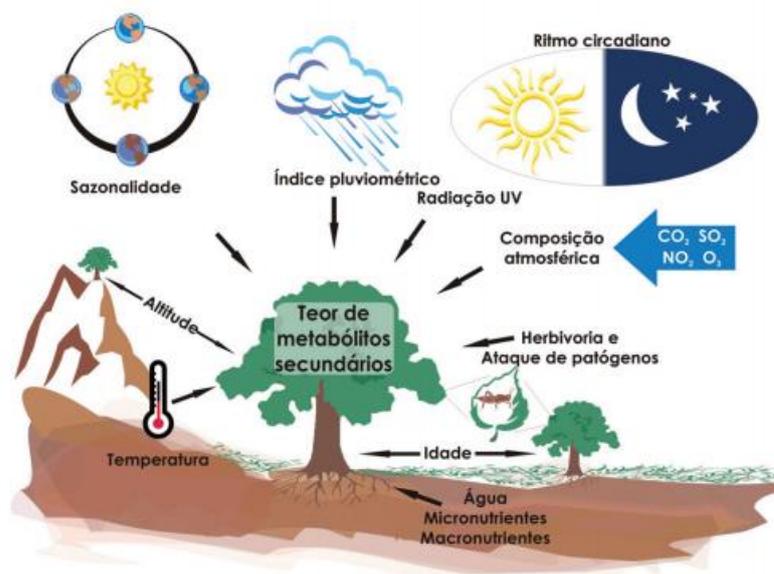
Qualquer organismo tem a necessidade de transformar e converter um número grande de compostos orgânicos para que possa viver, crescer e se reproduzir. Há a necessidade da formação de energia e de diversas outras substâncias essenciais para a manutenção morfológica e funcional das estruturas e tecidos. (THEIS & LERDAU, 2003)

O conjunto de reações químicas/ transformações a que as substâncias são submetidas dentro de um organismo é conhecido como metabolismo. Os organismos, mesmo pertencendo a reinos diferentes, acabam por produzirem as mesmas moléculas essenciais para viver. As vias para obtenção dessas moléculas podem variar entre as espécies, porém é comum a elas a produção de carboidratos, lipídeos, ácido nucleicos e proteínas, que são provenientes do metabolismo primário. (THAKUR *et al.*, 2019)

Os vegetais possuem um metabolismo especial que é chamado de metabolismo secundário, os metabólitos secundários são importantes para a manutenção da vida dos vegetais e estão ligados as atividades biológicas quando se utiliza uma planta medicianl. Aos vegetais é impossível mover-se quando expostos a condições estressantes ou não agradáveis, portanto muitos dessas substâncias fazem parte da adaptação dos vegetais ao ambiente em que vivem. Apresentam uma importância muito grande para os vegetais, já que são responsáveis por promover a proteção contra o ataque de patógenos e herbívoros, proteção contra raios ultravioletas, atração de polinizadores, atração de animais dispersores de sementes e bactérias do gênero *Rhizobium*, competição entre os vegetais (produção de substâncias alelopáticas), produção de substâncias antioxidantes. (PAVARINI *et al.*, 2012; KATEROVA *et al.*, 2017)

Os fatores que podem influenciar na produção de metabólitos secundários orientando ou mudando a qualitativamente ou quantitativamente a produção são: sazonalidade, ritmo circadiano, idade do vegetal, temperatura, pluviosidade, radiação luminosa (incluindo a radiação ultravioleta danosa aos organismos), tipo de solo (quantidade de macro e micronutrientes), altitude, poluição atmosférica, ataque de patógenos ou predadores, constituição genética (GLOBO-NETO& LOPES, 2007; NEWMAN & CRAGG, 2012; BORGES *et al.*, 2017) como demonstrado pela Figura 1.

**Figura 1: Fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários**



Fonte: (GLOBO-NETO & LOPES, 2007)

As pesquisas por produtos naturais derivados de plantas são voltadas para os metabólitos secundários, pois eles apresentam bioatividade comprovada e muitas vezes são novidades estruturais. Diversos medicamentos utilizados atualmente são derivados desses metabólitos secundários plantas ou de microorganismos. A digoxina, utilizada para insuficiência cardíaca, é encontrada na dedaleira (*Digitalis purpurea*); assim como a vimblastina e a vincristina, utilizadas para o tratamento do câncer, são provenientes da vinca (*Catharanthus roseus*), entre outras substâncias. (PINTO *et al.*, 2002)

As principais classes de metabólitos secundários investigadas são: flavonoides, alcaloides, taninos, terpenoides, esteroides, saponinas, heterosídeos cardioativo, antracenosídeos, cumarinas. (SECA & PINTO, 2018)

### 3.3 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica consiste em uma série de ensaios qualitativos realizados para identificar as principais classes de metabólitos secundários do vegetal. Tem a vantagem de serem ensaios rápidos e de fácil execução. Tem por objetivo conhecer as classes dos constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. (SIMÕES, 2010)

Para a realização da triagem devem ser coletadas folhas, flores, caules, raízes, sementes ou frutos e posteriormente obter extratos, tinturas, óleo essencial, entre outros. As reações que ocorrem entre os constituintes do extrato e os reagentes geralmente resultam em

precipitação, em produtos cromogênicos e podem ainda ser realizadas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). (MATTE *et al.*, 2015; SIMÕES & ALMEIDA, 2015)

É importante salientar que os metabólitos primários e secundários estão intimamente ligados. Os metabólitos primários, uma vez produzidos, tornam-se substratos para a formação de compostos secundários ou, em alguns casos, os precursores dos dois tipos de metabólitos são os mesmos. Os metabólitos secundários, por sua vez, permitem que a espécie sobreviva no ambiente sobre forte pressão de agentes competitivos e nocivos, o que indiretamente permite à planta uma condição homeostática, garantindo melhores condições para a produção de metabólitos primários. Desta maneira, os dois grupos de compostos sintetizados pelas plantas são interdependentes, quando avaliados dentro das condições naturais em que se encontram os vegetais. (RAMOS, 2017)

### **3.4 Antioxidante**

Observa-se que inúmeras atividades biológicas de produtos de origem vegetal têm sido avaliadas com o objetivo de se confirmar o uso popular de uma planta ou com o intuito de se investigar um potencial uso da planta ou de seus derivados. Dentre as várias atividades biológicas pesquisadas destaca-se a atividade antioxidante dos metabólitos secundários. O interesse nessa atividade biológica é devido, em parte, à participação de espécies reativas de oxigênio ou radicais em inúmeros processos patológicos. (SILVA *et al.*, 2010; PROVENSI, 2018)

Antioxidante é qualquer substância que, quando em baixas concentrações comparado ao substrato passível de sofrer oxidação, regenera o substrato ou previne a cadeia de reações de oxidação. Podem ter atividade antioxidante as vitaminas (vitamina E, A), pigmentos naturais (betacaroteno, licopeno curcumina), metabólitos secundários (compostos fenólicos como os flavonoides), e enzimas, além dos antioxidantes sintéticos (BHT, BHA, TBHQ). (DELMONDES, 2013)

Radical é toda espécie química que possui um ou mais elétrons não emparelhados. São compostos instáveis e altamente reativos, pois, com o intuito de se estabilizarem, podem doar o elétron desemparelhado (ocorrendo sua oxidação) ou abstrair um elétron de outra molécula, alterando assim as funções, estrutura e conformação de componentes das células. (AQUINO *et al.*, 2017; VERRUCK *et al.*, 2018)

Os radicais, que são as espécies reativas de nitrogênio ou oxigênio (ERN' s e ERO's respectivamente), são produzidas em processos fisiológicos regularmente no organismo

humano, tendo importantes funções como modulação do sistema imune, na biologia reprodutiva, sinalização celular, geração de ATP pela cadeia transportadora de elétrons. Ocorre também a produção de antioxidantes endógenos que modula os radicais formados durante os processos fisiológicos para evitar que causem danos aos tecidos. Entretanto, pode ocorrer um desequilíbrio oxidativo por produção supra-fisiológica dos radicais, deficiência na produção dos antioxidantes endógenos ou pela a exposição do organismo a agentes pró- oxidantes, caracterizando o estresse oxidativo. (BARREIROS *et al.*, 2006; DUARTE-ALMEIDA *et al.*,2006)

Os agentes pró-oxidantes exógenos para o ser humano são a radiação ultravioleta, maus hábitos alimentares, consumo de álcool e tabaco, poluição ambiental, alimentação rica em gorduras saturadas, entre outros. (ROQUE *et al.*, 2019)

Há indícios de que os radicais livres possam estar ligados ao desenvolvimento e agravamento de diversas doenças como doenças cardiovasculares (principalmente a arteriosclerose), doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer) aumento das complicações do Diabetes Mellitus, catarata, doenças inflamatórias, afetam o sistema imune, desencadeiam o envelhecimento precoce, causam danos teciduais e alguns tipos de câncer são relacionados ao estresse oxidativo. (LEMES *et al.*,2017; VASQUES & FONSECA, 2018; ROQUE *et al.*, 2019).

Atualmente a pesquisa de antioxidantes naturais tem se expandido, pois são mais biodegradáveis, são mais solúveis tanto em água quanto em óleo, além de que o apelo comercial sobre produtos naturais está cada vez mais forte, pois muitos dos compostos sintéticos utilizados nas indústrias de alimentos, cosméticos e de produtos farmacêuticos são prejudiciais à saúde. (TURECK *et al.*, 2017; VASQUES & FONSECA, 2018)

Dentre os antioxidantes de origem natural destacam-se os compostos fenólicos, e a classe de fenólicos mais importante e mais abundante encontrada na natureza é a dos flavonoides, (LIMA, 2016) os quais serão abordados no próximo tópico.

### **3.5 Compostos Fenólicos, Flavonoides e Metodologias para Avaliação Antioxidante**

Os compostos fenólicos são uma ampla classe de substâncias bioativas provenientes do metabolismo secundário dos vegetais que englobam moléculas simples e moléculas com alto grau de polimerização. São substâncias com um anel aromático com no mínimo uma hidroxila como substituinte. Muitos dos compostos fenólicos são conhecidos por terem uma alta capacidade antioxidante podendo ter ação sobre sistemas enzimáticos, agindo como quelantes de metais, como doadores de elétrons, além de absorverem a radiação ultravioleta. (HAIDA *et*

*al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2018) A Tabela 2 traz as principais classes de compostos fenólicos presentes em vegetais.

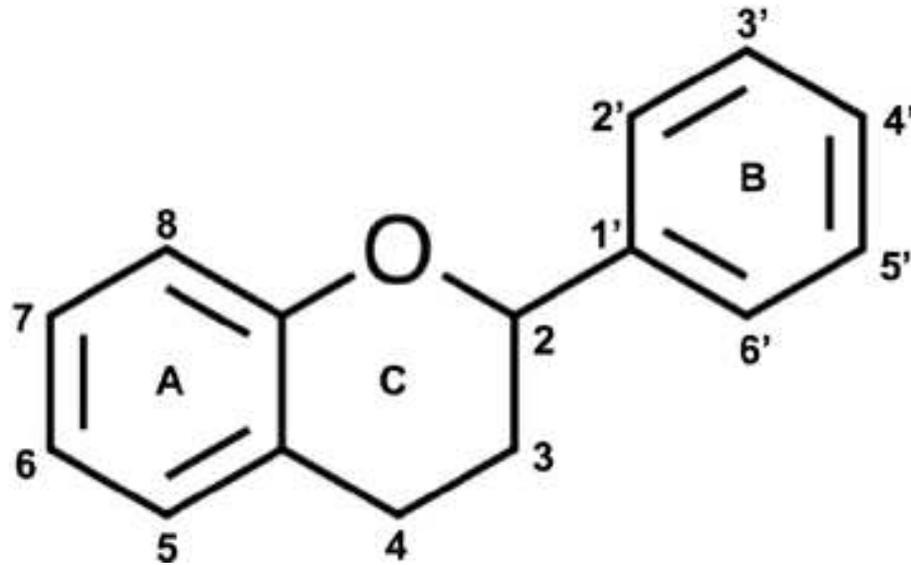
**Tabela 2. Classe de compostos fenólicos em vegetais.**

<b>Classe</b>	<b>Estrutura</b>
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6—C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6—C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6— C3
Naftoquinonas	C6— C4
Xantonas	C6— C1— C6
Estilbenos, antraquinonas	C6— C2— C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6— C3— C6
Lignanas, neolignanas	(C6— C3)2
Biflavonóides	(C6— C3— C6 )2
Ligninas	(C6— C3) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C6— C3— C6) <sub>n</sub>

**Fonte:** ÂNGELO & JORGE, 2007

Uma das principais e maiores classes de compostos fenólicos é a classe dos flavonoides. Eles são derivados de três moléculas de acetato e uma molécula de ácido cinâmico ou outro fenilpropanóide derivado deste. Seu esqueleto básico contém 15 carbonos e é composto por três anéis, os anéis A e B (anéis aromáticos) ligados através de um anel pirano C, (ÂNGELO & JORGE, 2007, LIMA & BEZERRA, 2012) como demonstrado pela Figura 2.

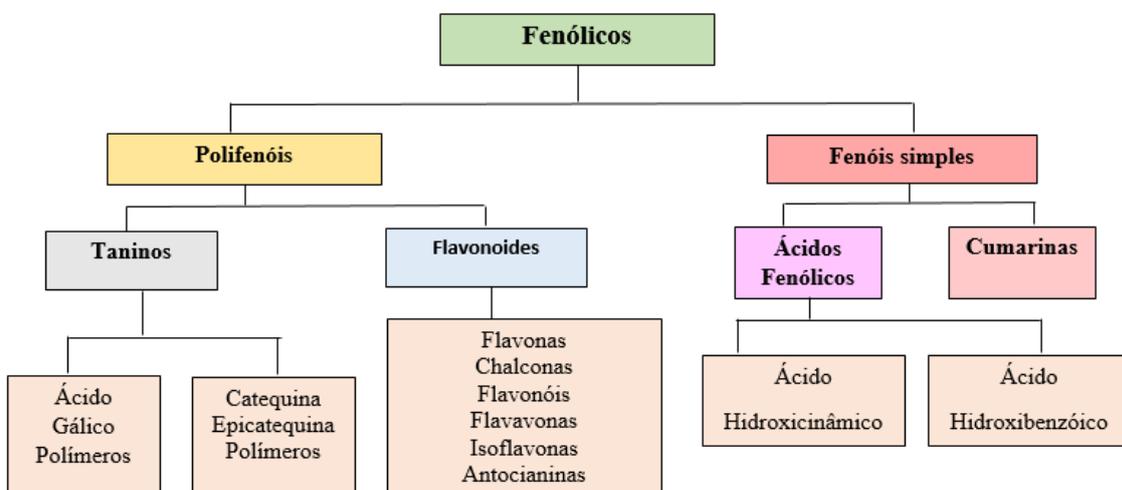
**Figura 2: Estrutura do esqueleto do flavonoide**



Fonte: TEIXEIRA *et al.*, 2013.

Os flavonoides são encontrados em diversos alimentos comuns como a uva, maçã, cebola, couve, morango, chá verde. O mais comum e também mais estudado é a quercetina, sendo reportada suas atividades anti-carcinogênica, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, anti-idade, antiagregante plaquetário, vasodilatadora. Em geral a quercetina é encontrada nos vegetais na forma de heterosídeos, ou seja, ligada a açúcares, sendo o seu heterosídeo mais comum representado pela rutina. (KASIKCI & BAGDATLIOGLU, 2016). A Figura 3 apresenta a classificação dos flavonoides dentro dos compostos fenólicos.

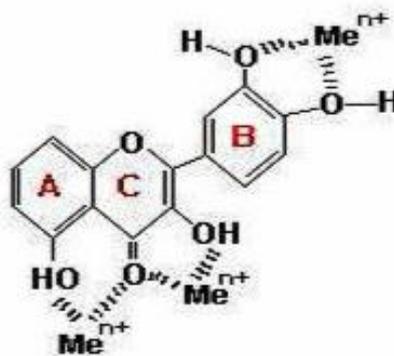
**Figura 3: Classificação dos compostos fenólicos**



Fonte: Adaptado de TAIZ & ZEIGER, 2004.

As atividades bioquímicas dos flavonoides são dependentes de diversos fatores, sendo a estrutura química um dos principais fatores que interferem na atividade biológica. A estrutura química varia conforme suas substituições: hidrogenação, hidroxilação, metilação, sulfatação, glicosilação. A atividade antioxidante pode ser determinada por algumas características: solubilidade e interação com as membranas; a capacidade de quelar metais de transição (essa capacidade é de fundamental importância, pois os metais de transição são pró-oxidantes e catalisam diversas reações dentro do organismo) (Figura 4); capacidade de absorver luz ultravioleta (que é um agente pró-oxidante); agente doador de hidrogênio radicalar  $H\cdot$  e de elétrons (o que estabiliza radicais livres), sendo que um número grande de hidroxilas na estrutura leva a uma maior atividade de doação de hidrogênio radicalar. (GIADA, 2006; SANTOS & RODRIGUES, 2017)

**Figura 4: Representação esquemática da ação do flavonoide como quelante de metais.**

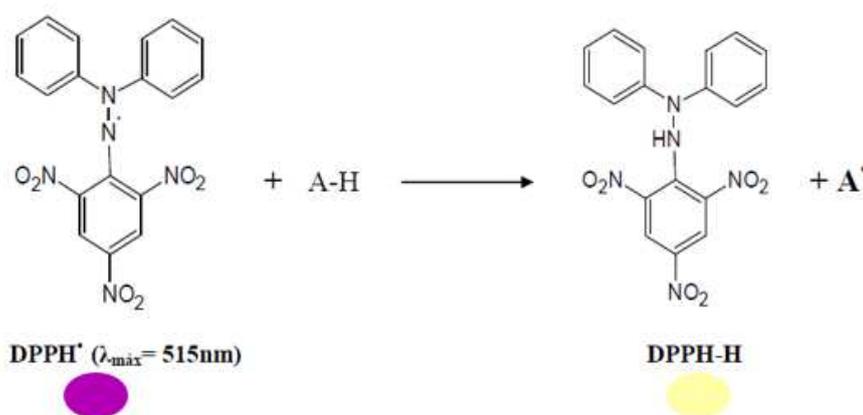


Fonte: site < <http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/13/2450-16667.html> >

O método de sequestro de radicais, com o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é um dos ensaios mais utilizados para realizar a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos extratos vegetais. Baseado na capacidade que tem as substâncias que estão presentes no extrato de inibir/ remover/ sequestrar os radicais do meio reacional doando hidrogênio radicalar para a estabilização do radical DPPH $\bullet$ . O radical DPPH $\bullet$  é considerado estável devido a deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. A deslocalização do elétron faz com que a solução de DPPH $\bullet$  em metanol apresente uma coloração roxa/ violeta tendo uma absorção em 515 nm. Ao entrar em contato com uma molécula antioxidante que doa hidrogênio, o radical DPPH $\bullet$  é reduzido e ocorre a mudança na coloração que passa do violeta para amarelo, indicando que o radical foi neutralizado (ALVES *et al.*, 2010; FERNANDES, 2016) (Figura 5).

A partir dos resultados obtidos é feita a porcentagem de inibição do radical DPPH●, e a partir desses resultados é calculado o EC<sub>50</sub> para determinar a eficiência do antioxidante em reduzir a concentração do radical DPPH● em 50%. Quanto maior o consumo do radical, menor será o EC<sub>50</sub> e maior a atividade antioxidante. É um método simples e de fácil execução.(THAIPONG *et al* , 2006; PIRES *et al.*, 2017)

**Figura 5: Representação da reação do radical DPPH● com um antioxidante**

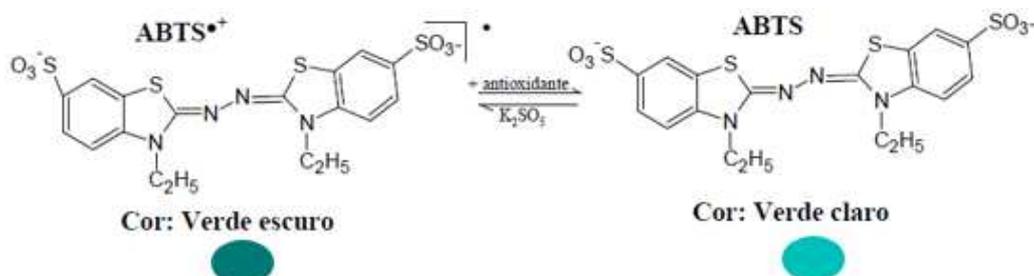


Fonte: Adaptado de Lima, 2016.

Outro método importante para a determinação da atividade antioxidante é o sequestro do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS●<sup>+</sup>). Da mesma maneira que o radical DPPH●, o radical ABTS●<sup>+</sup> é estável nas condições analíticas estabelecidas. Entretanto, o radical ABTS●<sup>+</sup> necessita ser gerado antes de sua utilização. O reagente é dissolvido em água ou solventes orgânicos e posteriormente é adicionado persulfato de potássio e incubado para que seja formado o radical, o que não ocorre para o radical DPPH● o qual já vem pronto e só precisa ser diluído apenas em solventes orgânicos. (THAIPONG *et al* , 2006; BARBI, 2018; SILVA *et al.*, 2018)

O sequestro do radical (ABTS●<sup>+</sup>) ocasiona uma descoloração do radical que passa de um verde-escuro para verde claro, causando um decréscimo da absorvância. Portanto, quanto menor a absorvância maior será o potencial antioxidante do extrato analisado. Esse decréscimo da absorvância é detectado por espectrofotometria no comprimento de onda de 734 nm.( BARBI, 2018; HENRIQUES *et al.*, 2018) A figura 6 demonstra a estabilização do radical e a formação do mesmo pelo persulfato de potássio.

**Figura 6: Representação da estabilização do radical ABTS e a formação do radical pelo persulfato de potássio**



Fonte: Adaptado de RUFINO *et al.*, 2006.

### 3.6 Família Fabaceae

A família Fabaceae, também conhecida por Leguminosae, inclui árvores, arbustos e plantas herbáceas perenes ou anuais (RAHMAN & PARVIN, 2014). Amplamente distribuída pelo mundo, sendo encontrada em florestas secas, savanas, e em florestas úmidas tropicais como as da África, Ásia e América do Sul e também no Mediterrâneo e em ambientes desérticos. (YAHARA *et al.*, 2013; DRYFLOR, 2016; BARROS, 2017)

Uma das maiores famílias botânicas existentes no mundo em relação a número de espécies, atrás apenas de Orchidaceae e Asteraceae, possui aproximadamente 19500 espécies, 770 gêneros e seis sub-famílias (Cercidoioideae, Detarioideae, Duparquetioideae, Caesalpinioideae, Papilionoideae). (AZANI *et al.*, 2017; BARROS, 2017). A família é encontrada no Brasil, em todos os estados, contando com 222 gêneros, 2846 espécies, 59 subespécies, deste montante, 16 gêneros, 1540 espécies, e 18 subespécies são endêmicos. (Flora do Brasil, 2020)

Fabaceae é a segunda maior família economicamente importante de plantas, pois muitos de seus frutos e sementes são utilizados na alimentação humana e animal. São fontes muito importantes de proteínas e micronutrientes, além de que a partir de seus grãos podem ser extraídos óleos vegetais com finalidades diversas. As proteínas existentes nesses grãos são complementares as proteínas dos cereais. (YAHARA *et al.*, 2013)

Outro fator muito importante que ocorre em muitas espécies da família Fabaceae é em relação a fixação de nitrogênio atmosférico. Bactérias do gênero *Rhizobium* podem ser encontradas em nódulos radiculares nesses vegetais, onde fazem a conversão do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub> gasoso) em amônia (NH<sub>3</sub>), uma forma solúvel, que acaba por repor o nitrogênio do solo que é utilizado por outros vegetais vizinhos. (LEWIS, 1987; LEWIS *et al.*, 2005; YAHARA *et al.*, 2013; AZANI *et al.*, 2017).

