



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, TEOR DE FENÓIS  
TOTAIS E PROANTOCIANIDINAS DO EXTRATO ETANÓLICO E  
COMPOSICAO QUIMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Diospyros hispida* A. DC**

Yury Oliveira Lugo

Uberlândia  
Minas Gerais - Brasil  
2015

YURY OLIVEIRA LUGO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, TEOR DE FENÓIS  
TOTAIS E PROANTOCIANIDINAS DO EXTRATO ETANÓLICO E  
COMPOSICAO QUIMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Diospyros hispida* A. DC**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química  
da Universidade Federal de Uberlândia,  
como requisito parcial para obtenção do  
do título de Mestre em Química

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Chang

Uberlândia  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L951e Lugo, Yury Oliveira, 1989-  
2015 Estudo da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e proantocianidinas do extrato etanólico e composição química do óleo essencial de *Diospyros hispida* A. DC / Yury Oliveira Lugo. - 2015.  
61 f. : il.

Orientador: Roberto Chang.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Plantas dos cerrados - Teses. 3. Óleos vegetais - Teses. 4. Plantas medicinais - Teses. I. Chang, Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 217/PPQUI.

DATA: 20/05/2015

DISCENTE: Yury Oliveira Lugo

MATRÍCULA: 11312QMI009

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e proantocianidinas do extrato etanólico e composição química do óleo essencial de diospyros hispida A. DC.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo da composição do óleo essencial de partes de Diospyros hispida A.DC (Ebenaceae) em 4 estações do ano e sua atividade antioxidante e antimicrobiana.

Às quatorze horas do dia vinte de maio do ano dois mil e quinze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Blyeny Hatalita Pereira Alves, do Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia de Goiás, Alberto de Oliveira e Roberto Chang, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

o mesmo

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 38 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 45 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

(trinta e oito)

Prof<sup>a</sup> Dra. Blyeny Hatalita Pereira Alves  
IFG

Prof. Dr. Alberto de Oliveira  
IQUFU

Orientador(a): Prof. Dr. Roberto Chang – IQUFU

## AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu forças e sabedoria para realizar este trabalho;

À minha família pelo apoio incondicional, em especial meus pais;

Ao meu orientador, professor Dr. Roberto Chang, por ter me ajudado de todas as formas na execução deste trabalho;

Ao professor Dr. Evandro Afonso do Nascimento pelas contribuições científicas nas análises dos óleos essenciais;

Ao professor Dr. Glein Monteiro de Araújo, do Instituto de Biologia da UFU, pela identificação do material vegetal;

Aos professores doutores Sérgio Antônio Lemos de Moraes, Alberto de Oliveira e Francisco José Torres de Aquino do grupo de pesquisa;

Aos colegas de laboratório por toda ajuda nos experimentos, em especial a Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa e a doutoranda Carla de Moura Martins;

Ao professor mestre Mário Machado Martins e aos alunos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU pela realização das análises de citotóxicidade;

Ao professor Doutor Ricardo Reis Soares da Faculdade de Engenharia Química (FEQ-UFU), pela permissão para a utilização do equipamento de CG-EM;

À Banca examinadora, pelo aceite ao convite e pela compreensão em relação aos prazos de entrega dos trabalhos e agendamento para defesa desta dissertação;

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQUFU) e ao programa de Pós-Graduação em Química da UFU;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 A importância das plantas medicinais e óleos essenciais.....	11
1.2 O Cerrado.....	16
1.2.1 Plantas medicinais do Cerrado.....	18
1.3 A espécie <i>Diospyros hispida</i> DC.....	20
1.3.1 Atividades biológicas da família e espécies.....	22
1.4 Antioxidantes e capacidade sequestrante do radical DPPH.....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	30
3.1 Coleta e preparo do material vegetal .....	30
3.2 Identificação dos compostos voláteis de <i>Diospyros hispida</i> .....	30
3.2.1 Extração dos óleos essenciais.....	30
3.2.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM.....	31
3.2.3 Identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial.....	31
3.3 Preparação do extrato.....	32
3.4 Determinação do teor de fenóis totais .....	32
3.5 Determinação do teor de taninos condensados .....	34
3.6 Determinação do teor de flavonóides.....	35
3.7 Capacidade sequestrante do radical DPPH.....	35
3.7.1 Cálculo do CE50.....	35
3.8 Prospecção fitoquímica dos constituintes presentes no extrato.....	36
3.9 Análises estatísticas.....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	38
4.1 Identificação dos compostos voláteis da espécie.....	38
4.2 Prospecção fitoquímica.....	42
4.3 Capacidade sequestrante do radical DPPH, teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonóides.....	43
4.4 Atividade antileishmania e citotóxica do óleo essencial e extrato etanólico de <i>D. hispida</i> .....	47

<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE A - Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos (C8-C30).....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de <i>D. hispida</i> no início de seca.....	39
Tabela 2: Composição química do óleo essencial das folhas de <i>D. hispida</i> no período de seca.....	41
Tabela 3: Prospecção fitoquímica do extrato bruto das folhas de <i>D. hispida</i> .....	43
Tabela 4 - Valores de CE <sub>50</sub> , fenóis totais (FT), proantocianidinas (P) e flavonoides (F) obtidos para o extrato etanólico de folhas de <i>D. hispida</i> .....	46
Tabela 5 – Valores de CE <sub>50</sub> para a atividade antileishmania e citotoxicidade...	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparação dos tipos de organismos que deram origem a novos compostos nos anos de 2001 e 2010.....	11
Figura 2: Produtos naturais como fonte de novas drogas.....	12
Figura 3: Quinina e alguns análogos antimaláricos sintéticos.....	12
Figura 4: Metabólitos secundários de organismos marinhos que representam importantes modelos para desenvolvimento de fármaco...	13
Figura 5: Via do ácido chiquímico para a biossíntese de compostos fenólicos e alguns alcaloides.....	15
Figura 6: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	16
Figura 7: Abrangência do Cerrado no território brasileiro.....	17
Figura 8: Distribuição geográfica da espécie <i>Diospyros hispida</i> DC.....	21
Figura 9: <i>Diospyros hispida</i> DC.....	21
Figura 10: Estrutura da plumbagina .....	22
Figura 11: Estruturas da maritrona (1), chitranona(2), zeylaonona (3).....	22
Figura 12: Estrutura crassiflorona (4) e gerberinol (5).....	23
Figura 13: Estrutura da diospirina.....	24
Figura 14: Estrutura química de alguns compostos fenólicos.....	26
Figura 15: Estrutura básica de um flavonóide.....	27
Figura 16: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu .....	33
Figura 17: Reação da vanilina com uma proantocianidina .....	34
Figura 18: Estrutura do ( <i>E</i> )-nerolidol.....	40
Figura 19: Reação entre um composto fenólico e o radical livre DPPH..	44
Figura 20: Curva de calibração do ácido gálico.....	44
Figura 21: Curva de calibração para determinação de proantocianidinas.....	45
Figura 22: Curva de calibração para a determinação de flavonoides.....	46

## LISTA DE ABREVIações

**ANOVA** - Analysis of variance

**BHT** - Butilidróxitolueno

**CC50** - Concentração citotóxica: 50% de viabilidade celular

**CCD** – Cromatografia em camada delgada

**CE50** - Concentração eficiente. Quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

**CG/EM** - Cromatografia gasosa/espectroscopia de massas

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DP** - Desvio padrão

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

**EAG** - Equivalentes de ácido gálico

**ECAT** - Equivalentes de catequina

**EQ** – Equivalente de quercetina

**FT** - Fenóis totais

**HUFU** - Herbarium Uberlandense

**IA** - Índice aritmético

**N.I.** - Não identificado

**NP/PEG** - Natural products / polyethylene glycol

**P** - Proantocianidinas

**PBS** - Phosphate buffered saline

**TIC** - Total ions chromatogram

**TR** - Tempo de retenção

**TRIS** - Tris(hidroximetil)aminometano

**UV** - Ultravioleta

## RESUMO

A espécie *Diospyros hispida* pertence à família Ebenaceae, sendo conhecida também como, *Diospyros burchellii* Hiern, *Diospyros mattogrossensis* Hoehne, *Diospyros coccolobifolia* var. pubescens e popularmente conhecida como olho-de-boi, caqui-do-mato, caqui-do-cerrado, bacupari-bravo e caqui-bravo. Esta espécie tem sido usada por comunidades do Cerrado para o tratamento de doenças infecciosas. Não há relatos na literatura sobre a composição do seu óleo essencial, ou sobre seu extrato etanólico e nem sobre a sazonalidade. A composição química do óleo essencial foi determinada no mês de abril com a prevalência de álcoois monoterpênicos e sesquiterpênicos. As análises por CG-EM do óleo essencial de *D. hispida*, na mesma época, revelaram a presença de 30 compostos, sendo o sesquiterpeno (*E*)-nerolidol, o principal constituinte com 26,53%. Já para o mês de agosto, o óleo essencial apresentou alcanos de cadeia longa, sendo o constituinte mais abundante, o (*Z*)-hex-3-en-1-ol com concentração de 23,62%. O resultado obtido para a determinação de fenóis totais para o extrato etanólico de *D. hispida* foi  $161,87 \pm 1,32$  mg EAG/g de extrato. O teor de proantocianidinas para o mesmo extrato foi de  $54,57 \pm 7,33$  mg ECAT/g de extrato. A atividade antioxidante pelo método do DPPH apresentou um valor de  $CE_{50}$  de  $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para a prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *D. hispida* utilizando-se o revelador NP/PEG, detectou-se a presença de flavonoides. Com os reveladores Liebermann-Burchard e vanilina sulfúrica verificou-se a presença de substâncias fenólicas, triterpenos e esteróides. Utilizando-se os reveladores Iodo-Cloro-Platinado e Dragendorff, foi verificado que este extrato não apresentou alcaloides.

**Palavras-chave:** óleo essencial, *Diospyros hispida*, atividade antioxidante, extrato etanólicos

## ABSTRACT

*Diospyros hispida* species belongs to the Ebenaceae family. It is also known as *Diospyros burchellii* Hiern, *Diospyros mattogrossensis* Hoehne, *Diospyros coccolobifolia* var. pubescens and is popularly known as olho-de-boi, caqui-do-mato, caqui-do-cerrado, bacupari-bravo e caqui-bravo. This species has been used for the Cerrado communities for treating infectious diseases. There are no reports in the literature about the composition of the essential oil *Diospyros hispida*, or the ethanolic extract, and neither on its seasonality. The essential oil chemical composition was determined in April with the prevalence of monoterpenes and sesquiterpenes alcohols. The analysis by GC-MS of the essential oil of *D. hispida*, at the same time, revealed the presence of 30 compounds, and the sesquiterpene (*E*)-nerolidol, as the main constituent with 26.53%. For the month of August, the essential oil presented long-chain alkanes and the most abundant constituent was (*Z*)-hex-3-en-1-ol with concentration of 23.62%. The values obtained for the determination of total phenols for the ethanolic extract of *D. hispida* was  $161.87 \pm 1.32$  mg of GAE/g of extract. The proanthocyanidin content for the same extract was  $54.57 \pm 7.33$  mg of ECAT/g of extract. The antioxidant activity by DPPH method showed an  $EC_{50}$  value of  $11.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . For phytochemical screening of the ethanol extract of the leaves of *D. hispida* using the developer NP / PEG, detected the presence of flavonoids. With the Liebermann-vanillin sulfuric Burchard developers and verified the presence of phenolic substances, triterpenes and steroids. Using the developers Iodo-Chloro-platinum and Dragendorff, it was found that this extract showed no alkaloids.

**Keywords:** essential oil, *Diospyros hispida*, antioxidant activity, ethanolic extract

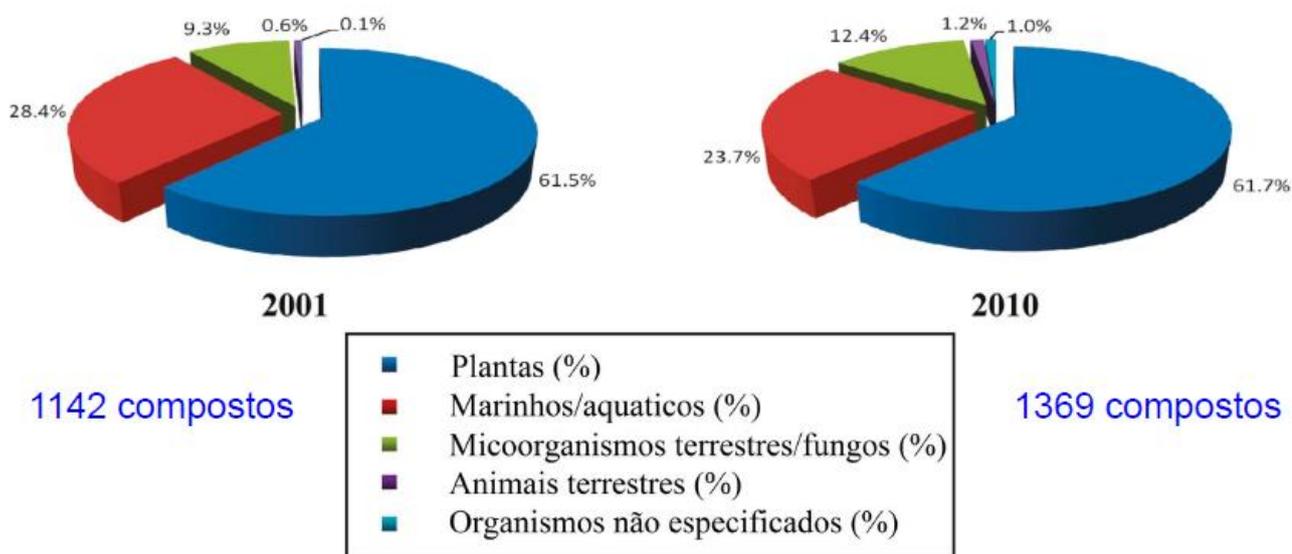
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A importância das plantas medicinais e óleos essenciais

O saber popular sobre plantas sempre foi a principal fonte de descoberta dos princípios ativos responsáveis no combate de doenças (DI STASI, 1996). De acordo com a OMS, cerca de 80% da população mundial faz uso de tratamentos sugeridos pela medicina tradicional (BASSO et al., 2005).

