

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ERIC QUEIROZ COIMBRA

**COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS METANÓLICOS DE *Senna rugosa***

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2019**

ERIC QUEIROZ COIMBRA

**COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS METANÓLICOS DE *Senna rugosa***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme R. O. e
Freitas**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Joyce F. da C.
Guerra**

PATOS DE MINAS – MG

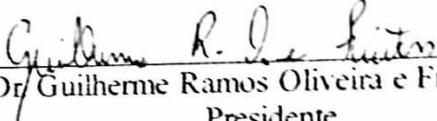
DEZEMBRO DE 2019

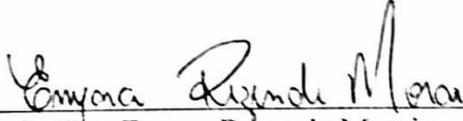
ERIC QUEIROZ COIMBRA

Compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante de extratos metanólicos de *Senna rugosa*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:


Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – IBTEC
Presidente


Profa. Dra. Enyara Rezende Moraes – IBTEC
Membro


Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira – IBTEC
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Guilherme por toda a sua paciência e disposição comigo. Nem sempre sou uma pessoa fácil de trabalhar e por isto ele tem uma gratidão imensurável minha!

Aos meus pais e minha avozinha, pelo complexo apoio que sempre me proporcionaram.

Aos meus amigos de longa data e mais íntimos, por serem a base de meu sustento nos momentos mais difíceis e por serem aqueles que me lembram de meus sonhos.

Aos meus colegas de equipe e calorosos amigos da Inovatos, passamos todos por um crescimento em conjunto que jamais vou me esquecer.

Aos meus colegas de turma por serem aqueles que trilharam boa parte deste caminho ao meu lado e por estarem curando minhas feridas e compartilhando suas dores comigo ao longo da graduação. Este trabalho não é apenas meu, mas de todos nós.

RESUMO

O Cerrado brasileiro possui rica biodiversidade, incluindo plantas popularmente conhecidas por suas propriedades medicinais. Essas plantas são fontes de compostos com atividades biológicas, interessando o estudo dos produtos naturais para que estes possam ser utilizados em benefício da saúde. Uma das plantas deste bioma é a *Senna rugosa*, utilizada como vermífugo e contra mordeduras de cobra. Apesar do potencial farmacológico já ter sido demonstrado para outras plantas do mesmo gênero, comprovando inclusive seu potencial antioxidante, pouco se sabe a respeito da capacidade terapêutica de *S. rugosa*. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides de extratos metanólicos preparados a partir da raiz, casca, folhas e flores de *S. rugosa*, bem como as suas atividades antioxidantes. O teor de compostos fenólicos totais dos órgãos da planta, foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, sendo que o extrato das cascas apresentou maior teor (62,5 mg EAG/g), enquanto, as flores foram as que apresentaram o menor valor (27,3 mg EAG/g). Para a determinação do teor de flavonoides foi utilizado o cloreto de alumínio, tendo o extrato preparado das folhas apresentado os maiores resultados (48,3 mg EQ/g) e o de raiz os menores (22,6 mg EQ/g). A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do sequestro dos radicais livres DPPH, dos quais apresentaram um aumento significativo desta atividade biológica até a concentração de 10 mg/ml, sendo a maior atividade antioxidante encontrada para o extrato preparado com a raiz (90%). Também, foram calculados os IC50 para cada um dos extratos apresentando valores de 6,61; 4,90; 7,24 e 6,76 mg/mL, respectivamente, para raiz, casca, folha e flor. Assim, os resultados demonstram que a atividade antioxidante está fora da faixa encontrada normalmente para o gênero *Senna*, sendo necessário mais estudos nesse sentido para melhores conclusões.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Cerrado. Metabólitos Secundários. Estresse oxidativo. Droga vegetal.

ABSTRACT

The Brazilian Cerrado has rich biodiversity, including plants popularly known for their medicinal properties. These plants are sources of compounds with biological activities, being interesting the study of natural products so that they can be used for the benefit of health. One of the plant of this biome is Senna rugosa, used as dewormer and against snake bites. Little is known about the therapeutic capacity, the pharmacological potential has already been demonstrated for other plants of the same genus, proving even their antioxidant potential. The aim of this study was to determine the content of total phenolic and flavonoid compounds of methanolic extracts prepared from S. rugosa root, bark, leaves and flowers, as well as their antioxidant activities. The content of total phenolic compounds in the plant organs was based on the Folin-Ciocalteu method, and the bark presented the highest amount (62.5 mg EAG / g), while the flowers presented the lowest value (27 , 3 mg EAG / g). For the flavonoid content, aluminum chloride was used, and the prepared extract of the leaves presented the highest results (48.3 mg EQ / g) and the lowest results (22.6 mg EQ / g). The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical sequestration method, which showed a significant increase of this biological activity up to the concentration of 10 mg / ml, being the highest antioxidant activity found for the extract prepared with the root (90%). Also, the IC50 for each of the extracts presenting values of 6.61 were calculated; 4.90; 7.24 and 6.76 mg / mL, respectively, for root, bark, leaf and flower. Thus, the results demonstrate that the antioxidant activity is outside the range normally found for Senna genus, and further studies are needed in this regard for better conclusions.