### 3.6.1 Sub-Família Papilionoideae

Papilionoideae é a maior subfamília pertencente à família Fabaceae, abrangendo 503 gêneros e 14000 espécies (SHARMA & KUMAR, 2013, AZANI *et al.*, 2017;); tem uma larga distribuição entre as regiões tropicais, subtropicais e regiões temperadas. No Brasil são encontrados cerca de 100 gêneros e por volta de 1100 espécies. (MARTINS *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018)

São encontrados árvores, ervas, arbustos, cipós ou trepadeiras. É a subfamília a qual engloba amendoim (*Arachis hypogaea*), lentilha (*Lens culinaris*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*), andu (*Cajanus cajan*), soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum*) que são alimentos muito nutritivos e economicamente importantes. (GOMES *et al.*, 2019)

### 3.6.2 Gênero *Acosmium*

O gênero *Acosmium* Schott (Sophoreae, Papilionoideae) é um gênero neotropical composto por 17 espécies que se estendem desde o sul do México ao norte da Argentina, sendo que a maioria das espécies é encontrada no Brasil. Existem evidências de fósseis que foram coletados na Argentina (Patagônia), Brasil e Bolívia indicando que *Acosmium* spp. já existiam na América do Sul desde o Plioceno entre 5 e 2 milhões de anos atrás. (SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2009)

De acordo com Trevisan (2002), as espécies de *Acosmium* mais utilizadas na medicina popular são *Acosmium dasycarpum*, *Acosmium panamense* e *Acosmium sublegans*. A tabela 3 apresenta a as espécies *A. panamense* e *A. sublegans*, seu uso popular e metabólitos identificados. Na tabela 4 encontram-se os resultados de ensaios realizados com as duas espécies de *Acosmium* citadas anteriormente.

**Tabela 3: Uso popular e Metabólitos encontrados em duas espécies do gênero *Acosmium***

<b>Espécie</b>	<b>Indicação popular</b>	<b>Metabólitos Identificados</b>
<i>Acosmium panamense</i>	<b>Flores:</b> antiemético, enxaqueca, asma, histeria, eclampsia, dismenorreia, desequilíbrios neurodegenerativos, espasmos musculares	Pironas glicosídicas (WIEDENFELD & ANDRADE-CETTO, 2003)  Alcaloides quinolizidínicos (VEITCH <i>et al.</i> , 1997).

	<b>Cascas da raiz e caule:</b> catarro, tosse, malária, febre, sífilis, glicemia alta  (FIGUEIREDO, 2009)	
<i>Acosmium subelegans</i>	<b>Cascas da raiz e do caule e folhas:</b> epilepsia, sífilis, reumatismo, infecções cutâneas, espasmos musculares, histeria, asma, e desequilíbrios neurodegenerativos  (FIGUEIREDO, 2009)	Alcaloides, lupeol (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1994; VEITCH <i>et al.</i> , 1997).

Tabela 4: Ensaio realizados com espécies de *Acosmium*

<b>Espécie</b>	<b>Atividades encontradas</b>	<b>Tipo de Extrato/ parte da planta utilizada</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<i>Acosmium panamense</i>	Atividade hipoglicemiante	Extrato aquoso e butanólico das cascas	ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2003
	Atividade contra linhagem CaP (RA+) ( Câncer de próstata)	Extrato metanólico do caule	AGUDO <i>et al.</i> , 2016
<i>Acosmium subelegans</i>	Atividade anticonvulsivante e depressora do SNC	Extrato etanólico das cascas do caule	VIEIRA <i>et al.</i> , 2002
	Absorção da radiação UVA	Extrato etanólico das raízes	VIOLANTE <i>et al.</i> , 2008

### 3.6.3 *Acosmium dasycarpum*

*Acosmium dasycarpum*, conhecida popularmente como perobinha do campo, chapada, pau para tudo, unha d'anta e genciana, é encontrada nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, e Mato Grosso (MEDEIROS, 2011).

É uma espécie restrita ao Cerrado, sua altura pode variar de 4 a 6 metros, possui copa pequena, tronco tortuoso e casca suberosa, flores brancas, frutos do tipo legume, apresentando vagem achatada, sua floração ocorre entre os meses de novembro e dezembro. *Acosmium* significa “sem adorno” e refere-se as flores deste vegetal que são pequenas. (BARROSO, 1991). Na figura 7 é possível visualizar a *A. dasycarpum*

**Figura 7:** *Acosmium dasycarpum*



Fonte: Site < [shorturl.at/cKTW4](http://shorturl.at/cKTW4) >

Parizotto (2003) avaliou a atividade antiúlcera (induzindo úlcera em ratos com etanol) e analgésica (utilizando modelo de dor induzido por ácido acético), do extrato metanólico do cerne das raízes e foi constatada atividade antiúlcera e analgésica nas doses de 20 e 200mg/Kg, respectivamente.

Trevisan *et al.*, (2008) isolaram e identificaram alcaloides diaza-adamantanos e quinolizidínicos, lupeol e a 4-metoxi-6- (p-hidroxiestiril)-  $\alpha$ -pirona do extrato da casca da raiz de *A. dasycarpum*. Do extrato da casca da raiz foi isolado o lupeol (triterpeno), o que pode explicar a ação depressora do sistema nervoso central (SNC) quando esse extrato foi testado em camundongos. (ROCHA *et al.*, 1980 apud SOUSA- JUNIOR *et al.*, 2009).

O extrato bruto metanólico das cascas das raízes foi também testado para atividades antibacteriana (cepa *Staphylococcus epidermidis*), antifúngica (*Tricophyton mentagnophytes*), antioxidante (DPPH). Para as atividades antibacteriana e antifúngica foram utilizadas as concentrações de 50 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente e essas concentrações foram eficazes contra as cepas avaliadas. Para a atividade de captura do radical DPPH observou-se uma inibição de 90,76% do radical na concentração de 50µg/mL (TREVISAN, 2002 apud SOUSA- JUNIOR *et al.*, 2009).

Silva *et al.* (2015) isolaram e identificaram do extrato metanólico das folhas de *A. dasycarpum*: catequina, lupeol (E)-4-hidroxicinamato de metila e (Z)-4-hidroxicinamato de metila, bornesitol, 3-O-β-D-glicopiranosilsterol.

Rodrigues *et al.*, 2019 realizaram a triagem fitoquímica clássica do extrato etanólico das folhas de *A. dasycarpum* e detectaram a presença de flavonoides, taninos e antocianinas e para o extrato hexânico observaram a presença apenas de esteroides e triterpenos.

### 3.7 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae é uma das famílias de angiospermas mais complexas e diversas da ordem Malpighiales, é composta por 317 gêneros e mais de 8000 espécies (RAMALHO *et al.*, 2017), é dividida em cinco subfamílias: Phyllanthoideae, Oldfieldoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae. É encontrada nas áreas tropicais e subtropicais, principalmente na África e nas Américas. (SECCO *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2013; TRINDADE & LAMEIRA, 2014)

No Brasil, é estimado que ocorram 1100 espécies distribuídas em 72 gêneros, encontradas nos mais diversos biomas brasileiros e mais de 60% das espécies é endêmica. (SOUZA & LORENZI, 2006; LUCENA & ALVES )

Os vegetais que compõe essa família apresentam grande diversidade e complexidade morfológica, podendo-se encontrar árvores, arbustos, ervas ou lianas. São considerados pioneiros quanto a colonização de habitats e essa característica pode explicar o motivo pelo qual um grande número de plantas dessa família apresenta propriedades medicinais, pois os diferentes estímulos ambientais acabam por favorecer a produção de uma ampla e diversa quantidade de metabólitos secundários. . (HIROTA *et al.*, 2010; MWINEL & VAN- DAMME, 2011; COSTA *et al.*, 2018)

Os metabólitos secundários mais descritos para essa família são os taninos, terpenoides, flavonoides, alcaloides e esteroides; é fonte de muitas moléculas bioativas sendo medicinais ou tóxicas. (TRINDADE & LAMEIRA, 2014)

Euphorbiaceae está entre umas das famílias de importância econômica devido a vegetais como, a mandioca (*Manihot esculenta*) que é fonte de alimento, a mamona (*Ricinus communis*) de onde é extraído o óleo de rícino (castor-oil), a seringueira (*Hevea brasiliensis*) de onde é extraída a borracha natural, e algumas espécies são utilizadas como ornamentais coroa-de-cristo (*Euphorbia milii*), bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima*), cróton (*Codiaeum variegatum*). ( OLIVEIRA, 2013)

Os gêneros *Euphorbia*, *Croton*, *Phyllanthus*, *Acalypha*, *Macaranga*, *Antidesma*, *Drypetes*, *Jatropha*, *Manihot.*, *Tragia* são considerados os mais importantes da família. HIROTA *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2013) Os gêneros *Croton*, *Euphorbia* e *Jatropha* são os gêneros mais estudados quando se trata de uso terapêutico. (ALMEIDA *et al.*, 2010; SECCO *et al.*, 2012; CREPALDI *et al.*, 2015)

Atualmente os estudos estão voltados para os gêneros *Croton* L. e *Jatropha* L. devido à presença de peptídeos cíclicos bioativos (orbitídeos) que estão sendo consideradas as substâncias mais promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois, já foram relatados como tendo ação citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, imunossupressora e também agem como inibidores de proteases. (RAMALHO *et al.*, 2017; RAMALHO *et al.*, 2018 NASTRI, 2019; QUEIROZ, 2019)

### 3.7.1 Gênero *Croton*

O gênero *Croton* é o segundo maior da família Euphorbiaceae e em praticamente todo território brasileiro são encontradas espécies; há no Brasil aproximadamente 303 espécies, sendo 236 endêmicas. Muitas delas são utilizadas na medicina tradicional a *Croton cajucara* é usada para hipercolesterolemia e obesidade; *Croton celtidifolius*, para inflamações, úlcera, leucemia; *Croton napetaefolius*, para inapetência e cólicas; *Croton palanostigma*, para feridas, inflamação intestinal; *Croton urucurana*, para reumatismo e câncer; as cascas e folhas de *Croton zehntneri* são utilizadas como adoçante, e também para tratar anorexia e distúrbios gastrintestinais; *Croton humilis* é utilizada para distúrbios urinários; *Croton lechleri*, como cicatrizante, também seu óleo essencial é muito comercializado sendo indicado para inflamações de pele, acne, herpes, e como poderoso antirrugas. Muitas espécies desse gênero ainda são caracterizadas por produzirem óleos essenciais com ação antioxidante. ( REIS, 2014; SIQUEIRA, 2019)

A maioria das espécies de *Croton* produz látex vermelho o que faz com que seja conhecida popularmente como drageira ou sangue-de-dragão. Duas espécies nativas do Brasil apresentam o látex vermelho a *C. palanostigma* e a *C. urucurana*. (SILVA *et al.*, 2017)

A espécie mais estudada e conhecida do gênero é a *C. lechleri* pois, tem um poder antioxidante muito grande assim como seu poder para a cicatrização de feridas, sendo a taspina (alcalóide) o composto responsável pelo efeito de cicatrização.

Dentre os metabólitos encontrados nas espécies de *Croton* podem ser citados flavonoides, proantocianos, alcaloides, esteroides e terpenoides. Portanto as espécies de *Croton* apresentam uma fonte muito grande de compostos bioativos que precisam ser estudados. (SILVA *et al.*, 2019)

A Tabela 5 apresenta alguns estudos realizados com espécies de *Croton*.

**Tabela 5: Alguns ensaios realizados com espécies do gênero *Croton***

<b>Espécie</b>	<b>Efeito terapêutico</b>	<b>Tipo de Extrato/ parte da planta utilizada</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<i>Croton floribundus</i>	Atividade anti-inflamatória por redução de NO <sub>2</sub> em macrófagos	Extrato hidroalcoólico das raízes	QUEIROZ <i>et al.</i> , 2019
<i>Croton urucurana</i>	Citotoxicidade contra células NCI- ADR/RES	Extrato de acetato de etila do látex	CÂNDIDO-BACANI <i>et al.</i> , 2015
	Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva	Extrato metanólico das cascas	CORDEIRO <i>et al.</i> , 2016
	Atividade antibacteriana	Extrato etanólico das folhas	SILVA <i>et al.</i> , 2017
	Atividade antioxidante	Extrato hidroalcoólico das folhas	
<i>Croton cordifolius</i>	Antioxidante e anti-inflamatória	Extrato etanólico do caule	ALVES, 2017

<i>Croton laui</i>	Atividade anti-inflamatória por redução de NO <sub>2</sub> em macrófagos	Fração de acetato de etila do extrato metanólico das folhas	LI <i>et al.</i> , 2019
<i>Croton echinocarpus</i>	Atividade antioxidante e antibacteriana contra bactérias Gram- negativas	Extrato etanólico das folhas e caule	ATHAYDE, 2013
<i>Croton vulnerarius</i>	Atividade antioxidante e antibacteriana contra bactérias Gram- negativas	Extrato etanólico das folhas e caule	ATHAYDE, 2013
<i>Croton macrobothrys</i>	Atividade citotóxica contra as linhagens NCI-H460 (Pulmão) e K562 (Leucemia)	Extrato hexânico das folhas	MOTTA <i>et al.</i> , 2011
<i>Croton sphaerogynus</i>	Atividade citotóxica contra linhagem MCF-7 (Câncer de mama)	Extrato etanólico das folhas	SANTOS <i>et al.</i> , 2015
	Atividade citotóxica contra linhagem U251 (Glioma)	Fração hexânica do extrato etanólico das folhas	
<i>Croton cajucara</i>	Atividade antibacteriana e antioxidante	Óleo essencial extraído das folhas	AZEVEDO <i>et al.</i> , 2013
<i>Croton lechleri</i>	Cicatrização de úlceras em diabéticos	Pomada feita a base do látex	SILVA <i>et al.</i> , 2019

	Atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	Látex do tronco	TORREJÓN & HONORES, 2016
<i>Croton dichogamus</i>	Atividade citotóxica contra linhagem Caco-2 (adenocarcinoma colorretal)	Diterpenos extraídos das raízes	ALDHAHER <i>et al.</i> , 2017
<i>Croton linearis</i>	Atividade antibacteriana	Extrato etanólico das folhas	DÍAZ <i>et al.</i> , 2019
<i>C. palanostigma</i>	Atividade antibacteriana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e antifúngico contra <i>Candida albicans</i>	Extrato metanólico das folhas e extrato diclorometanico da casca	MOTA <i>et al.</i> , 2015
	Atividade contra as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	Extrato metanólico das cascas e folhas e extrato diclorometanico das folhas e cascas	

### 3.7.2 *Croton antisyphiliticus*

*Croton antisyphiliticus* é uma planta arbustiva encontrada no cerrado brasileiro principalmente em Minas Gerais. É amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de sífilis e inflamações uterinas principalmente, mas também é utilizada como sudorífica, antirreumática, diurética, cicatrizante, para úlceras e para picadas de cobra. É conhecida popularmente como curraleira, pé-de-perdiz, alcanforeira, canela-de-perdiz. Seu uso se dá por meio de chás e garrafadas das folhas e raízes. A figura 8 apresenta um espécimen de *C. antisyphiliticus*. (REIS, 2013; SIQUEIRA, 2019)

**Figura 8:** *Croton antisiphiliticus*



Fonte: Site < <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/15724085687> >

Os estudos realizados com a *C. antisiphiliticus* são restritos a atividade antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória. Braga e colaboradores (2000) avaliaram o efeito do extrato (extração foi realizada com diclorometano e metanol na proporção [1:1]) das folhas de *C. antisiphiliticus* sobre a inibição da 5-lipoxigenase e observaram que houve uma inibição de aproximadamente 25 % da enzima.

Serra *et al.*, 2005 demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *C. antisiphiliticus* teve a capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) em 32% aproximadamente.

Pereira *et al.*, (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico das raízes de *C. antisiphiliticus*, das frações e do diterpeno (ácido ent-kaur-16-em-18-óico) que foi isolado. A atividade antimicrobiana foi realizada contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Observou-se uma CIM (Concentração inibitória mínima) de 0,250 mg/mL para o ácido ent-kaur-16-en-18- óico frente à *S. aureus*, em comparação com seu epímero, o ácido caurenóico (ácido ent-kaur-16-en-19-óico), que apresentou uma CIM de 0,125 mg/ mL

Fernandes e colaboradores (2013) isolaram um epímero caurenóico do extrato clorofórmico das raízes de *C. antisiphiliticus* e testaram sua citotoxicidade contra as linhagens

de células B-16 (melanoma de murinho), HeLa (carcinoma cervical humano) e 3T3 (fibroblastos normais de embriões de camundongos), observaram que houve indução da apoptose em todas as três linhagens celulares, porém observaram também que o epímero caurenóico não era seletivo entre as células tumorais e células normais.

Um estudo utilizando frações do extrato hidroalcoólico (hexânica, acetato de etila e aquosa) das folhas avaliou o efeito anti-inflamatório em camundongos que foram submetidos a pleurisia pela carragenina. Foi observado que houve uma redução dos mediadores pró-inflamatórios como o Óxido nítrico (NOx), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e a Interleucina-17 (IL-17), e ainda inibiu leucócitos ativados. (REIS *et al*, 2014)

Lima (2016) avaliou a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas e caule da *C. antisiphiliticus* pelo método de captura do radical DPPH• e do radical ABTS•<sup>+</sup>. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos apresentaram um forte potencial antioxidante quando comparado ao padrão ácido gálico. Para o DPPH• o EC<sub>50</sub> do extrato do caule foi de 238,32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o das folhas, 374,85  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para o ABTS•<sup>+</sup> o resultado obtido foi de 903,27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o extrato do caule e de 1042,65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o extrato das folhas. É possível observar com esses dados que o extrato do caule apresenta um potencial antioxidante maior que o extrato das folhas.

Também foram encontrados metabólitos secundários promissores nessa espécie como alcaloides, terpenoides, protoantocianos (PIZZOLATTI *et al*, 2013; REIS *et al*, 2013), flavonoides, flavanonas, fênois, esteroides, xantonas (MAGALHÃES *et al*, 2010).

Devido ao uso popular bastante difundido e dos metabólitos encontrados na *C. antisiphiliticus*, essa espécie tem se tornado um alvo para pesquisas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Equipamentos

Para preparo dos extratos, frações, reagentes e soluções necessários nos experimentos, foram utilizados equipamentos e microplacas, como:

Agitador de Placas; Balança analítica (Shimadzu® AW220); Banho Maria (BM); Dessecador de Vidro; Multileitora de microplacas (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform); Microplaca 96 cavidades com Tampa, Fundo Chato, Poliestireno (PS),(GLOBAL PLAST®); Moinho de facas; pHmetro (HANNA® - HI 3221 pH/ORP/ISE Meter); Rotaevaporador (Fisatom® 802); Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas modelo: Shimadzu® modelo QP2010 equipado com coluna capilar de sílica fundida RTx-5ms (Restek Co. Bellefonte, PA, USA), apresentando 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme); Cromatógrafo líquido (modelo LCMS2020 SHIMADZU®) com detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M20A SHIMADZU®), equipado com coluna analítica Agilent® 5-HC LC-18 (250 x 4,6 mm) com filme de revestimento de 5 µm de espessura, com sistema de pré-coluna *Amalical Guard Cartridge System* modelo KJO-4282 (Phenomenex®).

### 4.2 Preparo de Reagentes e Soluções para ensaios antioxidantes, teor de fenólicos totais e teor de flavonoides

Os reagentes e soluções foram preparados de acordo com as especificações técnicas dos fabricantes e armazenados de acordo com a estabilidade de cada um.

#### **Extratos: Solução estoque – 2000 µg/mL**

Foram pesados 0,2g dos extratos brutos e diluídos em 100 mL de álcool metílico (PA). O volume foi aferido em balão volumétrico de 100 mL. A solução estoque foi armazenada em geladeira, ao abrigo da luz. A partir da solução estoque foram preparadas as diluições do extrato.

#### **Ácido Gálico (AG) - Solução estoque – 2000 µg/mL**

Foram pesados 0,1g do AG e diluídos em 50 mL de água Mili-Q (pH 7,0). O volume foi aferido em balão volumétrico de 50 mL. A solução foi armazenada em frasco âmbar, em geladeira. As diluições do AG para a realização dos ensaios foram preparadas apenas no dia do experimento.

#### **Solução estoque de Quercetina- 2000 µg/mL**

Foram pesados 0,2 g da quercetina e diluídos em 100 mL de metanol grau analítico O volume foi aferido em balão volumétrico de 100 mL. A solução foi armazenada em

refrigeração e ao abrigo da luz. As diluições para a realização dos ensaios foram preparadas apenas no dia do experimento.

#### **Solução de Cloreto de Alumínio- 2%**

Foram pesados 2g de cloreto de alumínio e diluídos em 100 mL de metanol grau analítico. O volume foi aferido em balão volumétrico de 100 mL. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, em frasco âmbar e ao abrigo da luz.

#### **Solução do radical DPPH – 60 µM**

Foram pesados 0,0012 g de DPPH e diluídos em 50 mL de álcool metílico (PA). O volume foi aferido em balão volumétrico de 50 mL. A solução foi preparada apenas no dia do experimento e armazenada ao abrigo da luz até a sua utilização.

#### **Solução Estoque de ABTS 7mM**

Foram dissolvidos 0,096 g de ABTS em água Milli-Q (pH 7,0) e o volume final foi aferido em balão volumétrico de 50 mL. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar devidamente identificado, sob refrigeração.

#### **Preparo do Radical ABTS**

Pipetou-se 5 mL da solução estoque de ABTS 7 mM e adicionou-se 88 µL da solução de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140 mM). A mistura foi mantida ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, a mistura foi diluída em álcool etílico (PA) até obter uma absorbância de 0,7± 0,001 nm no comprimento de onda de 734 nm. O radical foi incubado por 16 horas antes do experimento e a diluição foi feita apenas no momento do experimento.

### **4.3 Coleta e Identificação do Material Botânico**

As plantas utilizadas no estudo são nativas do Cerrado e foram obtidas na região de Diamantina, Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais, Brasil. Os vegetais foram coletados e georreferenciados e as exsiccatas estão depositadas no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF).

*Acosmiun dasycarpum*

Coletado em Sítio Gangorras, no município de Planalto de Minas, Minas Gerais, Brasil.

**Coodenadas:** Lat: 17°39'00" Sul, Long: 43°20'00" Oeste

**Data da coleta:** 12/10/2010

**Número de Registro:** HDJF1147

### *Croton antisiphiliticus*

Coletado no município de São Gonçalo do Rio Preto, Minas Gerais, Brasil

**Coodenadas:** Lat: 18°00'46" Sul, Long: 43°38'06" Oeste

**Altitude:** 787 m

**Data da coleta:** 27/11/2016

**Número de registro:** HDJF4639

#### **4.4 Preparo dos extratos Vegetais**

Após a coleta e identificação taxonômica, o material vegetal foi submetido a dessecação em estufa de ar quente circulante com temperatura de 40°C, até que fosse atingido peso constante. Foi então realizada a pulverização em moinho de facas.

