



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Tomás Francisco Roquete Silva

Avaliação do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante das folhas
de *Banisteriopsis argyrophylla* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae)

Uberlândia

2017

Tomás Francisco Roquete Silva

Avaliação do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante das folhas de *Banisteriopsis argyrophylla* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae)

Monografia apresentado ao curso de graduação em bacharelado em Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção de créditos na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (GQB056)

Orientador: Professor Dr. Alberto de Oliveira

Co-orientadora: MSc. Daiane Maria Oliveira

Uberlândia

2017

Tomás Francisco Roquete Silva

**Avaliação do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante das folhas
de *Banisteriopsis argyrophylla* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae)**

Monografia apresentado ao curso de graduação em
bacharelado em Química Industrial da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção de
créditos na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso
(GQB056)

Orientador: Professor Dr. Alberto de Oliveira

Co-orientadora: MSc. Daiane Maria Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Carla de Moura Martins

Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos

Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, 15 de dezembro de 2017

A minha mãe, Salviana, pelo amor, carinho, força, cuidado e dedicação.

A memória de minha avó, Silvia, companheira e um exemplo de determinação e bondade.

Aos meus demais familiares, por seus exemplos e por suas orações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças, por sempre estar comigo e por me guiar pelo caminho correto.

Ao meu orientador, Alberto de Oliveira por todo o conhecimento transmitido, pelos conselhos, pelo incentivo e por confiar e acreditar em mim.

A Daiane Maria de Oliveira, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e ajuda.

Aos meus familiares, por acreditarem em mim e incentivar a seguir os meus sonhos.

Aos meus colegas de graduação, Gilberto, Karoline Vitória, Bárbara Catrine, Nayane, Hanna, Wiler, por estarem comigo nos momentos mais difíceis e pelo apoio dado.

Aos meus colegas de laboratório do NuPPEN, por toda ajuda.

Ao instituto de Química de UFU, ao CNPq e a FAPEMIG (APQ-01392-14) pelo apoio financeiro e bolsas concedidas.

“Só sei que nada sei”.

(Sócrates)

RESUMO

Estudos apontam que os antioxidantes sintéticos, como o 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) e o *terc*-butilidroquinona (*t*-BHQ), são prejudiciais à saúde humana, sendo capazes de promover danos ao DNA. Portanto, a busca por novas substâncias bioativas se faz necessária e os produtos naturais têm sido grandes fontes de novos medicamentos. O Brasil é um país com uma biodiversidade rica, o que lhe promove grande importância para os estudos dos produtos naturais. Dentre os biomas destaca-se o Cerrado, devido sua fauna, flora e cultura popular. A *Banisteriopsis argyrophylla* (Malpighiaceae) é uma planta nativa do Cerrado, popularmente conhecida como cipó-prata, sendo utilizada na medicina popular no tratamento de problemas renais, inflamações e hemorragias. Até o presente momento, não se encontram registros de estudo da atividade antioxidante desta planta. Todavia, espécies do gênero *Banisteriopsis* e da família Malpighiaceae apresentaram potencial antioxidante. Assim, este trabalho teve como objetivo medir os teores de fenóis, flavonoides e proantocianidinas e avaliar a atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) do extrato etanólico das folhas da *B. argyrophylla* e de suas frações, obtidas por extração líquido-líquido. Os teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas foram quantificados pelos métodos do reagente de Folin-Ciocalteau, do reagente cloreto de alumínio e por meio da técnica com a vanilina sulfúrica, respectivamente. Os resultados obtidos para os teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG), quercetina (EQ) e catequina (EC). O extrato etanólico apresentou maior quantidade de fenóis totais ($337,13 \pm 1,44$ mg EAG/g_{extrato}). Dentre as frações, a fração acetato de etila (FAE) apresentou o maior teor de fenóis totais ($405,46 \pm 3,20$ mg EAG/g_{extrato}) e flavonoides ($211,85 \pm 2,89$ mg EQ/g_{extrato}), enquanto a fração *n*-butanol (FB) apresentou maior teor de proantocianidinas ($226,59 \pm 2,86$ mg EC/g_{extrato}). O resultado da atividade antioxidante foi expresso em concentração eficiente (CE₅₀). A FAE (CE₅₀ = $4,10 \pm 0,1$ µg mL⁻¹) e a FB (CE₅₀ = $4,80 \pm 0,1$ µg mL⁻¹) apresentaram melhores atividades antioxidante, com valores menores que o controle positivo BHT (CE₅₀ = $4,90$ µg mL⁻¹). Portanto, a *B. argyrophylla* é uma espécie importante que contém compostos com potencial antioxidante.

Palavras-chave: *Banisteriopsis argyrophylla*, fenóis, flavonoides, proantocianidinas, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Studies have reported that synthetic antioxidants, such as 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) and *tert*-butylhydroquinone (*t*-BHQ) are harmful to human health and are capable of promoting DNA damage. Therefore, the search for new bioactive molecules is a trend and the natural products have been a great source of new ones. Brazil is a country with a rich biodiversity, which enhances the importance of studies on natural products. Among the biomes, Cerrado stands out for its fauna, flora and folk knowledge. The species *Banisteriopsis argyrophylla* (Malpighiaceae) is Cerrado's native plant, known as "cipó-prata", and is used in folk medicine to treat kidney problems, inflammations and hemorrhages. Until the moment, there are no studies about the antioxidant activity of this plant. However, species of the genus *Banisteriopsis* and family Malpighiaceae presented antioxidant potential. The objective of this work was to measure the levels of total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins and to evaluate the antioxidant activity by the scavenging free radical method of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) from the ethanolic extract of leaves of *B. argyrophylla* and its fractions, obtained by liquid-liquid extraction. The levels of total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins were quantified by the Folin-Ciocalteau reagent, the aluminum chloride reagent and by sulfuric vanillin technique, respectively. Results for the levels of total phenolic, flavonoids and proanthocyanidins were expressed in gallic acid equivalent (EAG), quercetin (EQ) and catechin (EC), respectively. The ethanolic extract showed higher amount of total phenolics (337.13 ± 1.44 mg EAG/g_{extract}). Among the fractions, the ethyl acetate fraction (FAE) had the higher content of phenolics (405.46 ± 3.20 mg EAG/g_{extract}) and flavonoids (211.85 ± 2.89 mg EQ/g_{extract}), and *n*-butanol fraction (FB) presented higher proanthocyanidins content (226.59 ± 2.86 mg EC/g_{extract}). The result of antioxidant activity was expressed in effective concentration (EC₅₀). The FAE (CE₅₀= 4.10 ± 0.1 µg mL⁻¹) and the FB (CE₅₀= 4.80 ± 0.1 µg mL⁻¹) had higher antioxidant activities with values lower than the positive control BHT (EC₅₀= 4.90 µg mL⁻¹). Thus, *B. argyrophylla* is an important species with compounds with high antioxidant potential.