Segundo Reinbothe, Diettrich e Luckner (1990), a natureza de forma geral tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças. Prova disto, é o gráfico mostrado a seguir comparando-se os tipos de organismos que deram origem a novos compostos publicados no periódico “Journal of Natural Products”, nos anos de 2001 e 2010:

Figura 1: Comparação dos tipos de organismos que deram origem a novos compostos nos anos de 2001 e 2010.



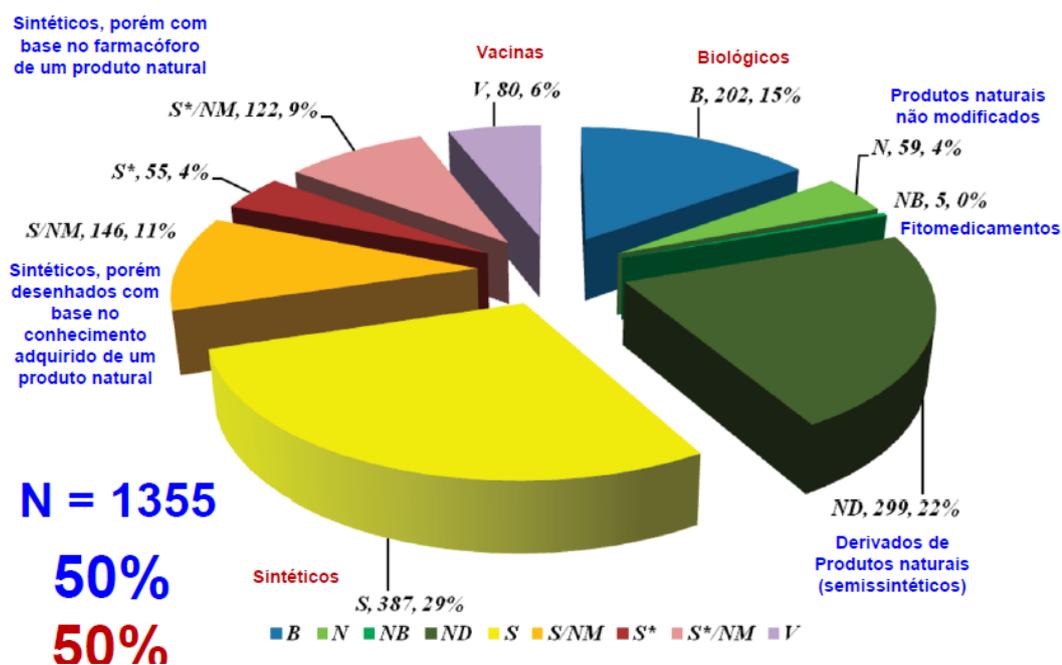
Fonte: Kinghorn, Fletcher e Chai, Journal of Natural Products, n. 74, p. 1539-1555, 2011.

O grande número de metabólitos biossintetizados pelas plantas foi uma forma de evolução e adaptação desses vegetais às condições ambientais não

favoráveis a eles, como mecanismo de defesa (REINBOTHE; DIETRICH; LUCKNER, 1990).

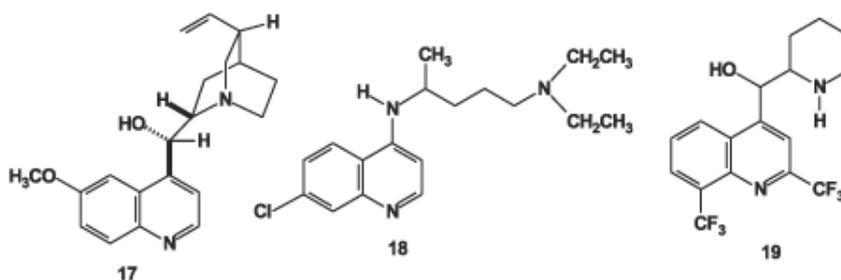
A importância e a potencialidade química das plantas medicinais reflete-se nos dados obtidos em pesquisas científicas atuais, uma vez que 50% dos medicamentos lançados em 2010 originaram-se de produtos naturais, derivados de produtos naturais (semissintéticos), ou sintéticos, porém com base no conhecimento adquirido de um produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2012). Entretanto, esse potencial é ainda muito pouco explorado, considerando todas as espécies de plantas existentes no mundo (BRESOLIN; CECHINEL, 2010).

Figura 2: Produtos naturais como fonte de novas drogas.



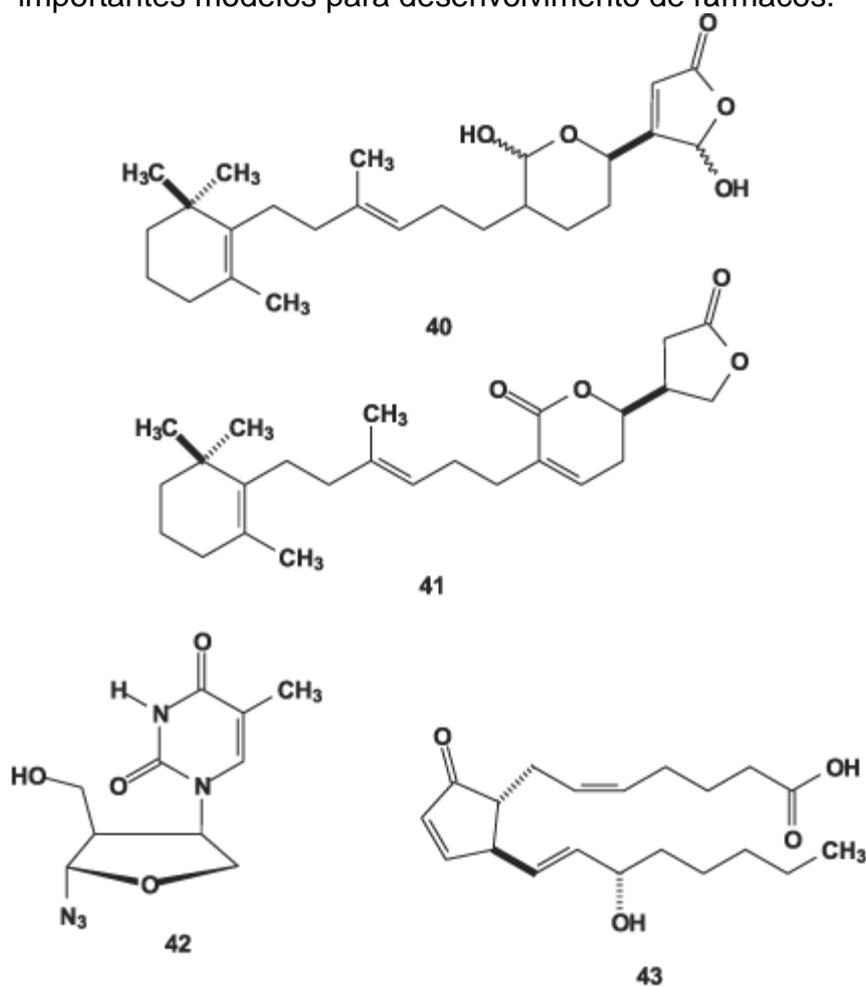
Fonte: NEWMAN e CRAGG, 2012.

Figura 3: Quinina e alguns análogos antimaláricos sintéticos.



Fonte: VIEGAS JR, 2006.

Figura 4: Metabólitos secundários de organismos marinhos que representam importantes modelos para desenvolvimento de fármacos.



Fonte: VIEGAS JR, 2006.

Plantas medicinais e aromáticas apresentam estreita correlação no que se refere à quase totalidade das espécies vegetais produtoras de óleos essenciais, apresentam uso na medicina popular, no tratamento das mais diversas doenças. As plantas aromáticas, na forma de infusatos e seus óleos essenciais, têm uso popular como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarréicos, analgésicos, anti-inflamatórios, diuréticos e hipotensores (ANDRADE et al., 2002).

Segundo Onayade-Sontan (1991), o uso de plantas aromáticas é bastante difundido, em especial no tratamento de infecções microbianas, inflamações, dores, eczemas e na regulação da fertilidade. Entre as propriedades farmacológicas encontradas em óleos voláteis estão a atividade antifúngica (DI STASI, 1996, RASOOLI; ABYANEH, 2004), repelente

(LWANDE et al., 1999; CHENG et al., 2004), anti-inflamatória (JUERGENS; STOBER; VETTER, 1998), anticolinesterásica (MIYAZAWA et al., 1998), e analgésica (SILVA et al., 2003). Ladeira (2002) cita o uso de chás de plantas ricas em óleo volátil para o tratamento de diversas enfermidades.

Uma das classes mais importante é a dos óleos essenciais, que são princípios ativos presentes em plantas aromáticas constituído de uma mistura de substâncias voláteis e hidrofóbicas. Suas características mais peculiares são: aroma agradável, sabor, volatilidade, insolubilidade ou pouca solubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos e, quando liberados pelas plantas, agem como sinais químicos para a comunicação entre espécies, na proteção contra microrganismos, herbívoros e intempéries ambientais. Os óleos essenciais podem apresentar atividade ótica, tem coloração incolor ou amarelada e em temperatura ambiente estão na forma oleosa (SIMÕES E SPITZER et al., 2004).

A composição destes óleos é bastante complexa, uma vez que se podem encontrar diversos compostos aromáticos e alifáticos, derivados de fenilpropanóides e terpenóides. Apresentam, normalmente, um ou dois compostos majoritários na sua constituição (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003).

Fatores como variabilidade genética intraespecífica, condições ambientais, épocas de colheita, condições de cultivo, tipo de solo e parte da planta analisada podem influenciar no teor e na composição química dos óleos essenciais (HAY; SVOBODA, 1993).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes de compostos, porém os terpenos e os fenilpropanóides são as classes de compostos mais comumente encontradas. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos, bem como os diterpenos, constituintes minoritários dos óleos essenciais.

Castro et al. (2004), analisando cinco acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) em localidades diferentes do estado de Minas Gerais, nas mesmas condições de cultivo, observaram que houve uma diferença significativa na quantidade e na composição do óleo essencial estudado.

Atribuíram o fato a vários fatores, como constituição genética das plantas que influenciam na produção de determinados metabólitos, época de colheita, idade da planta, horário do dia da coleta, variedades das espécies, condições climáticas e de solo.

Há vários estudos sobre óleos essenciais e suas composições químicas e principalmente de suas propriedades biológicas, que vão desde atividade antifúngica, antiprotozoária, antileishmanica, antimicrobiana, dentre outras (BAKKALI et al., 2008, BRAGA et al., 2007, FABRI et al., 2012, BURT, 2004, COWAN, 1999).

A composição química dos óleos voláteis pode ser formada através de origens biossintéticas distintas (Figura 3), ou seja, a partir de derivados de fenilpropanóides, via ácido chiquímico, e de terpenóides via acetilcoenzima A (BRUNETON, 2001, SIMÕES;SPITZER, 2003).

Os fenilpropanóides são formados via ácido chiquímico que por sua vez é formado a partir da condensação do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fosfato. O ácido chiquímico é responsável pela formação das duas unidades básicas dos fenilpropanóides, o ácido cinâmico e o ácido p-cumárico que por meio de redução, oxidação e ciclização formam os alilbenzenos, aldeídos aromáticos, propenilbenzenos e cumarinas (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Figura 5: Via do ácido chiquímico para a biossíntese de compostos fenólicos e alguns alcaloides.

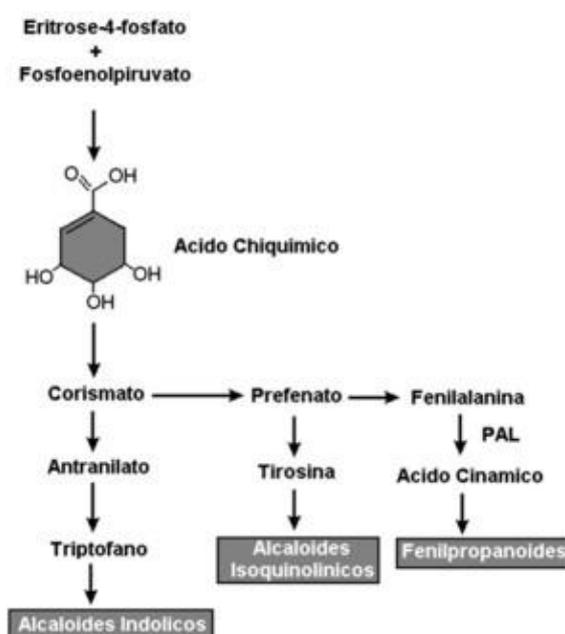
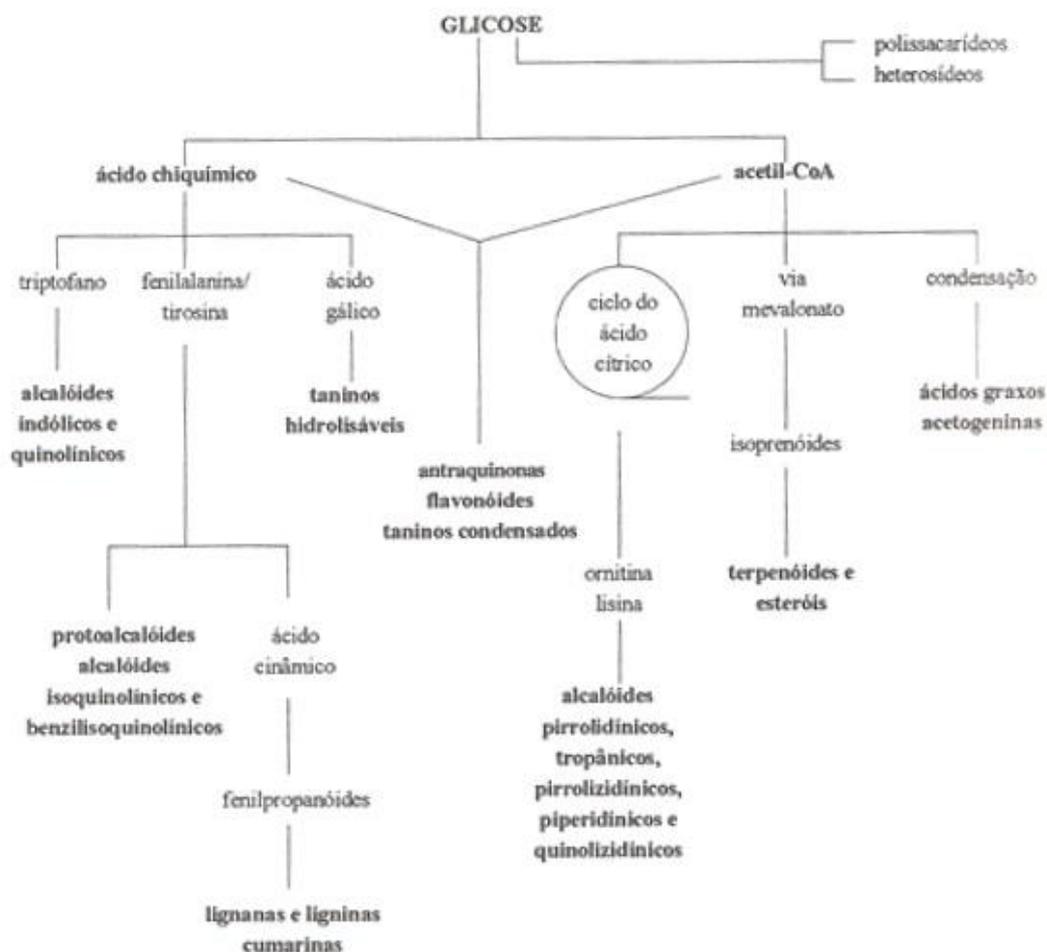


Figura 6: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: SIMÕES E SPITZER, 2003.