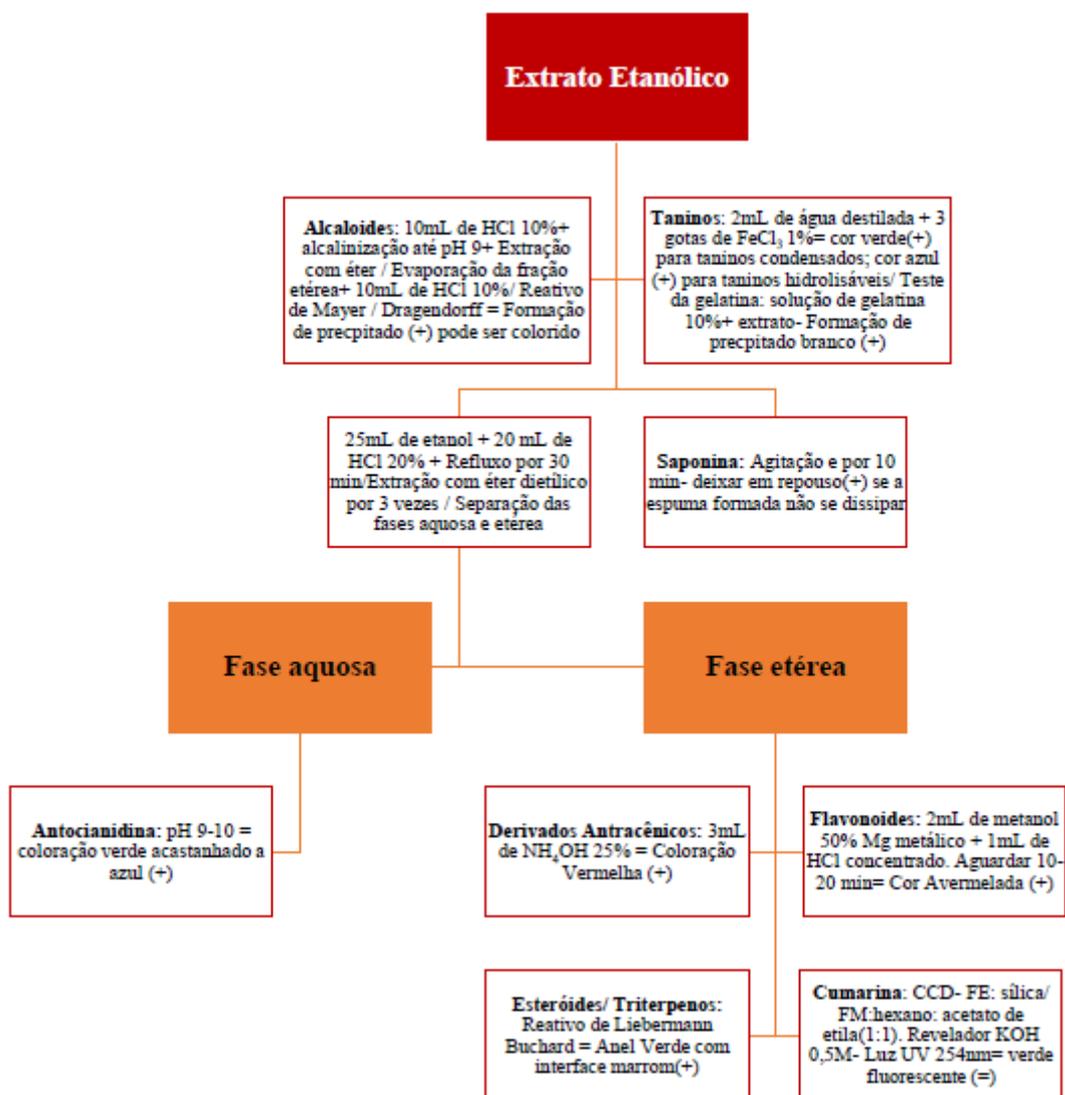
As folhas secas e pulverizadas foram utilizadas para a preparação do extrato. O método utilizado foi a maceração em álcool etílico absoluto (PA), na proporção de 2:1 (droga bruta: álcool), o material vegetal foi deixado em maceração por 7 dias e posteriormente foi feita a filtração do extrato e o material vegetal foi colocado em contato novamente com álcool etílico para uma nova maceração e esse procedimento foi repetido até exaustão. Todo o extrato filtrado foi então concentrado em evaporador rotativo a temperatura de 40-42°C (Fisatom® 802). O extrato foi então transferido para frasco de vidro previamente tarado para término da secagem à temperatura ambiente. Foram preparados 2 extratos: Extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum* e extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus*.

#### **4.5 Estudo Fitoquímico**

##### **4.5.1 Triagem Fitoquímica**

Os extratos etanólicos brutos foram submetidos a triagem fitoquímica clássica, utilizando-se métodos convencionais, cujo desenvolvimento de coloração específica ou formação de precipitado indicam a presença de determinadas classes de metabólitos secundários. Os ensaios foram realizados seguindo metodologias consagradas (COSTA, 1982; FARNSWORTH, 1966; MATOS, 1988). A Figura 9 esquematiza os testes de triagem fitoquímica realizados com os extratos etanólicos de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus*

**Figura 9. Esquema de testes de triagem fitoquímica realizados com os extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e *Croton antisyphiliticus***



#### 4.5.2 Quantificação de Compostos Fenólicos

Para o ensaio da quantificação de fenólicos os reagentes Folin- Ciocalteu e Carbonato de Sódio (1M) foram previamente preparados, assim como as diluições dos extratos e do ácido gálico (AG) que foi utilizado como padrão. As concentrações utilizadas foram 80, 200, 400,600, 800 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos e para o padrão. (LIMA, 2016)

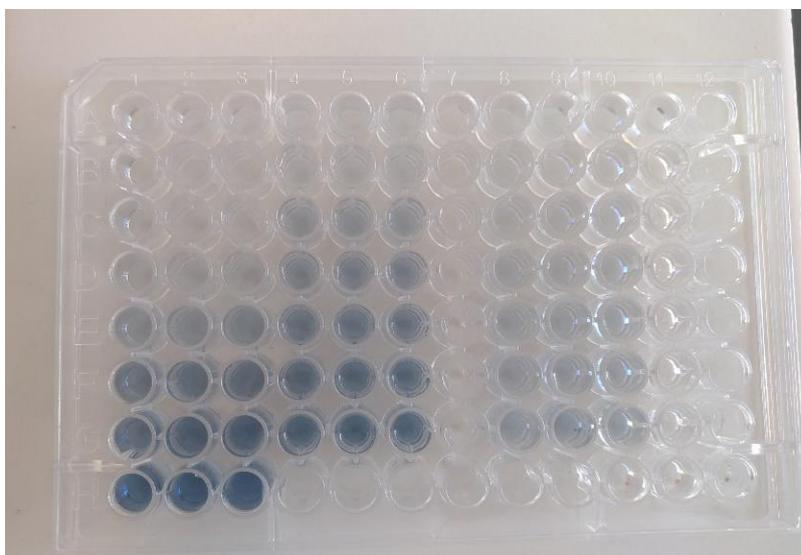
Pipetou-se 12,5  $\mu\text{L}$  das diluições dos extratos e do padrão (AG) nos poços da microplaca de 96 poços de fundo chato (Globo Plast®). Em seguida, foram adicionados 12,5  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin- Ciocalteu e 100  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q (pH=7,0). A microplaca foi submetida a agitação seguida de repouso por 5 min. Posteriormente foram adicionados 125  $\mu\text{L}$

de carbonato de sódio (1M). As microplacas foram incubadas ao abrigo da luz por 90 minutos. (LIMA, 2016)

Foi feito um controle dos extratos: pipetou-se 250 uL de cada concentração do extrato na microplaca, para observação da absorbância dos extratos, no comprimento de onda utilizado para a leitura. (LIMA, 2016)

A leitura da absorbância foi realizada a 750 nm em leitor de microplacas SpectraMax®. O metanol foi utilizado como branco para zerar o leitor. A partir das concentrações do padrão foi elaborada a curva analítica e a partir da equação da reta obtida foram convertidas as absorbâncias dos extratos em concentração de ácido gálico. O ensaio foi realizado em triplicata (n=3). A figura 10 mostra uma foto da microplaca em uma etapa do ensaio realizado para determinar o teor de compostos fenólicos nas amostras dos extratos.

**Figura 10: Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para determinar o teor de compostos fenólicos nos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antispyhiliticus***



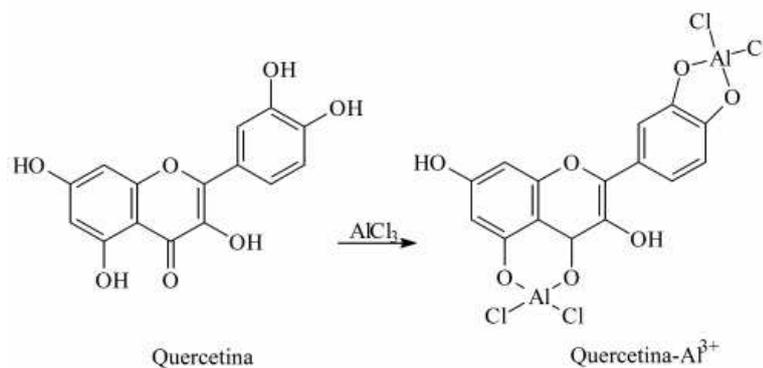
Fonte: Autor

#### 4.5.3 Quantificação de Flavonoides

Para o ensaio de quantificação de flavonoides foi utilizado como padrão a Quercetina. A solução de quercetina foi previamente diluída em metanol nas concentrações: 5, 10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL. As concentrações dos extratos foram: 50, 100, 250, 350, 450, 550, 650.

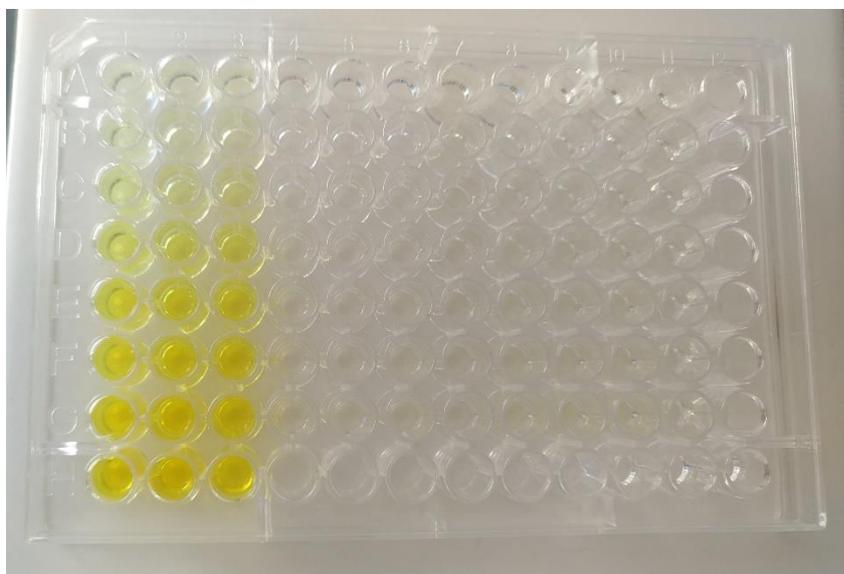
Pipetou-se 125  $\mu\text{L}$  das soluções dos extratos e do padrão (quercetina) nos poços da microplaca de 96 poços, e adicionou-se 125  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio a 2%; em seguida incubou-se por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor de microplacas SpectraMax® no comprimento de onda de 420 nm. O metanol foi utilizado como branco para zerar o leitor. A partir das concentrações do padrão foi elaborada a curva analítica e a partir da equação da reta obtida foram convertidas as absorbâncias dos extratos em concentração de quercetina. O ensaio foi realizado em triplicata ( $n=3$ ). (SOBRINHO *et al.*, 2012) A figura 11 mostra como ocorre a complexação entre a quercetina e o cloreto de alumínio. A figura 12 mostra uma foto da microplaca durante a realização do ensaio.

**Figura 11: Complexação entre o flavonoide quercetina e o cloreto de alumínio, formando um complexo estável**



Fonte: SOBRINHO *et al.*, 2012

**Figura 12 : Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para quantificar flavonóides totais nos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antisymphiliticus***



Fonte: Autor

#### 4.5.4 Fracionamento dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos brutos foram ressuspensos em metanol e água, proporção (3:1), e foram posteriormente fracionados através de partição líquido- líquido. Os solventes utilizados na partição foram o hexano e o diclorometano. Foram então obtidas, para cada extrato, três frações: hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica. As frações hexânicas e diclorometânicas foram submetidas rotaevaporação e, então, foram armazenadas em dessecador para que os solventes orgânicos evaporassem por completo, sendo, posteriormente analisadas por CG/EM. As frações hidroalcoólicas foram submetidas a evaporação utilizando o rotaevaporador rotativo para que fosse retirado o álcool e depois as frações hidroalcoólicas foram liofilizadas e utilizadas para os ensaios de CLAE/DAD.

#### 4.5.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

As análises cromatográficas das fases hexânica e diclorometânica obtidas a partir do extrato etanólico de cada planta foram feitas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP/USP). Essas análises foram conduzidas em cromatógrafo Shimadzu® modelo QP2010 equipado com coluna capilar de sílica fundida RTx-5ms (Restek Co. Bellefonte, PA, USA), apresentando 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme).

Cada amostra foi submetida às seguintes condições analíticas: o gás de arraste utilizado foi o gás Hélio, com velocidade linear de 43,2cm/s; a pressão empregada foi de 86,7 kPa; a injeção foi feita no modo split (1:5), com temperatura do injetor a 260°C; a temperatura inicial de análise foi de 60°C, aumentando 4°C/min e permanecendo a 320°C por 25 minutos. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização eletrônica a 70 eV com varredura de  $m/z$  de 35 a 600 Da. A interface foi mantida a 320°C e a fonte de íons a 250°C.

A quantificação dos componentes das amostras foi determinada pela área relativa dos picos (%). A análise qualitativa resultou em proposta de identificação de componentes das amostras. Para as propostas de identificação foram realizados: estudos dos espectros de massas obtidos experimentalmente e comparação destes com os espectros das espectrotecas NIST11, WILEY7 e FFNSC1.3; e foi calculado o IRR (Índice de Retenção Relativo), de acordo com a equação (1). Para se conseguir o IRR de componentes das amostras foi obtido, nas mesmas condições cromatográficas utilizadas nas análises das fases hexânicas e diclorometânicas, um cromatograma com uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos (C<sub>9</sub>-C<sub>40</sub>).

$$\bullet \quad \text{IRR} = 100.n + 100 (t_x - t_a) / (t_{a+1} - t_a) \quad (1)$$

Onde:

IRR = número do Índice de Retenção Relativa (IRR)

n = número de átomos de carbono do hidrocarboneto eluído imediatamente antes do composto “x” de interesse

$t_a$  e  $t_{a+1}$  = tempos de retenção dos hidrocarbonetos eluídos imediatamente antes ( $t_a$ ) e após ( $t_{a+1}$ ) o composto “x” de interesse, respectivamente.

$t_x$  = tempo de retenção do composto “x”

#### 4.5.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD)

As frações hidroalcoólicas liofilizadas obtidas a partir da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum* e do extrato de *Croton antispyhiliticus* foram analisadas em cromatógrafo líquido (LCMS2020 SHIMADZU®) com Detector de Arranjo de Diodos (SPD-M20A SHIMADZU®). Foi utilizada para análise coluna analítica Agilent® 5-HC LC-18 (250 x 4,6 mm) com filme de revestimento de 5 µm de espessura, com sistema de pré-coluna equipado *Analytical Guard Cartridge System* modelo KJO-4282 (Phenomenex®).

A fase móvel foi composta por acetonitrila (grau HPLC) e a água deionizada foi purificada por um sistema Milli-Q (Millipore Corporation®). Os solventes e as fases hidroalcoólicas dos extratos foram filtrados previamente ao experimento. Para as fases hidroalcoólicas dos extratos foram utilizados filtros de seringa Millipore com 13mm de diâmetro com membrana de Nylon HN 0.45µm Millex®. As condições analíticas foram: fluxo de 1 mL/min, temperatura ambiente, detecção UV-Vis 200~700 nm, o volume de injeção foi de 20 µL. Nas tabelas 6 e 7 estão os gradientes utilizados no desenvolvimento cromatográfico.

**Tabela 6 – Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE/DAD da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	10	90
5	30	70
10	50	50
15	90	10
20	0	100

Fase Móvel A: água Milli-Q

Fase Móvel B: acetonitrila

**Tabela 7 – Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE/DAD da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de *Croton antispyhiliticus***

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	100	0
2	90	10
5	70	30
10	50	50
15	10	90
20	0	100

Fase Móvel A: água Milli-Q

Fase Móvel B: acetonitrila

#### **4.6 Ensaio Antioxidantes**

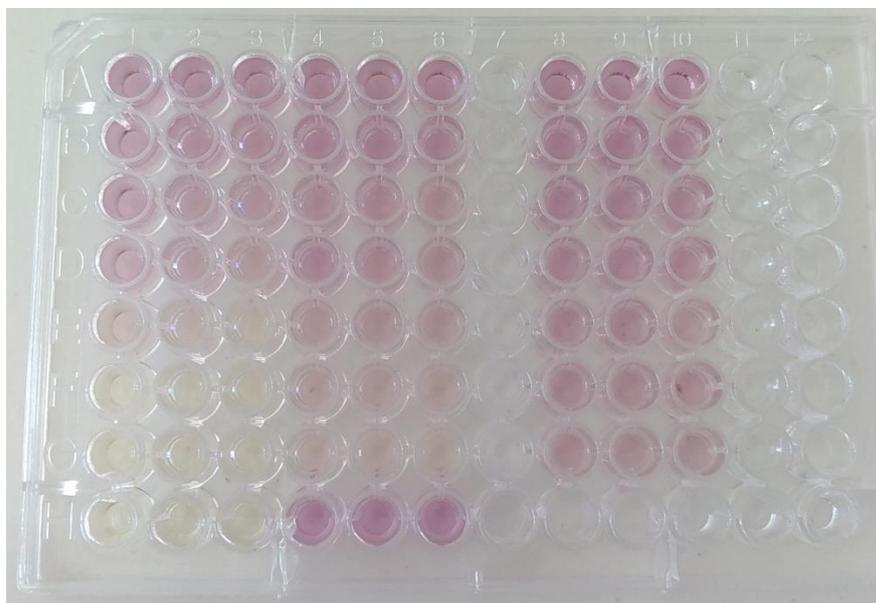
##### **4.6.1 Ensaio para a captura do Radical DPPH•**

O ensaio foi realizado em um ambiente escuro, por causa da reatividade do radical em presença de luz. Pipetou-se 6 uL de cada diluição dos extratos e do padrão (AG) para os poços da microplaca. Foram então adicionados 244 uL do radical DPPH• (60uM). A placa foi incubada por 30 minutos ao abrigo da luz. (DUARTE & ALMEIDA, 2006)

As leituras das absorbâncias foram realizadas a 515 nm. O metanol foi utilizado como branco para zerar o equipamento. A leitura foi realizada em leitor de microplacas SpectraMax®. (DUARTE & ALMEIDA, 2006)

Foi feito um controle dos extratos, pipetou-se 250 uL de cada concentração do extrato na microplaca, para observação da absorbância dos extratos, no comprimento de onda utilizado para a leitura. Realizou-se também um controle contendo somente o reagente DPPH•. As concentrações do padrão utilizadas foram: 5, 10, 18, 25, 50 µg/mL. As concentrações dos extratos de *A. dasycarpum* e de *C. antispyhiliticus* foram: 50, 100, 350, 550 e 650 µg/mL. As concentrações do extrato de A figura 13 mostra a microplaca utilizada durante o experimento realizado.

**Figura 13: Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para verificar a capacidade dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antispyhiliticus* em capturar o radical DPPH**



Fonte: Autor

Os resultados da absorbância foram convertidos em Porcentagem de Inibição pela equação 2 e foi calculada a Concentração Eficiente ( $EC_{50}$ ) para captura de 50% do radical.

$$\text{Inibição (\%)} = ((Ac - Aam) / Ac) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $Ac$  = Absorbância do controle  
 $Aam$  = Absorbância amostra

#### 4.6.2 Ensaio para a captura do Radical ABTS<sup>•+</sup>

O ensaio foi realizado em um ambiente escuro, devido a reatividade do radical em presença de luz. Pipetou-se 2,5 $\mu$ L de cada diluição dos extratos e do padrão (AG) para os poços da microplaca, sendo então adicionados 247,5  $\mu$ L do radical ABTS<sup>•+</sup>. A placa foi incubada por 6 minutos ao abrigo da luz. As concentrações do padrão utilizadas foram: 25, 50, 100, 150, 450  $\mu$ g/mL. As concentrações dos extratos foram: 50, 100, 250, 350, 450, 550  $\mu$ g/mL.

As leituras das absorbâncias foram realizadas a 734 nm, sendo o etanol utilizado como branco para zerar o equipamento. A leitura foi realizada em leitor de microplacas SpectraMax®.

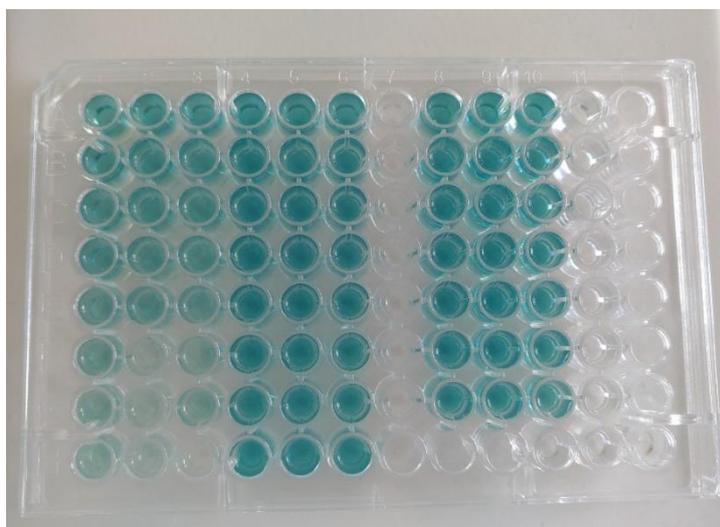
Foi feito um controle dos extratos: pipetou-se 250  $\mu$ L de cada concentração do extrato na microplaca, para observar se a absorbância dos extratos, no comprimento de onda

utilizado para a leitura não interferiria nos resultados. Realizou-se também um controle contendo somente o radical **ABTS<sup>•+</sup>**.

Os resultados da absorbância foram convertidos em Porcentagem de Inibição pela equação 2.

A figura 14 mostra uma foto obtida durante a realização do experimento.

**Figura 14: Microplaca de 96 poços utilizada no ensaio para verificar a capacidade dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antisiphiliticus* em capturar o radical **ABTS<sup>•+</sup>**.**



Fonte: Autor

#### 4.6.3 Absorção dos extratos

Foi realizada uma varredura ( $\lambda = 230$  a  $1000$  nm) com a maior concentração dos extratos ( $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), assim como com as suas diluições, para se verificar o comportamento de absorção dos extratos nos comprimentos de onda utilizados nos ensaios, certificar que a absorção dos extratos não interferiria nos ensaios. Foi observado que a absorção dos extratos era quase nula, garantindo que os componentes do extrato não interfeririam nas análises.

#### 4.6.4 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas ( $n=3$ ) e os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão da média das repetições. Para avaliar as diferenças entre as médias foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . O software utilizado foi o Graphpad Prism versão 8.0.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem Fitoquímica

A triagem ou prospecção fitoquímica é uma série de experimentos qualitativos que detectam as principais classes de metabólitos secundários contribuindo assim para o conhecimento do perfil químico dos extratos vegetais, além de servir como base para o direcionamento de futuros experimentos. Os ensaios da triagem fitoquímica consistem em reações cromogênicas e de precipitação (realizadas em soluções dos extratos contidos em tubos de ensaio) e de cromatografia em camada delgada.

Os resultados foram considerados positivos quando houve o aparecimento da coloração específica ou quando houve formação de precipitado nas reações desenvolvidas em tubos de ensaio, ou ainda, quando houve surgimento de mancha característica frente a um agente revelador específico na CCDC, indicando a detecção do metabólito pesquisado. O resultado negativo indica que possa haver a ausência do metabólito pesquisado para aquele extrato ou que o metabólito esteja em baixa concentração (por isso não houve detecção).

As tabelas 8 e 9 apresentam os resultados dos extratos etanólicos brutos de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus* para a triagem fitoquímica.

**Tabela 8: Resultados da triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***

<b>Classe de Metabólitos Secundários</b>	<b>Reação</b>	<b>Resultado</b>
Alcaloides	Mayer	(-)
	Dragendorff	(-)
Cumarinas	CCDC – agente revelador: KOH + radiação UV	(-)
Derivados Antracênicos	Borntrager	(+)
Flavonoides	Shinoda	(+)
Antocianidina	Elevação do pH até 9	(+)
Núcleo esteroidal ou triterpênico	Liebermann- Buchard	(+)
Saponinas	Teste Afrogênico	(-)
Taninos	Cloreto Férrico (Coloração azul)	(+)

	Precipitação com gelatina	(+)
--	---------------------------	-----

**Tabela 9: Resultados da triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***

Classe de Metabólitos Secundários	Reação	Resultado
Alcaloides	Mayer	(+)
	Dragendorff	(+)
Cumarinas	CCDC – agente revelador: KOH + radiação UV	(-)
Derivados Antracênicos	Borntrager	(-)
Flavonoides	Shinoda	(+)
Antocianidina	Elevação do pH até 9	(+)
Núcleo esteroidal ou triterpênico	Liebermann- Buchard	(+)
Saponinas	Teste Afrogênico	(-)
Taninos	Cloreto Férrico (Coloração verde)	(+)
	Precipitação com gelatina	(+)

Como mostrado nas tabelas, foram detectados para a *A. dasycarpum*: antocianidina, derivados antracênicos, flavonoides, esteroides/triterpenos e taninos. Rodrigues e colaboradores (2019) detectaram a presença de antocianinas, flavonoides e taninos para o extrato etanólico das folhas de *A. dasycarpum*. Portanto, os dados obtidos corroboram com os dados da literatura em parte, pois ainda foram detectados constituintes esteroidais e antracênicos, essa diferença pode ocorrer devido a procedência diferentes entre os vegetais o que influencia na composição química deles.