Keywords: *Banisteriopsis argyrophylla*, phenolics compounds, flavonoids, proanthocyanidins, antioxidant activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns metabólitos secundários isolados das <i>Banisteriopsis: caapi</i> e da <i>anisandra</i>	16
Tabela 2 - Rendimento das extrações em etanol 95% com folhas de <i>B. argyrophylla</i>	21
Tabela 3 - Rendimentos obtidos na extração líquido/líquido do extrato etanólico de folhas de	21
Tabela 4 - Concentrações de extrato e frações utilizados na determinação do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides	22
Tabela 5 - Faixa de concentração de extrato etanólico e frações na análise no ensaio do DPPH.....	24
Tabela 6 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas do EE das folhas de <i>B.</i> <i>argyrophylla</i>	27
Tabela 7 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas das frações das folhas de <i>B.</i> <i>argyrophylla</i>	28
Tabela 8 - Valores de concentração eficiente (CE ₅₀) da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do DPPH do extrato etanólico (EE) e frações das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	31
Tabela 9 - Relação entre as intensidades de CE ₅₀ com a atividade antioxidante	31
Tabela 10 - Avaliação qualitativa do grau de correlação entre duas variáveis	32
Tabela 11 - Correlações (<i>r</i>) entre a capacidade antioxidante analisada pelo método do DPPH (1/CE ₅₀) com o teor de fenóis totais, flavonoides, proantocianidinas do extrato etanólico e frações....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Origem dos fármacos desenvolvidos de 1981-2014	12
Figura 2 - Fórmulas estruturais dos salicilatos que se destacaram no período de 1800 – 1900	13
Figura 3 - Fórmulas estruturais do BHT e do <i>t</i> -BHT	14
Figura 4 - Área total de área desmatada e remanescente em 2010 no Cerrado.....	15
Figura 5 - Fórmulas estruturais dos flavonoides isolados de <i>Malpighia glabra</i>	16
Figura 6 - Fotografias das folhas de <i>Banisteriopsis argyrophylla</i>	19
Figura 7 - Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético.....	20
Figura 8 - Reação do ácido gálico com molibdênio	25
Figura 9 - Estrutura geral dos flavonoides	26
Figura 10 - Reação de complexação do cloreto de alumínio com os flavonoides.....	26
Figura 11 - Reação entre a vanilina sulfúrica e um tanino	27
Figura 12- Reação DPPH e monitoramento da absorção.....	30

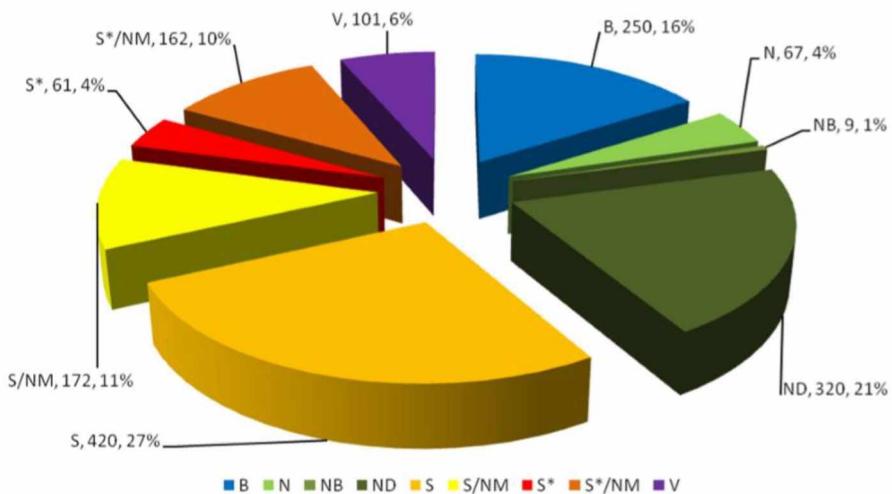
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS INSTRUMENTAIS	20
3.1 Coleta e identificação do material botânico	20
3.2 Preparo do extrato etanólico	20
3.3 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>B. argyrophylla</i>	21
3.5 Determinação do teor de flavonoides	22
3.6 Determinação do teor de proantocianidinas	23
3.7 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)	23
3.8 Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Análise dos teores de fenois totais, flavonoides e proantocinidinas	25
4.2. Análise da atividade antioxidante	28
4.3 Correlação entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos	32
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A importância dos produtos naturais é relatada desde os tempos antigos, estando associada à busca por alívio e a cura de doenças pelo uso de extratos obtidos, sendo em sua maioria de plantas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 85% das pessoas do mundo utilizam extratos vegetais para fins medicinais e 80% das pessoas dos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional (SOLER, 2000). Newman e Cragg (2016) apontaram que entre 1981 a 2014 dos 1562 novos fármacos que foram produzidos, 73% apresentam sua origem em produtos naturais (Figura 1).

Figura 1 - Origem dos fármacos desenvolvidos de 1981-2014



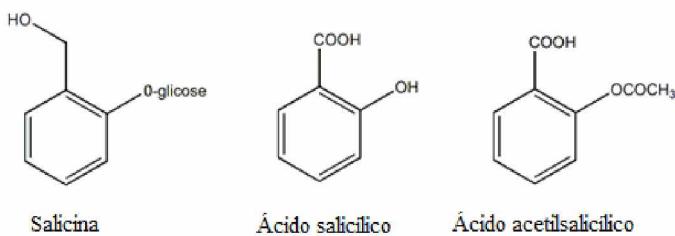
Fonte: Newman; Cragg (2016). N - produto natural; B - macromolécula biológica; NB - produto natural “botânico” (fitoterápicos); ND - derivado semissintético de produto natural; NM - desenvolvidos a partir do conhecimento adquirido de produto natural; S - sintético; S* - sintético com grupo farmacofórico de produto natural e V - vacina.

Neste contexto, a química se une a medicina e a farmacêutica para propor novos arranjos moleculares baseados nos princípios ativos presentes nas plantas que são responsáveis pelas atividades biológicas. Segundo a Farmacopeia Brasileira, princípio ativo é toda substância química ativa que tenha propriedades farmacológicas e que seja utilizada para diagnóstico, alívio ou tratamento de doenças (ANVISA, 2017).

Um marco para o desenvolvimento da química de produtos naturais foi à descoberta dos salicilatos obtidos das cascas do salgueiro (*Salix alba*), em 1757 por Edward Stone. Anos mais tarde foram isolados em pequena quantidade a salicina (em 1828 por Johann A. Buchner),

sintetizado o ácido salicílico (em 1860 por Hermann Kolbe) e descoberto o ácido acetilsalicílico (AAS, em 1898 por Felix Hofmann) (Figura 2). Tais compostos apresentam propriedades analgésicas e antipiréticas (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Figura 2 - Fórmulas estruturais dos salicilatos que se destacaram no período de 1800 – 1900



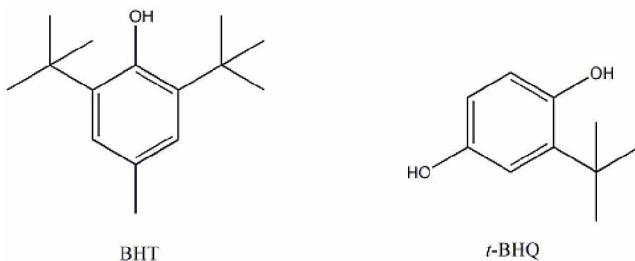
Fonte: o autor.

Embora a química de produtos naturais seja antiga, a sua modernização se deu de forma lenta, pois dependia do desenvolvimento e acoplamento de técnicas cromatográficas, espectroscópicas e espectrométricas que fornecem informações adicionais sobre a estrutura molecular dos componentes da amostra. Foram criados métodos eficientes de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG), além de técnicas para detecção, como espectrofotometria de UV-Visível (UV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) (LIANG; XIE; CHAN, 2004).