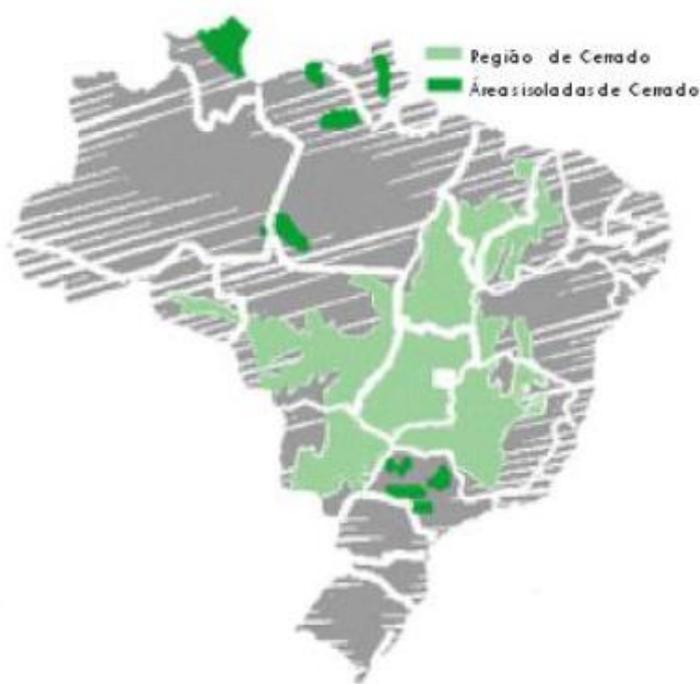
Existem na literatura alguns trabalhos que relatam o uso de várias plantas medicinais do Cerrado pela população (VIEIRA, 1991, MARTINS, 2000, RODRIGUES; CARVALHO, 2001, GUARIM NETO; MORAIS, 2003), contudo ainda é necessário realizar estudos etnobotânicos para aprofundar os conhecimentos de espécies utilizadas na medicina popular, identificar essas espécies e as substâncias biologicamente ativas para comprovar a ação terapêutica e também avaliar sua toxicidade.

## 1.2 O Cerrado

Atualmente há vários sistemas de classificação para as grandes áreas de vegetação existentes no país, sendo seis biomas continentais

reconhecidos: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa. O bioma Amazônia é o de maior extensão territorial, com 49,29% da área total, enquanto o Pantanal é o de menor, com 1,76%. O Cerrado possui 23,92% de extensão e ocupa a totalidade do Distrito Federal, mais da metade dos estados de Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Tocantins (IBGE, 2004).

Figura 7: Abrangência do Cerrado no território brasileiro.



Fonte: IBGE, 2004.

Durante as décadas de 1970 e 1980 houve um rápido deslocamento da fronteira agrícola, com base em desmatamentos, queimadas, uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, que resultou em 67% de áreas do Cerrado “altamente modificadas”, com voçorocas, assoreamento e envenenamento dos ecossistemas. Atualmente restam apenas 20% de área conservada, o que fez com que a região fosse incluída na lista de *hotspots* (IBAMA, 2014).

Em 2004 foi lançado pelo Ministério do Meio Ambiente o Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado com o

objetivo de promover a conservação, restauração e recuperação no Bioma Cerrado para reverter os impactos socioambientais negativos causados pela ocupação desordenada (BRASIL, 2004).

Embora bastante desconhecida, a flora do Cerrado é riquíssima, sendo constituída por cerca de 3.000 espécies arbóreas, sendo 1.000 delas do estrato arbóreo-arbustivo e 2.000 do herbáceo-subarbustivo. Como famílias de maior expressão destacam-se as Leguminosas (Mimosaceae, Fabaceae e Caesalpiniaceae), as Gramíneas (Poaceae) e as Compostas (Asteraceae). Entre os recursos naturais disponíveis, destaca-se o recurso terapêutico oferecido pelas plantas medicinais. Porém ainda há carência de estudos destas plantas medicinais úteis do Cerrado, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

O clima do Cerrado é caracterizado por duas estações climáticas bem definidas: invernos secos e verões chuvosos. A estação seca ocorre entre os meses de abril e setembro. Nesse período a umidade relativa do ar é baixa, contribuindo para a ocorrência de incêndios e a estação chuvosa ocorre entre os meses de outubro a março, período onde a flora do Cerrado se torna mais exuberante. O solo apresenta características bem marcantes, é bastante antigo, quimicamente ácido (pH 4,3 a 6, 2) e profundo. Devido a profundidade do solo e a presença de água nas camadas mais profundas, as árvores e os arbustos possuem complexos sistemas de raízes que os ajudam no período mais seco, garantindo a sobrevivência e proteção contra as queimadas. Devido ao fato de abranger uma área muito grande, a vegetação do Cerrado é dividida em onze tipos fitofisionômicos, agrupados em três formações: Florestal (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), Savânica (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e Campestre (Campo Sujo, Campo Rupestre e Campo Limpo) (SANTOS et al., 2011).

### **1.2.1 Plantas medicinais do Cerrado**

O fruto da espécie do Cerrado *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), conhecida como faveira, é uma das fontes da rutina, flavonoide que compõe medicamentos que combatem a fragilidade capilar. A infusão das folhas de

mangaba, *Hancornia speciosa* (Apocinaceae) é utilizada no tratamento da tuberculose e de úlceras e o chá das folhas para cólica menstrual. A espécie *Guarea kunthiana* (DE MESQUITA et al., 2005) apresentou importante atividade para as formas promastigotas de *Leishmania donovani* com IC<sub>50</sub> de 10µg/mL.

O estudo do extrato hexânico da casca da raiz de *Matayba guianensis* em *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina culminou no isolamento de quatro matayosideos ativos inéditos (DE MESQUITA et al., 2005, DE MESQUITA et al., 2007).

As espécies de *Xylopiya aromatica* e *Xylopiya emarginata* (Annonaceae) tiveram excelentes resultados quando testadas em *Plasmodium falciparum* (DE MESQUITA et al., 2007). Os extratos hexânicos em diclorometano das folhas de *Schinus terebenthifolius* (Anacardiaceae) demonstraram atividade citotóxica em células tumorais (DE MESQUITA et al., 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* reportaram atividades antibacterianas, antifúngica, cicatrizante e antileishmanial de *S. terebenthifolius* (LUCENA et al., 2006, BRAGA et al., 2007).

As espécies do Cerrado, *Cupania vernalis*, conhecida como olho de cotia e utilizada como anti-inflamatório e *Serjania lethalis*, conhecida como timbó e usada como analgésico e anti-inflamatório demonstraram acentuada atividade anti-*Plasmodium* e anti-*Leishmania* (DE MESQUITA et al., 2007). Além dessas, outras espécies do Cerrado, usadas tradicionalmente para tratar a malária ou como antipiréticos são descritas pela importante atividade anti-plasmódio, como *Aspidosperma* spp., *Annona squamosa* (EL TAHIR; SATTI; KHALID, 1999), *Casearia elliptica* (SIMONSEN et al., 2001), *Duguetia hadrantha* e *Xylopiya frutescens* (JENETT-SIEMS et al., 1999).

Os extratos diclometânicos de raízes de *Brosimum gaudichaudii* e *Lantana Camara* foram capazes de inibir o fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*. A primeira espécie é amplamente utilizada no Brasil para o tratamento do vitiligo (DEF, 2000). Essa atividade é atribuída à presença das furanocumarinas, bergapteno e psolareno (ALVES; SILVA; BRANDÃO, 2000).

Fisher et al., (2004) mostraram que as espécies do Cerrado, *Cissampelos ovalifolia* e *Siparuna guinensis* utilizadas na medicina tradicional

para o tratamento de febres e como antimalárico (RODRIGUES; CARVALHO, 2001) foram ativas em *P. falciparum* corroborando o uso tradicional.

Da infusão de folhas de *Byrsonima crassa*, utilizada tradicionalmente como febrífuga e para o tratamento de doenças de pele foram isolados compostos com atividades biológicas como imunomodulação, proteção contra o câncer e doenças cardiovasculares (MONTOURO et al., 2005).

### **1.3 A espécie *Diospyros hispida* DC**

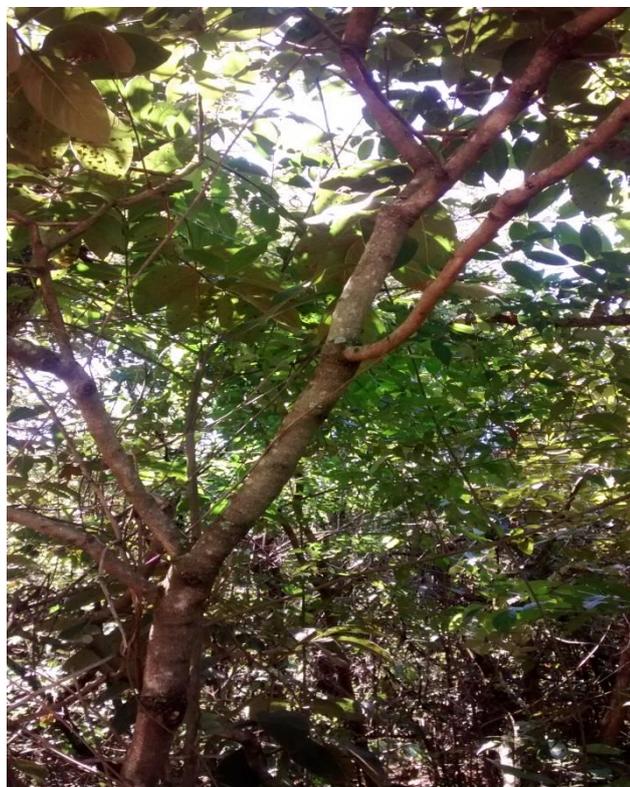
A espécie *Diospyros hispida* pertence à família Ebenaceae, sendo conhecida também como, *Diospyros burchellii* Hiern, *Diospyros mattogrossensis* Hoehne, *Diospyros coccolobifolia* var. pubescens e é vulgarmente conhecida como olho-de-boi, caqui-do-mato, caqui-do-cerrado, bacupari-bravo e caqui-bravo. Foi descrita como sendo uma planta dióica, de 4 a 7 metros de altura, com copa globosa e densa, tronco tortuoso, casca grossa, com folhas alternas, simples, e pilosas. Sua floração ocorre entre os meses de agosto a novembro e a frutificação entre os meses de dezembro a março. Ela é uma espécie nativa, não endêmica, podendo ser encontrada em Rondônia, Tocantins, Pará, Bahia, Maranhão, Piauí, Ceara, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, distribuída pelos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Esta espécie tem sido usada por comunidades do Cerrado para o tratamento de doenças infecciosas (LORENZI, 2002).

Figura 8: Distribuição geográfica da espécie *Diospyros hispida* DC



Fonte: Reflora, 2010.

Figura 9: *Diospyros hispida* DC

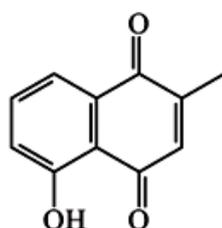


Fonte: o autor

### 1.3.1 Atividades biológicas da família e espécies

A família Ebenaceae tem mais de 350 espécies espalhadas nos trópicos e subtropicais. Mais de 300 compostos já foram identificados no gênero *Diospyros*, rico em naftoquinonas e triterpenos. O primeiro composto isolado, em 1952, foi a plumbagina, uma naftoquinona encontrada principalmente nas folhas de plantas desse gênero. A plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona), pigmento de coloração amarela foi encontrada na espécie *D. marítima* (VAN DER VIJVER, 1972).