A *A. dasycarpum* é conhecida por apresentar alcaloides quinolizidínicos (TREVISAN, 2002), porém, na triagem fitoquímica não foi detectada a presença de alcaloides. Isso pode ocorrer por vários fatores, como a baixa concentração do alcaloide no extrato, assim

como a época de coleta do material vegetal, tipo de solo no qual o vegetal se encontra, pluviosidade, entre outros.

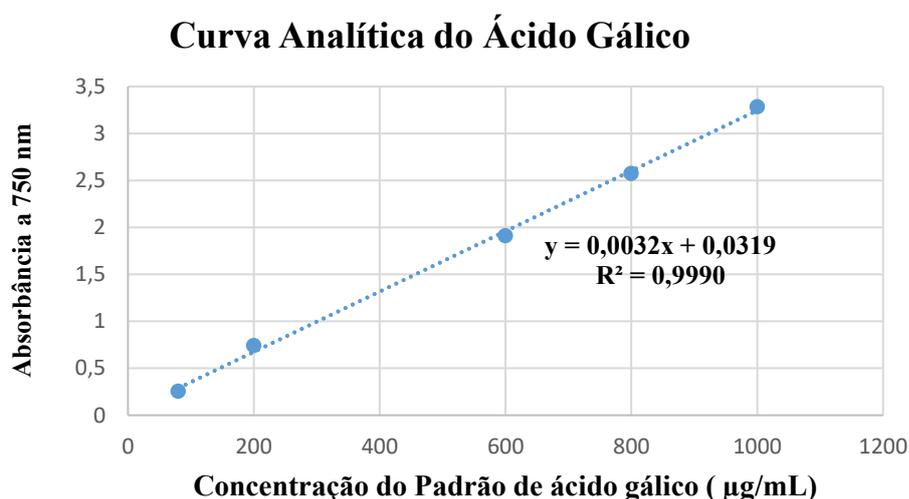
Para a *C. antisiphiliticus* foram detectados alcaloides, antocianidina, flavonoides, taninos e esteroides/triterpenos. Magalhães e colaboradores (2010) identificaram a presença de alcaloides, esteroides e flavonoides para o extrato etanólico das raízes de *C. antisiphiliticus*, corroborando, em parte, com os dados obtidos no presente experimento. Algumas diferenças nos resultados são explicadas porque o material trabalhado por Magalhães e colaboradores (2010) difere do material desta pesquisa, por se tratar de extrato das raízes.

## 5.2 Quantificação de Compostos Fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos totais é uma análise fitoquímica importante para entender a atividade antioxidante dos extratos. Isso porque, muitas vezes, a atividade antioxidante pode ocorrer pela presença de compostos fenólicos totais (taninos, fenilpropanóides, antocianos, ...) e em especial, por flavonoides.

O ácido gálico é um tanino muito utilizado como padrão neste ensaio. O gráfico 1 apresenta a curva analítica obtida a partir dos resultados de absorbância do ácido gálico; essa curva foi utilizada para obter a quantificação dos compostos fenólicos dos extratos vegetais em estudo.

**Gráfico 1: Curva analítica do padrão ácido gálico ( n=3)**



É possível observar pelo gráfico que a medida que a concentração do padrão aumenta, verifica-se um aumento também na leitura da absorbância, demonstrando linearidade. O coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9990 o que confirma essa linearidade, pois foi próximo de 1.

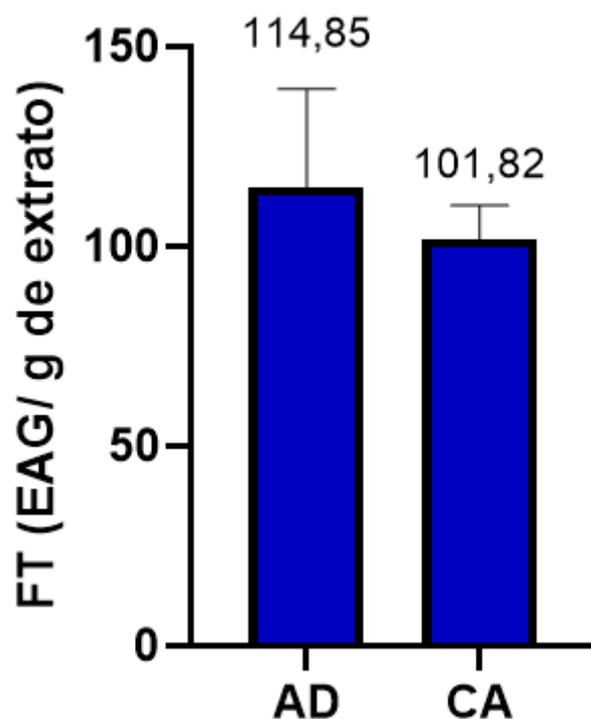
A equação 3 é a equação da curva analítica do padrão, obtida pela leitura das concentrações conhecidas do padrão de ácido gálico a 750 nm (o experimento foi realizado em triplicata).

$$\text{Equação 3: } y = 0,0032x + 0,0319$$

Onde: y= absorvância da amostra e x= concentração de equivalentes de ácido gálico. A curva analítica foi utilizada para o cálculo do teor de fenólicos nos extratos etanólicos

brutos de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus* expressos em EAG/g de extrato e estão representados no gráfico 2

**Gráfico 2: Teor de Fenólicos Totais (FT) ( $\pm$ DP) em EAG/g (equivalente em ácido gálico por grama de extrato) Etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus* (n=3).**



Legenda: AG- ácido gálico; AD – *A. dasycarpum*; CA- *C. antisiphiliticus*. Extratos na concentração de 600  $\mu$ g/mL – Teste de T, com  $n < 0,05$  (n=3, média  $\pm$  DP da média)

Estudos tem demonstrado uma relação direta entre a composição qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante. (KONGNOU *et al.*, 2016) O teor de fenólicos totais é importante, pois os compostos fenólicos em geral têm características estruturais específicas, que vão permitir um maior potencial de captura e estabilidade da energia proveniente dos radicais.

Sá *et al.*, (2012) realizaram um experimento com extrato etanólico de *Selaginella convoluta* (nas concentrações de 0 a 1000  $\mu$ g/mL) tendo um resultado de teor de compostos fenólicos de aproximadamente 64 EAG/ g de extrato e a atividade antioxidante foi mensurada utilizando o teste de DPPH e obtiveram um resultado de EC<sub>50</sub> de aproximadamente 53 $\mu$ g/mL e uma porcentagem de inibição de 76% do radical DPPH• mostrando uma atividade antioxidante satisfatória.

Costa *et al.*, (2017) fizeram estudo com extrato etanólico de *Croton argyrophyllus*, nas concentrações de 3,9 a 250  $\mu$ g/mL. Obtiveram um resultado de 269,72 EAG/g de extrato e

um resultado de DPPH• expresso pelo EC<sub>50</sub> de 9,75 µg/mL com uma porcentagem de inibição de 92,96 %.

Neto *et al.*, (2018) estudaram 5 plantas *Abarema cochliacarpus* (Fabaceae), *Croton corchoropsis* (Euphorbiaceae), *Myroxylum peruiferum* (Fabaceae), *Stryphnodendron pulcherrimum* (Fabaceae), *Tanaecium cyrtanthum* ( Bignoniaceae), quantificando compostos fenólicos com o extrato metanólico das folhas. Esse estudo demonstrou um resultado de teor de fenólicos de: *A. cochliacarpus* 120,39 EAG/ g de extrato; *C. corchoropsis* 28,84 EAG/ g de extrato; *M. peruiferum* 42,18 EAG/g de extrato; *S. pulcherrimum* 86,67 EAG/ g de extrato; *T. cyrtanthum* 30,16 EAG/g de extrato.

Esses exemplos são para mostrar o quão usual é esse ensaio fitoquímico de quantificação e sua relação com ensaios antioxidantes.

Não há dados na literatura, até o presente momento, sobre ensaios realizados para a quantificação de compostos fenólicos em *A. dasycarpum*. Para *C. antisiphiliticus* há alguns dados publicados. Um experimento realizado por Lima (2016) com o extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus* demonstrou um teor de fenólicos de 280,04 EAG/g de extrato e um resultado de DPPH• expresso pelo EC<sub>50</sub> de 374,85 µg/mL (não foi relatado a porcentagem de inibição do radical referente a esse valor de EC<sub>50</sub>).

Observa-se que, o resultado de teor de fenólicos obtido para *C. antisiphiliticus* difere do resultado apresentado por Lima (2016), apesar dos dois estudos utilizarem extrato etanólico das folhas da espécie em questão. Todavia os materiais utilizados nos dois estudos são de procedências diversas (indivíduos diferentes, épocas distintas de coleta, os locais de obtenção dos vegetais não são os mesmos). Sabe-se que vários fatores (ambientais bióticos e abióticos, genéticos e ontogênicos) interferem qualitativa e quantitativamente no teor de metabólitos secundários (GOBBO NETO & LOPES, 2007), o que pode justificar as diferenças observadas entre pesquisas distintas.

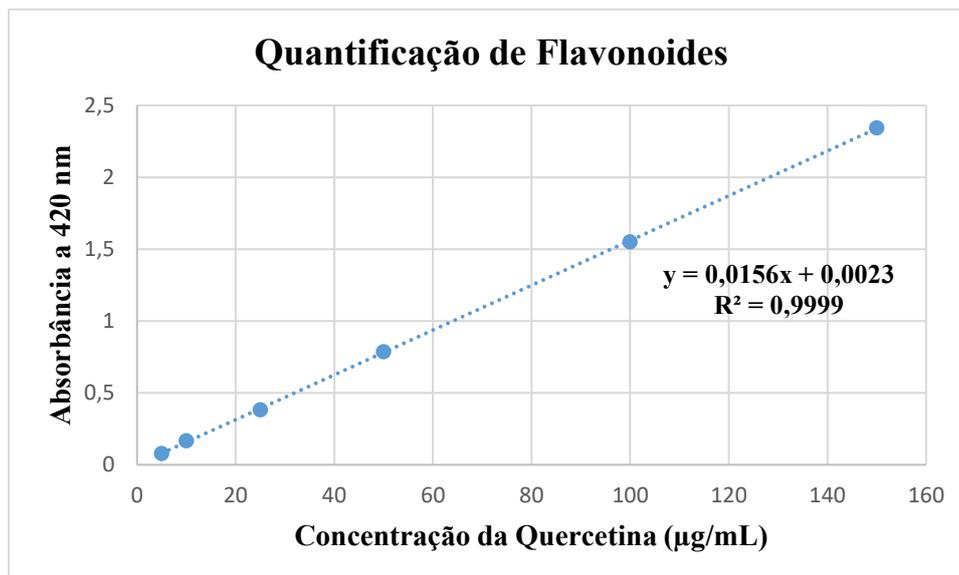
Considerando os dados obtidos de teor de fenólicos totais para *A. dasycarpum* (114,85 EAG/g de extrato) e para *C. antisiphiliticus* (101,82 EAG/g de extrato) e comparando com dados na literatura para a quantificação de fenólicos é possível inferir que os resultados foram de teores moderados de compostos fenólicos.

### 5.3 Quantificação de Flavonoides

Os flavonoides representam uma das classes de metabólitos secundários com evidente atividade antioxidante. Normalmente sua quantificação é associada aos ensaios

antioxidantes. O gráfico 3 apresenta a curva analítica obtida a partir dos resultados de absorvância do padrão Quercetina (flavonoide). Essa curva foi utilizada para quantificar os flavonóides dos extratos vegetais em estudo.

**Gráfico 3: Curva analítica do padrão de Quercetina (n=3)**



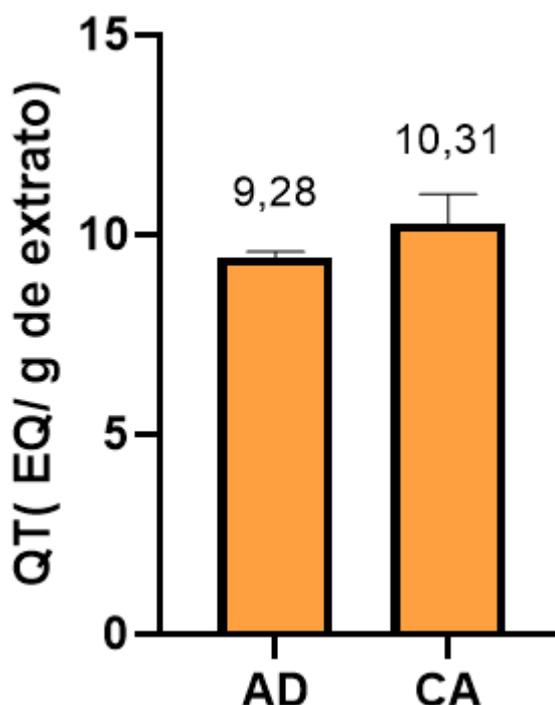
O Coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9999 garantindo a linearidade, por ser próximo de um. É possível observar pelo gráfico que a medida que a concentração do padrão de quercetina aumenta, também há um aumento na absorvância, indicando que são grandezas proporcionais, e mantendo-se a linearidade.

A equação 4 é a equação da curva analítica do padrão, obtida pela leitura das concentrações conhecidas do padrão de Quercetina a 420 nm (o experimento foi realizado em triplicata). A curva analítica foi utilizada para o cálculo do teor de flavonoides nos extratos de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus* expressos em EQ/g de extrato e estão representados no gráfico 4

$$\text{Equação 4: } y = 0,0156x + 0,0023$$

Onde: y= absorvância da amostra e x= concentração de equivelente em quercetina (EQ) .

**Gráfico 4: Teor de Flavonoides Totais (QT) expresso em EQ/g (equivalente de ácido gálico por grama) de Extrato Etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus* (n=3).**



Legenda: Teste de T, com  $n < 0,05$  ( $n=3$ , média  $\pm$  DP da média); AD- *A. dasycarpum*; CA- *C. antisiphiliticus*.

Os flavonoides são um tipo de composto muito importante presente em vegetais, que tem um alto poder antioxidante, pois tem a capacidade de agir como quelante de metais de transição (que são pró-oxidantes). Quando doam hidrogênio para estabilizarem um radical e conseguem se estabilizar por ressonância, garantindo assim a não propagação das reações de oxidação. Além disso, devido a sua grande densidade eletrônica, conseguem absorver a energia da radiação ultravioleta e, portanto, diminuir a formação de novos radicais.

São muito comuns em alimentos consumidos pelo ser humano como a maçã, cebola, hortaliças, chá verde, uva.

Santos et al., (2018) realizaram um estudo com extrato hidroetanólico do caule de *Croton linearifolius* que mostrou um teor de flavonoides de 15,67 EQ/ g de extrato para o extrato hidroalcoólico e para a fração de acetado de etila mostrou um teor de 73,62 EQ/g de extrato.

Neto et al., (2018) estudaram o extrato metanólico das folhas de *Abarema cochliacarpus* (Fabaceae), *Croton corchoropsis* (Euphorbiaceae), *Myroxylum peruiferum* (Fabaceae) *Stryphnodendron pulcherrimum* (Fabaceae), *Tanaecium cyrtanthum*

(Bignoniaceae). Esse estudo demonstrou um resultado de teor de flavonóides de: *A. cochliacarpus* 5,55 EQ/ g de extrato; *C. corchoropsis* 4,11 EQ/ g de extrato; *M. peruiiferum* 10,52 EQ/g de extrato; *S. pulcherrimum* 6,04 EQ/ g de extrato; *T. cyrtanthum* 3,84 EQ/g de extrato.

A triagem fitoquímica clássica realizada no presente trabalho detectou a presença de flavonoides tanto em *A. dasycarpum* como em *C. antisyphiliticus*. A quantificação de flavonoides confirmou a presença dessa classe de metabólitos em ambos os extratos, com teor de 9,28 EQ/g de extrato para *A. dasycarpum* e 10,31 EQ/g de extrato para *C. antisyphiliticus*

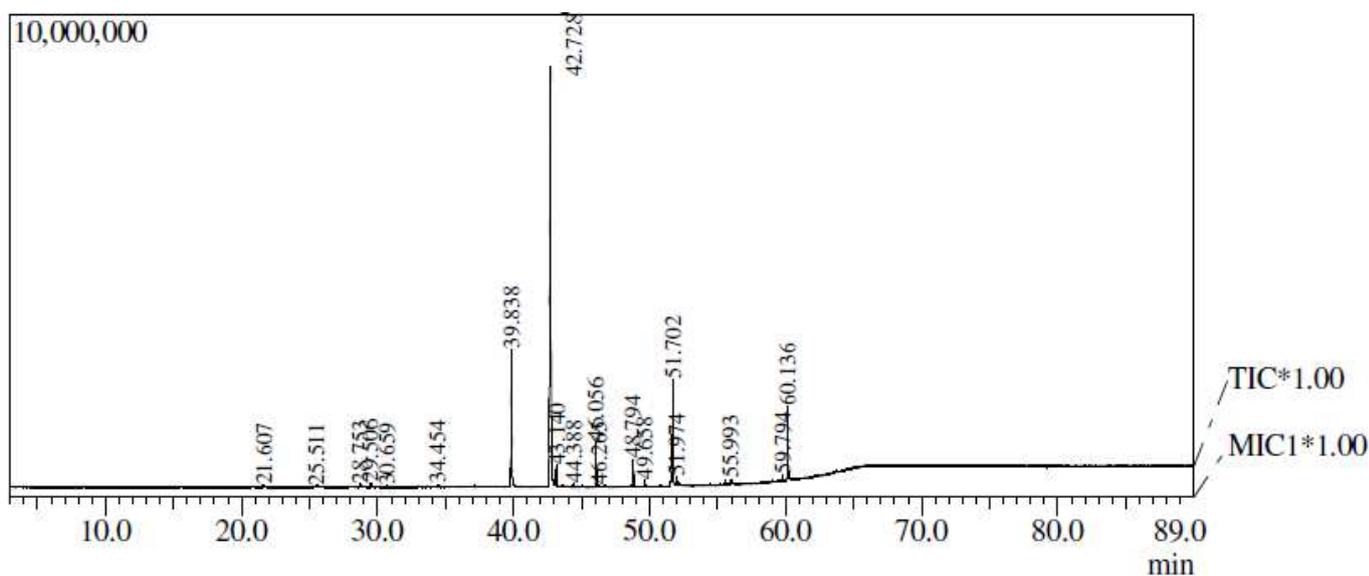
## 5.4 Cromatografia Gasosa das fases Diclorometânicas

As fases diclorometânicas do extrato etanólico das folhas de *A. dasycarpum* e do extrato de *C. antisiphiliticus* foram analisadas por CG-EM. Alguns constituintes da fase diclorometânica não puderam ser identificados, devido a não existência de semelhanças espectrais e de índice de retenção relativa (IRR), mediante comparação dos espectros e dos IRR experimentais com a literatura e com espectros e informações de IRR de espectrotecas.

### 5.4.1 Fase diclorometânica de *Acosmium dasycarpum*

O cromatograma obtido está na figura 15. Na Tabela 10 se encontram as propostas referentes às substâncias presentes na fase diclorometânica a qual foi obtida a partir do extrato etanólico da planta. Foram detectados 19 constituintes, porém foi proposta a identificação de 5 constituintes, dentre eles encontram-se fitona, lupeol e acetato de lupeol, um éster de ácido graxo e um flavonóide do tipo flavona. A detecção dos terpenóides (lupeol e seu acetato) e da genkivanina (flavonóide) estão de acordo com o que foi detectado para a triagem fitoquímica. Nas Figuras 16, 17 e 19 estão representados os espectros dos dois triterpenos e do flavonóide, respectivamente e na figura 18 é apresentada a proposta de fragmentação dos triterpenos.

**Figura 15: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase diclorometânica obtida do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



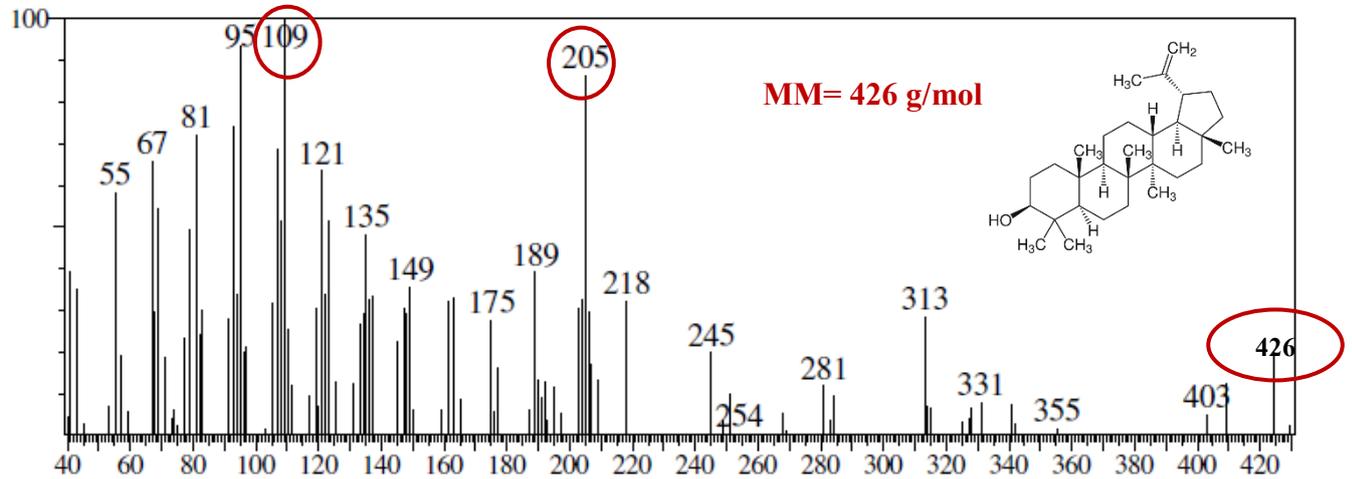
Fonte: Autor

**Tabela 10– Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase diclorometânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***

<b>Pico</b>	<b>Tempo Retenção</b>	<b>Área do Pico (%)</b>	<b>Índice de Similaridade</b>	<b>Substância</b>	<b>Índice de retenção Relativa Literatura</b>	<b>Índice de Retenção Relativa experimental</b>
1	21,61	0,2		*	-	-
2	25,51	0,41		*	-	-
3	28,75	0,24		*	-	-
4	29,51	0,44		*	-	-
5	30,66	0,12	85	Fitona	1846,7	1841
6	34,45	0,13		*	-	-
7	39,84	12,07		*	-	-
8	42,73	58,32		*	-	-
9	43,14	1,84	91	ácido hexanodióico, bis(2- etil-hexil) ester	2398,2	2414
10	44,39	0,42		*	-	-
11	46,06	4,32			-	-
12	46,27	0,21		*	-	-
13	48,79	2,21		*	-	-
14	49,66	0,57		*	-	-
15	51,70	9,29		*	-	-
16	51,97	0,94	81	4H-1-Benzopiran-4-ona, 5- hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-7- metóxi ou Genkivanina	2682	2602
17	55,99	0,47		*	-	-
18	59,79	0,44	85	Lupeol	3270	2848
19	60,14	7,36	89	Acetato de lupeol	3525	2987