As estruturas moleculares presentes nas plantas podem apresentar uma diversidade de funções biológicas, sendo classificados como metabólitos primários ou secundários (SRIVASTAVA; PANDEY, 2015). Os metabólitos primários são os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e polímeros (polissacarídeos, proteínas, lipídeos, RNA e DNA etc.) e têm por função o crescimento e a sobrevivência da planta (CASTRO et al., 2004). Já os metabólitos secundários (MS) estão associados ao meio ambiente no qual o vegetal se encontra, assim a sua concentração dependerá de fatores como a sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, e indução por estímulos mecânicos ou ataques patogênicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Os MS possuem diversas aplicações, como agroquímicos, fragrâncias, agentes colorantes, aditivos alimentares, e princípio ativo de fármacos com atividades diversas como a antioxidante (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006, RAMALHO; JORGE, 2006, BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

Alguns destes compostos com propriedades antioxidantes, como o 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) e o *terc*-butilidroquinona (*t*-BHQ) (Figura 3), demonstraram efeitos colaterais ao organismo humano, animal e sobre o meio ambiente, assim, uma alternativa seria buscar nas plantas por novas moléculas bioativas (SASAKI et al., 2002; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 3 - Fórmulas estruturais do BHT e do *t*-BHT



Fonte: o autor.

Antioxidantes são substâncias que bloqueiam os danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos (DIPLOCK et al., 1998). O processo de oxidação ocorre por meio da transferência de um ou mais elétrons para outra substância. O processo de transferência de elétrons tem como efeito colateral a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO). Embora naturalmente presentes no organismo e atuando em diversas funções, o excesso de radicais livres pode conduzir a diversas patologias crônicas e degenerativas, como câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, choque hemorrágico, catarata e disfunções cognitivas (ALVES et al., 2010).

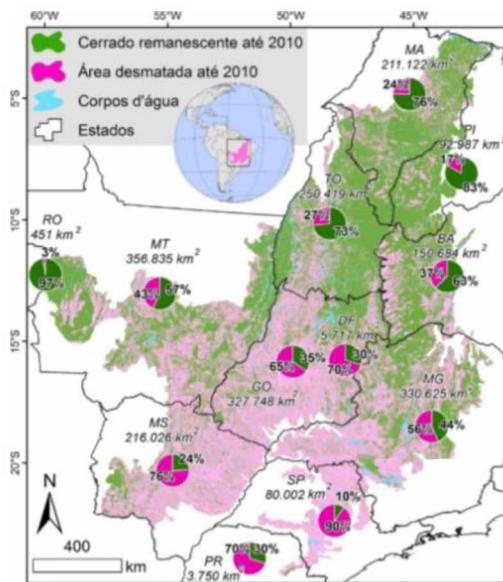
Estudos clínicos e epidemiológicos evidenciam que populações cujas dietas alimentares são ricas na ingestão de cereais, frutas e vegetais, contribuem para a redução da incidência dessas doenças (ROESLER et al., 2007). Tais alimentos possuem em sua composição compostos que possuem atividade antioxidante, como fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados (flavonoides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis) (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002, CASTRO et al., 2004, SINGH; RAJINI, 2004). Atrelado a isto, o Brasil apresenta uma rica diversidade de espécies que biossintetizam antioxidantes naturais que podem vim substituir os tradicionais (BHT e o *t*-BHT).

Segundo estimativas o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas. Contudo, o impacto dos fitoprodutos na economia brasileira não é significativa (BRASIL, 2006, 2014)

Devido a sua grande flora e fauna, é possível identificar seis biomas no Brasil, entre eles o Cerrado, que é o segundo maior em extensão, ocupando aproximadamente 24% do território

brasileiro, cerca de 2.036.448 km². O Cerrado apresenta elevada biodiversidade, e ligada a ela uma rica sociobiodiversidade. Devido a crescente perda de vegetação nativa, e dos efeitos sobre o meio ambiente e recursos hídricos, são necessárias ações de preservação, visto que nos últimos anos houve um enorme desmatamento deste bioma (Figura 4) (IBGE, 2016). Assim, estudos das plantas nativas do Cerrado em busca novas substâncias ativas é de grande importância para valorização do mesmo.

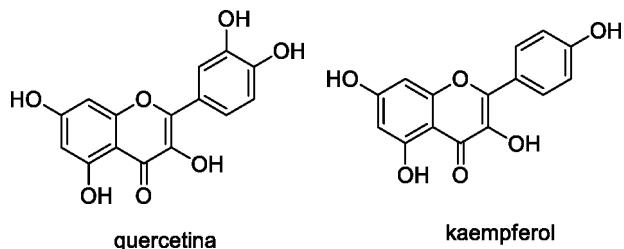
Figura 4 - Área total de área desmatada e remanescente em 2010 no Cerrado



Fonte: Brasil (2014).

A família Malpighiaceae é um exemplo de grupo de plantas que se destacam no Cerrado, devido ao grande número de espécies que apresentam propriedades biológicas e químicas, que estão relacionadas à presença dos metabólitos secundários. Compreende 77 gêneros e cerca de 1.300 espécies, com a maior diversidade nas Américas (DAVIS; ANDERSON, 2010). No Brasil, existem 45 gêneros e aproximadamente 572 espécies, das quais 345 são endêmicas (MAMEDE et al., 2015). A acerola (*Malpighia glabra*) faz parte desta família, sendo uma fonte rica de vitamina C e apresenta atividade antioxidante, uma vez que flavonoides, como a quercetina e kaempferol (Figura 5) foram isolados de suas frutas (HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2009).

Figura 5 - Fórmulas estruturais dos flavonoides isolados de *Malpighia glabra*



Fonte: Hoffmann-Ribani, Huber e Rodriguez-Amaya (2009).

Dentro da família Malpighiaceae, o gênero *Banisteriopsis* se destaca devido ao grande número de espécies. São conhecidas 92 espécies distribuídas principalmente na Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e no Brasil (WANG et al., 2010). Muitas espécies de *Banisteriopsis* são utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças, dentre elas podemos citar *B. caapi* (popularmente conhecida por cipó-miriri), que é amplamente citada na literatura por apresentar, além de atividades biológicas, a atividade antioxidante. Nesta planta foram isolados alcaloides e taninos (HASHIMOTO; KAWANISHI, 1976, SAMOYLENKO et al., 2010). Também podemos citar a *B. anisandra* (popularmente conhecida por perinha), que apresenta atividade antifúngica contra *Candida spp.* e também antioxidante (FREITAS, 2010). Em ensaios de prospecção fitoquímica foram identificados à presença de flavonoides, alcaloides, taninos e antraquinonas em extratos de folhas destas espécies (Tabela 1) (FRIAS; COSTA; TAKAHASHI, 2011).

Tabela 1 - Alguns metabólitos secundários isolados das *Banisteriopsis*: *caapi* e da *B. anisandra*

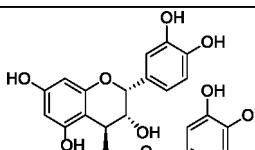
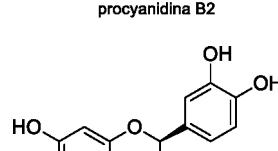
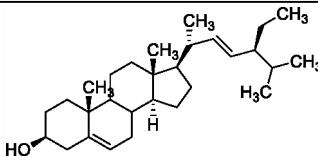
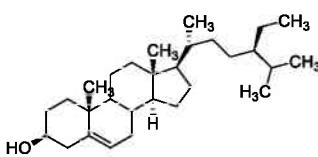
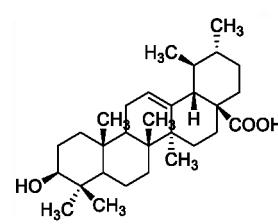
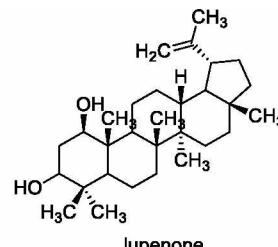
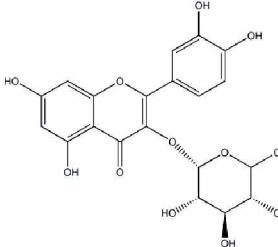
Espécies	Parte da planta	Taninos	Referências
<i>B. caapi</i>	Folhas		
	Caules	procyanidina B2	Samoylenko et al. (2010)
	Ramos		