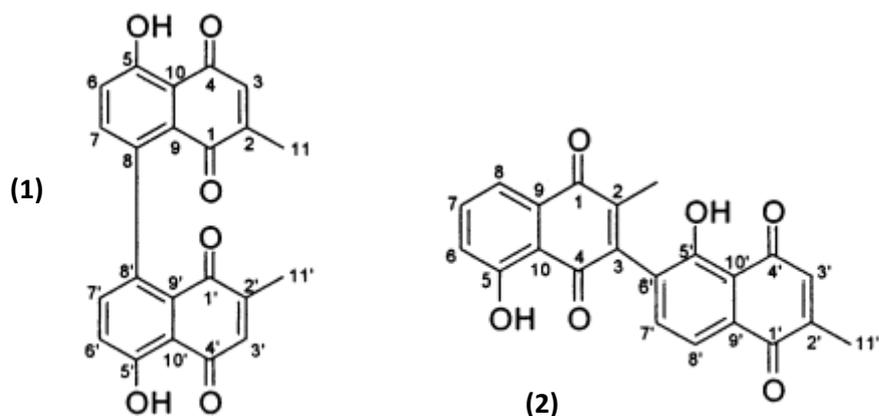
Figura 10: Estrutura da plumbagina



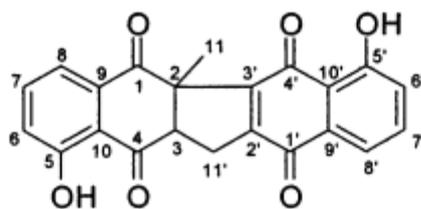
Fonte: PAIVA et al., 2004.

Gu et al. (2004) mostraram que a plumbagina possui forte atividade antibacteriana e antifúngica. Outros compostos foram isolados a partir de *D. marítima* como a maritina (1), a chitranona (2), a zeylanona (3) e a 4,8-dihidroxi-6-metil-1-tetralona.

Figura 11: Estruturas da maritina (1), chitranona(2), zeylanona (3)



(3)

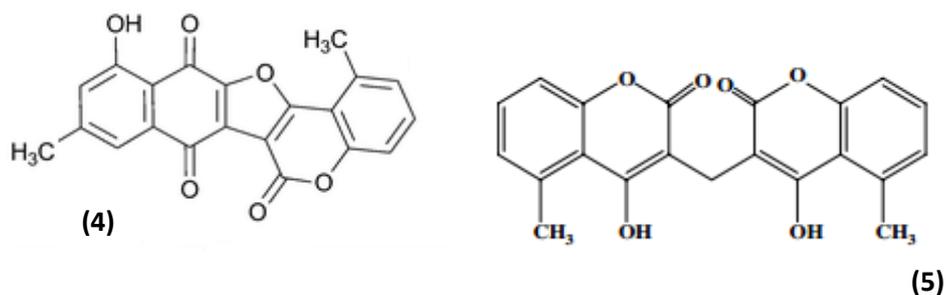


Fonte: GU et al., 2004.

O estudo do extrato clorofórmico dos galhos de *Diospyros discolor* permitiu o isolamento de 4 novos triterpenos desta espécie: 24-etil-3 $\beta$ -metoxilano-9-(11)-en-25-ol, 3 $\beta$ -metoxi-24-metilelano-9-(11)-en-25-ol, 3 $\beta$ -metoxi-25-metil-24-metilelano-9-(11)-en-21-ol, 3 $\beta$ -metoxi-24-metilelano-9-(11),25-dien-24-ol (GANAPATY et al., 2005, CHEN et al., 2007).

O estudo do extrato diclorometânico da casca do caule de *Diospyros crassiflora* (TANGMOUO et al., 2006) permitiu isolar uma naftoquinona, a crassiflorona, além do gerberinol. A atividade antimicrobiana desses compostos foi avaliada e foram considerados ativos em *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* e *Candida krusei*.

Figura 12: Estrutura crassiflorona (4) e gerberinol (5)

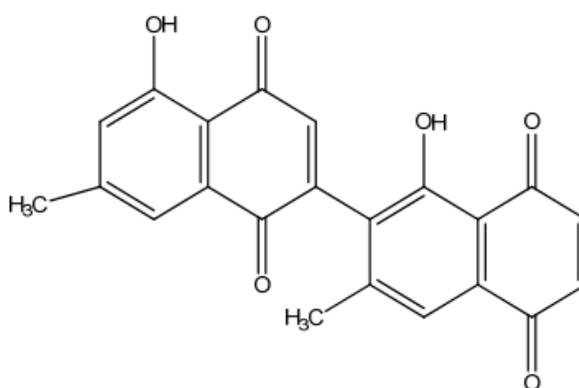


Fonte: TANGMOUO et al., 2006.

A investigação do extrato clorofórmico das raízes de *Diospyros assimilis* permitiu isolar seis derivados naftalenos: 4-hidróxi-3,5-dimetoxi-2-naftaldeído, 4-hidróxi-5-metóxi-2-naftaldeído, 5-hidróxi-4-metóxi-2-naftaldeído, 8'-hidróxi-isodiospirina, diospirina e plumbagina. Esses compostos foram testados contra os protozoários *Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp. e

*Plasmodium* sp. As quinonas diméricas, 8'hidroxiisodiospirina e diospirina mostraram acentuada atividade em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania donovani*, moderada atividade em *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina e à pirimetamina, e baixa atividade em *T. cruzi* (GANAPATY et al., 2006).

Figura 13: Estrutura da diospirina



Fonte: GANAPATY et al., 2006.

As frações lipofílicas da raiz e do caule de *Diospyros anisandra* apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 6,25 µg/mL em *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Clostridium gloeosporioides*. O estudo do extrato hexânico da mesma espécie, resultou no isolamento da plumbagina (BORGES-ARGÁEZ et al., 2007). O extrato metanólico da espécie inibiu cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* a uma concentração de 25 µg/mL.

A partição acetato de etila da raiz de *D. hispida* mostrou valores de CE<sub>50</sub> de 1µg/mL contra *Plasmodium falciparum*. Este extrato não apresentou atividade citotóxica frente a células de mamíferos, resultando em um índice de seletividade (IS) de 435,8. Valores positivos de IS indicam que os extratos e óleos essenciais mostraram maior seletividade pelos microrganismos que toxicidade às células (ALBERNAZ et al., 2010).

#### **1.4 Antioxidantes e capacidade sequestrante do radical DPPH**

Nos últimos anos, estudos na área de estresse oxidativo tiveram o seu foco voltado a esclarecer a importância dos radicais livres no processo patológico de síndromes como câncer, aterosclerose, inflamação e diabetes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Inúmeras evidências levaram a crer que estas espécies químicas possuem um papel fundamental no desenvolvimento destas doenças (SOUZA et al., 2007). Os radicais livres podem ter a sua origem endógena, sobretudo nos processos metabólicos, mais especificamente na respiração celular (CERUTTI, 1994).

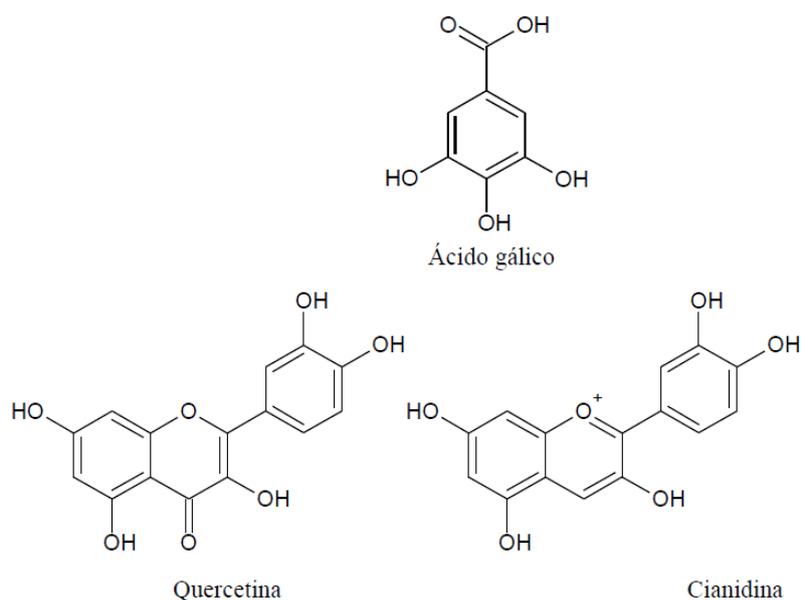
As mais importantes reações de radicais livres em células aeróbicas envolvem o oxigênio molecular e seus derivados, nitrogênio, peróxidos e metais de transição (DE ZWART et al., 1999). A produção contínua de radicais livres ativa um tipo de mecanismo chamado defesa antioxidante, que limita a ação destas espécies químicas sobre as biomoléculas (SIES, 1993, HALLIWELL et al., 1995). Neste mecanismo de defesa, envolvem-se compostos antioxidantes que vão desde enzimas a pequenas moléculas obtidas pela dieta (VASCONCELOS et al., 2007).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que tem a capacidade de inibir uma ação oxidativa, quando presente em baixa concentração (SIES; STAHL, 1995). São compostos que protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994). Dentre os antioxidantes naturais, se encontram classe de compostos com maior potencial antioxidante e os mais estudados, que estão distribuídos amplamente na natureza, são eles os compostos fenólicos, carotenóides e tocoferóis (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996, LIU, 2004).

Entre os fitocompostos, os compostos fenólicos assumem um papel de destaque, uma vez que estes compostos exercem funções biológicas em plantas e despertam interesse por suas diversas propriedades farmacológicas (ANGELO; JORGE, 2007). Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário de plantas, que exercem funções fisiológicas essenciais (TSIMIDOU; PAPADOPOULOS; BOSKOU, 1992; SOARES, 2002). Esta classe está incluída na categoria de interruptores de radicais livres,

sendo eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Alguns fenólicos não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, como tal se inserem os taninos e as ligninas (ANGELO; JORGE et al., 2007). A classe dos compostos fenólicos é importante pelas suas propriedades antioxidantes, antiinflamatória, antimicrobiana e os fenólicos que mais se destacam são flavonóides, antocianinas, taninos (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Figura 14: Estrutura química de alguns compostos fenólicos



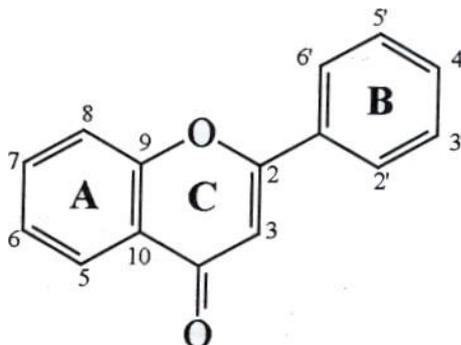
Fonte: SOUZA, 2013

Os flavonóides são polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e da via do acetato. Esta via é precursora de várias classes como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (MANN, 1987; DORNAS et al., 2007). Um derivado do ácido cinâmico (fenilpropano), sintetizado a partir do ácido chiquímico, age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato com posterior ciclização da estrutura (DI CARLO et al., 1999; PIETTA, 2000).

A estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo flavano, constituído de quinze átomos de carbono condensados em três anéis (C6-C3-C6) (DI CARLO et al., 1999), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e

um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A. Os anéis A e B são hidroxilados e podem conter substituintes metoxílicos (MIEAN; MOHAMED, 2001).

Figura 15: Estrutura básica de um flavonóide



Fonte: MIEAN; MOHAMED, 2001.

Plantas medicinais que contêm flavonóides são usadas há milhares de anos na medicina popular (SOOBRAATTEE et al., 2005; MACHADO et al., 2008). No entanto, ainda são pouco usados na terapia convencional embora possuam atividade antioxidante, bem como função protetora conhecida e serem eficaz no tratamento de doenças degenerativas originadas do estresse oxidativo (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; LOPEZ-REVUELTA et al., 2006).

Os taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência e podem ser utilizados para curtimento de couro (RIBÉREAU-GAYON, 1974; COVINGTON, 1997). Esse fenólico contém grupos hidroxila que se ligam permitindo a formação de ligações estáveis com proteínas formando complexos (ANDREO; JORGE, 2006).

Os taninos classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (DA SILVA, 1999; SANCHES et al., 2005). Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, esterificado com açúcares (HAGERMAN et al., 1978; SANTOS; BLATT, 1998; MONTEIRO et al., 2005). Os condensados são constituídos por oligômeros de taninos, sendo os elagitaninos o principal representante deste grupo. (BRUNETON, 2001; SGARBIERI, 1996).

As aplicações biológicas dos taninos estão relacionadas com suas propriedades adstringentes, efeitos antidiarréico e antiséptico (KOLECKAR et al., 2008). A capacidade de precipitar proteínas deste composto confere efeito antifúngico e em processo de cicatrização de feridas e queimaduras podem auxiliar na formação de uma camada protetora sobre tecidos epiteliais lesionados (DE ALMEIDA et al., 2005).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas complexas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destaca-se o de sequestro de radicais livres, utilizando o radical DPPH, que é baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Por este método há um descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio radicalar (HUANG; OU; RONALD, 2005; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Como não há relatos na literatura sobre *Diospyros hispida*, principalmente no que diz respeito à composição do seu óleo essencial, este trabalho teve como objetivo principal contribuir com o estudo do perfil químico do óleo essencial e verificar suas diferenças em função da sazonalidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os constituintes voláteis do óleo essencial das folhas em diferentes períodos sazonais;
- Avaliar a capacidade de sequestro do radical livre DPPH, o teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonóides do extrato bruto etanólico das folhas de *Diospyros hispida*.
- Avaliar as atividades biológicas do óleo essencial e do extrato etanólico frente a protozoários (*Leishmania amazonenses*);
- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial no ensaio *in vitro* com células Vero.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Coleta e preparo do material vegetal

As folhas de *Diospyros hispida* foram coletadas no Parque Municipal Victorio Siquierolli (18°58'34"S; 48°15'21"W), no município de Uberlândia-MG. A coleta foi feita de modo aleatório e de indivíduos diferentes, próximos uns dos outros. A identificação foi feita pelo professor Glein Monteiro de Araújo do Instituto de Biologia da UFU (INBIO) e a exsicata já estava depositada sob o número de registro: 46788, no Herbário Uberlandense da UFU (HUFU).

As folhas foram destinadas a preparação de extrato etanólico, sendo estas secas em estufa a 35°C e posteriormente picadas a mão. A coleta do material vegetal destinado à obtenção dos óleos essenciais, que sempre era fresco, foi feita em duas situações diferentes, no mês de abril, período considerado de início de estiagem na região de Uberlândia e no mês de agosto, período de fim de estiagem. A coleta foi realizada em situações climáticas diferentes com o intuito de comparar as diferenças na constituição química dos óleos essenciais.