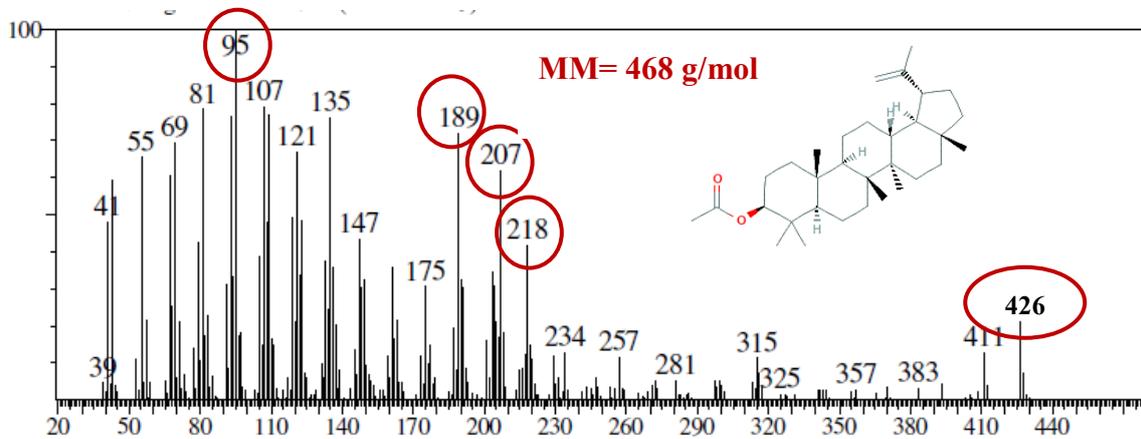
\*pico não identificado

**Figura 16: Espectro do Lupeol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



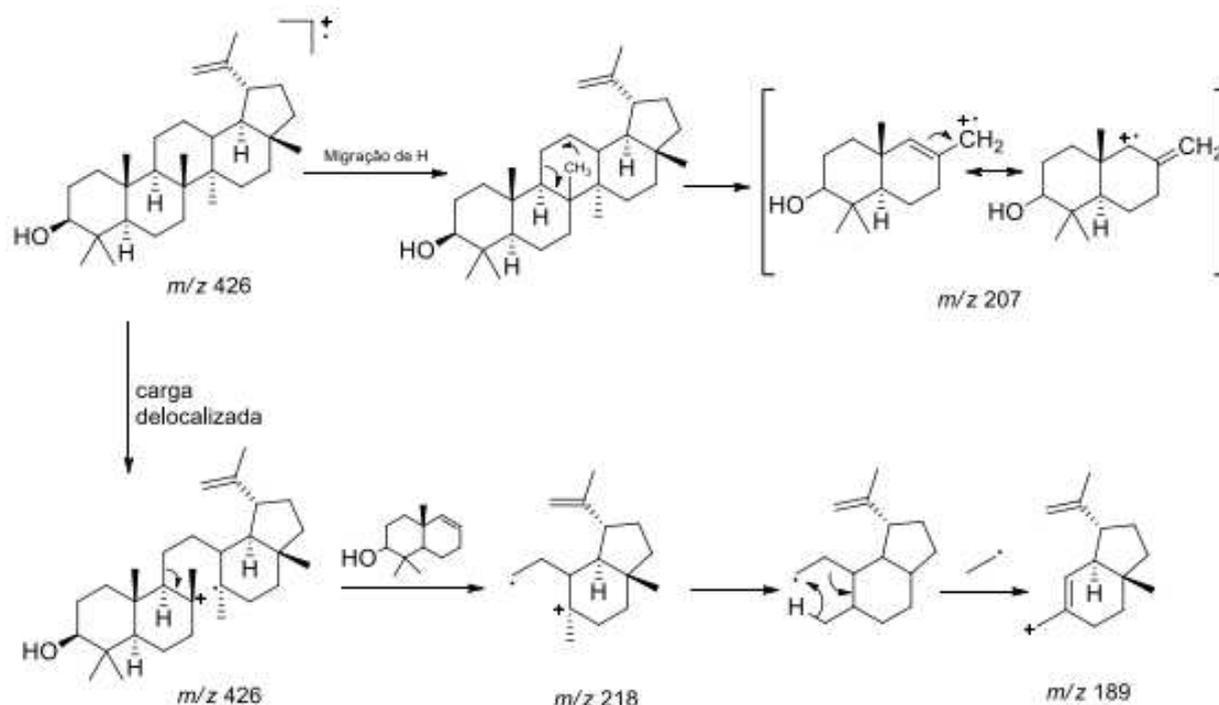
Fonte: Autor

**Figura 17: Espectro do Acetato de Lupeol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



Fonte: Autor

**Figura 18 : Proposta de fragmentação do Lupeol**



Fonte: SILVA, 2014

É possível observar o pico do íon molecular do lupeol em 426 na Figura 16, assim como os fragmentos  $[M^+ - 219]$  devido a migração de um hidrogênio dando origem a dois fragmentos, o fragmento  $m/z = 207$  e o fragmento resultante  $m/z = 218$ . Assim também é possível observar no espectro do lupeol com seus fragmentos característicos  $m/z = 426$ ,  $m/z = 205$ ,  $m/z = 218$  e  $m/z = 189$ .

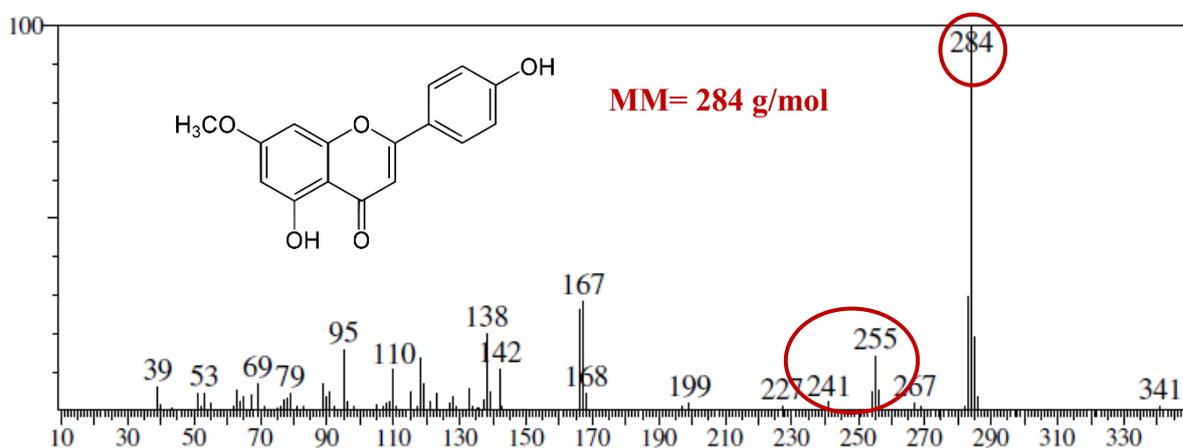
O lupeol é um triterpeno antigamente conhecido como fagarsterol, encontrado em repolho, pimenta verde, azeitona, manga, morando, uva. Possui muitos efeitos benéficos, tanto terapêuticos como na redução de risco de diversas doenças. (SALEEM, 2009) O lupeol mostrou ter capacidade de inibir o benzopireno (hidrocarboneto aromático policíclico com capacidade mutagênica e altamente cancerígeno) em modelos murinos (PRASAD *et al.*, 2008 apud SALEEM, 2009)

Um estudo realizado na Universidade de Winsconsin- Madison mostrou o efeito do lupeol sobre o câncer de pele (ensaio foi realizado com ratos). A aplicação tópica de lupeol na dose de 40mg/kg, 3 vezes/semana, durante 28 semanas, demonstrou a diminuição do tumor, a redução na multiplicidade e aumento no período de latência do tumor. (SALEEM *et al.*, 2004)

Em um ensaio realizado com o extrato da casca de *Acosmium dasycarpum* foi isolado o lupeol que foi utilizado em um experimento com camundogos o qual obteve um resultado de ação depressora do sistema nervoso central. (ROCHA *et al.*, 1980 apud SOUSA-JUNIOR *et al.*, 2009)

Fernandes *et al.*, (2001) demonstraram que o lupeol e seus derivados (assim como o acetato de lupeol) tem uma alta capacidade anti-inflamatória. O estudo indicou que a aplicação tópica de lupeol diminuiu os níveis de mieloperoxidase, redução da infiltração celular, redução da prostaglandina E2, além de que o extrato de *Pimenta racemosa* que é rico em lupeol teve um comportamento anti-inflamatório semelhante a Indometacina. Os experimentos foram realizados em modelos murinos.

**Figura 19- Espectro Genkivanina obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



Fonte: Autor

A genkivanina é uma flavona foi isolada primeiramente em *Daphne genkwa* (umas das 50 ervas fundamentais utilizadas na medicina tradicional chinesa). A genkivanina demonstrou ter um alto potencial anti-inflamatório, por inibir os mediadores pró-inflamatórios, além de aumentar a das células Natural-killer e atividade citotóxica dos linfócitos T. (NASR-BOUZAIENE *et al.*, 2016)

Apresentou atividade antitumoral para algumas linhagens de células (LI *et al.*, 2017), antibacteriana (LUCARINI *et al.*, 2015), antiviral quanto ao vírus da febre africana suína (HAKOBAYAN *et al.*, 2019), antitussígeno, expectorante, antioxidante (PORRAS *et al.*, 2019)

Um estudo avaliou o efeito da genkivanina em ratos que foram induzidos a apresentarem artrite, a genkivanina diminuiu significativamente o edema da pata, e consequentemente a inflamação causada pela artrite, reduziu a destruição óssea nos tecidos articulares, além de diminuir as concentrações séricas de TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose tumoral  $\alpha$ ), IL-6 (Interleucina 6) e NO (óxido nítrico), e aumentou os níveis de IL-10 (Interleucina 10). (BAO *et al.*, 2019)

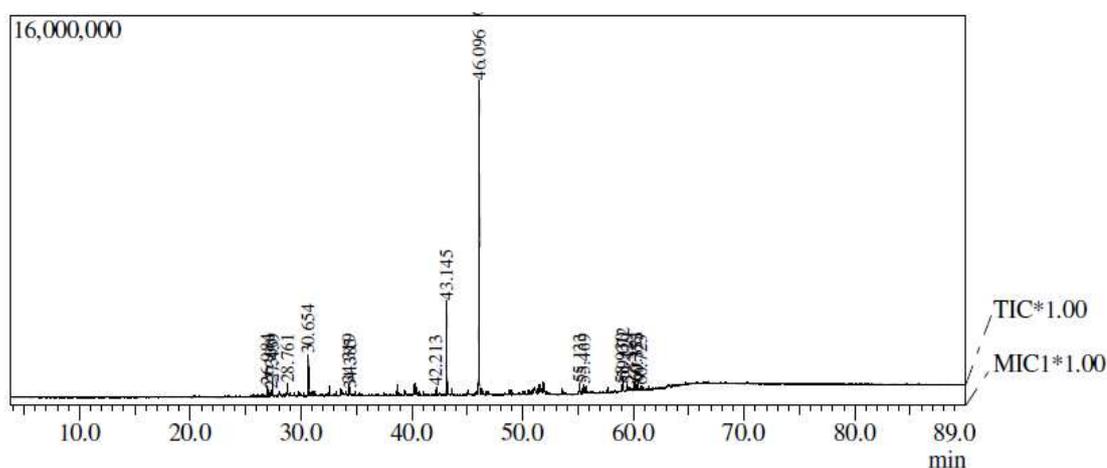
É possível observar o pico base com  $m/z=284$ , característico da genkvanina, assim como  $[M^+ - C_2H_2O]$  que forma o fragmento  $m/z=241$ , e  $[M^+ - CO]$  que forma o fragmento  $m/z=255$ .

#### 5.4.2 Fase diclorometânica de *Croton antisiphiliticus*

O cromatograma da fase diclorometânica do extrato etanólico da planta obtido por cromatografia gasosa está representado na figura 20. Na Tabela 11 se encontram as propostas referentes às substâncias presentes na fase diclorometânica. Foram detectados 18 constituintes, porém foi proposta a identificação de 7 constituintes, dentre eles encontram-se fitona, (-) espatulenol,  $\gamma$ - sitosterol.

A seguir são discutidas as interpretações de alguns espectros de massas obtidos experimentalmente.

**Figura 20: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase diclorometânica obtida do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***



Fonte: Autor

**Tabela 11– Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos compostos presentes na fase diclorometânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***

Pico	Tempo Retenção	Área do Pico (%)	Índice de Similaridade	Substância	Índice de Retenção Relativa Literatura	Índice de Retenção Relativa Experimental
1	26,98	1,55	78	Epóxido de dihidroisocariofileno	-	1565
2	27,30	1,05	96	Etanol, 2-(dodeciloxi)	-	1731
3	27,44	1,86	85	(-)-Espatulenol	1572	1536
4	28,76	1,33		*	-	

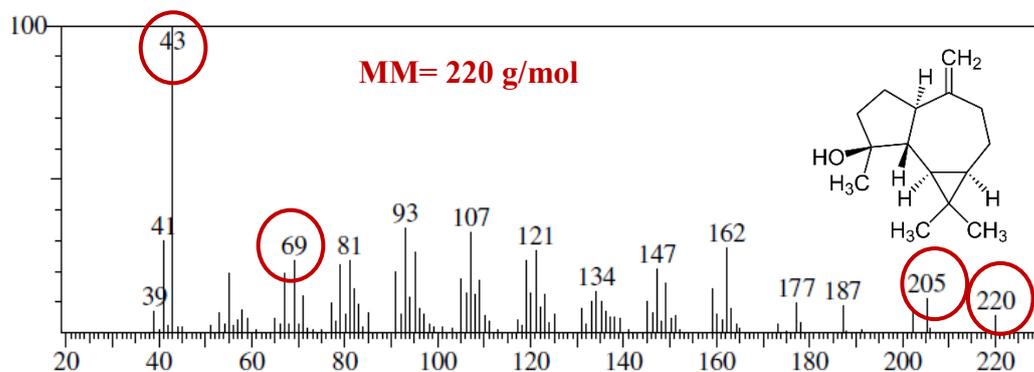
5	30,65	6,03	97	Fitona	1846,7	1841
6	34,32	1,30		*	-	
7	34,39	0,75		*	-	
8	42,21	1,19	93	4,8,12,16- Tetrametilheptadecan-4-olido	2364,2	2258
9	43,15	17,25	97	ácido hexanedíóico, bis(2- etilhexil) ester	2398,2	2414
10	46,09	56,73			-	
11	55,13	1,34	82	*	-	2579
12	55,47	1,12		*		
13	58,93	1,75	87	$\gamma$ -Sitosterol	3290	2731
14	59,07	2,26		*	-	
15	59,43	1,30		*	-	
16	60,12	1,41		*	-	
17	60,35	1,04		*	-	2562
18	60,72	0,75		*	-	

\*pico não identificado

Não foram detectadas, na análise cromatográfica, classes de metabólitos secundários que foram observadas na triagem fitoquímica, exceto esteroide (sitosterol). Na análise cromatográfica foram observados terpenóides (di e sesquiterpenos) e éster de ácido graxo. A fitona, por exemplo, é um terpenóide e pode ser encontrado em diversos organismos que realizam a fotossíntese. É uma cetona derivada do fitol, um diterpeno oxigenado formado por 4 isoprenos, constituinte da clorofila e precursor da vitamina A. (Torres ,2017). As outras classes de metabólitos secundários que não foram identificadas pelo CG-EM são classes de metabólitos mais polares, portanto não apareceriam nos espectros de CG-EM, seria possível identifica-las por CLAE-DAD.

Espatulenol e  $\gamma$ -Sitosterol são constituintes da planta que tem atividades biológicas farmacologicamente interessantes e que foram relatadas na literatura, merecendo destaque. Assim, as Figuras 21, 22, 23 e 24 representam respectivamente o espectro do espatulenol, proposta de fragmentação do espatulenol,  $\gamma$ - sitosterol, proposta de fragmentação do  $\gamma$ -sitosterol.

**Figura 21: Espectro do (-) - Epatulenol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***



Fonte: Autor

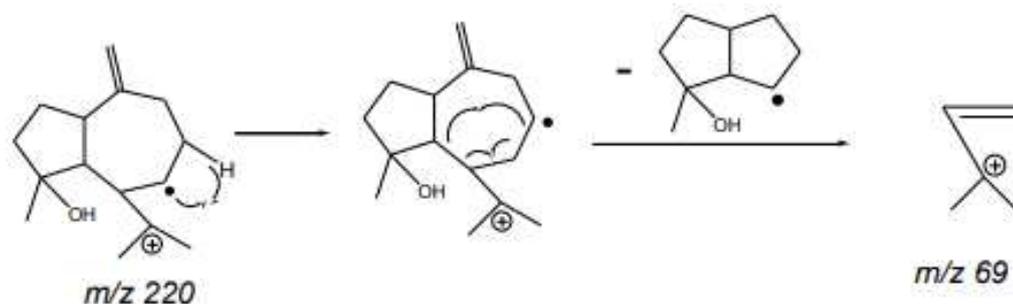
Ziaei e colaboradores (2011) isolaram do extrato metanólico de *Salvia mirzavanni* o espatulenol e demonstraram o seu efeito como imunomodulador, tendo a capacidade de inibir a proliferação dos linfócitos e induzir a apoptose dos linfócitos.

O sesquiterpeno espatulenol possui um aroma amadeirado e é utilizado em formulações aromatizantes de alimentos, perfumes, medicamentos, cosméticos, entre outros. Apresenta uma importante atividade biológica tendo propriedades antibacterianas, e uma moderada atividade citotóxica. (SANTANA, 2013)

O espatulenol tem diversas atribuições biológicas relatadas como repelente contra o *Triatoma infestans* (vetor da doença de chagas), *Aedes aegypti* (vetor da dengue, febre amarela, zika, entre outros) e *Anopheles stephensi* (vetor da malária). Possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, imunomoduladora, antiproliferativa. (NASCIMENTO, 2017)

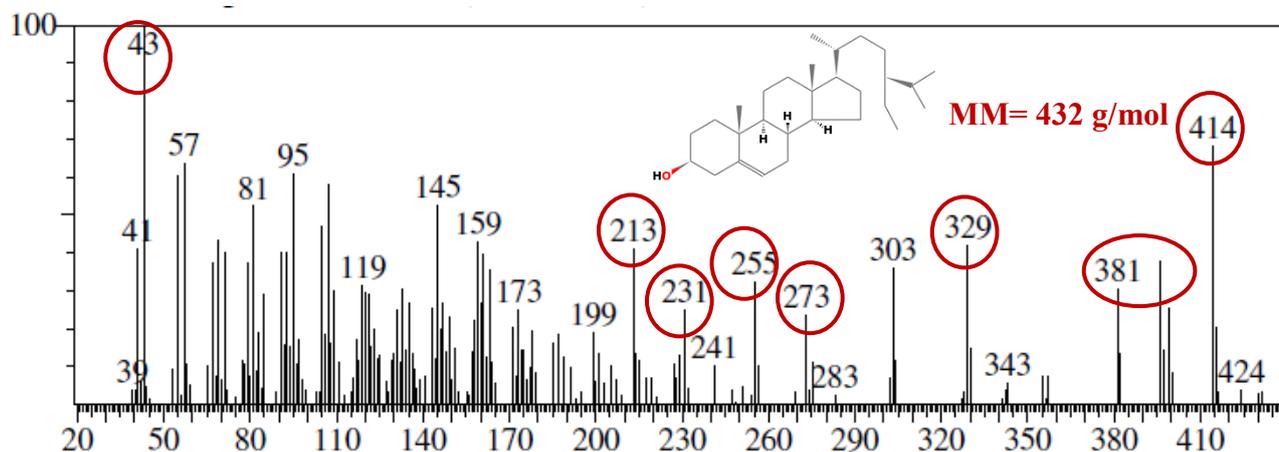
Pelo espectro é possível observar o pico do íon molecular  $m/z = 220$  e o fragmento  $m/z = 205$  identificado por perda de uma metila [ $M^+ - CH_3$ ], característicos para a molécula.

**Figura 22 : Proposta de fragmentação do espatulenol**



Fonte: SILVA, 2018

**Figura 23: Espectro do  $\gamma$ - Sitosterol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase diclorometânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***



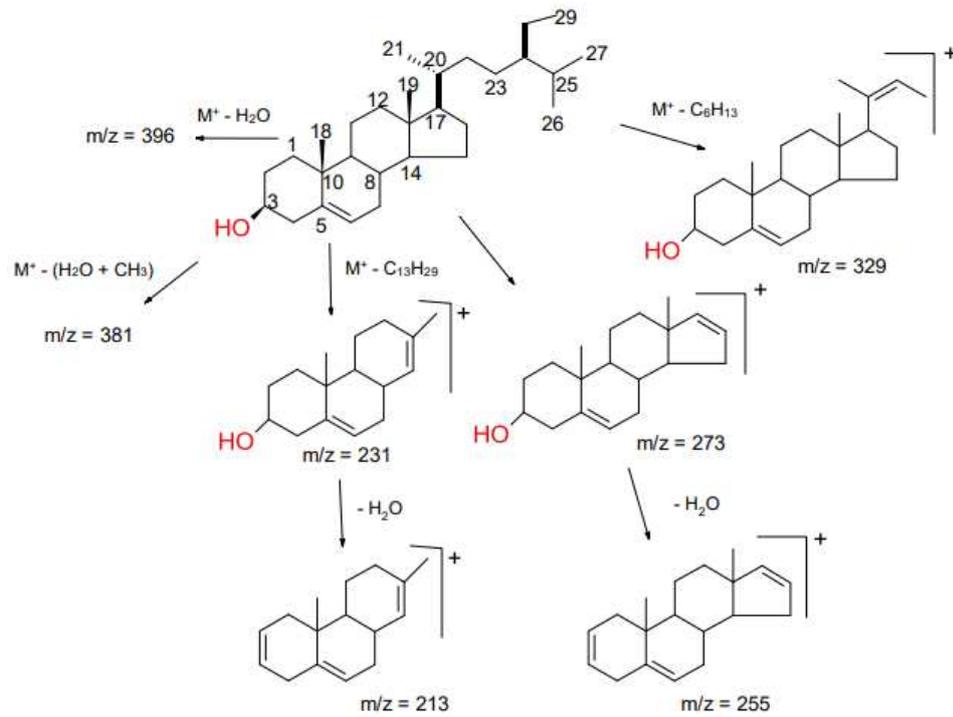
Fonte: Autor

O  $\gamma$ -Sitosterol foi identificado pela primeira vez nas folhas de *Girardinia heterophylla*, e após realizado ensaio em ratos diabéticos (Diabetes induzida por estreptozotocina) pode-se observar que o  $\gamma$ -Sitosterol foi capaz de reduzir a hiperglicemia e aumentar a secreção de insulina além de inibir a glicogênese. (TRIPATHI *et al.*, 2013)

O  $\gamma$ -Sitosterol apresenta atividade anti-inflamatória, anti-diabética, pesticida, antioxidante, antifúngica, anti-aging, antibacteriana. (MAHATO & SHARMA, 2019)

A análise do espectro permitiu identificar o pico do íon molecular do  $\gamma$ -Sitosterol  $m/z = 414$  e alguns fragmentos como o íon  $m/z = 329$  podem ser justificados pela perda da cadeia lateral [  $M^+ - (C_6H_{13})$  ]. O íon  $m/z = 396$  e  $m/z = 381$  oriundos da perda de uma molécula de água [  $M^+ - H_2O$  ] e da perda de uma molécula de água e mais uma metila [  $M^+ - (H_2O + CH_3)$  ] respectivamente. Os fragmentos  $m/z = 255$  e  $m/z = 213$ , são provenientes da perda de uma molécula de água dos íons  $m/z = 273$  e  $m/z = 231$ , respectivamente.

**Figura 24: Proposta de fragmentação do  $\gamma$ - Sitosterol**



Fonte: SILVA, 2016

Na triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto do vegetal foi detectada a presença de estruturas esteroidais ou terpênicas. Dessa forma, a proposição da presença do  $\gamma$ -Sitosterol na fase diclorometânica do extrato etanólico das folhas da *C. antisiphiliticus* vem reforçar o dado encontrado na triagem clássica.