Tabela 1 - Alguns metabólitos secundários isolados das *Banisteriopsis: caapi* e da *B. anisandra*
 (continuação)

Espécies	Parte da planta	Alcaloides	Referências
<i>B. caapi</i>			Samoylenko et al. (2010)
	Folhas		
	Caules		
	Ramos		Hashimoto; kawanishi (1975)
	Folhas		Hashimoto; kawanishi
	Caules		(1976)
	Raízes		
	Folhas		Freitas et al. (2015)

Tabela 1 - Alguns metabólitos secundários isolados das *Banisteriopsis: caapi* e da *B.anisandra* (conclusão)

Espécies	Parte da planta	Terpenos	Referências
<i>B. anisandra</i>			
	Raízes		
	Folhas		Freitas et al. (2015)
			
<i>B. anisandra</i>	Raízes		Freitas et al. (2015)
	Folhas		

Outra espécie desse gênero é a *Banisteriopsis argyrophylla* (Figura 6), encontrada no Brasil principalmente em São Paulo e em Minas Gerais. É conhecida popularmente como cipó-prata ou cipó-folha-de-prata, sendo usada na medicina popular no tratamento de problemas renais (cálculos renais e diuréticos), anti-inflamatório, para dores relacionadas à bexiga,

blenorragias, clareamento da pele e manchas, hemorragias ovarianas, na gonorreia e em nefrites (RODRIGUES; CARVALHO, 2007, PLANTAMED, 2014).

Figura 6 - Fotografias das folhas de *Banisteriopsis argyrophylla*



Fonte: o autor.

Neste contexto, este trabalho decorre da quantificação de teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas, e da avaliação da atividade antioxidante de folhas da *Banisteriopsis argyrophylla*.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a avaliação antioxidante das folhas de uma planta nativa do Cerrado, a *Banisteriopsis argyrophylla*.

Os objetivos específicos foram:

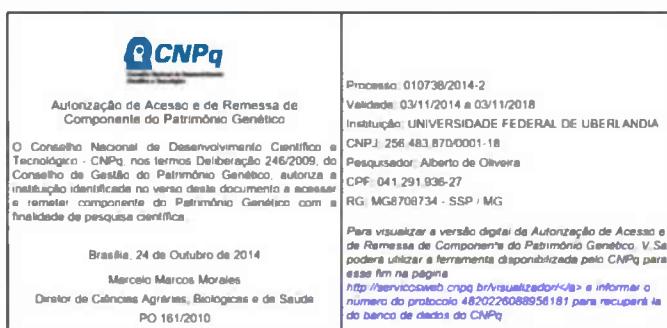
- Preparar o extrato etanólico 95% das folhas de *B. argyrophylla*;
- Fracionar o extrato etanólico utilizando solventes de polaridade crescente;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações, pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH);
- Avaliar os teores de fenóis, proantocianidinas e flavonoides do extrato etanólico e frações;

3. MATERIAIS E MÉTODOS INSTRUMENTAIS

3.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Banisteriopsis argyrophylla* foram coletadas em novembro de 2014 na fazenda Passa Três localizada no município de Monte Alegre de Minas (MG), Brasil ($18^{\circ}34'56.85"S$ e $49^{\circ}2'52.61"O$), mediante ao aceite de acesso ao patrimônio genético que está em vigência com o número de registro 010738/2014-2 (Figura 7). A planta foi identificada pela Professora Dr. Maria Cândida Henrique Mamede do Instituto de Botânica de São Paulo e depositada no herbário da UFU, com o número de registro 67.076. Foi obtido o termo de responsabilidade para o transporte de amostra.

Figura 7 - Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético



Fonte: o autor.

3.2 Preparo do extrato etanólico

As folhas foram coletadas e deixadas em estufa a 40°C por 48h. As folhas secas, tiveram seu teor de umidade medido e posteriormente foram trituradas utilizando um multiprocessador e o pó resultante (746,1 g) foi submetido à extração com etanol 95% ($7 \times 2,5$ L), mantendo um intervalo de 7 dias entre as extrações. O extrato foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotatório a pressão reduzida e banho a 40°C , sendo obtido o extrato etanólico (86,7 g). O rendimento da extração foi de 11,55% (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento das extrações em etanol 95% com folhas de *B. argyrophylla*

Extração	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
1 ^a Extração	34,38	4,61
2 ^a Extração	21,25	2,85
3 ^a Extração	13,78	1,85
4 ^a Extração	10,77	1,36
5 ^a Extração	6,60	0,88
Total	86,78	11,55

3.3 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *B. argyrophylla*

O extrato etanólico (EE) (75, 5 g) foi solubilizado em 300,0 mL de CH₃OH:H₂O (9:1), filtrado e submetido ao fracionamento via extração líquido-líquido com hexano (H) (5 × 300,0 mL), diclorometano (DCM) (5 × 300,0 mL), acetato de etila (AE) (5 × 300,0 mL) e *n*-butanol (B) (5 × 300,0 mL), sucessivamente, restando a fração aquosa. A Tabela 3 mostra as massas e os rendimentos obtidos destas extrações.

Tabela 3 - Rendimentos obtidos na extração líquido/líquido do extrato etanólico de folhas de *B. argyrophylla*

Frações	Extrações (g)					Massa (g)	Rendimento (%)
	1^a	2^a	3^a	4^a	5^a		
FH	8,87	3,53	1,81	0,36	0,27	14,84	19,66
FDCM	3,60	2,57	0,85	0,62	0,13	7,77	10,29
FAE	5,74	3,36	2,35	1,52	1,60	14,57	19,30
FB	9,24	5,03	1,46	1,99	0,75	18,47	24,47
FH ₂ O	7,33	-	-	-	-	7,33	9,71

3.4 Determinação do teor de fenóis totais

Foi preparada uma mistura com 0,5 mL de solução metanólica da amostra (as concentrações estão na Tabela 4, foi considerado a Lei de Beer-Lambert); 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10% ($v\ v^{-1}$) e 2,0 mL de uma solução recém-preparada de carbonato de sódio 7,5% ($m\ v^{-1}$). A mistura foi mantida por 5 minutos, em banho a 50 °C, e em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 760 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a solução de amostra por CH₃OH. As amostras foram preparadas em triplicata. Foi utilizada uma solução de ácido gálico, nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para obtenção de uma curva analítica do gráfico de concentração versus absorbância. O teor de fenóis totais foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (MORAIS et al., 2008).

Tabela 4 - Concentrações de extrato e frações utilizados na determinação do teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides

Amostras	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EE	100
FH	200
FDCM	500
FAE	100
FB	100
FH ₂ O	500

3.5 Determinação do teor de flavonoides

Foi preparada uma mistura com 2,0 mL de solução em metanol de amostra (Tabela 4), 1,0 mL de solução em metanol de cloreto de alumínio 5% ($m\ v^{-1}$) e 2,0 mL de CH₃OH. A mistura foi mantida por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 425 nm. Para a obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado, substituindo a solução de amostra por metanol. As amostras foram preparadas em triplicata. Foi utilizada uma solução de quercetina, nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para obtenção de uma curva analítica do gráfico de concentração versus absorbância. O

teor de flavonoides foi expresso em miligramas de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato (WOISKY; SALATINO, 1998).