Foi feita a determinação da umidade utilizando uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600, sendo que aproximadamente 1 g de amostra foi deixada a uma temperatura de  $105 \pm 5$  °C por quinze minutos até que o teor de umidade permanecesse constante.

### 3.2 Identificação dos compostos voláteis de *Diospyros hispida*

#### 3.2.1 Extração dos óleos essenciais

Folhas frescas foram cortadas e colocadas em um aparelho de Clevenger e o óleo essencial foi extraído com arraste de vapor por 4 h. A mistura água e óleo foi transferida para um funil de separação onde o óleo essencial foi extraído com cerca de 5 mL de diclorometano (MORAIS et al., 2009). Em seguida, o óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado, deixado à temperatura ambiente para evaporação do diclorometano, acondicionado em frasco de vidro âmbar e armazenado à temperatura de -18

± 5 °C até o momento da análise. A massa do óleo foi pesada em uma balança analítica para o cálculo do rendimento em relação à massa seca da amostra inicial.

### 3.2.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM

As amostras dos óleos essenciais foram analisadas em um cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM) da marca Shimadzu, modelo GC17A/QP5010, equipado com coluna capilar da marca Supelco SPB-5 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O gás carreador usado foi o hélio a fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup>, as temperaturas do injetor (modo split 1:20) e detector foram 220 e 246 °C, respectivamente e o volume de injeção foi 1 µL de óleo diluído em diclorometano na concentração de aproximadamente 10 mg/mL. A rampa de aquecimento foi de 60 a 246 °C (3 °C min<sup>-1</sup>). O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram registrados os fragmentos de 40 a 650 Da (ADAMS, 2007).

### 3.2.3 Identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi baseada na comparação do espectro de massas obtido com os espectros das bibliotecas Wiley229, Nist08s, Wiley7 e Shim2205 e na comparação dos índices aritméticos (IA) calculados e tabelados na literatura. A equação utilizada no cálculo do IA (Equação 1) foi proposta por Van den Dool e Kratz em 1963 e adotada recentemente por Adams (ADAMS, 2007) por ser mais precisa que aquela utilizada no cálculo do índice de Kovats:

$$\text{Equação 1:} \quad \text{IA (x)} = 100 (\text{n}^\circ \text{ de carbonos do Pz}) + 100 \frac{t(x) - t(\text{Pz})}{t(\text{Pz}+1) - t(\text{Pz})}$$

Onde:

x = composto no momento t;

t (x) = tempo de retenção do composto em análise;

Pz = alcano antes de x;

t (Pz)= tempo de retenção do alcano antes de x;

Pz + 1 = alcano depois de x;

t (Pz+1)= tempo de retenção do alcano depois de x.

O tempo de retenção dos alcanos lineares, para a aplicação da equação em questão, foi obtido através da análise de padrões (C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub>, pares e ímpares) injetados nas mesmas condições da amostra. Detalhes da identificação estão descritos no apêndice A.

Primeiramente, foram selecionados os espectros de massas das diversas bibliotecas com índice de similaridade igual ou superior a 94%; em seguida, buscou-se na literatura o composto com índice aritmético igual ou próximo ao calculado (ADAMS, 2007; NIST, 2010; THE PHEROBASE, 2003).

A quantificação de cada componente foi obtida através da normalização das áreas dos picos no cromatograma de íons totais (TIC, total ions chromatogram). Os resultados representaram a média dos valores de três análises.

### **3.3 Preparação do extrato**

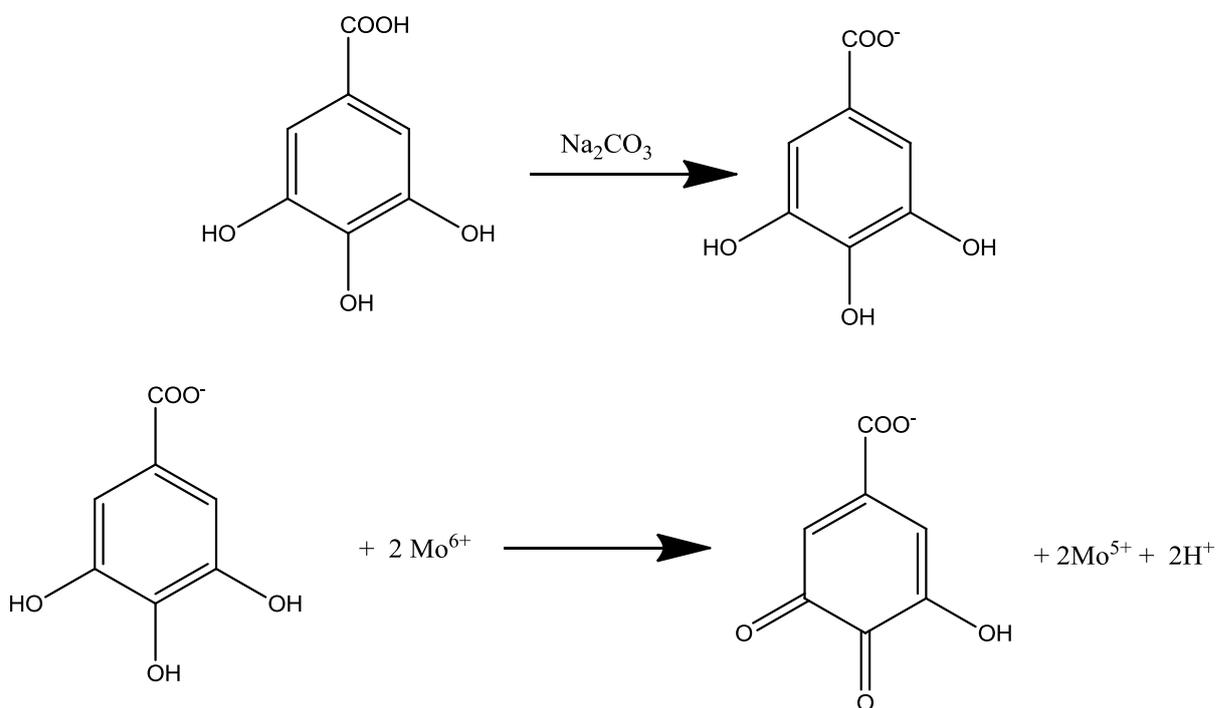
O material vegetal foi previamente seco e triturado e 100 g de folhas foram usadas para preparação do extrato. A preparação foi feita utilizando o método de maceração e o solvente utilizado foi o etanol 95%. Foram feitas 3 macerações repetidas por um período de 48 h cada. Ao final do processo de maceração, foi feita uma filtração simples utilizando papel filtro e em seguida o solvente foi evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Depois de secos os extratos foram liofilizados e o rendimento foi calculado.

### **3.4 Determinação do teor de fenóis totais**

A determinação do teor de fenóis totais presentes no extrato etanólico das folhas foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965; SOUSA et al., 2007) que contém uma mistura de ácidos fosfomolibídico e

fosfotungstico, com formação de um complexo de coloração azul com absorção máxima em 760 nm na presença de um agente redutor. Uma alíquota contendo 25 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume final completado com o solvente. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL da solução metanólica do extrato foi misturada com 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu 10% (v v<sup>-1</sup>) e 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m v<sup>-1</sup>). A mistura foi incubada por 5 min em banho-maria, a 50 °C e posteriormente a absorvância foi medida a 760 nm. Foi preparada uma solução contendo metanol e todos os reagentes com exceção da amostra (branco). O teor de fenóis totais foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg mL<sup>-1</sup>) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato.

Figura 16: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

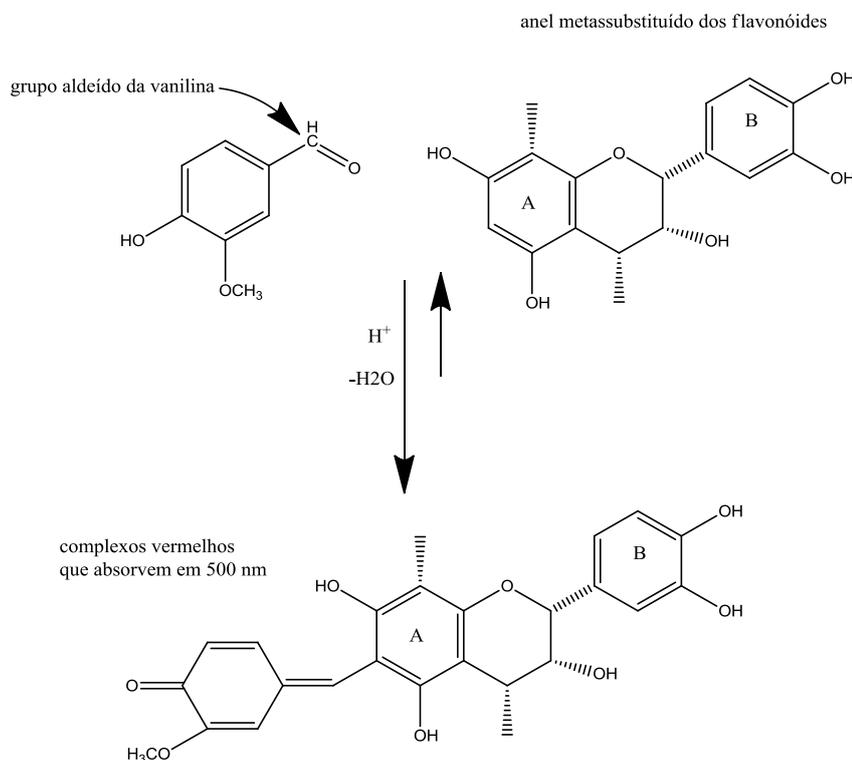


Fonte: OLIVEIRA et al., 2009.

### 3.5 Determinação do teor de taninos condensados

Para a determinação dos taninos condensados (proantocianidinas) foi utilizado o método da vanilina (GODEFROOT et al., 1981 apud MORAIS et al., 2009). Uma alíquota contendo 25 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume final completado com solvente. Desta solução foi retirada uma alíquota de 2 mL, transferida para um tubo de ensaio e adicionados a 3 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70% (v v<sup>-1</sup>), na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>. A mistura foi mantida em banho-maria a uma temperatura de 50 °C (15 min.). A amostra foi esfriada e a absorvância medida a 500 nm. Foi preparada uma solução contendo metanol e todos os reagentes com exceção da amostra (branco). O teor de taninos condensados foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração construída com padrões de catequina (1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 µg mL<sup>-1</sup>). A curva padrão foi construída nas mesmas condições da reação em que a amostra foi substituída pela catequina. Os resultados foram expressos como mg de ECAT (equivalentes de catequina) por grama de extrato.

Figura 17: Reação da vanilina com uma proantocianidina



Fonte: SCHOFIELD et al., 2001 apud CUNHA, 20013.

### 3.6 Determinação do teor de flavonoides

Utilizando-se a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998), o teor de flavonoides foi determinado para o extrato das folhas. Inicialmente, em um tubo de ensaio foram adicionados 2,0 mL de solução em metanol do extrato ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 1,0 mL de solução em metanol de  $\text{AlCl}_3$  5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e 2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada em repouso por 30 min a temperatura ambiente. Em um espectrofotômetro, a absorvância da mistura foi registrada em 425 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a amostra por metanol. O resultado foi expresso em mg de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato e material vegetal. Para isto, a quercetina, em variadas concentrações (40 a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi reagida com a solução de  $\text{AlCl}_3$ , sendo construída uma curva analítica da absorvância obtida *versus* concentração de quercetina utilizada.

### 3.7 Capacidade sequestrante do radical DPPH

A capacidade dos extratos etanólicos das cascas e folhas em sequestrar o radical livre DPPH foi analisada seguindo metodologia descrita na literatura, com modificações, monitorando-se o consumo deste radical pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995, SOUSA et al., 2007).

#### 3.7.1 Cálculo do $\text{CE}_{50}$

Solução do extrato preparada em metanol na concentração de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi diluída nas concentrações de 83, 66, 49, 32, e 15% a partir da amostra original (100%). As medidas das absorvâncias foram feitas das reações entre 0,3 mL das diluições das amostras e 2,7 mL da solução estoque de DPPH ( $C = 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), realizadas à 517 nm, a cada 5 minutos até completar 1 h. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução em metanol do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco. A partir dos valores de absorvância

obtidos no tempo de 60 min. para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH<sub>REM</sub>), conforme a equação 2 (YILDIRIM et al., 2001):

$$\text{Equação 2: } \%DPPH_{\text{REM}} = \frac{[DPPH]_{T=60} - ([DPPH]_{T=0} - \text{BRANCO})}{[DPPH]_{T=0}} \times 100$$

Onde:

[DPPH]<sub>T=60</sub> : Absorvância do DPPH após a reação com o extrato;

[DPPH]<sub>T=0</sub> : Absorvância do DPPH sem o extrato (40 µg mL<sup>-1</sup>);

BRANCO: Absorvância do extrato + metanol.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE<sub>50</sub>), foi determinada a partir de uma curva linear de primeira ordem, obtida plotando-se no eixo das ordenadas as concentrações da amostra (µg mL<sup>-1</sup>) e no eixo das abscissas a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPH<sub>REM</sub>).

### 3.8 Prospecção fitoquímica dos constituintes presentes no extrato

Foram preparadas soluções metanólicas nas concentrações de 1 mg mL<sup>-1</sup> de amostras de extratos brutos das folhas de *D. hispida*. As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada, sendo a sílica a fase estacionária, e para detecção de determinadas classes de substâncias foram utilizados os seguintes reveladores preparados de acordo com a metodologia de Wagner e Bladt (1996):

#### a) Dragendorff (detecção de alcalóides)

Para revelação, foram preparadas duas soluções:

Solução A: Foram dissolvidos 0,85 g de nitrato de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial e adicionados 40 mL de água destilada sob aquecimento.

Solução B: Foram dissolvidos 8 g de iodeto de potássio em 30 mL de água.

Solução estoque: Mistura de A e B (1:1).