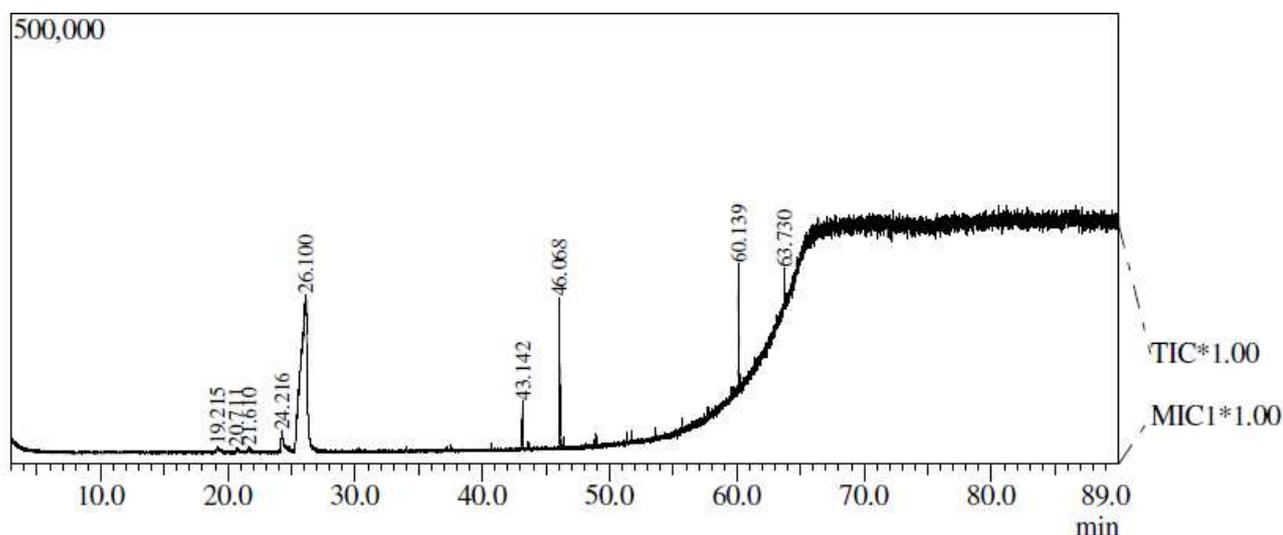
## 5.5 Cromatografia Gasosa das fases Hexânicas

As fases hexânicas dos extratos etanólicos das folhas de *A. dasycarpum* e de *C. antisiphiliticus* foram analisadas por CG-EM. Alguns constituintes das fases hexânicas não puderam ser identificados, devido a não existência de semelhanças espectrais e de incompatibilidades de índice de retenção relativa (IRR), mediante comparação com espectros das espectrotescas e com a literatura.

### 5.5.1 Fase Hexânica de *Acosmium dasycarpum*

O cromatograma da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de *A. dasycarpum* está na figura 25. Na Tabela 12 se encontram as propostas referentes às substâncias constituintes da amostra analisada por CG-EM. Foram detectados 9 constituintes, porém foi proposta a identificação de 5 constituintes, dentre eles encontram-se ácidos graxos e o triterpeno lupeol. Este último pertence a classe de metabólito especial que foi detectado no extrato durante a triagem fitoquímica clássica. Na figura 26 há a representação do espectro de massas de um dos ácidos graxos detectados no material analisado.

**Figura 25: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



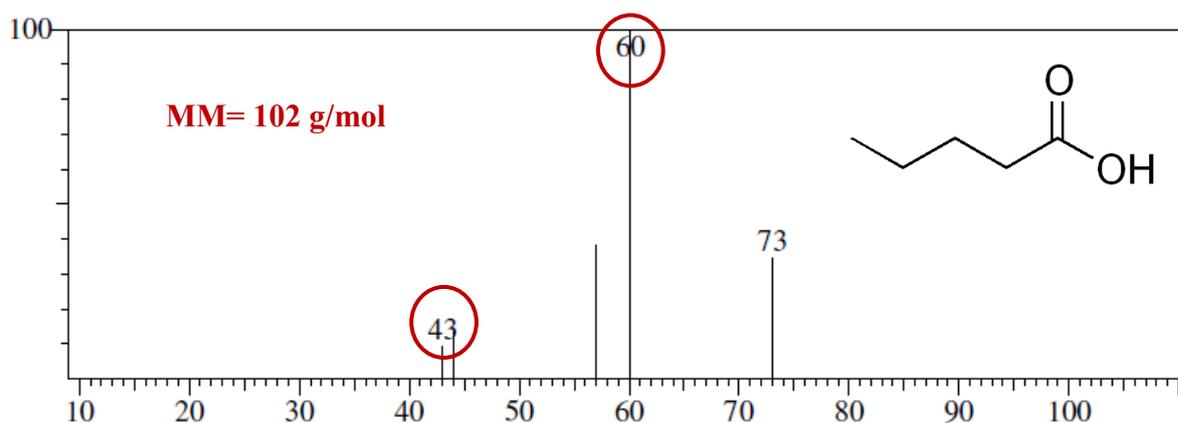
Fonte: Autor

**Tabela 12– Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos constituintes presentes na fase hexânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***

Pico	Tempo Retenção	Área do Pico (%)	Índice de Similaridade	Substância	Índice de Retenção Relativa Literatura	Índice de Retenção Relativa Experimental
1	19,22	1,11	88	*	-	-
2	20,71	0,67	84	Ácido pentanóico	920	875
3	21,61	0,71		*	-	-
4	24,22	1,8	75	Ácido Heptanóico	1080	1073
5	26,1	80,12		*	-	-
6	43,14	2,01	89	Ácido hexanedióico bis(2-ethylhexyl) ester	2398,2	2414
7	46,07	6,65			-	-
8	60,14	5,52	90	Lupeol	3270	2848
9	63,73	1,39		*	-	-

\*pico não identificado

**Figura 26: Espectro do Ácido pentanóico obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase hexânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



Fonte: Autor

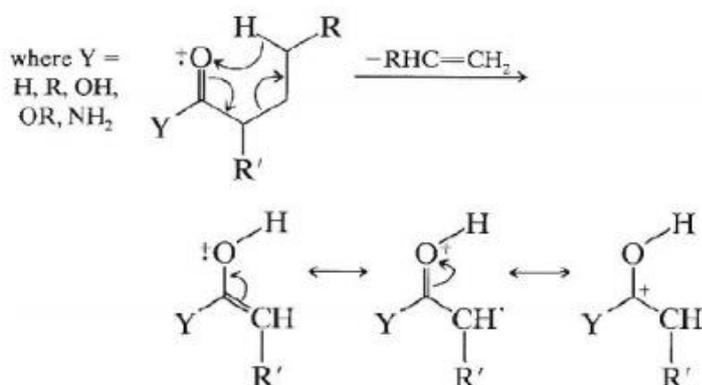
O ácido pentanóico é também conhecido como ácido valérico e é encontrado na *Valeriana officinalis*, sendo um dos constituintes de seu óleo essencial, além de ser encontrado também em suas raízes e folhas. (SODATELLI *et al.*, 2010).

O ácido pentanóico tem a estrutura parecida com a do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), e um ensaio realizado com o ácido pentanóico isolado de *Valeriana wallichii* verificou o efeito gabaérgico deste ácido. O experimento foi realizado em ratos que tiveram

estreptozotocina ( é um antineoplásico de ocorrência natural utilizado para cânceres nas ilhotas de Langerhans) injetada nos ventrículos cerebrais, os pesquisadores observaram que o ácido valérico tem um efeito gabaérgico significativo e obtiveram uma melhora na demência dos ratos, além de reduzir os níveis de peroxidação lipídica e restaurar os níveis de glutatona no cérebro. (VISHWAKARMA *et al.*, 2016)

No espectro de massas é possível observar o pico base característico de ácidos  $m/z = 60$ , que corresponde também ao rearranjo de McLafferty; assim como o fragmento  $m/z = 43$  correspondentes a molécula neutra resultante do rearranjo, a figura 27 mostras como ocorre o rearranjo de McLafferty.

**Figura 27: Esquema do Rearranjo de McLafferty**

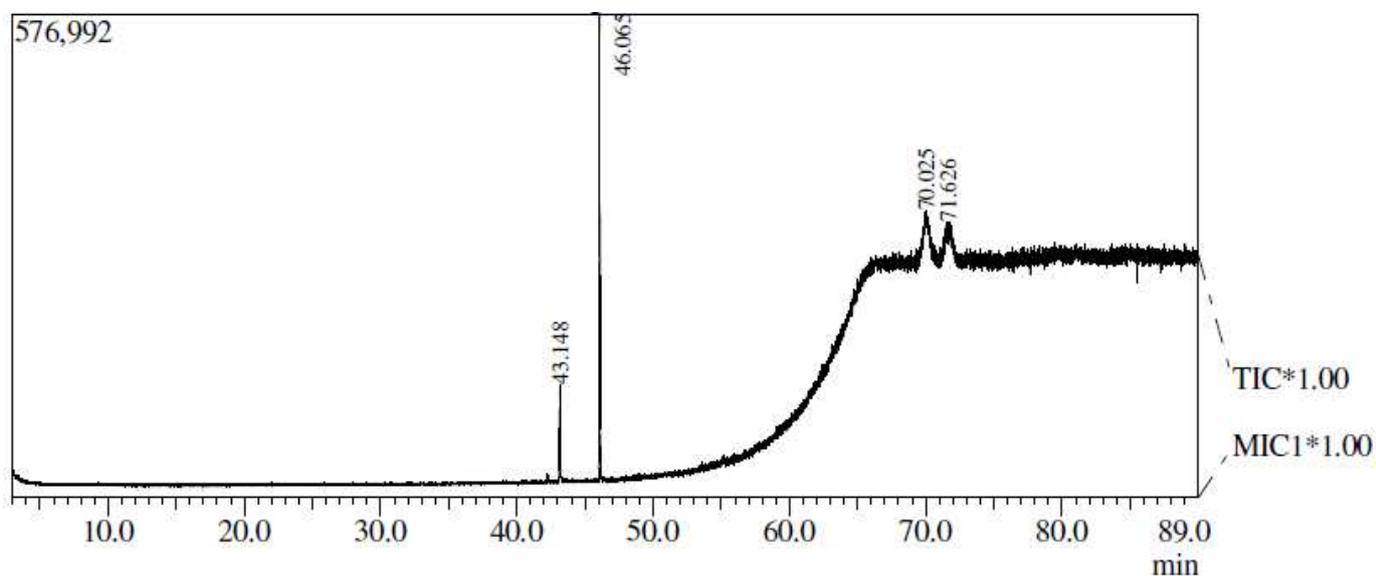


Fonte: SILVERTEIN *et al.*, 2007

### 5.5.2 Fase Hexânica de *Croton antisiphiliticus*

O cromatograma obtido a partir da análise da fase hexânica do extrato etanólico de *C.antisiphiliticus* está representado na figura 28. Na Tabela 13 se encontram as propostas referentes às substâncias presentes na amostra analisada. Foram detectados 4 constituintes, porém foi possível propor a identificação de dois: um éster de ácido graxo comum em seres vivos e o acetato de lupeol, um triterpeno. A classe de terpenóides já foi detectada na triagem fitoquímica clássica realizada com o extrato bruto. O espectro de massas do acetato de lupeol está representado na Figura 29.

**Figura 28: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da fase hexânica obtida do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***



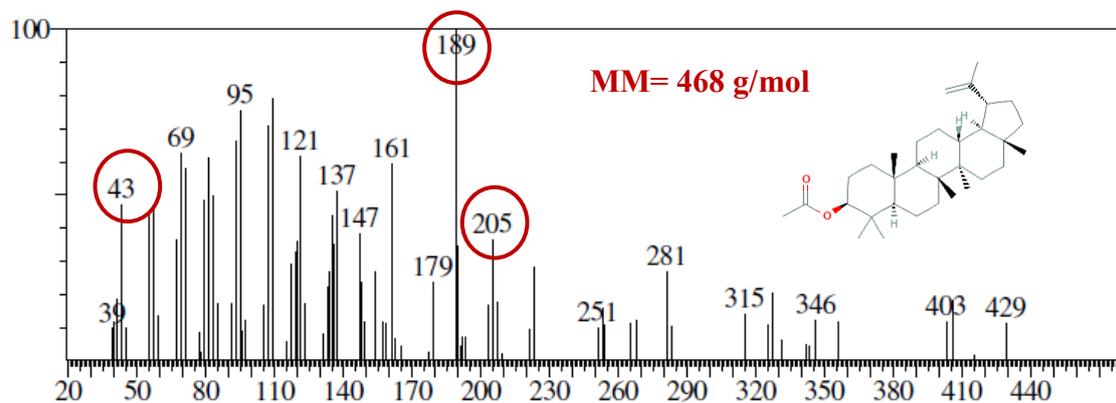
Fonte: Autor

**Tabela 13– Proposta de dados qualitativos e quantitativos dos constituintes presentes na fase hexânica obtida por partição do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***

Pico	Tempo Retenção	Área do Pico (%)	Índice de Similaridade	Substância	Índice de Retenção Relativa Literatura	Índice de Retenção Relativa Experimental
1	43,15	7,19	94	Ácido Hexanodióico bis(2-ethylhexyl) ester	2398,2	2414
2	46,07	28,65	97	*	-	2704
3	70,03	35,14		*	-	
4	71,63	29,02	73	Acetato de Lupeol	3525	2987

\*pico não identificado

**Figura 29: Espectro do Acetato de Lupeol obtido a partir de análise por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de massas da fase hexânica resultante da partição do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***



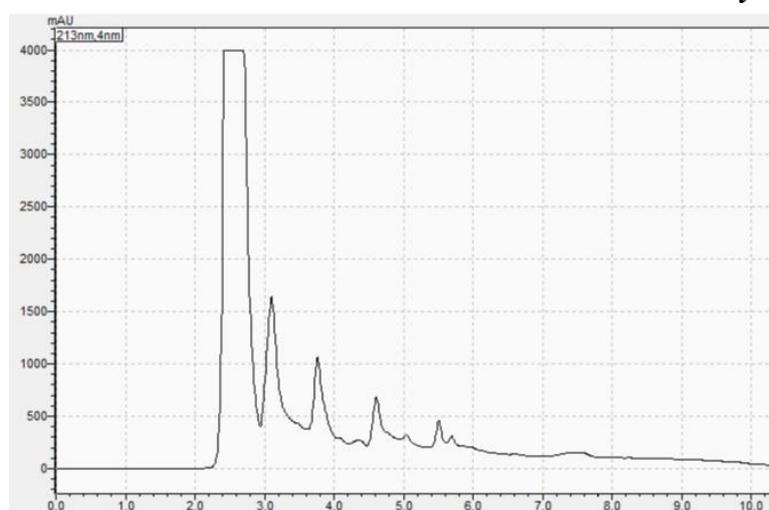
Fonte: Autor

O acetato de lupeol já foi isolado de outros vegetais e demonstrou capacidade anti-inflamatória em experimentos realizados em camundongos. (LUCETTI *et al.*, 2010) É possível observar no espectro a presença de picos característicos como o  $m/z=189$ ,  $m/z=205$ , e o pico do acetil em  $m/z=43$ .

## 5.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE/DAD) das frações hidroalcoólicas

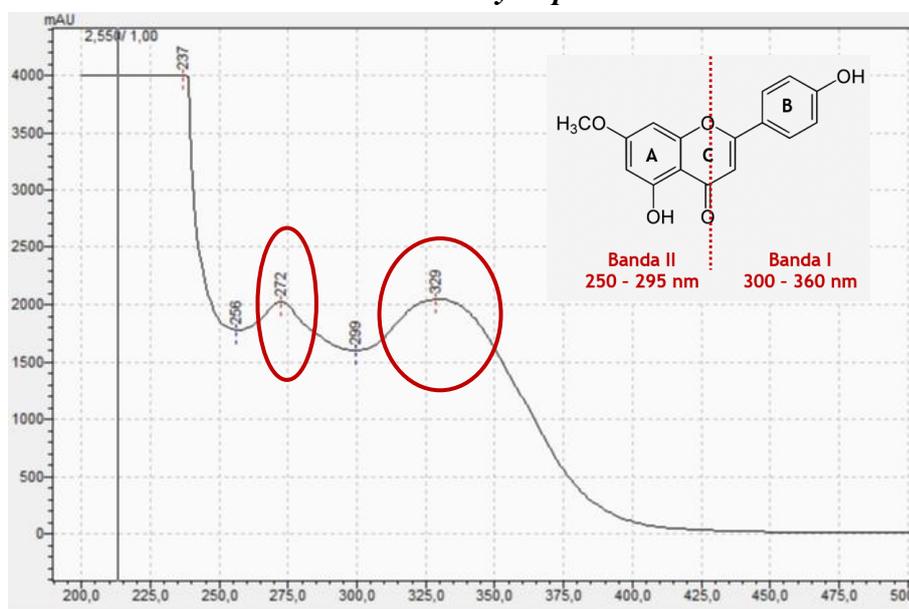
As frações hidroalcoólicas dos extratos etanólicos das folhas de *A. dasycarpum* e de *C. antisiphiliticus* foram avaliadas por CLAE/DAD, obtendo-se os cromatogramas representados nas Figuras 30 e 32, respectivamente. Espectros UV-DAD de um constituinte de cada amostra estão representados respectivamente nas Figuras 31 e 33.

**Figura 30: Cromatograma obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



Fonte: Autor

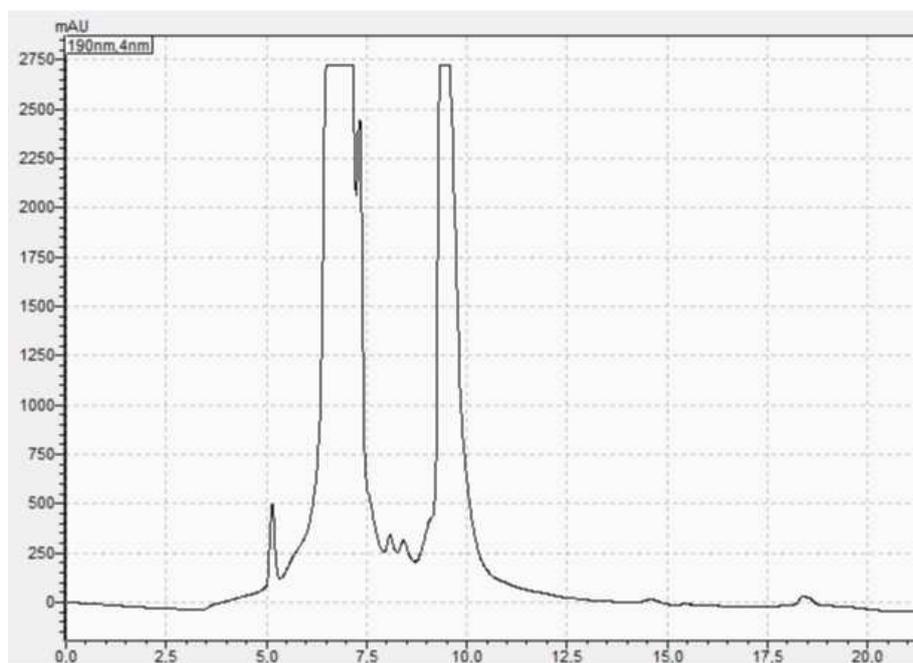
**Figura 31: Espectro Ultravioleta obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) do componente eluído no tempo 3,19 min, presente na fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de *Acosmium dasycarpum***



Fonte: Autor

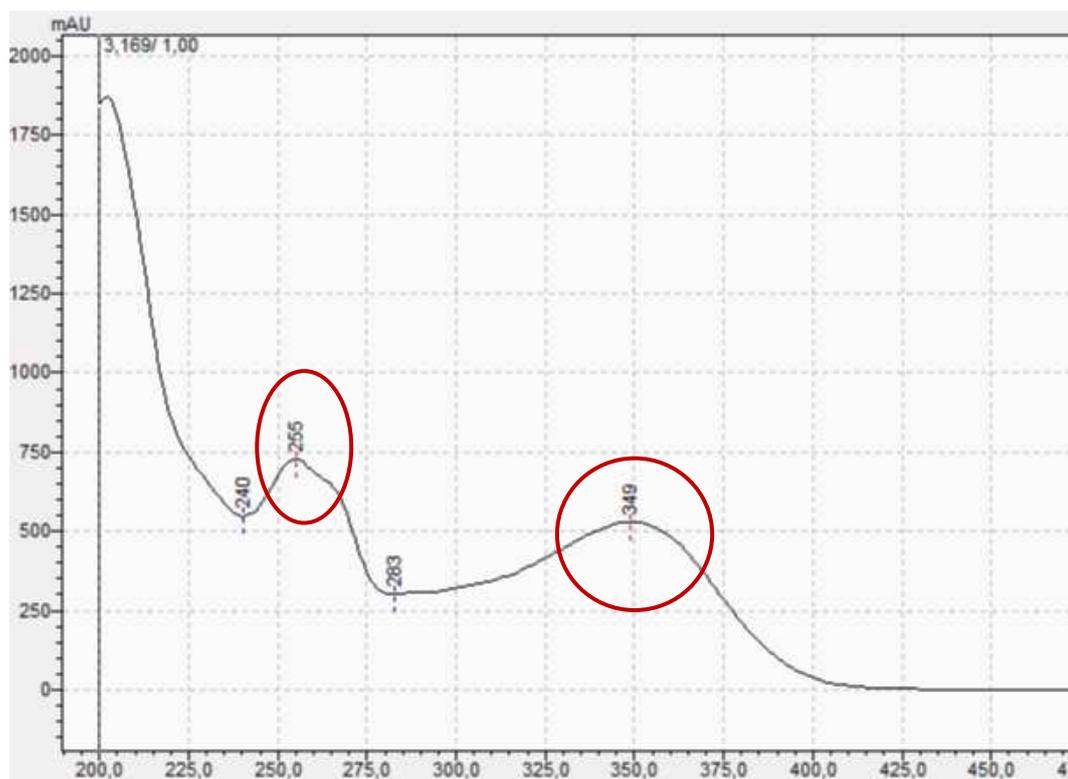
O espectro de UV obtido permite observar duas bandas de absorção em  $\lambda = 272$  nm e  $\lambda = 329$  nm, sendo essas bandas características de flavonoides. Os espectros desses metabólitos obtidos na região do UV apresentam uma banda entre  $\lambda = 250 - 295$  nm e outra entre 300-360 nm. (CAMPIDELI, 2017) A absorção nestas regiões do espectro de UV pode estar relacionada a derivados flavônicos (240-285 – banda II e 300-400 nm – banda I) de núcleo benzopirona. (SANTI *et al.*, 2014). Os perfis dos demais espectros obtidos a partir da análise da amostra em CLAE-DAD apresentaram um perfil semelhante a este espectro apresentado na Figura 31 e devido a ausência de padrões para compostos fenólicos, não foi realizada a comparação para obter mais informações a respeito dos dados obtidos. Tanto na triagem fitoquímica quanto na quantificação de compostos fenólicos e flavonoides foram obtidos resultados que confirmam a presença de compostos fenólicos e flavonoides no extrato.

**Figura 32: Cromatograma obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***



Fonte: Autor

**Figura 33: Espectro Ultravioleta obtido pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) do componente eluído no tempo 5,23 min, presente na fração hidroalcoólica do extrato etanólico das folhas de *Croton antisiphiliticus***



Fonte: Autor

No espectro anterior é possível observar um pico que apresentou absorção em  $\lambda=255$  nm, característico de grupo carbonila  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturado. (SANTI *et al.*, 2014) É possível observar dois picos com máximos de absorção em  $\lambda= 255$  nm e 349 nm, podendo estar relacionado com a presença de flavonas que apresentam a absorção da banda II entre 250- 280 nm e absorção da banda I entre 310-350nm, sendo que as flavonas fazem parte do grupo dos flavonoides.( CAMPIDELI, 2017) Os perfis dos demais espectros obtidos a partir da amostra do extrato de *C. antisiphiliticus* apresentaram um perfil semelhante e devido à ausência de padrões para compostos fenólicos, não foi realizada a comparação para obter mais informações a respeito dos dados obtidos. Com a triagem fitoquímica foi possível detectar a presença de flavonoides e antocianidina, além de ser realizada a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides, obtendo-se resultados satisfatórios e corroborando com os dados encontrados no espectro ultravioleta (Figura 34).