3.6 Determinação do teor de proantocianidinas

Foi preparada uma mistura com 2,0 mL de solução metanólica das amostras (Tabela 4) e 3,0 mL solução de vanilina ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) em ácido sulfúrico 70% (m/m). A mistura foi mantida por 15 minutos em banho a 50 °C. Em seguida, foi feita à leitura da absorbância a 500 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a solução de amostra por CH_3OH . As amostras foram preparadas em triplicata. Foi utilizada uma solução de catequina, nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, para obtenção de uma curva analítica do gráfico de concentração versus absorbância. O teor de proantocianidinas foi expresso em miligramas de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato (MORAIS et al., 2008).

3.7 Determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante foi determinada usando o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), considerando o método de Morais (2008) com algumas modificações. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a absorbância deve ser no máximo 0,99) e uma solução metanólica para o extrato etanólico/frações, cujas concentrações estão na Tabela 5. Estas soluções, denominadas de 100%, foram diluídas para 83, 66, 49, 32 e 15%. Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,1 mL da solução do extrato etanólico da solução 100% e 2,9 mL da solução de DPPH. A solução foi deixada em repouso no escuro durante 1 hora, e posteriormente o decréscimo da absorbância registrado no comprimento de onda de 517 nm durante. O mesmo procedimento foi realizado para as demais diluições.

O branco foi realizado substituindo o extrato/frações por metanol. A atividade antioxidante (AA) que corresponde à porcentagem de DPPH sequestrado foi determinada usando a equação:

$$\% \text{ de radical DPPH sequestrado} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100$$

Onde A_{controle} é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH e A_{amostra} é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra).

A medida da concentração eficiente (CE_{50}), que corresponde à concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH foi calculada através da equação de regressão linear obtida através do gráfico das atividades antioxidantes versus as concentrações de extrato/frações.

Tabela 5 - Faixa de concentração de extrato etanólico e frações na análise no ensaio do DPPH

Amostras	Concentração das amostras ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
EE	19 – 127
FH	78 – 520
FDCM	75 – 520
FAE	17 – 121
FB	17 – 127
FH ₂ O	75 – 546
BHT	46 – 320

BHT: Controle positivo.

3.8 Análise estatística

Para avaliar estatisticamente os resultados foi utilizado o programa Sigma Plot 11.0. Foi aplicado o método de Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Turkey para analisar a semelhança entre os dados, sendo considerados os valores com nível de significância menor ou igual 5% para denotar diferença estatística significativa.

Foi calculado também o coeficiente de correlação ou grau de relacionamento para dados amostrais pelo método de linear de Pearson.

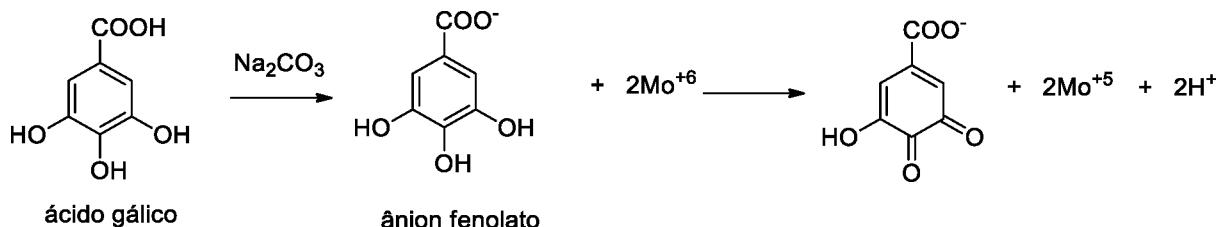
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos teores de fenóis totais, flavonoides e proantocinidinas

Metabolitos secundários, como os compostos fenólicos, são responsáveis por inibir os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, uma vez que são substâncias antioxidantes (BABA; MALIK, 2015). Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxílicos. As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos devem-se principalmente a sua estrutura química e as suas propriedades redutoras (FATTAHI et al., 2014).

O método utilizado neste trabalho para quantificação do teor de fenóis totais utiliza do reagente Folin-Ciocalteau, uma mistura de coloração amarela composta por ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico. Com adição de um agente redutor, ocorre a redução do molibdênio e tungstênio, observado pela mudança de coloração para azul, com absorbância intensa próxima a 760 nm (Figura 8) (SÁ et al., 2012). O reagente Folin-Ciocalteu pode interagir com outros compostos não fenólicos, o que pode levar a resultados superestimados dos fenóis totais (ROESLER et al., 2007).

Figura 8 - Reação do ácido gálico com molibdênio



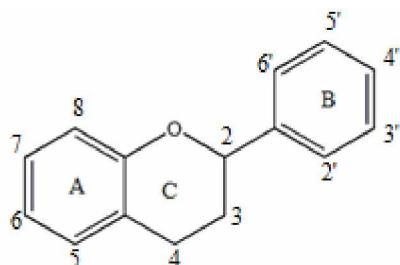
Fonte: Oliveira (2009).

De acordo com Malbert (2015), os compostos fenólicos distribuem-se nas seguintes categorias: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas.

Os flavonoides são compostos fenólicos de baixo peso molecular que são caracterizados pelo núcleo flavilium, que diferem pelo seu estado de oxi-redução, estrutura do anel C, no grau de hidroxilação, nas posições dos grupos hidroxila e diferença na derivatização dos mesmos (Figura 9). São divididos em nove classes: chalconas, flavonóis, flavan-3-óis, dihidroflavonóis,

antocianinas, auronas, flavanonas, isoflavonas e flavonas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002, MALBERT, 2015).

Figura 9 - Estrutura geral dos flavonoides

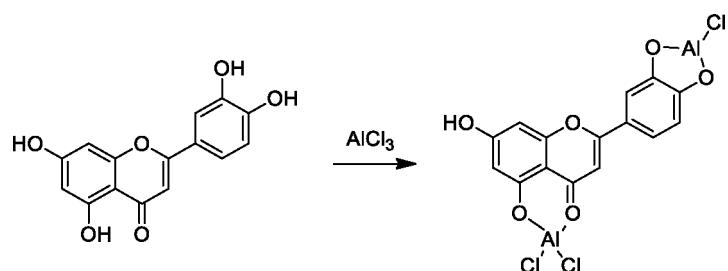


Fonte: o autor.

Esses compostos têm sido utilizados na indústria alimentar visando melhorar a qualidade dos alimentos, inibindo ou reduzindo a oxidação lipídica dos mesmos, assim como na indústria de cosméticos, onde atuam em reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006, FATTAAHI et al., 2014). Os flavonoides ainda apresentam efeitos benéficos à saúde, devido a sua natureza antioxidante, protegendo contra doenças cardiovasculares (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Para a quantificação do teor de flavonoides foi considerado a reação de complexação com o alumínio (Al^{3+}), do cloreto de alumínio (AlCl_3), com os flavonoides presentes no extrato etanólico e frações (Figura 10). O complexo apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não complexado o que possibilitou o monitoramento a 425 nm dos descolamentos químicos provenientes da formação complexo Al^{3+} com os flavonoides (WOISKY; SALATINO, 1998).