Solução para pulverização: 1 mL da solução estoque foi misturada com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água e analisada em Luz UV.

**b) Liebermann-Burchard (detecção de triterpenos e esteróides)**

5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa foi pulverizada com 10 mL da solução, aquecida a 100 °C por 5 a 10 min. e então analisada em luz UV (365 nm).

**c) NP/PEG (detecção de flavonoides)**

Para revelação, foram preparadas duas soluções:

Solução A: Solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 1% (m v<sup>-1</sup>).

Solução B: Solução etanólica de polietileno glicol-4000 a 5% (m v<sup>-1</sup>).

Solução para pulverização: Foram misturados 10 mL da solução A e 8 mL da solução B. Após a borrifação na placa, a análise foi feita sob luz UV (365 nm).

**d) vanilina sulfúrica (detecção de fenóis, triterpenos e fenilpropanóides)**

Para revelação, foram preparadas duas soluções:

Solução A: Solução etanólica de vanilina a 1% (m v<sup>-1</sup>).

Solução B: Solução etanólica de ácido sulfúrico 10% (m v<sup>-1</sup>).

A placa foi pulverizada com 10 mL da solução A, seguida de 10 mL da solução B.

Depois aquecida em chapa aquecedora a 110 °C por 5 a 10 min sob observação, e então analisada em luz UV (365 nm).

**e) Iodocloroplatinado**

0,3g de hidrogênio hexacloroplatinado (IV) foi dissolvido em 100 mL de água e misturado com 100 mL de solução de iodeto de potássio 6%.

A placa foi pulverizada com 10 mL da solução e analisada em luz UV (365 nm).

### 3.9 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média  $\pm$  DP para análises realizadas em triplicata. O teste t foi realizado para comparação do rendimento dos óleos essenciais. A comparação entre as médias foi realizada por Análise de Variância (ANOVA), seguida por teste de Holm Sidak para análises de CE<sub>50</sub>, fenóis totais e proantocianidinas e teste Tukey para análises de CC<sub>50</sub> através do programa SigmaPlot 11.0. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados para denotar diferença estatística significativa.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Identificação dos compostos voláteis da espécie

Os rendimentos dos óleos essenciais de *Diospyros hispida* em diferentes épocas do ano foram de 0,0034%  $\pm$  0,0001403 para o mês de abril (outono) e de 0,01257%  $\pm$  0,006306 para o mês de agosto (inverno). Esse rendimento é baixo, assim como em outras plantas do Cerrado. É importante destacar que a composição química do óleo essencial de *Diospyros hispida* nunca foi estudada e não há relato algum sobre seu óleo essencial e sua composição. A Tabela 1 apresenta a composição do óleo essencial das folhas de *D. hispida* obtida por CG-EM no mês de abril (outono) que corresponde ao início do período de seca. É importante frisar que no mês de abril ainda há a ocorrência de chuvas.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de *D. hispida* no início de seca

Composto	Tempo de retenção (min.)	IA	Concentração (%) (média ± DP)
1. (Z)-hex-3-en-1-ol	4,386	860	1,66 ± 0,48
2. octanol	10,921	1079	1,18 ± 0,28
3. linalol	11,838	1105	13,92 ± 0,81
4. hotrienol	12,100	1111	0,68 ± 0,09
5. α-terpineol	15,847	1199	2,81 ± 0,22
6. nerol + alc. monoterp.	17,523	1237	1,59 ± 0,05
7. N.I.	17,708	1241	0,63 ± 0,03
8. geraniol	18,639	1263	2,08 ± 0,10
9. (E)-2-decenal	18,788	1266	0,98 ± 0,12
10. tigolato de (Z)-hex-3-enila	21,615	1330	0,87 ± 0,01
11. hexenoato de (Z)-hex-3-enila	24,009	1385	1,02 ± 0,07
12. (E)-β-damascenona	24,271	1392	2,65 ± 0,09
13. N.I.	25,644	1424	0,83 ± 0,04
14. (E)-α-ionona	26,099	1435	0,65 ± 0,06
15. N.I.	26,230	1438	1,23 ± 0,14
16. geranil acetona	27,088	1459	0,85 ± 0,04
17. (E)-β-ionona	28,560	1494	1,52 ± 0,07
18. (E,E)-α-farneseno	29,299	1512	5,65 ± 0,10
19. N.I.	30,523	1542	0,85 ± 0,26
20. (E)-nerolidol	31,576	1569	26,53 ± 0,14
21. benzoato de (Z)-hex-3-enila	31,919	1577	14,04 ± 0,18
22. N.I.	32,125	1582	2,97 ± 0,19
23. α-cadinol	35,256	1664	0,80 ± 0,22
24. pentadecanal	37,240	1717	2,91 ± 0,02
25. hexahidrofarnesil-acetona	41,919	1846	0,75 ± 0,12
26. (9Z)-octadeca-9,17-dienal	43,401	1890	1,52 ± 0,06
27. N.I.	43,626	1897	3,86 ± 0,36
28. heptadecanal	44,414	1956	0,72 ± 0,15
29. (E,E)-geranil linalol	48,144	2034	1,03 ± 0,14
30. fitol	50,749	2118	3,18 ± 0,01
TOTAL (%):			99,93

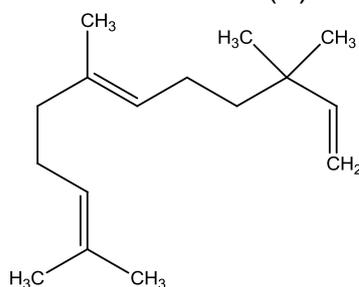
N.I. = não identificado; IA = índice aritmético

Um elevado percentual da composição química do óleo essencial foi determinado (99,93%) com a percentagem de álcoois monoterpênicos e sesquiterpênicos em predominância. As análises por CG-EM do óleo essencial de *D. hispida* permitiram a identificação de 30 compostos. O principal constituinte foi o sesquiterpeno (*E*)-nerolidol, com média de 26,53%. Para a amostra do mês de abril (início de seca) foram detectadas em altas concentrações, o benzoato de (*Z*)-hex-3-enila (14,04%) e o linalol (13,92%). Em concentrações mais baixas foram obtido outros constituintes como: (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno (5,65%), fitol (3,18%), pentadecanal (2,91%),  $\alpha$ -terpineol (2,81%), (*E*)- $\beta$ -damascenona (2,65%), geraniol (2,08%). Os demais constituintes minoritários ficaram com médias abaixo de 2,0%.

O (*E*)-nerolidol é bastante comum em diversos óleos essenciais de plantas medicinais como o nerol (*Citrus aurantium* var. *Sinensis*) gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller ) e capimlimão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf).

O (*E*)-nerolidol é usado como agente aromatizante pelas indústrias alimentícias e apresenta um grande interesse para as indústrias de cosméticos em virtude de ser um fixador natural (FRIZZO, 2000). Atualmente tem sido utilizado em testes de penetração dérmica, como um agente potencializador para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica (KOUDOU et al., 2005).

Figura 18: Estrutura do (*E*)-nerolidol



Fonte: o autor.

A Tabela 2 apresenta a composição do óleo essencial das folhas de *D. hispida* no mês de agosto (inverno) que corresponde ao período de seca na região.

Tabela 2: Composição química do óleo essencial das folhas de *D. hispida* no período de seca.

Composto	Tempo de retenção (min.)	IA	Concentração (%) (média ± DP)
1. ( <i>E</i> )-2-hexenal	4,269	851	3,22 ± 0,41
2. ( <i>Z</i> )-hex-3-en-1-ol	4,337	855	23,62 ± 4,17
3. hex-2-en-1-ol +1-hexanol	4,627	870	1,45 ± 0,45
4. linalol	11,848	1104	5,64 ± 0,86
5. α-terpineol	15,831	1198	1,03 ± 0,07
6. ( <i>E</i> )-β-damascenona	24,259	1391	1,22 ± 0,05
7. nerolidol B (cis ou trans)	31,591	1569	4,33 ± 0,13
8. benzoato de ( <i>Z</i> )-hex-3-en-1-ol	31,925	1577	6,46 ± 0,16
9. N.I.	32,538	-	1,28 ± 0,03
10. α-cadinol	35,276	1664	1,07 ± 0,04
11. pentadecanal	37,246	1717	4,44 ± 0,15
12. (2 <i>E</i> )(6 <i>E</i> )-farnesol	37,738	1730	1,48 ± 0,18
13. ácido tetradecanóico	39,329	1774	2,30 ± 0,19
14. hexahydrofarnesil-acetona	41,932	1848	2,88 ± 0,40
15. (9 <i>Z</i> )-octadeca-9,17-dienal	43,416	1890	2,68 ± 0,15
16. (9 <i>Z</i> )(12 <i>Z</i> )(15 <i>Z</i> )-octadeca-9,12,15-trien-1-ol	43,648	1897	8,01 ± 0,48
17. tridecanal	44,423	1920	1,22 ± 0,07
18. ácido hexadecanóico	46,196	1974	7,16 ± 0,68
19. eicosano	47,055	2000	1,27 ± 0,38
20. N.I.	49,654	-	1,53 ± 0,07
21. fitol	50,779	2118	5,84 ± 1,19
22. hexadecanal dialil acetal	51,616	2146	1,37 ± 0,21
23. N.I.	51,923	-	1,21 ± 0,13
24. <i>p</i> -metóxicinamato de 2-etilhexila	52,429	2173	1,23 ± 0,22
25. docosano	53,256	2200	1,05 ± 0,03
26. tetracosano	58,920	2400	1,30 ± 0,19

27. pentacosano	61,592	2500	1,15 ± 0,08
28. heptacosano	67,754	2700	1,16 ± 0,11
29. hentriacontano	77,286	3100	3,37 ± 0,23
TOTAL (%):			99,97

N.I. = não identificado; IA = índice aritmético

Já na época de seca a composição do óleo essencial de *D. hispida* apresentou mudanças com a presença de alcanos de cadeia longa como o docosano, tetracosano, pentacosano, heptacosano, hentriacontano. Pelas análises foi possível se obter 29 compostos, dentre eles o mais abundante foi o (Z)-hex-3-en-1-ol com concentração de 23,62%, seguido do (9Z)(12Z)(15Z)-octadeca-9,12,15-trien-1-ol com concentração de 8,01%. Para essa mesma amostra (mês de agosto) também foi detectada a presença em concentrações maiores do ácido hexadecanóico (7,89%), benzoato de (Z)-hex-3-en-1-ol (6,46%), fitol (5,84%), linalol (5,64%), pentadecanal (4,44%), nerolidol B (4,33%).

Além desses compostos houve a presença em menor quantidade de hentriacontano (3,37%), (E)-2-hexenal (3,22%), hexahydrofarnesil-acetona (2,88%), (9Z)-octadeca-9,17-dienal (2,68%) e do ácido tetradecanóico (2,30%). Os demais constituintes minoritários ficaram com médias abaixo de 2,0%.

A presença destes alcanos de cadeia longa no período seco reforça a ideia de que a planta os produz com a principal finalidade de proteção contra perda de água por transpiração excessiva ou fortes radiações solares características desta época (SPERA, 2012).

## 4.2 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica baseia-se na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos (reveladores).

A Tabela 3 apresenta os resultados da prospecção fitoquímica dos constituintes presentes no extrato bruto etanólico das folhas de *D. hispida*.

Tabela 3: Prospecção fitoquímica do extrato bruto das folhas de *D. hispida*

Classe de substâncias	Reveladores	Eluente A	Eluente B
Flavonóides	NP/PEG	+	+++
Fenol, triterpenos e esteróides	Liebermann-Burchard	+++	+++
Fenol, triterpenos, fenilpropanóides	Vanilina sulfúrica	+	+++
Alcalóides	Iodocloroplatinado	-	-
Alcalóides	Dragendorff	-	-

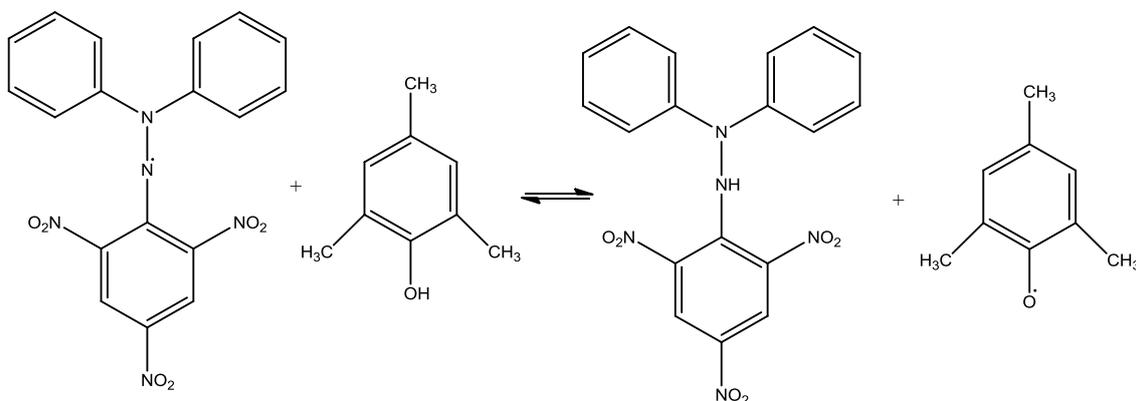
Nota: (+++) forte; (++) moderado; (+) fraco; (-) negativo; eluente A: clorofórmio, metanol, hidróxido de amônio (9,0:1,0:0,25); eluente B: ácido fórmico, ácido acético, acetato de etila e água (1,1:1,1:10,0:2,6).

Esta análise de cromatografia em camada delgada, para o extrato bruto das folhas de *D. hispida* utilizando-se o revelador NP/PEG, detectou a presença de flavonoides. Com os reveladores Liebermann-Burchard e vanilina sulfúrica verificou-se a presença de substâncias fenólicas, triterpenos e esteróides. Estes extratos não apresentaram alcaloides, o que foi verificado utilizando os reveladores Iodo-Cloro-Platinado e Dragendorff. Mediante a isto, se concentrou por meio da extração ácido-base possíveis alcaloides e assim, conclui-se que os mesmos não apresentam esta classe de substâncias.