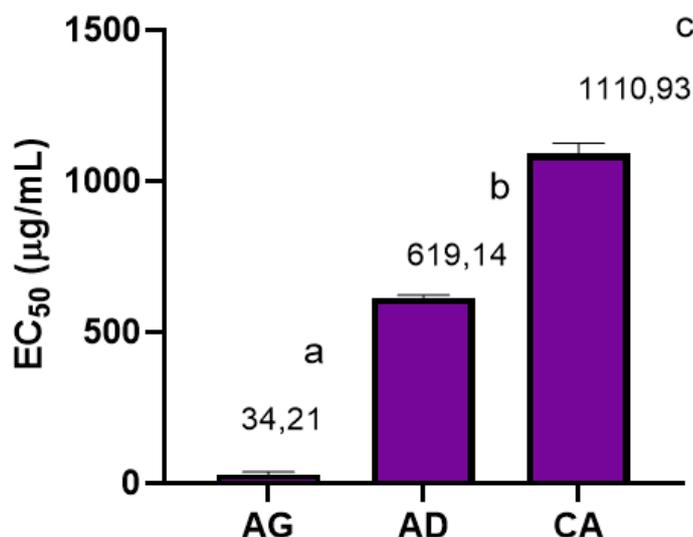
## 5.7 Ensaios antioxidantes

### 5.7.1 Avaliação da captura do radical DPPH•

O ensaio para a captura do radical DPPH• foi realizado como descrito por Duarte e Almeida (2006). As absorvâncias foram medidas em 515 nm e posteriormente convertidas em porcentagem de inibição utilizando a Equação 2, descrita na metodologia.

Através dos gráficos de porcentagem de inibição versus concentração, foi obtido a Concentração Eficiente para captura de 50% do radical DPPH• (EC<sub>50</sub>) dos extratos e do padrão de referência ácido gálico. (GRÁFICO 5). Portanto, quanto menor o valor do EC<sub>50</sub>, maior será a atividade antioxidante do extrato analisado.

**Gráfico 5: Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antispyhiliticus* medida através do valor da Concentração Eficiente para captura de 50% do radical DPPH• (EC<sub>50</sub>)**



Legenda: AG- ácido gálico . Letras iguais correspondem a valores que não possuem diferença estatisticamente significativa, letras diferentes indicam valores que obtiveram diferença estatisticamente significativa, ANOVA, Tukey com  $n < 0,05$  ( $n=3$ , média  $\pm$  dp da média). AG- ácido gálico AD- *A. dasycarpum*; CA- *C. antispyhiliticus*

Os extratos analisados apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao padrão. O extrato de *C. antispyhiliticus* apresentou um valor maior de EC<sub>50</sub> quando comparado ao padrão. O extrato de *A. dasycarpum* também apresentou um valor de EC<sub>50</sub> muito alto quando comparado ao padrão, porém foi mais baixo que o de *C.*

*antisyphiliticus*, portanto ele apresentou um poder antioxidante um maior que o do extrato de *C. antisyphiliticus*.

Melo e colaboradores (2008), avaliando a capacidade antioxidante de frutas *in natura* pelo método de captura de radicais DPPH•, classificou como forte poder antioxidante, quando capturavam acima de 70% dos radicais DPPH•; moderado poder antioxidante, quando capturavam entre 50 e 70% e de fraca atividade antioxidante, quando capturavam menos de 50% dos radicais.

No presente estudo, o extrato de *A. dasycarpum* apresentou 52,64% de inibição do radical DPPH• caracterizando como um poder antioxidante moderado. O extrato de *C. antisyphiliticus* apresentou uma porcentagem de inibição para o radical DPPH• de 29,25% caracterizando-se por uma fraca atividade antioxidante. (Tabela 14)

Um estudo realizado com o extrato de *A. dasycarpum* para avaliar a atividade de captura do radical DPPH• indicou uma inibição de 90,76% do radical na concentração de 50µg/mL (TREVISAN, 2002 apud SOUSA- JUNIOR *et al.*, 2009). Comparando com os dados obtidos no presente estudo em que *A. dasycarpum* teve uma inibição máxima de 52,64% (Tabela 14), a atividade sobre a captura do radical foi moderada.

Em um estudo realizado por Costa e colaboradores (2017) com o extrato etanólico e frações do caule de outra espécie de *Croton*, a *Croton argyrophyllus*, obtiveram um resultado de 269,72 EAG/ g de extrato; 98,43 EQ/g de extrato; 92,96% de inibição do radical DPPH• e um EC<sub>50</sub> de 9,75 µg/mL mostrando um alto poder antioxidante. A porcentagem de inibição máxima obtida por *C. antisyphiliticus* para o presente estudo foi de 29,25, sendo um valor baixo.

Lima, (2016) avaliou o extrato etanólico das folhas de *C. antisyphiliticus* e o resultado obtido para o radical DPPH• foi um EC<sub>50</sub> de 374,85 µg/mL. Enquanto que no presente estudo o valor encontrado para o EC<sub>50</sub> foi de 1110,93 µg/mL.

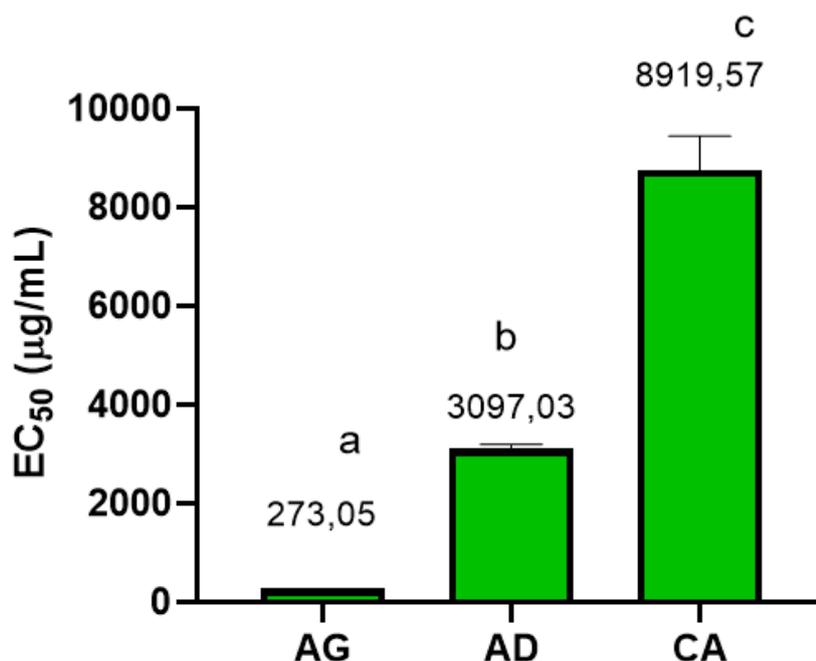
Pelos dados apresentados na literatura, comparando-os aos dados obtidos é possível inferir que os extratos de *A. dasycarpum* e de *C. antisyphiliticus* tiveram uma baixa capacidade de capturar o radical DPPH•, mesmo apresentando um teor moderado de compostos fenólicos e de flavonoides. Os resultados discrepantes entre os estudos podem ser explicados pois, diversos fatores interferem na composição química dos vegetais de mesma espécie, mas com procedências diferentes. Além dos fatores ambientais, genéticos e ontogênicos também interferem na composição de extratos vegetais: a época de coleta do exemplar e os processos utilizados na secagem do material e no preparo dos extratos.

### 5.7.2 Avaliação da captura do radical ABTS<sup>•+</sup>

Os resultados para a atividade de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> foi apresentado como porcentagem de inibição para cada um dos extratos e do padrão de ácido gálico, calculada a partir da conversão dos valores de absorvância utilizando a equação 2, descrita na metodologia.

Através dos gráficos de porcentagem de inibição versus concentração do extrato ou do padrão, foi obtida a Concentração Eficiente para captura de 50% do radical ABTS<sup>•+</sup> (EC<sub>50</sub>) dos extratos e do padrão de referência ácido gálico. (GRÁFICO 6)

**Gráfico 6: Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antisiphiliticus* medida através do valor da Concentração Eficiente para captura de 50% do radical ABTS<sup>•+</sup> (EC<sub>50</sub>)**



Legenda: AG- ácido gálico; AD- *A. dasycarpum*; CA- *C. antisiphiliticus*. Letras iguais correspondem a valores que não possuem diferença estatisticamente significativa, letras diferentes indicam valores que obtiveram diferença estatisticamente significativa, ANOVA, Tukey com  $n < 0,05$  ( $n=3$ , média  $\pm$  dp da média)..

Os extratos analisados apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao padrão e entre si. Assim como para a captura do radical DPPH<sup>•</sup>, os extratos de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus* apresentaram um valor alto de EC<sub>50</sub> quando comparado ao padrão de ácido gálico. O extrato de *A. dasycarpum* apresentou um valor mais

baixo de EC<sub>50</sub> quando comparado ao da *C. antisiphiliticus*, porém ainda assim os valores altos quando comparados ao do padrão.

Em um estudo realizado por Santos *et al.*, 2016 com o extrato etanólico e frações do extrato etanólico das folhas de planta do mesmo gênero da *C. antisiphiliticus*, a *Croton sphaerogynus*, o resultado obtido para o radical ABTS•<sup>+</sup> foi um EC<sub>50</sub> de 13,92 µg/mL.

No estudo realizado por Neto *et al.*, (2018) com três vegetais da família Fabaceae, a qual a *A. dasycarpum* pertence: a *Abarema cochliacarpus* obteve 75,69% para a % inibição do radical ABTS•<sup>+</sup>; *Myroxylum peruiferum* apresentou 20,92% para a % inibição do radical ABTS•<sup>+</sup>; e *Stryphnodendron pulcherrimum* 69,65% para a % inibição do radical ABTS•<sup>+</sup>. Também foi realizado o experimento com *Croton corchoropsis*, vegetal de mesmo gênero que a *C. antisiphiliticus* 33,66% de inibição do radical ABTS•<sup>+</sup>.

Lima (2016) avaliou o extrato etanólico das folhas de *C. antisiphiliticus* e o resultado obtido para o radical ABTS•<sup>+</sup> foi um EC<sub>50</sub> de 1042,65 µg/mL. Sendo o valor encontrado no presente estudo para a mesma espécie, muito superior. Indicando baixo poder redutor do radical ABTS•<sup>+</sup>.

Castro (2012), avaliando a capacidade antioxidante de frutas brasileiras, encontrou resultados de EC<sub>50</sub> para a captura do radical ABTS•<sup>+</sup> variando de 100 a 3000 µg/mL. Velloso (2005) encontrou melhores resultados quando utilizou frações de extratos. No presente estudo e no estudo conduzido por Castro (2012) foram utilizados extratos brutos, o que parece interferir na atividade de captura dos radicais.

No presente trabalho *A. dasycarpum* apresentou um EC<sub>50</sub> de 3097,03 µg/mL e uma porcentagem de inibição do ABTS•<sup>+</sup> de 11,77%. *C. antisiphiliticus* apresentou um EC<sub>50</sub> de 8919,57 µg/mL e uma porcentagem de inibição do ABTS•<sup>+</sup> de 8,98%, como observado na Tabela 14.

**Tabela 14: Relação entre os resultados obtidos para a captura dos Radicais DPPH e ABTS, teores de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antisiphiliticus*.**

Extrato	Fenólicos EAG/g de extrato	Flavonoides EQ/g de extrato	% inibição radical DPPH	EC <sub>50</sub> radical DPPH( µg/mL)	%inibição Radical ABTS	EC <sub>50</sub> Radical ABTS ( µg/mL)
<i>A.dasycarpum</i>	114,85	9,28	52,64	619,14	11,77	3097,03
<i>C.antisiphiliticus</i>	102,82	10,31	29,25	1110,93	8,98	8919,57

Ácido gálico	-	-	84,49	34,21	72,03	273,05
--------------	---	---	-------	-------	-------	--------

Legenda: EAG/g- Equivalente em ácido Gálico/g de extrato; EQ/g de extrato- Equivalente em quercetina/ g de extrato; EC50- Concentração Eficiente para a captura de 50% do radical.

Existem poucos estudos relacionados a atividade antioxidante para os vegetais utilizados no presente estudo.

Ao verificar todos os resultados obtidos para avaliação do potencial antioxidante e comparando com os teores de flavonoides e fenólicos (Tabela 14), é possível perceber que a correlação existente entre o conteúdo de flavonoides e fenólicos e atividade antioxidante não foi satisfatória. Também foi possível identificar a presença de compostos conhecidamente antioxidante nos dois vegetais avaliados no presente estudo como o flavonóide genkivanina, o triterpeno lupeol .

O conteúdo de fenólicos encontrados foi moderado comparando-se os dados da literatura (os quais não apresentam um parâmetro para comparação, porém relacionando a quantidade de fenólicos e a atividade antioxidante o valor foi considerado moderado). Esperava-se que o potencial antioxidante fosse moderado, porém apenas a *A. dasycarpum* obteve um potencial antioxidante moderado para a captura do radical DPPH• o que não foi visto na captura do radical ABTS•<sup>+</sup> já que o extrato obteve um valor muito alto para o EC<sub>50</sub> e uma porcentagem de captura do radical ABTS•<sup>+</sup> baixa.

Os extratos apresentaram um percentual de fenólicos totais de 11,48% (*A. dasycarpum*) e de 10,28% (*C. antisiphiliticus*). Desses fenólicos totais, a maioria não se trata de flavonoides, uma vez que os percentuais para flavonoides foram de 0,92% e de 1,03%, respectivamente. Dessa forma, outros compostos fenólicos, como taninos, por exemplo, que foram detectados na triagem fitoquímica devem contribuir para a atividade antioxidante observada, mesmo que não seja uma atividade significativa (como evidenciado pelos EC<sub>50</sub>).

Quantidades significativas de fenólicos são importantes para se detectar atividade antioxidante de um extrato, mas não é o único fator determinante, pois a atividade antioxidantedos compostos fenólicos depende da sua estrutura: (1) reatividade como agente doador de hidrogênio radicalar H• e de elétrons. O flavonóide radical (A•) se auto-estabiliza, pois, o elétron desemparelhado entra em ressonância com a nuvem eletrônica do anel aromático. Quanto maior o número de hidroxilas aromáticas do flavonóide (ou de outro fenólico), maior a atividade como agente doador de H• e de elétrons – assim, flavonoides monoidroxilados apresentam atividade muito baixa; (2) no caso específico de flavonoides, a estabilidade do radical flavanoil formado, depende da habilidade do flavonoide em deslocalizar o elétron

desemparelhado - A presença de hidroxilas em *orto* é o principal fator que auxilia nessa deslocalização (isso é verdade também para outros fenólicos, como taninos); (3) reatividade frente a outros antioxidantes; (4) capacidade de quelar metais de transição: a remoção de metais de transição livres no meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do organismo, visto que esses catalisam as reações de Haber-Weiss e de Fenton; (5) solubilidade e interação com as membranas biológicas. (LIMA e BEZERRA, 2012).

As duas plantas estudadas têm aplicação na medicina popular. A *A. dasycarpum* apresentou, dentre outras substâncias, taninos, terpenos (como o lupeol), flavonoides (como a genkivanina), que com certeza contribuem para suas atividades medicinais relatadas pela população que faz uso. No caso de *C. antisiphiliticus*, um de seus usos é como anti-inflamatório e, neste estudo, foram detectados o acetato de lupeol, que tem potencial anti-inflamatório; dessa forma, essa substância, dentre outras, pode contribuir para a atividade medicinal da planta. Como foi citado anteriormente, as espécies radicalares estão presentes em diversos processos patológicos (como a inflamação); neste estudo, não foi detectada atividade significativa de captura de radicais, pelo menos nas concentrações avaliadas e com as metodologias empregadas. Dessa forma, outros estudos com esses extratos, utilizando metodologias diferentes devem ser conduzidos para se verificar se, há ou não uma ação antioxidante das plantas atuando paralelamente no tratamento de patologias.

## 6 CONCLUSÃO

No estudo fitoquímico foi possível detectar a presença de compostos fenólicos comoderivados antracênicos, flavonoides (incluindo antocianos) e taninos além de terpenóides (esteroides e triterpenos) no extrato de *A. dasycarpum*, e alcaloides, esteroides e triterpenos e copostos fenólicos (flavonoides (como os antocianos) e taninos) no extrato de *C. antisiphiliticus*. Os fenólicos totais foram quantificados, bem como os flavonoides. Os teores de compostos fenólicos foram considerados moderados, comparando-se com dados da literatura, e os teores de flavonoides comparando-se com valores encontrados na literatura são considerados satisfatórios. No caso dos flavonoides, foi possível, através de GC-EM identificar a Genkivanina no extrato de *A. dasycarpum*. Nos extratos das duas espécies vegetais foi possível verificar a presença de flavonoides, através de espectros de UV característicos obtidos nas análises CLAE-DAD. Através do CG-EM também foi possível identificar os triterpenos Lupeol e Acetato de Lupeol e o esteroide  $\beta$ -Sitosterol. Esses dados fitoquímicos corroboram com os dados presentes na literatura sobre essas espécies e seus gêneros e famílias botânicas e podem explicar alguns efeitos obtidos quando esses vegetais são utilizados pela população, principalmente quando utilizados para o combate a alguma inflamação.

Quanto a porcentagem de captura dos radicais DPPH e ABTS, os extratos analisados não demonstraram uma atividade efetiva e os valores de  $EC_{50}$  indicam baixa atividade, quando comparados aos valores de  $EC_{50}$  do padrão ácido gálico. Esses resultados antioxidantes obtidos com as duas espécies vegetais diferem de outros previamente publicados com as mesmas espécies, no entanto, isso é possível devido a diferenças dos materiais utilizados (procedência e preparo, por exemplo) em estudos distintos.

Conclui-se que os resultados confirmam a presença de compostos antioxidantes nos dois extratos. Porém, os resultados dos ensaios antioxidantes não foram significativos. Portanto devem ser realizados ensaios utilizando outras metodologias (FRAP, ORAC, sequestro do ânion superóxido, captura de ácido hipocloroso ...) para a avaliação do potencial antioxidante dos compostos bioativos presentes nos extratos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDO, O.; ANTONIO, D.; PAREDES, M.; SHANTALL, N.; RIVAS, E.; FERNANDO, A.; TORRES, G.; PATRICIO, C.; MAHABIR, P.G. Evaluación de la actividad antiproliferativa de extractos metanólicos de plantas de la familia leguminosae. **Revista Cubana de Plantas Medicinails**, v. 21, n. 3, p. 272-283, 2016.

ALDHAHER, A.; LANGAT, M.; NDUNDA, B.; CHIRCHIR, D.; MIDIWO, J.O.; NJUE, A.; SCHWIKKARD, S.; CAREW, M.; MULHOLLAND, D. Diterpenoids from the roots of *Croton dichogamus* Pax. **Phytochemistry** , 144, 1–8, 2017.

ALMEIDA, C.F.C.B.R., RAMOS, M.A., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U.P. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil.. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674–684, 2010.

ALVES, I.A.B.S. **Estudo Farmacognóstico e Etnofarmacológico de *Croton cordiifolius* BAIL.**(Euphorbiaceae), 128 folhas, 2017. Tese de Doutorado ( Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 128f. 2017.

ALVES, C. Q. DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. MÉTODOS para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ÂNGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos Fenólicos em Alimentos- Uma breve Revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p.1-9, 2007.

AQUINO, V.V.F.de; COSTA, J.G.M. da.; ANGÉLICO, E.C.; MEDEIROS, R.S.de.; ARAÚJO, M.F.; RODRIGUES, O. G. Metabólitos Secundários e Ação Antioxidante de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v.1, n.3, p.7-10, 2017.

ATHAYDE, N.R. **Perfil químico e atividades biológicas de *Croton echinocarpus* Baill. e *Croton vulnerarius* Müll.Arg**, 131 folhas, 2013. Dissertação de Mestrado ( Biociências-Botânica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 131f. 2013.

AZANI, N.; BABINEAU, M.; BAILEY, D.; BANKS, H.; BARBOSA, A.; PINTO, R.; BOATWRIGHT, J.; BORGES, L.; BROWN, G.; BRUNEAU, A.; CANDIDO, E.; CARDOSO, D.; CHUNG, K.; CLARK, R.; CONCEIÇÃO, A.; CRISP, M.; CUBAS, P.; DELGADO-SALINAS, A.; DEXTER, K.; DOYLE, J.; DUMINIL, J.. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66 (1): 44 – 77. 2017.

AZEVEDO, M. M. B., CHAVES, F. C. M., ALMEIDA, C. A, BIZZO, H. R., DUARTE, R. S., CAMPOS-TAKAKI, G. M., ALVIANO, C. S., ALVIANO, D. S. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of 7-hydroxy- calamenene-rich essential oils from *Croton cajucara* Benth. *Molecules* (Basel, Switzerland), 18(1), 1128–37. doi:10.3390/molecules18011128, 2013.

BARBI, R. C.T. **Amido de Sementes de Nêspera: Avaliação de Compostos Bioativos, Atividade Antioxidante, Propriedades Térmicas, Reológicas e Morfológicas.** 2018, 98 folhas. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 98f. 2018.

BARREIROS, A. L. B. S. DAVID, J. M. ; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARROS, L. de C. Estudo Taxônicos de Espécies do Gênero *Dicymbe* Spruce Ex BENTH. 2017, 39 folhas ( FABADEAE; Derarioideae) com Ocorrência na Amazônia Brasileira. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) Universidade Federal do Pará, Belém, 39f., 2017.

BAYMAN-SILVA, G.; TEIXEIRA, A.H.C.; LEIVAS, J.F. Estimativa de parâmetros biofísicos no bioma Cerrado do Estado de Minas Gerais. *Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, p. 3703-3710, 2017.

BARROSO, G.M., GUIMARÃES, E.F. & ICHASO, C.L.F. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. v. 2. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1991.

BAO, Y., SUN, Y.-W.; JI, J.; GAN, L.; ZHANG, C.-F.; WANG, C.-Z.; YUAN, C.-S. Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- $\kappa$ B signaling pathways. **Phytomedicine**, v. 63, Doi:10.1016/j.phymed.2019.153036, 2019.

BAZZO, Y. M.; GALDOS- RIVEROS, C. Perfil fitoquímico, susceptibilidade antibacteriana e capacidade antioxidante das folhas de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 3, p. 264- 270, 2017

BERLINCK, R. G.S.; BORGES, W. de S.; SCOTIL, M.T.; VIEIRA, P.C. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Revista Química Nova**, v.40, n.6, p.706-710, 2017.

BORGES, C.V.; MINATEL, I.O.; GOMEZ-GOMEZ, H.A.; LIMA, G.P.P Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Contento of Secondary Metabolites, em GHORBANPOUR, M.; VERMA, A. Medicinal Plants and Environmental Challenges, Capítulo 15, p. 259-257, 2017.

BRAGA, F.C. et al. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5- lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, p. 447–452. 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Revista Ciência e Cultura (Versão on-line)**, v.55, n. 3, p.37-39, julho/ setembro, 2003. Disponível em < <https://bit.ly/37BUZ8F>> Acesso em 25 de janeiro do 2020.

CAMPIDELI, M.B. **Avaliação do perfil químico de folhas de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) por CLAE, RMN e IES-EM com vistas ao desenvolvimento de cosméticos e alimentos funcionais**, 127 folhas, 2017. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade Estadual Paulista. Araraquara/ SP, 127 f., 2017.

CÂNDIDO-BACANI, P. DE M.; FIGUEIREDO, P. DE O.; MATOS, M. DE F. C; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, v.78, n.11, 2015.

CASTRO, J. F. A. **Estudo da atividade antioxidante em frutas nativas e exóticas brasileiras**. 2012, 85 folhas. Dissertação de mestrado (Biotecnologia - Bioquímica e Tecnologia Química), Universidade Estadual Paulista UNESP, Instituto de Química - Araraquara 85 f., 2012.

CORDEIRO, K.W.; FELIPE, J.L.; MALANGE, K. F.; PRADDO, P.R.; *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>, 2016.

COSTA, A.F. *Farmacognosia vol. III*. 2ª ed, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 1982.

COSTA, M.A.R.; *et al.* Fenólicos Totais, Flavonoides Totais e Atividade Antioxidante de Extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth ( Euphorbiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v.14 n.25; p.687- 710, 2017.