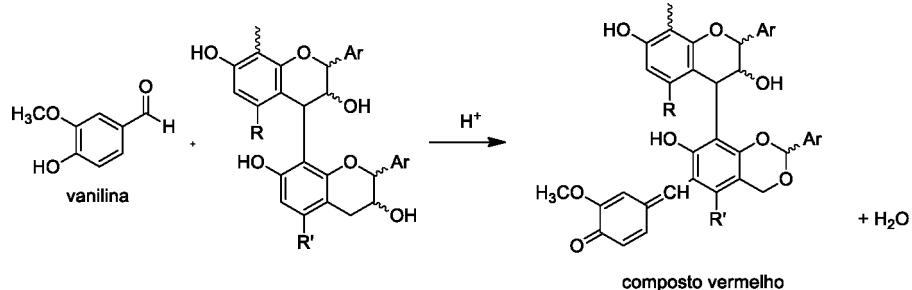
Figura 10 - Reação de complexação do cloreto de alumínio com os flavonoides



Fonte: Woisky e Salatino (1998).

Os taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular, que podem ser divididos de acordo com seu tipo estrutural em taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidinas. Os taninos apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas a antioxidante (ROCHA et al., 2011, QUIJADA et al., 2015). Para quantificação do teor de proantocianidinas foi considerado a reação de substituição eletrofílica aromática da vanilina no tanino condensado, formando um composto de coloração vermelha (Figura 11).

Figura 11 - Reação entre a vanilina sulfúrica e um tanino



Fonte: Schofield, Mbugua e Pell (2001).

O teores de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides foram determinados através das regressões lineares da curva analítica de gráficos da absorbância, das reações entre o ácido gálico e o Folin; entre a catequina e a vanilina e entre quercetina e o AlCl₃ versus as concentrações de ácido gálico, catequina e de quercetina, respectivamente.

As equações da reta e os valores do coeficiente linear considerados na quantificação estão na Tabela 6. Os resultados obtidos foram dados em mg de equivalente de ácido gálico (EAG), catequina (EC) ou quercetina (EQ) por g de extrato e por g de material vegetal seco (considera o rendimento de extração). Quanto maior este valor, maior o teor de compostos presentes nas amostras.

Tabela 6 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas do EE das folhas de *B. argyrophylla*

	Equação Linear y=ax+b	R²	mg EAG¹, EQ²	mg EAG¹, EQ²
			ou EC³/ g_{vegetal}	ou EC³/ g_{extrato}
Fenóis totais ¹	y=0,015x-0,0019	0,9998	39,90±0,17	337,13±1,44
Flavonoides ²	y=0,0769x+0,0524	0,9975	8,50±0,05	71,82±0,30
Proantocianidinas ³	y=0,0274x+0,011	0,9971	32,25±0,04	272,48±0,31

Y= absorbância, x= concentração de ácido gálico, quercetina ou catequina (mg mL⁻¹)

Embora os teores das folhas da *B. argyrophylla* sejam inferiores, quando comparados aos das folhas da *B. argyrophylla* em gramas de vegetal ($542,3 \pm 2,10$ mg EAG g_{vegetal}⁻¹, $274,6 \pm 3,00$ mg EC g_{vegetal}⁻¹ e $61,24 \pm 0,43$ mg EQ g_{vegetal}⁻¹), a mesma apresenta bons teores em questão de gramas de extrato (NUNES, 2016).

Uma vez que o EE de folhas da *B. argyrophylla* apresentou acentuada quantidade desses compostos, foi realizado o ensaio com as frações obtidas na extração líquido-líquido (Tabela 7).

Tabela 7 - Teores de fenóis totais, flavonoides e de proantocianidinas das frações das folhas de *B. argyrophylla*

Amostras	Fenóis (mg EAG g_{extrato}⁻¹)	Flavonoides (mg EQ g_{extrato}⁻¹)	Proantocianidinas (mg EC g_{extrato}⁻¹)
FH	$174,91 \pm 1,93^c$	$71,00 \pm 1,92^c$	$99,08 \pm 2,49^d$
FDCM	$73,10 \pm 1,12^d$	$59,27 \pm 0,98^a$	$51,83 \pm 1,14^c$
FAE	$405,46 \pm 3,20^a$	$211,85 \pm 2,89^d$	$208,79 \pm 1,14^b$
FB	$229,46 \pm 1,07^b$	$21,40 \pm 0,64^{b;c}$	$226,59 \pm 2,86^e$
FH ₂ O	$67,48 \pm 0,45^e$	n.i.	$36,01 \pm 0,65^a$

n.i.= não identificado. Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

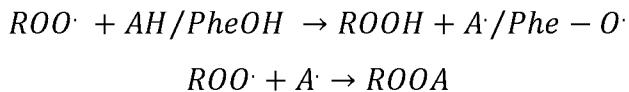
O EE apresentou um alto teor de fenóis totais, assim como FAE. As FAE e FB apresentaram alto teor de proantocianidinas. A FAE foi a que apresentou maior concentração de flavonoides. Estes resultados podem ser explicados pela polaridade dos solventes utilizados, visto que os flavonoides são substâncias polares, estes ficaram mais concentrados nas frações provenientes de solventes mais polares. (SOUZA et al., 2014, JUSTINO et al., 2016, NUNES et al., 2016).

4.2. Análise da atividade antioxidante

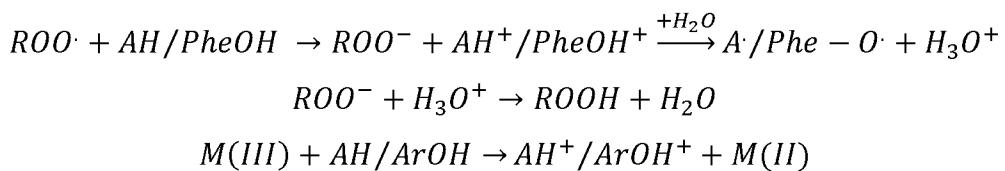
Os ensaios de determinação da atividade antioxidante são importantes para auxiliar na escolha de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos. Na sua avaliação são consideradas análises *in vitro*, que podem ser classificadas de acordo com o tipo de reação de

conversão do radical por meio da transferência do átomo de hidrogênio, da transferência de elétrons, entre outras (ALVES et al., 2010; PRIOR, 2015).

No mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio (HAT- *hydrogen atom transfer*), o hidrogênio é transferido para o radical alvo. Conforme as reações abaixo:



No mecanismo de transferência de elétrons (SET- *single electron transfer*), um ou mais elétrons são transferidos para reduzir o radical alvo:



Onde: ROO^{\cdot} é o radical livre, AH é qualquer antioxidante com hidrogênio doável, PheOH é fenol ou polifenol, e M é o metal redox-ativo. O mecanismo como o radical será convertido depende das condições do sistema, como o solvente e o pH (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Apesar da sua importância, as análises de atividade antioxidante *in vitro* apresentam limitações conceituais e técnicas. Dentre as conceituais se pode citar:

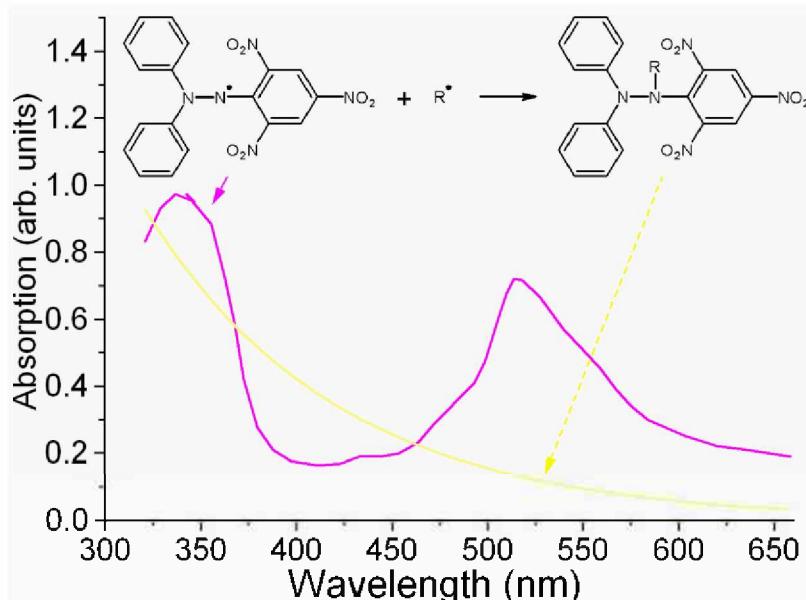
- Resultados não replicáveis *in vivo*, devido à má absorção das substâncias ou sua conjugação e excreção na urina;
- Alvos em análise *in vitro* são irrelevantes para condições *in vivo*, pois requerem muito tempo para sua redução;
- Não é analisada a reação dos radicais com lipídios.