#### 4.3 Capacidade sequestrante do radical DPPH, teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonóides

O resultado da capacidade de sequestro do radical livre DPPH para o extrato bruto analisado foi expresso através da média das concentrações efetivas (CE50) que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% do radical livre DPPH. Assim, o valor do CE50 foi calculado a partir da equação 2 e os valores obtidos estão na tabela 4 para o extrato bruto da folha.

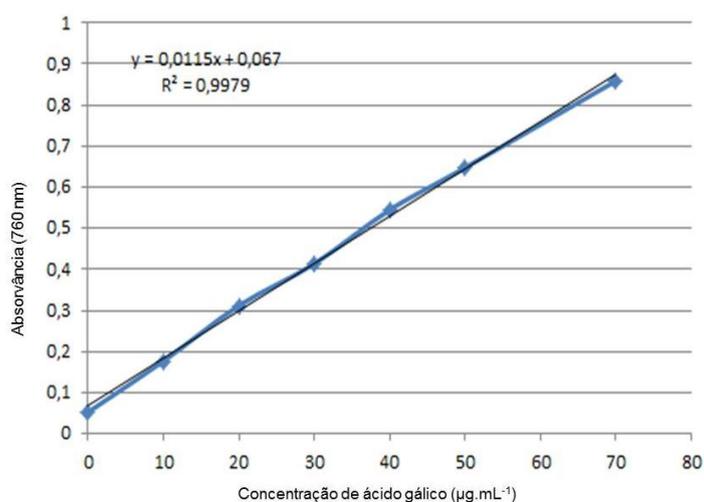
Figura 19: Reação entre um composto fenólico e o radical livre DPPH.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2009

O método Folin-Ciocalteu foi empregado com o objetivo de detectar todas as classes de compostos polidroxifenólicos. A partir da determinação das absorvâncias obtidas para diferentes concentrações de ácido gálico, foi traçada uma curva de calibração para a determinação do teor de fenóis totais na amostra.

Figura 20: Curva de calibração do ácido gálico.



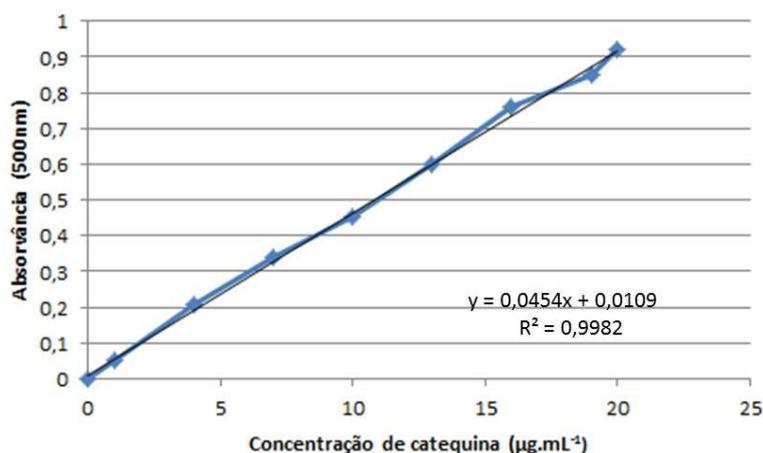
Fonte: o autor

A partir dos valores de absorvância medidos das amostras em 760 nm e empregando a equação da reta obtida pela curva de calibração do ácido gálico, foram determinados os teores de fenóis totais, expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra, apresentados na Tabela 4.

Já o método da vanilina foi empregado com o objetivo de detectar uma classe mais limitada de compostos fenólicos denominada de proantocianidinas (taninos condensados). A partir da determinação das absorvâncias de diferentes concentrações de catequina, foi construída uma curva de calibração (Figura 21).

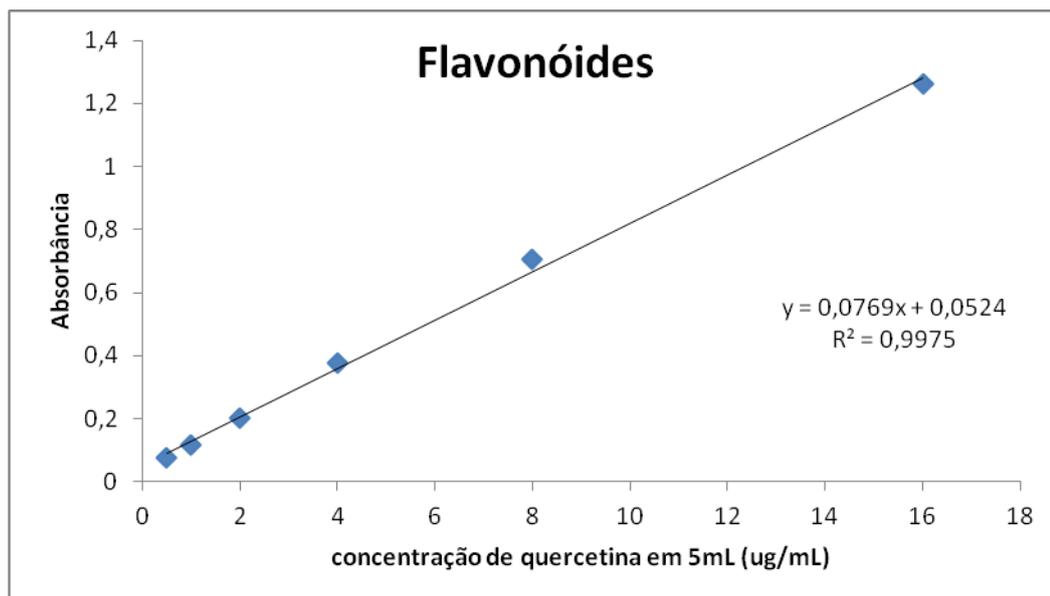
A partir dos valores de absorvância medidos das amostras em 500 nm, e empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração da catequina, os teores de proantocianidinas (taninos condensados) foram obtidos e expressos em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra (mg de ECAT/g<sub>extrato</sub>) (Tabela 4).

Figura 21: Curva de calibração para a determinação de proantocianidinas.



Fonte: o autor

Figura 22: Curva de calibração para a determinação de flavonoides.



Fonte: OLIVEIRA, 2014

Tabela 4: Valores de  $CE_{50}$ , fenóis totais (FT), proantocianidinas (P) e flavonoides (F) obtidos para o extrato etanólico de folhas de *D. hispida*

	$CE_{50} \pm DP$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	FT $\pm DP$ (mg de EAG/ $g_{\text{extrato}}$ )	P $\pm DP$ (mg de ECAT/ $g_{\text{extrato}}$ )	F $\pm DP$ (mg de EQ/ $g_{\text{extrato}}$ )
<b>EFDH</b>	$11,8 \pm 0,29$	$161,8 \pm 1,32$	$54,5 \pm 7,33$	$42,0 \pm 2,25$
<b>BHT</b>	$6,5 \pm 0,2$			

\*EDH: Extrato *Diospyros hispida*; BHT: hidroxitolueno butilado, (antioxidante sintético);  $CE_{50}$ : concentração eficiente; FT: fenóis totais; P: proantocianidinas; F: flavonóides

O resultado obtido para a determinação de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu para o extrato etanólico de *D. hispida* foi  $161,87 \pm 1,32$  mg EAG/g de extrato. E para a determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina sulfúrica para o mesmo extrato foi de  $54,57 \pm 7,33$  mg ECAT/ g de extrato. *D. hispida* apresentou maiores teores de conteúdo fenólico quando comparada aos extratos etanólicos de outras espécies estudadas pelo grupo. Por exemplo, *Qualea multiflora* apresentou conteúdo fenólico de  $134,61 \pm 4,3$  mg EAG/g de extrato (ROCHA, 2014). Extratos das folhas de *Campomanesia pubescens* indicaram teor de fenóis totais de  $115,26 \pm 1,3$  mg EAG/g de

extrato (ROCHA, 2011). O teor de proantocianidinas encontrado nos extratos de *D. hispida* foi maior quando comparado aos valores encontrados nos extratos etanólicos das folhas de *C. pubescens*, com valor de  $17,3 \pm 0,2$  mg de ECAT/g de extrato. Quanto ao valor de  $CE_{50}$ , o extrato de *D. hispida* apresentou um valor de  $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Extratos etanólicos de 16 espécies pertencentes a 5 famílias diferentes foram testados com relação a capacidade sequestradora de DPPH e os valores de  $CE_{50}$  variaram de 11,56 até 184,92  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (MENSOR et al., 2001). Os melhores resultados obtidos foram para extrato das folhas de *Pseudopiptadenia contorta* e para extrato das folhas de *Anadenanthera peregrina* com valores de  $CE_{50}$  de 13,84 e 11,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente (MENSOR et al., 2001). Comparando-se esses valores a capacidade de sequestro do radical DPPH do extrato de *D. hispida*, são próximos e com relação ao BHT não se mostrou tão discrepante.

O resultado obtido para a determinação de flavonóides totais para o extrato etanólico de *D. hispida* foi  $42,0 \pm 2,25$  mg de EQ/g de extrato. O resultado da quantificação de flavonóides totais no extrato de *Ginkgo biloba* L. apresentou um valor médio de 0,037 mg de EQ/g de extrato, (BANOV et al., 2006), bem inferior ao encontrado no extrato de *D. hispida*.

#### 4.4 Atividade antileishmania e citotóxica do óleo essencial e extrato etanólico de *D. hispida*

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da atividade antileishmania e resultados de citotoxicidade com células Vero; foram usadas amostras de extratos etanólicos de folhas e do óleo essencial de *D. hispida*.

Tabela 5: Valores de  $CE_{50}$  para a atividade antileishmania e citotoxicidade.

Amostra	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
	<i>Leishmania amazonensis</i>	Célula Vero
Óleo essencial	$178 \pm 20$	$163 \pm 5$
Extrato etanólico	$>512$	$>512$
Anfotericina B	$0,288 \pm 0,006$	

Quanto menor for o valor de  $CE_{50}$ , melhor é a ação antileishmania da amostra, ou seja, as amostras de óleo essencial de *D. hispida* apresentaram melhor atividade contra o parasita *Leishmania amazonensis* do que o extrato etanólico de folhas da mesma espécie. Comparado à droga-controle, o resultado não é promissor, pois não tem tanta eficácia quanto à Anfotericina B. Provavelmente a composição química do óleo essencial das folhas de *D. hispida* possui compostos ativos frente à este protozoário.

Martins (2012) testou a atividade antileishmania contra *Leishmania amazonensis* usando-se extratos etanólicos de folhas de *Vernonia brasiliiana*, sendo que o valor de  $CE_{50}$  encontrado foi de  $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Este teste indica que o extrato etanólico desta planta, nessa atividade biológica, possui resultados mais promissores que o extrato etanólico de folhas de *D. hispida*. Para o ensaio de citotoxicidade com as Células Vero, quanto maior for o valor de  $CE_{50}$ , melhor será o resultado, indicando que as amostras de óleo essencial e extrato etanólico de *D. hispida* têm baixa citotoxicidade frente às células analisadas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial das folhas de *Diospyros hispida* foi analisado pela primeira vez por meio da técnica cromatográfica CG-EM. Os rendimentos dos óleos essenciais de *Diospyros hispida* foram de 0,0034% e 0,01257% para abril e agosto respectivamente, ambos baixos, comuns às plantas do Cerrado. A partir dos dados obtidos observou-se que houve diferença na composição química dos óleos essenciais. Identificou-se o (*E*)-nerolidol como constituinte majoritário para o mês de abril e o (*Z*)-hex-3-en-1-ol como constituinte majoritário para o mês de agosto. A grande diferença na composição química dos óleos essenciais foi a presença de alcanos de cadeia longa como o docosano, tetracosano, pentacosano, heptacosano, hentriacontano no mês de agosto que corresponde ao período seco. Dessa forma, é notada uma grande diferença nos óleos essenciais desta espécie nas duas épocas estudadas. É possível dessa forma, determinar se a planta está em estresse hídrico ou não, permitindo uma melhor adubação/irrigação para melhor aproveitamento dos frutos ou óleo essencial, se for plantado para fins comerciais. O óleo obtido no mês de Abril possui maior quantidade de linalol, produto usado como fixador na indústria de perfumes.

As investigações por CCD permitiram o descobrimento das classes de compostos existentes que foram comprovados pelos ensaios espectrofotométricos.

O extrato etanólico de *D. hispida* apresentou relação direta entre a atividade antioxidante e o seu conteúdo fenólico, situando-se de modo intermediário entre as outras espécies estudadas pelo grupo.

O ensaio de capacidade de sequestro do radical DPPH é diretamente proporcional ao conteúdo fenólico. Os valores obtidos pelos ensaios de DPPH foram valores melhores que a maioria das outras plantas investigadas pelo grupo. Uma prospecção fitoquímica mais detalhada e específica permitirá o isolamento dos compostos responsáveis por esta atividade.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M. Biological Screening of Brazilian Medicinal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95: 367-373, 2000.

ALBERNAZ, L. C.; DE PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Brasília, v 131, p. 116-121, 2010.

ANDRADE, E. H. A.; RIBEIRO, A. F.; DA SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. **Plantas Medicinais Aromáticas Usadas pela População Ribeirinha**. In: Lisboa, P.L.B. (org.), Caxiuanã. Belém, Museu Paraense Emilio Goeldi. p.421-432, 2002.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 66(1), pp. 01-09. 2007.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Revista Food and Chemical Toxicology** 46, 446–475, 2008.

BANOV D., BABY A. R., DEL BOSCO L. M., KANEKO T. M., VELASCO, M. V. R. Caracterização do Extrato Seco de *Ginkgo biloba* L. em Formulações de Uso Tópico. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, 25 (2): 219-24, 2006.

BASSO, L. A.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; FETT-NETO, A. G.; DE AZEVEDO JR., W. F.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; ASTOLFI FILHO, S.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100(6): 475-506, 2005.