COSTA, J.L.C.; SECCO, R.S.; GURGEL, E. S. C. Flora das cangas da serra dos Carajás, Pará, Brasil: Euphorbiaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1,p. 59-75, 2018.

CORDEIRO, S.A.; SOUZA, V.K.S.; SOUZA, G.S.F. de; SILVA, E.C.A.; OLIVEIRA, J.C.S.de; SILVA, E.C.A.da; BARROS, A.L.S.; MARTIN, A.C.S. Importância dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Tratamento de Doenças. **International Journal of Nutrology**, v.11, n. S01, p. Traba457, 2018

CREPALDI, C.G.; CAMPOS, J.L.A.; ALBUQUERQUE, U.P.; SALES, M.F. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South African Journal of Botany** ,2015

DELMONDES, P.H. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. Interdisciplinar: Revista Eletrônica da Univar. v.1, n. 09, p. 1- 5, 2013.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites** , v.2, p.303-336 , DOI:10.3390/metabo2020303, 2012.

DÍAZ, J.G.; TUENTER, E.; ARRANZ, J.C.E.; MAURY, G.L.; COS, P. PIETRS, L. Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of *Croton linearis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 236, p.250–257, 2019.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.;GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema Beta-Caroteno/Ácido Linoléico e Método de Seqüestro de Radicais DPPH.. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p. 446–52, 2006.

DUKE, J.A.. Handbook of Legumes of World Economic Importance. New York: Plenum Press. 1981.

DRYFLOR. Plant diversity patters in neotropical dry forests and their conservation implications. **Science**, v.353,p.1383 – 1387. 2016.

**Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro.Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 19 Outubro. 2019

FARNSWORTH, N. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55 (3), 225-276, 1966

FERNANDES, R. D. **Estudo fitoquímico de *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) e atividades biológicas.** Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. 2016.

FERNANDES, V.C. *et al.* The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic towards B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 1005-1011, april. 2013.

FERNANDES, V.C.; PEREIRA, S.I.V; COPPEDE, J.; MARTINS, J.S. *et al.* The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisiphiliticus* is cytotoxic toward B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.2, p.1005-1011 ,2013.

FERNÁNDEZ, M. A.; TORNOS, M. P.; GARCÍA, M. D.; DE LAS HERAS, B.; VILLAR, A. M.; SÁENZ, M. T. Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosavar. grissea*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 53(6), 867–872. doi:10.1211/0022357011776027, 2011.

GLOBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Mediciniais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Revista Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOMES, G. S.; SILVA, G. S.; SILVA, D.L. S.; OLIVEIRA, R. R.; MARTINS, P.R.P.; ARAÚJO, M.F.V.; CONCEIÇÃO, G.M. Papilionoideae of an Area of Vegetation in Northeast from Brazil. **Asian Journal of Environment & Ecology**, v.7, n. 1, p. 1-15, 2018.

GOMES, G. S.; SILVA, G. S.; CONCEIÇÃO, G.M. Leguminosae: Florística e Taxonomia de áreas de Cerrado do Maranhão, Nordeste do Brasil. **Revista verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável** (Versão online), v. 14, n. 2, 2019. Disponível em <<https://bit.ly/2sVEYeo>> Acesso em 25 de janeiro de 2020.

HAKOBYAN, A.; ARABYAN, E.; KOTSINYAN, A.; KARALYAN, Z.; SAHAKYAN, H.; ARAKELOV, V.; NAZARYAN, K.; FERREIRA, F.; ZAKARYAN, H. Inhibition of African Swine Fever Virus Infection by Genkwanin. **Antiviral Research**, v. 167, p. 78-82, 2019.

HAIDA, K.S.; HAAS, J.; MELLO, S.A.; HAIDA, K.S.; ABRÃO, R.M.; SAHD, R. Compostos fenólicos e Atividade Antioxidante de Goiaba (*Psidium guajava* L.) Fresca e Congelada. **Revista Fitos**, v. 9, n. 1, p 37-44 , 2015.

HENRIQUES, G.S.; CAMPELO, F.A.; LACERDA, I.C.A.; ARAÚJO, R.L.B.; QUEIROZ, V.A.V.; SIMEONE, M.L.F. Caracterização Química e Determinação da Capacidade Antioxidante de Genótipos Brasileiros de Sorgo (*Sorghum bicolor* L.). XXVI Congresso Brasileiros Ciência e Tecnologia de Alimentos, p. 1-8, Agosto de 2018.

HIROTA, B.C.K.; TREVISAN, R.R.; DIAS, J.F.G. MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoquímica e Atividades Biológicas do Gênero *Jatropha*: Mini- Revisão. **Visão Acadêmica**, v. 11, n.2, p. 103-112, 2010.

KATEROVA, Z.; TODOROVA, D.; SERGIEV, I. Plant Secondary Metabolites and Some Plant Growth Regulators Elicited by UV Irradiation, Light and/ or Shade em GHORBANPOUR, M.; VERMA, A. Medicinal Plants and Environmental Challenges, Capítulo 6, p. 97-121, 2017.

KASIKCI, M.B.; BAGDATLIOGLU, N. Bioavailability of Quercetin. 1<sup>ST</sup> International Multidisciplinary Conference on Nutraceuticals and Functional Foods Current Research in Nutrition and Food Science, v. 4, SI. 2, p. 146-151, 2016.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v.4, p. 17-31, 2013.

LEMES, E. de O.; FERNANDES, M.M.C.; ROSA, V.P.; NASCIMENTO, A.H. Levantamento da Utilização do Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) Como Agente Antioxidante na Prevenção de Doenças Neurodegenerativas. **UNICIÊNCIAS**, v.21, n.2, p. 110-114, 2017.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 369, 1987.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 577, 2005.

LI, F.; ZHANG, D.; LI, J.; *et al.* Bioactive terpenoids from *Croton laui*. **Natural Product Research**, DOI: 10.1080/14786419.2019.1675062, 2019.

LI, Y.; HONG, J.; LI, H.; QI, X.; GUO, Y.; HAN, M.; WANG, X. Genkwanin nanosuspensions: a novel and potential antitumor drug in breast carcinoma therapy. **Drug Delivery**, v. 24, n.1, p. 1491-1500, 2017.

LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. Flavonoides e Radicais Livres. **Disciplinarum Scientia**, v. 13, n.1, p. 111-124, 2012.

LIMA, PHILIPPE DIAS DE ÁVILA. 2016. **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PLANTAS DO CERRADO: *Ageratum Fastigiatum* (GARDN.) R. M. KING et H. ROB., *Croton Antisyphiliticus* MART.,**

*Kielmeyera Rubriflora* CAMB., *Miconia Ferruginata* DC., E *Norantea Adamantium* CAMB.”  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

LUCARINI, R.; TOZATTI, M.G.; SILVA, M.L.A.; GIMENEZ, V.M.M.; PAULETTI, P.M.; GROppo, M.; TURATTI, I.C.C.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Antibacterial and anti-inflammatory activities of an extract, fractions, and compounds isolated from *Gochnatia pulchra* aerial parts. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p.1-9, 2015.

LUCENA, M. F. A. & ALVES, M. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae s.l. do Nordeste do Brasil. **Hoehnea**, v.37, p. 71-85, 2010.

LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P.; BANDEIRA, M.A.M.; VERA, H.N.H. *et al.* Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 17, 2010.

MAGALHÃES, J.S.; MOREIRA, R.P.; NDIAYE, E.A. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antibacteriana das Raízes de *Croton antisyphiliticus* Mart. 50º Congresso Brasileiro de Química, 2010.

MARTINS, M.V.; CAVASSAN, O.; TOZZI, A.M.G.A; KOCH, I. Espécies arbóreas de Papilionoideae (Leguminosae) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 1, p. 85-104, 2016.

MATTE, A.K.; DEAK, A.R.; MATA, P.T.G. Triagem Fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana de extratos das flores de *Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, p. 1049-1054, 2015.

MATOS, F.A.J. *Introdução à fitoquímica experimental*. Ed. UFC, Fortaleza, 1988.

MEDEIROS, J. de D. Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies. 2011.

MAHATO, D.; SHARMA, HP.; Phytochemical profiling and antioxidant activity of *Leea macrophylla* Roxb. ex Hornem.-*in vitro* study. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 18, n. 3, p. 493-499, 2019.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMETO, R.J. Capacidade Antioxidante de Hortaliças Usualmente Consumidas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p. 639-644, jul.-set. 2006.

MOTA, E. F.; ROSÁRIO, D.M.; VEIGA, A.S.S.; BRASIL, D.S.B.; SILVEIRA, F.T.; DOLABELA, M.F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmaconosy Magazine**, v. 11, n. 43, p. 601-606, 2015.

MOTTA, L.B., FURLAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.C., SALATINO, M.L.F., DUARTE-ALMEIDA, J.M., NEGRI, G., CARVALHO, J.E., RUIZ, A.L.T.G., CORDEIRO, I, SALATINO, A. Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 21, no. 6, 2011.

MWINEL, J.T.; VAN-DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, vol. 5, n.5, p. 652-662, 2011.

NASCIMENTO, K.F. **Composição Química e Avaliação Biológica de Óleo Essencial e Composto Isolado das Folhas de *Psidium guineense* Swartz (Myrtaceae)**, 71 folhas, 2017. Dissertação de Mestrado ( Biologia Geral / Bioprospecção), Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados – MS, 71 f., 2017.

NASR-BOUZAIENE, N.; SASSI, A.; BEDOUI, A.; KRIFA, M.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Immunomodulatory and cellular antioxidant activities of pure compounds from *Teucrium ramosissimum* Desf. **Tumor Biology**, v.37, n. 6, p. 7703–7712, 2016

NASTRI, J. P. **Orbitídeos de Euphorbiaceae, caracterização química e síntese: prospecção racional de peptídeos cíclicos com potencial antitumoral**. 2019, 88 folhas. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 88f. 2019.

NETO, J.R.L.; UCHÔA, A.D.A.; MOURA, P.A.; FILHO, C.M.B.; TENÓRIO, J.C.G.; SILVA, A.G. *et al.* Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some

plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n.27, p. 409-416, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Product as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, F. C. de.; *et al.*; Jaboticaba Skin Extracts: Phenolic Compounds and Antibacterial Activity. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.21, p.1-11, 2018.

OLIVEIRA F, SAITO M.L.; FURUKAWA, C.M. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de perobinha do campo - *Acosmium subelegans*. XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Fortaleza, Brasil. 1994.

OLIVEIRA, D.G. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de Caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**, v. 9, n. 4, p. 1-7 , 2013.

PARIZOTTO, C.A. **Contribuição ao estudo químico do cerne das raízes de *Acosmium dasycarpum* (Vog) Yakovlev**. Cuiabá, 86p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, 2003.

PAVARINI, D.P.; PAVARINI, S.P.; NIEHUES, M.; LOPES, N.P. Exogenous Influences on plant Secondary Metabolites Levels. *Journal Animal Feed Science and Techonology*, v. 176, p. 5-16, 2012.

PEREIRA, S.; CONTINI-TALEB, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.; PEREIRA, A. M. An *ent*-Kaurane- Type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. *Molecules*, v. 17, p. 8851 – 8858, 2012.

PINTO, A. C.; SILVA, D.H.S.S.; BOLZANI, V.da S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R. de A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Revista química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIRES, J.; TORRES, P.B.; SANTOS, D.Y.A.C. dos; CHOW, F. Ensaio em Microplaca do Potencial Antioxidante Através do Método de Sequestro do radical DPPH para Extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, Setembro de 2017.

PIZZOLATTI, M.G.; BORTOLUZZI, A.J.; BRIGHETE, I.M.C.; ZUCHINALLI, A.; CARVALHO, F.K.; CANDIDO, A. C.S.; PERES, M.T.L.P. Clerodane Diterpenes from Bark of *Croton urucurana* Baillon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 4, p.609-614, 2013.

PORRAS, G.; BACSA, J.; TANG, H.; QUAVE, C.L.; Characterization and Structural Analysis of Genkwanin, a Natural Product from *Callicarpa americana*. **Cristals**, v. 9, n. 419, p.1-12, 2019.

PROVENSI, L.R. **Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante de *Justicia thunbergioides* (Lindau) Leonard. (Acanthaceae)**, 2018, 161 folhas. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente), Centro Universitário de Anápolis UniEvangélica, Anápolis 161f., 2017.

QUEIROZ, S.A.S. **Busca por orbitídeos em espécies do gênero *Croton* (Euphorbiaceae) oriundas da Mata Atlântica**, 140 folhas, 2019. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 140f., 2019.

RAHMAN, A.H.M.M.; PARVIN, M.I.A. Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi. **Research in Plant Sciences**, Vol. 2, No. 1, p. 6-8, 2014.

RAMALHO, S.D.; PINTO, M.E.F.; FERREIRA, D.; BOLZANI, V.S. Biologically Active Orbitides from the Euphorbiaceae Family. Thiteme, 2017

RAMALHO, S. D.; WANG, C. K.; KING, G. J.; BYRIEL, K. A.; HUANG, Y. H.; BOLZANI, V. S.; CRAIK, D. J. Synthesis, Racemic X-ray Crystallographic, and Permeability Studies of Bioactive Orbitides from Species. **Journal of Natural Products**, v. 81, p. 2436-2445, 2018

RAMOS, J.P.da S. **Prospecção Fitoquímica de Extratos Hidroalcoólicos de Pimentas *Murupis* e Avaliação de Suas Propriedades Antioxidantes e Tóxicas**. 2017. 54 folhas.

Monografia (Curso de Engenharia Florestal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas- Seropédica 54f., 2017.

REIS, G.O. **Estudo do Efeito anti-inflamatório da *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae) no Modelo de pleurisia induzida por Carragenina, em camundongos**, 94 folhas, 2013. Dissertação de Mestrado (Ciências Médicas), Universidade Federal de Santa Catarina. 94f., 2013.

RODRIGUES, D.A.; PEREIRA, G.A.M.; SILVA, A.A.; SANTOS, M.H; DEMUNER, A.J.; OLIVEIRA, P.M. Phytochemical Profile of Pasture Weeds from the Brazilian Cerrado. **Revista Planta Daninha**, v.37, p. 1-10, 2019.

ROQUE, S.A. L.da S.; OLIVEIRA, J.A.R. F.; PIMENTA, R.S. A Nutrigenômica como Método de Prevenção e Tratamento de Doenças. **Revista Desafios**, v. 6, n.3, p. 3-10, 2019.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MANCINI FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema b-caroteno/ ácido linoleico. Fortaleza: Embrapa, 2006. (Comunicado Técnico).

SÁ, P. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SALEEM ,M. Lupeol, a Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n.2, p. 109-115, Doi:10.1016/j.canlet.2009.04.033, 2009.

SALEEM, M.; AFAQ F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Lupeol modulates NF-kappa B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene** ,v.23, n. 30, p.5203–5214, 2004.

SANTANA, H.C. D. **Caracterização Química do Óleo Essencial de *Bacharis reticularia* DC. ( Asteraceae) em Função de Diferentes Procedências e da Sazonalidade no Distrito**

**Federal**, 84 folhas, 2013. Dissertação de Mestrado ( Agronomia), Universidade de Brasília. Brasília, 84f. 2013.

SANTI, M.M.; SANCHES, F.S.; SILVA, J.F.M.; SANTOS, P.M.L. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n.2, p. 256-261, 2014.

SANO, E.E.; ROSA, R.; BRITO, J.L.S.; FERREIRA, L.G. Mapeamento de Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e Resultados. EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF. 2007.

SANTOS, D.S. dos. RODRIGUES, M.M.F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica**, v.7, n.3, p. 29-35, 2017.

SANTOS, C.T. *et al.* Fenólicos Totais e Flavonoides Totais de Extratos Obtidos dos Caules de *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae). 58º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2018.

SANTOS, K. P.; SEDANO-PARTIDA, M.; MOTTA, L.B.; CORDEIRO, I.; FURLAN, C.M. Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. **Brazilian Journal of Botany**, v.39, n. 4, p. 1021-1030, 2016.

SECA, A. M.L.; PINTO, D.C.G.A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1- 22, 2018.

SECCO, R. S.; CORDEIRO, I.; SENNA-VALE, L.; *et al.* An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s.l. in Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 227-242, 2012.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Leguminosae (Fabaceae) in Tribal Medicines. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n.1, p.276-283, 2013.

SILVA, L. A.; RAPOSO, J.D. A.; CAMPOS, L. P. G. ; CONCEIÇÃO, E. C.; OLIVEIRA, R.B. ; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP,  $\beta$ caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v. 12, n.2, p. 117-126, 2018.

SILVA, L.E.; SOUSA, P.T.; KAYSER, A.K.; SILVA, V.C.; DALL'ÓGLIO, E.L. Estudo químico das folhas de *Acosmium dasycarpum* (VOGEL) YAKOVLEV. **Revista Ciência e Natura**, v. 37, n. 37, 2015.

SILVA, M. L. C.; Costa, R. S.; Santana, A. S.; Koblitz, M. G. B. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, T.L. **Estudo Químico de *Bowdichia virgilioides* ( Fabaceae) na Busca de Inibidores Seletivos de Cisteíno Peptidases** 112folhas, 2014. Dissertação de Mestrado ( Química), Universidade de São Carlos, São Carlos /SP, 112f. 2014.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK. P.R.(Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p. 2010.

SIMÕES, R.C.; ALMEIDA, S.S.M.da S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia**, v. 5, n.1, p. 27-31, 2015.

SIQUEIRA, V.L. **Avaliação da Atividade Cicatrizante do Extrato Etanólico da *Croton antispyhiliticus* em Feridas Cutâneas de Ratos**, 96 folhas, 2019. Dissertação de Mestrado (Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 96f. 2019.

SODATELLI, M.V.; RUSCHEL, K.; ISOLAN, T.M.P. *Valeriana officinalis*: uma alternativa para o controle da ansiedade odontológica?. **Stomatos**, Canoas, v. 16, n. 30, p. 89-97, 2010.

SOUSA-JÚNIOR, P.T.; DALL'OLGLIO, E.L.; SILVA, E.; FIGUEIREDO, U.S.; VIEIRA, P.C.; MACHADO, H.V.; SANTOS, L. G. Gênero *Acosmium*: composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 1<sup>a</sup>, p. 150-157, 2009.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 2006.

SANTOS, K.P.; MOTTA, L.B.; SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; *et al.* Antiproliferative Activity of Flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). **BioMed Research International**, v. 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/212809>, 7 folhas, 2015.

SILVA, D.S.; REMPEL, C.; MARMITT, D.J.; POMBO, C.N.F.; GOETTERT, M.I. Utilização de pomada à base de seiva de *Croton lechleri* Müll. Arg. No tratamento de úlceras em membros inferiores de pessoas com diabetes – estudo piloto. **Cadernos UniFOA**, Edição 40, 2019.

SILVA, K.L.da. **Contribuição ao conhecimento químico de espécies do gênero *Protium* (*Protium hebetatum* Daly e *Protium leptostachyum* Cuatrec. (Burseraceae)**, 96 folhas, 2016. Dissertação de Mestrado (Ciências e Inovação Tecnológica), Universidade Federal do Acre. Rio Branco/ AC, 96f., 2016.

SILVA, M.V.S.G. da. **Composição Química e Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti* do Óleo Essencial da *Eugenia calycina***, 122 folhas, 2018. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia/ MG, 122f., 2018.

TAIZ L; ZEIGER E 2004. Fisiologia vegetal. 3 Ed. Porto Alegre: Editora Artmed

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, San Diego, v.19, p.669-675, 2006.

THAKUR, M.; BHATTACHARYA, S.; KHOSLA, P.K.; PURI, S. Improving Production of Plant Secondary Metabolites Through Biotic and Abiotic Elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.12, p. 1-12, 2019.

THEIS, N.; LERDAU, M. Evolution of Fuction in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. 3, p. 93-102, 2003.

TORREJÓN, E.M.V.; HONORES, M.J.C. Efecto antifúngico in vitro del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. **Revista Pluebo Continente**, v.27, n.1, p. 89-94, 2016.

TORRES, P. B. **Caracterização Química e Atividades Biológicas de Algumas Espécies Nativas de Gracilaria de Importância Econômica**, 288 folhas, 2017. Tese de Doutorado (Biociências Botânica) Universidade de São Paulo. São Paulo, 288f. 2017.

TREVISAN T.C. 2002. **Estudo químico-farmacológico das cascas das raízes de *Acosmium dasycarpum* (Vog) Yakovlev**. Cuiabá, 173 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva), Universidade Federal de Mato Grosso. 173f., 2002

TREVISAN, T.C.; SILVA, E.A.; DALL’OGLIO, E.L.; SILVA, L.E.; VELOZO, E.S.; VIEIRA, P.C.; SOUSA-JÚNIOR, P.T. New quinolizidine and diaza-adamantane alkaloids from *Acosmium dasycarpum* (Vog.) Yakovlev—Fabaceae. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 6289-6292, 2008

TRINDADE, M.J.S.; LAMEIRA, O.A. Especies de interés de familia Euphorbiaceae en Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 1, p. 292- 309, 2014.

TRIPATHI, N.; KUMAR, S.; SINGH, R.; SINGH, C.J.; SINGH, P.; VARSHNEY, V.K. Isolation and Identification of  $\gamma$ - sitosterol by CG-MS from the Leaves of *Girardinia heterophylla* (Decne). **The Open Bioactive Compound Journal**, v. 4, p. 25-27, 2013.

TURECK, C.; LOCATELI, G.; CORRÊA, V.G.; KOEHNLEIN, E.A. Avaliação da ingestão de nutrientes antioxidantes pela população brasileira e sua relação com o estado nutricional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.20; n.1; p. 30-42, 2017.

VASQUES, M.A.A.; FONSECA, E.de B.M. Estresse Oxidativo, exercício físico e saúde Encefálica. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v.7, n., p. 76-98, 2018

VEITCH, N.C.; GOODWIN, B.L.; KITE, G.C.; SIMMONDS, S.J. Methoxylated quinolizidine alkaloids from *Acosmium panamense*. *Phytochemistry* 45: 847-850. 1997.

VELLOSA, J. C. R. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo de inibição da enzima mieloperoxidase.** Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara 129 f., 2005

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E.S.; SILVEIRA, S.M. da. Compostos Bioativos com Capacidade Antioxidante e Antimicrobiana em Frutas. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v.4, n. 1, p.111-124, 2018.

VIEIRA, R.A; LAPA, A.J.; LIMA, T.C.M. Atividade do extrato etanólico de *Acosmium subelegans* (Mohlenbr) no sistema nervoso central (SNC) de camundongos. XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Recife, Brasil, 2000.

VIOLANTE, I. M.P. *et al.* Estudo preliminar da atividade fotoprotetora in vitro de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 175-179, 2008.

VISHWAKARM , S.; GOYAL, R.; GUPTA, V.; DHAR, K.L. GABAergic effect of valeric acid from *Valeriana wallichii* in amelioration of ICV STZ induced dementia in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, p. 484- 489, 2016.

YAHARA, T.; JAVADI, F.; ONODA, Y.; QUEIROZ, L. P.; FAITH, D. P.; PRADO, D. E.; AKASAKA, M.; KADOYA, T.; ISHIHAMA, F.; DAVIES, S.; SLIK, J. W. F.; YI, T.; MA, K.; BIN, C.; DARNAEDI, D.; PENNINGTON, R. T.; TUDA, M.; SHIMADA, M.; ITO, M.; EGAN, A. E.; BUERKI, S.; RAES, N.; KAJITA, T.; VATANPARAST, M.; MIMURA, M.; TACHIDA, H.; IWASA, Y.; SMITH, G. F.; VICTOR, J. E.; NKONKI, T. Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies. **Taxon**. v. 62, p. 249–266, 2013

WIEDENFELD, H.; ANDRADE-CETO, A. Pyrone Glycosides from *Acosmium panamense* (Benth.) Yacovlev. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58 c, p. 637-639, 2003.

ZIAEI, A.; RAMEZANI, M.; WRIGHT, L.; PAETZ, C.; SCHNEIDER, B.; AMIRGHOFRAN, Z. Identification of Spathulenol in *Slavia mirzayanii* and the Immunomodulatory Effects. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 557- 562, 2011.