As limitações técnicas são geradas pela falta de monitoramento de fatores que afetam os resultados obtidos, tais como oxigênio dissolvido e atmosférico, luz, temperatura, efeitos do solvente, pH e cinética (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

O método do DPPH se baseia em uma reação de transferência de hidrogênio, sobressaindo-se sobre as demais técnicas por ser simples, rápido e sensitivo. O DPPH é um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Quando uma substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, o mesmo é reduzido, obtendo-se a hidrazina (2,2-difenil-1-pierilhidrazina). Tal reação é observada pela mudança na coloração de violeta para amarelo pálido, e pode ser monitorada em 517 nm, comprimento de onda no qual esse radical apresenta

máximo de absorção e a hidrazina apresenta mínimo de absorção (Figura 12) (ALVES et al., 2010, FOTI, 2015).

Figura 12- Reação DPPH e monitoramento da absorção.



Fonte: Abuin (2002).

O método do DPPH é sensível ao meio, tendo como interferentes o solvente, pH, oxigênio e exposição a luz. Em solvente com fortes ligações de hidrogênio, como por exemplo, o metanol (solvente ionizante), há interferência para a liberação de átomos de hidrogênio, e, portanto, o mecanismo da reação ocorre por SET ao invés de HAT. Já em solventes não ionizantes ou na presença de ácidos, o mecanismo será preferencialmente por HAT (LITWINIENKO; INGOLD, 2004, SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

A interação da espécie com o DPPH depende de sua conformação estrutural, que interfere na sua acessibilidade ao sítio do radical, assim como o número de grupos hidroxílicos disponíveis em sua estrutura (ALVES et al., 2010).

O ensaio do potencial antioxidante foi expresso em CE₅₀. O CE₅₀ foi calculado através da regressão linear da curva analítica do gráfico da porcentagem de DPPH sequestrado após 1 hora de reação versus as concentrações de extrato/frações (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de concentração eficiente (CE_{50}) da análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro do DPPH do extrato etanólico (EE) e frações das folhas de *B. argyrophylla*

Amostras	$CE_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$
EE	4,27±0,8 ^a
FH	12,02±2,0 ^b
FDCM	17,03±0,4 ^c
FAE	4,10±0,1 ^a
FB	4,80±0,1 ^a
FH ₂ O	23,07±2,3 ^d
BHT	5,31±0,2 ^a

BHT = controle positivo. Médias indicadas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Segundo Reynertson, Basile e Kennelly (2005), quanto menor o valor de CE_{50} melhor é o potencial antioxidante (Tabela 9). Assim, o extrato e as frações apresentaram elevada atividade antioxidante. Dentre as frações, as que apresentaram resultados mais promissores foram a FAE e FB, apresentando inclusive valores menores que o controle positivo (BHT).

Tabela 9 - Relação entre as intensidades de CE_{50} com a atividade antioxidante

$CE_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	Intensidade do potencial antioxidante
< 50	Elevada
50 – 100	Moderada
100 – 200	Baixa
> 200	Inativa

Fonte: Reynertson, Basile e Kennelly (2005).

As FH, FB e o EE apresentam melhores intensidade de CE_{50} , quando comparadas com as da *B. Laevifolia*, respectivamente 58,17±1,46; 8,39±1,07 e 4,53±0,92. O mesmo não é observado para FDCM e FAE, que apresentam intensidade de CE_{50} inferiores, quando comparadas com as da *B. Laevifolia*, respectivamente 9,14±0,79 e 4,07±0,46 (NUNES,2016).

4.3 Correlação entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos

A fim de confirmar a correlação dos resultados obtidos no ensaio com o DPPH com os teores de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas, foi feito um estudo estatístico considerando o ensaio proposto por Pearson (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Neste método são avaliadas se duas ou mais variáveis variam concomitantemente. Para isto, um parâmetro considerado é a correlação ou regressão múltipla (r). O valor de r está sempre entre -1 e 1 , sendo que sua intensidade é classificada em módulo como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Avaliação qualitativa do grau de correlação entre duas variáveis

$ r $	A correlação é dita
0	Nula
0 – 0,3	Fraca
0,3 – 0,6	Regular
0,6 – 0,9	Forte
0,9 – 1	Muito forte
1	Plena ou perfeita

Fonte: Callegari-Jacques (2003).

Os valores da atividade antioxidante obtidos pelo método do sequestro do radical DPPH ($1/\text{CE}_{50}$) foram correlacionados com o teor de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides, através do coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 11).

Tabela 11 - Correlações (r) entre a capacidade antioxidante analisada pelo método do DPPH ($1/\text{CE}_{50}$) com o teor de fenóis totais, flavonoides, proantocianidinas do extrato etanólico e frações

	$1/\text{CE}_{50}$
Fenóis	0,922
Flavonoides	0,534
Proantocianidinas	0,952

Os valores de CE_{50} foram expressos em $1/\text{CE}_{50}$, visto que quanto menor o valor de CE_{50} melhor é a atividade. A correlação foi realizada pelo método de Pearson através do Programa Sigma Plot 11.0. Para todas as correlações se obteve $p < 0,01$.

Os resultados obtidos estão relacionados com a presença de compostos fenólicos nas amostras. Fato que confirma a correlação entre essas substâncias com a atividade antioxidante (Tabela 8). A FAE e a FB, foram as que apresentaram maiores teores de fenóis e proantocianidinas respectivamente, e também foram as que apresentaram melhores potenciais antioxidantes, apresentando assim correlação muito forte entre os ensaios. Com relação ao teor de flavonoides, foi observado correlação regular com a atividade antioxidante, sendo que a FAE se destacou nos ensaios.

Vale ressaltar que, um alto conteúdo de fenóis está diretamente relacionado a um bom potencial antioxidante, porém depende do método escolhido e também das características hidrofóbicas/hidrofílicas do sistema teste e do antioxidante testado (ROESLER et al., 2007).

5. CONCLUSÃO

A atividade antioxidante foi medida pelo método do DPPH, mostrando que a FAE e a FB obtiveram melhores potenciais antioxidantes, sugerindo que os resultados estão relacionados com a alta presença de fenóis, flavonoides e proantocianidinas, metabólitos secundários que atuam como antioxidantes devido a sua estrutura química.

Desta forma, é importante dar continuidade aos estudos com estas frações, afim de melhorar os resultados, como por exemplo melhorando a extração dos compostos do extrato etanólico e avaliando o efeito que fatores como oxigênio dissolvido e atmosférico, temperatura, pH e cinética; assim como identificação dos metabolitos secundários presentes.