BORGES-ARGÁEZ, R.; CANCHE-CHAY, C. I.; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; MOLINA-SALINAS, G. M. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. **Fitoterapia**, 78: 370-372, 2007.

BRAGA, L. L.; TOLENTINO, G. S.; SANTOS, M. R.; VELOSO, M. D. M.; NUNES, Y. R. F. Germinação de Sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae) sob Influência do Tempo de Armazenamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 258-260, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Programa Nacional de Conservação e **Uso Sustentável do Bioma Cerrado**. Brasília, DF, 2004. Proposta elaborada pelo grupo de Trabalho do Bioma Cerrado, instituído pela Portaria MMA nº. 361 de 12 de setembro de 2004. Disponível em: <<http://cerradobrasil.cpac.embrapa.br/prog%20cerrado%20sustent.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food science and technology**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL, V. F. **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, p.417, 2010.

BRUNETON, J. **Farmacognosia Fitoquímica Plantas medicinales**. 2. ed. Editora Acribia. Zaragoza, 2001.

BURT, S. Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in foods – A Review. **Journal Food Microbiology** 3: 223-253, 2004.

CASTRO, H. G. de; OLIVEIRA, L. O. de; ALMEIDA, L. C. de B.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H. da; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, São Paulo v. 27, n. 1, p. 55-57, jan./fev. 2004.

CERUTTI, P. A. Oxyradicals and cancer. **Lancet**, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

CHEN, C. R.; CHENG, C. W.; PAN, M. H.; LIAO, Y. W.; TZENG, C. Y.; CHANG, C. L. Lanostane-Type Triterpenoids From *Diospyros discolor*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 55: 908-911, ., 2007.

CHENG, S., LIU, J., TSAI, K., CHEN, W. & CHANG, S. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52: 4395-4400, 2004.

COWAN, M. N. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews** 12: 564-582, 1999.

COVINGTON, A. D., 1997. Modern tanning chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26(2), p. 111-126. 1997.

CUNHA, L. C. S. **Estudo fitoquímico, atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da espécie cassia bakeriana craib**. 2013. 162p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

DA SILVA, M. A. A. P. (1999). Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista da Nutrição**, v. 12(1), p. 5-19. 1999.

DEF, **DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS**, 2000, Editora Guanabara Kogan

DE ALMEIDA, C. F. C. B. R.; DE LIMA E SILVA, T. C.; DE AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. D. S.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of arid environments**, v. 62(1), p.127-142. 2005.

DE MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIM, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology** 123: 439-445, 2009.

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; BLOND, A.; BROUARD, J. P.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; MAMBU, L., New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial ctivity. **Bioorganic Medicinal Chemistry** 13: 4499-4506, 2005.

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial ctivity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology** 110: 165-170, 2007.

DE ZWART, L.; L.; MEERMAN, J. H.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(1), 202-226. 1999.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life sciences**, v. 65(4), p. 337-353. 1999.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: arte e ciência**. Um Guia de Estudo Interdisciplinar. Ed. UNESP, São Paulo, 1996, 229 p.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F. D.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28(3), p. 241-249. 2007.

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**, Campinas, v. 26, n. 2, 2006.

EL TAHIR, A.; SATTI, G. M. H.; KHALID, S. A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. **Journal of Ethnopharmacology**, 64: 227-233, 1999.

FABRI, R. L., COIMBRA, E. S., ALMEIDA, A. C., SIQUEIRA, E. P., ALVES, T. M. A., ZANI, C. L., SCIO, E. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **Academia Brasileira de Ciencias**, 84: 1073-1080, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FISHER, D. C. H.; GUALDA, N. C. A.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C. S.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; ALVES, M. O.; YOGI, A.; DI SANTI, S. M.; AVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K.; MORENO, P. R. H. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica** 92 (3): 261-266, 2004.

FRIZZO, C. D.; DELLACASSA, E., SERAFINI, L. A., CASSEL, E. **Extração Supercrítica do Óleo Essencial de Planta Nativa do Gênero Baccharis**. In: Anais do XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering, XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, I Brazilian Congress of Phase Equilibrium and Fluid Properties for Chemical Process Design; 2000; Águas de São Pedro.

GANAPATY, S.; THOMAS, P. S.; KARAGIANIS, G.; WATERMAN, P. G.; BRUN, R. Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. **Phytochemistry**, 67:1950-1956, 2006.

GANAPATY, S.; THOMAS, P. S.; MALLIKA, B. N.; BALAJI, S.; KARAGIANIS, G.; WATERMAN, P. G. Dimeric naphthoquinones from *Diospyros discolor*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 33: 313-315, 2005.

GONÇALVES, L. A, BARBOSA, L. C. A, AZEVEDO, A. A, CASALI, V. W. D, NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6:8-14, 2003.

GUARIM NETO, G. & MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo Bibliografico. **Acta Botanica Brasilica**, 17(4): 561-584, 2003.

GU, J.-Q.; GRAF, T. N.; DONGHO, L.; CHAI, H.-B.; QIUWEN, M.; KARDONO, L. B. S.; SETYOWATI, F. M.; ISMAIL, R.; RISWAN, S.; FARNWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; SWANSON, S. M.; KROLL, D. P. J.; FALKINHAM, J. O.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; KINGHORN, A. D.; OBERLIES, N. H. Cytotoxic And Antimicrobial Constituents Of The Bark Of *Diospyros Maritima* Collected In Two Geographical Locations In Indonesia. **Journal Of Natural Products**, 67 (7): 1156-1161, 2004.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26(4), p. 809-812. 1978.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33(7), p. 601-617. 1995.

HAY, R. K. M; SVOBODA, K. P. In: Hay, R. K. M; Waterman. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**, Longman Group: England, 1993, p.5.

HUANG, D.; OU, B.; RONALD, L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53(6), p. 1841-1856. 2005.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.html>>. Acessado em: 9/12/2014

IBGE. Mapa de biomas e vegetação. 2004. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169)>. Acesso em: 24 nov. 2013.

JENETT-SIEMS, K.; MOCKEENHAUPT, F. P.; BIENZLE, U.; GUPTA, M. P.; EICH, E. In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Tropical Medicine & International Health** 4: 611-615, 1999.

JUERGENS, U. R.; STOBER, M. & VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. **European Journal of Medical Research**, 3: 407-412, 1998.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 6, p. 1539–1555, 2011.

KOLECKAR, V.; KUBIKOVA, K.; REHAKOVA, Z.; KUCA, K., JUN, D.; JAHODAR, L.; OPLETAL, L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8(5), p. 436-447. 2008.

KOUDOU J.; ABENA A. A.; NGAISSONA P.; BESSIÈRE J. M. Chemical composition and pharmacological activity of essential oil of *Canarium schweinfurthii* **Fitoterapia** 76: 700-703. 2005.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.

LADEIRA, A. M. **Plantas medicinais com óleos essenciais**. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Instituto de Botânica, 2002.

LIU R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134(12), p. 3479-85. 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 2002.

LUCENA, P. L.; RIBAS FILHO, J. M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N. G.; DIETZ, U. A.; CORREA NETO, M. A.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELLE, E. S. Evaluation of the aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats. **Acta cirurgica brasileira/ Sociedade Brasileira para Desenvolvimento em Pesquisa Cirúrgica**, 21: 46-51, 2006.

LWANDE, W., A.L. NDAKALA, L. HASSANALI, E. MOREKA, M. NDUNGU, H. AMIANI, P.M. GIYU, M.M. MALONZA, AND D.K. PUNYUA. Gynandropsis gynadra essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. **Phytochemistry**, 50:401-405, 1999.

LOPEZ-REVUELTA A.; SANCHES-GALLEGO J. I, HERNANDEZ-HERNANDEZ A.; SANCHEZ-YAGUE J, LLANILLO M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico Biological Interactions**, v. 161(1), p.79-91, 2006

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MANN J. Secondary metabolism. Oxford: **Clarendon Press**; p.374. 1987

MARTINS, M. M. **Constituintes voláteis, fenóis totais, capacidade antioxidantes e biológica de folhas, flores e raízes da Vernonia brasiliana Less.** 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MARTINS, P.M. **Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF.)**. Viçosa: UFV, 2000. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127-130, 2001.

MIYAZAWA, M., WATANABE, H, UMEMOTO, K. & KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 46: 3431-3434, 1998.

MIEAN, K. H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49(6), p. 3106-3112. 2001

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52(4), p. 673-751. 2000.

MONTOURO, P.; SANNOMIYA, M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of poly phenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Pubmed**, 19 (16): 2244-2250, 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido à diferente grau de torra. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARD AND TECHNOLOGY. Chemistry webBook, 2014. Disponível em: < <http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA, R. A. G. **Ação farmacológica sobre o sistema nervoso central de alcaloides da *Solanum pseudoquina* St. Hil.** 1986, 97 f. (Mestrado em Produtos Naturais) -Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, 1986.

ONAYADE-SONTAN, A. O. **Analysis of essential oils of some plants used in traditional medicine in Nigeria.** 1991, Ph.D. thesis, State University of Leiden. 1991.

PAIVA, S.R.; LIMA, L.A.; FIGUEIREDO, M.R. & KAPLAN, M.A.C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 76: 499-504, 2004.

PIETTA, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, 63(7), 1035-1042. 2000.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibition effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 479-483, 2004.

LISTA de espécies da flora do Brasil. In: REFLORA , 2010. Disponível em : <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB23007>> Acesso em: 03 abr. 2013.

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.J. Regeneration of plants from somatic embryos of digitalis-lanata. **Journal of Plant Physiology**, 137, 224, 1990.

RIBÉREAU-GAYON, P. A. S. C. A. The chemistry of red wine color. **Chemistry of wine making**, v. 137, p. 50-88. 1974.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New york, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA, E. O. **Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* O. Berg (Gabiroba)**. 2011. 80p. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

ROCHA, R. R. **Estudo da composição química dos óleos essenciais e as atividades antioxidante, antimicrobiana e antiprotozoária do óleo essencial e de extratos etanólicos de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* mart.** 2014. 95p. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos Cerrados**. Lavras: UFLA, 2001.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 32(1), p. 67-103. 1992.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica** v. 21(2), p. 135-140. 1998.

SANTOS, E. V.; FERREIRA, L. A. B.; LAMBERT, D.; SOUZA, C. L.; MENDES, E. A. P.; FERREIRA, I. M. **A ocupação do bioma Cerrado: a expansão da fronteira agrícola aos dias atuais**. 2011.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. D. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41(1), p. 101-107. 2005.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades - degradações - modificações**. São Paulo : Varela, 1996. Cap. 5: Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, A. F, BARBOSA, L. C. A, SILVA, E. A. M, CASALI, V. W. D, NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6: 1-7, 2003.

SIMÕES, C. M. O. & SPITZER, V. 2003. Óleos Voláteis. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C. P., Mentz, L.A. & Petrovick, (orgs). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed.UFSC. p.467. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004.

SIMONSEN, J. B.; NORDSKJOLD, U. W.; SMITT, U.; NYMAN, P.; PALPU, P.; JOSHI; VARUGHESE, G. *In vitro* screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 74: 195-204, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOARES, S. E. Acidos fenólicos como antioxidantes. **Revista da Nutrição**, v. 15(1), p. 71-81. 2002.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579(1-2), p. 200. 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, C. C.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CALVACANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. R.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society** [online], Campinas, v. 18, n. 6, p. 1276-1280, 2007.

SOUZA, R. O. S. **Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de resíduos de frutos amplamente consumidos no estado do Amazonas.** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2013.

SPERA, A. M. **Registro de variações ambientais dos últimos 3000 da Região da Ria do Mamanguá, Rio de Janeiro, utilizando marcadores orgânicos moleculares.** 2012. 120p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

TANGMOUO, J. G.; MELI, A. L.; KOMGUEM, J.; KUETE, V.; NGOUNOU, F. N.; LONTSI, D.; BENG, V. P.; CHOUDHARYC, M. I.; SONDEGAMA, B. L. Crassiflorone, a new naphthoquinone from *Diospyros crassiflora* (Hien). **Tetrahedron Letters**, 47: 3067-3070, 2006.

THE PHEROBASE. In: Database of insect pheromones and semiochemicals. 2003. Disponível em: <http://www.pherobase.com/> acesso em: 22 ago. 2014.

TSIMIDOU, M.; PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil—Part I. **Food chemistry**, v. 45(2), p. 141-144. 1992.

VAN DER VIJVER, L. M. Distribution Of Plumbagin In The Plumbaginaceae. **Phytochemistry**, 11: 3247-3248, 1972.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Medicinais.** 2ª Ed. São Paulo SP. Editora Ceres. 1991.

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

WAGNER, H.; BLADT. S. **Plant drug analysis.** 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal Apicultural Research**, 1998.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Davis, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

## APÊNDICE A - Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos (C8-C30)

**Tabela 1** – Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos (C8-C30).

Alcano	Tempo de retenção (min.)
octano (C8)	3,29
nonano (C9)	5,15
decano (C10)	7,95
undecano (C11)	11,66
dodecano (C12)	15,90
tridecano (C13)	20,30
tetradecano (C14)	24,63
pentadecano (C15)	28,83
hexadecano (C16)	32,82
heptadecano (C17)	36,62
octadecano (C18)	40,27
nonadecano (C19)	43,74
eicosano (C20)	47,05
heneicosano (C21)	50,21
docosano (C22)	53,23
tricosano (C23)	56,13
tetracosano (C24)	58,91
pentacosano (C25)	61,59
hexacosano (C26)	64,39
heptacosano (C27)	67,75
octacosano (C28)	69,55
nonacosano (C29)	71,78
triacontano (C30)	74,16

Exemplo do cálculo do índice aritmético:

Tempo de retenção do composto desconhecido: 15,89

$$IA(x) = 100 (11) + 100 \frac{15,89-11,66}{15,90-11,66}$$

$$IA(x) = 1200$$

O valor do IA calculado é então comparado a valores de índice aritmético disponíveis na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2010; PHEROBASE, 2003) para o composto que apresentou alto índice de similaridade com o espectro de massas da amostra desconhecida. Se os valores forem iguais ou próximos, a amostra é considerada identificada.