As folhas da *B. argyrophylla* se mostram promissora a produção de novos fármacos, que podem vir a substituir os antioxidantes sintéticos que são utilizados atualmente que podem ser prejudiciais ao ser humano.

6. REFERÊNCIAS

- ABUIN, E. et al. Uric acid reaction with DPPH radicals at the micellar interface. **Boletín de La Sociedad Chilena de Química**, [s. L.], v. 47, n. 2, p.145-149, 2002.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, out. 2010.

ANVISA DCB - Denominações Comuns Brasileiras. [2017]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeabrasileira/conteudo/cont_dcb_glossario.htm>. Acesso em: 15 nov. 2017.

BABA, S. A.; MALIK, S. A. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. **Journal of Taibah University for Science**, Tayba, v. 9, n. 4, p. 449-454, Oct. 2015.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, Jul. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006. 136 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no cerrado**. Brasília, DF, 2014. 132 p.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, London, v. 31, n. 11, p. 1612-61, Nov. 2014.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 1. ed. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255 p.

CASTRO, H.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa: Gráfica Suprema e Editora, 2004. 113 p.

DAVIS, C. C.; ANDERSON, W. R. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 97, n. 12, p. 2031–2048, Dec. 2010.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 80, n. 1, p. S77–S112, Aug. 1998.

FATTAHI, S.; ZABIHI, E.; ABEDIAN, Z.; POURBAGHER, R.; MOTEVALIZADEH ARDEKANI, A.; MOSTAFAZADEH, A.; AKHAVAN-NIAKI, H. Total phenolic and flavonoid contents of aqueous extract of stinging nettle and in vitro antiproliferative effect on hela and BT-474 cell Lines. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, Babol, v. 3, n. 2, p. 102-107, Jan. 2014.

FOTI, M. C. Use and Abuse of the DPPH center dot Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 40, p. 8765-8776, Oct. 2015.

FREITAS, L. B. D. O. Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss) B. Gates e síntese de amidas indólicas para avaliação da atividade alelopática 2010. 236 f. (mestrado) - Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte,

FREITAS, L. B. O.; BOAVENTURA, M. A. D.; SANTOSA, W. L.; STEHMANN, J. R.; JUNIOR, D. D.; LOPES, M. T. P.; MAGALHÃES, T. F. F.; DA SILVA, D.; RESENDE, M. A. D. Allelopathic, cytotoxic and antifungal activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 12, n. [S.I.], p. 9–10, Jun. 2015.

FRIAS, U. A. D.; COSTA, M. C. M.; TAKAHASHI, J. A. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antibacteriana e anticolinesterásica de extratos de *Banisteriopsis anisandra* A. Juss. (Malpighiaceae) **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v. 16, n. 1, p. 60–71, mar. 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374–381, out. 2007.

HASHIMOTO, Y.; KAWANISHI, K. New organic bases from amazonian *Banisteriopsis-caapi*. **Phytochemistry**, London, v. 14, n. 7, p. 1633–1635, Oct. 1975.

HASHIMOTO, Y.; KAWANISHI, K. New alkaloids from *Banisteriopsis-caapi*. **Phytochemistry**, London, v. 15, n. 10, p. 1559–1560, Jan. 1976.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, n. 10, p. 572–584, Oct. 2002.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 4, p. 263–268, Jun. 2009.

IBGE Safras de grãos. [2016]. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3118&busca=1&t=fevereiro-ibge-preve-safra-graos-0-9-maior-que-2015>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; DA SILVA, N. M.; DE SOUSA, R. M. F.; DE OLIVEIRA, A.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, n. Supplement C, p. 167-182, Dec. 2016.

LIANG, Y.-Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam; New York v. 812, n. 1, p. 53-70, Dec 2004.

- LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 69, n. 18, p. 5888-5896, Sept. 2004.
- MALBERT, Y. **Flavonoid glucodiversification with engineered sucrose-active enzymes**. 2015. 257 f. (Doctorate) - Institut National des Sciences, University of Toulouse, Toulouse, 2015.
- MAMEDE, M. C. H.; SEBASTIANI, R.; ALMEIDA, R. F.; FRANCENER, A.; AMORIM, A. M. A. Malpighiaceae. Lista de espécies da flora do Brasil. [2015]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 28 nov. 2017.
- MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. S, p. 198–207, dez. 2008.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 79, n. 3, p. 629–661, Mar. 2016.
- NUNES, B. C.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; DE OLIVEIRA, A.; CUNHA, L. C. S.; DA SILVA, C. V.; TEIXEIRA, T. L.; AMBRÓSIO, M. A. L. V.; MARTINS, C. H. G.; DE AQUINO, F. J. T. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 92, n. Supplement C, p. 277-289, Dec. 2016.
- NUNES, Bruno César. **Prospecção Química e Avaliação Biológica de Banisteriopsis laevifolia (Malpighiaceae)**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.
- PLANTAMED Plantas e ervas medicinais e fitoterápicos. [2014]. Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Banisteria_argyrophylla.htm>. Acesso em: 29 nov. 2017.
- PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, London, v. 18, n. Part B, p. 797-810, Oct. 2015.

QUIJADA, J.; FRYGANAS, C.; ROPIAK, H. M.; RAMSAY, A.; MUELLER-HARVEY, I.; HOSTE, H. Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 28, p. 6346-54, Jul. 2015.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 755-760, dez. 2006.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Manoa, v. 3, n. 1, p. 25-35, [S.I.] 2005.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B. D.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P. D.; AGOSTINI-COSTA, T. D. S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal v. 33, n. 4, p. 1215-1221, dez. 2011.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 17-35, fev. 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan./ mar. 2007.

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

SAMOYLENKO, V.; RAHMAN, M. M.; TEKWANI, B. L.; TRIPATHI, L. M.; WANG, Y. H.; KHAN, S.; MILLER, L. S.; JOSHI, V. C.; MUHAMMAD, I. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 127, n. 2, p. 357-367, Feb. 2010.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 519, n. 1, p. 103-119, Aug. 2002.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, London, v. 14, n. Supplement C, p. 111-125, Apr. 2015.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1–2, p. 21–40, May. 2001.

SINGH, N.; RAJINI, P. S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 4, p. 611–616, May. 2004.

SOLER, O. **Biodiversidade, bioeconomia & fitoterapia**. 2000. 32 f. (Doutorado em Ciências Sócio Ambientais) - Programa de Desenvolvimento do Trópico Úmido - PDTU. Núcleo de Altos Estudos da Amazônia - NAEA) - Faculdade de Economia, Universidade Federal do Pará, Bélem,

SOUSA, R. M. F.; LIRA, C. S.; RODRIGUES, A. O.; MORAIS, S. A. L.; QUEIROZ, C. R. A. A.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; MUÑOZ, R. A. A.; DE OLIVEIRA, A. Antioxidant activity of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) leaves extracts using spectrophotometric and voltammetric assays in vitro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 448-457, Jun. 2014.

SRIVASTAVA, P. K.; PANDEY, A. K. Natural products and derivatives: biological and pharmacological activities. **Biochemical and Cellular Archives**, Muzaffarnia, v. 1, n. 15, p. 1-38, Apr. 2015.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. D. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, jan. 2006.

WANG, Y. H.; SAMOYLENKO, V.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I. A.; MILLER, L. S.; CHAURASIYA, N. D.; RAHMAN, M. M.; TRIPATHI, L. M.; KHAN, S. I.; JOSHI, V. C.; WIGGER, F. T.; MUHAMMAD, I. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 128, n. 3, p. 662-671, Apr. 2010.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, Cardiff, v. 37, n. 2, p. 99–105, Mar. 1998.