Key words: Medicinal plants. Cerrado. Secondary metabolites. Oxidative stress. Vegetable drug.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma
µL: microlitro
AA: atividade antioxidante
CoeA: coeficiente angular
DIC: doença isquêmica coronariana
DMSO: dimetilsulfóxido
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EM: extrato metanólico
EMT: extrato metanólico total
FC: Folin-Ciocalteu
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
m/v: massa por volume
mg: miligrama
mgEAG: miligramas de equivalente de ácido gálico
mgEQ: miligramas de equivalente de quercetina
mL: mililitro
mm: milímetro
nm: nanômetro
UV: ultravioleta
v/v: volume por volume
°C: graus Celsius
%: por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Plantas medicinais do Cerrado.....	9
2.2 Compostos fenólicos totais e flavonoides.....	10
2.3 Atividade antioxidante em plantas medicinais.....	11
3 OBJETIVOS.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Coleta do material vegetal e preparo dos extratos metanólicos (EMs).....	12
4.2 Dosagem de compostos fenólicos totais.....	12
4.3 Dosagem de flavonoides.....	13
4.4 Atividade antioxidante do radical livre DPPH.....	14
4.5 Análises estatísticas.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
6 CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A sociedade moderna conta com diversas drogas utilizadas no tratamento ou na prevenção dos problemas de saúde humana. Estas drogas são em grande parte de origem sintética, em oposição aos primeiros fármacos que foram concebidos a partir de produtos naturais. Entretanto, o número limitado de opções terapêuticas, ou até a falta de opção contra determinadas doenças, vem fazendo com que novas pesquisas, cujo objetivo é a identificação de compostos naturais com potencial biotecnológico e farmacológico, sejam realizadas. Algumas destas estudam plantas utilizadas há décadas na medicina popular, cujas informações são passadas ao longo de gerações, mesmo sem embasamento científico de suas propriedades. Estes estudos são, portanto, uma forma de valorizar os recursos naturais, e uma tentativa de atender à crescente demanda de fármacos do mercado.

Dentre os inúmeros problemas de saúde que a população enfrenta na atualidade, podemos destacar as patologias provocadas pelo processo de envelhecimento celular, como por exemplo o estresse oxidativo e a degeneração crônica. Tal envelhecimento é parcialmente causado pela ação dos radicais livres e da oxidação, que em desequilíbrio é responsável por danos celulares e conseqüentemente por algumas doenças. Compostos antioxidantes sintéticos capazes de sequestrar radicais livres são utilizados para evitar a degeneração crônica, mas assim como muitos outros fármacos sintéticos, estes apresentam uma preocupante toxicidade. Alternativamente, antioxidantes de origem natural apresentam uma taxa de toxicidade muito menor, tornando estudos nessa área de grande importância.

O Brasil conta com uma das mais ricas biodiversidades do mundo, sendo o Cerrado um dos biomas que mais contribui para este fato. Nesta região, a vegetação é rica em espécies que produzem metabólitos secundários, com atividade biológica e efeitos benéficos para o ser humano. Próximo à região de Patos de Minas; MG, uma espécie frequente é a *Senna rugosa*, conhecida popularmente como fedegoso do campo ou boi-gordo. Diversos trabalhos já demonstraram que as plantas pertencentes ao gênero *Senna* apresentam grande potencial farmacológico, dentre eles o potencial antioxidante. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de compostos fenólicos totais e flavonoides no extrato metanólico de diferentes órgãos de *S. rugosa*, bem como avaliar a sua atividade antioxidante.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais do Cerrado

O Cerrado se estende por uma área de aproximadamente duzentos milhões de hectares, abrangendo cerca de 24% do território nacional, sendo, portanto, o segundo maior bioma do país (BONANOMI et al., 2019). Embora tenha sido ocupado apenas recentemente, o uso intensivo da terra causou a devastação de quase 50% desse bioma, e apenas 19,8% permanecem inalterados (STRASSBURG et al., 2017). A degradação do Cerrado implica em uma perda imensurável da biodiversidade e com ela, importantes propriedades que poderiam ser utilizadas a favor da saúde.

A região apresenta características de savana, com o clima marcado pela precipitação e distribuição das chuvas em raras ocasiões ao longo do ano, fato que reflete em sua vegetação. As espécies de plantas apresentam características adaptativas em resposta à deficiência nutricional, estresse hídrico sazonal e às altas intensidades luminosas típicas da região, de tal forma que, seus estômatos são adaptados para reduzir o fluxo transpiratório e suas raízes atingem maiores profundidades no solo para conseguir água (ROSSATTO, 2009; SANO, 2019).

As plantas do Cerrado são utilizadas por comunidades locais com diversos fins, desde alimentícios até medicinais (ELLER et al., 2015). O conhecimento etnofarmacológico é o resultado da integração de uma população com o meio ambiente de sua região, o que se justifica na sua riqueza e diversidade (RODRÍGUEZ, 2009). Um exemplo de planta medicinal do Cerrado é o *Stryphnodendron adstringens*, conhecido popularmente como barbatimão, que já foi largamente estudado e teve suas atividades terapêuticas comprovadas cientificamente, relacionadas a vários compostos produzidos pelo seu metabolismo secundário, como os alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides e taninos. Essa planta é utilizada pela indústria farmacêutica devido suas propriedades anti-inflamatórias, principalmente na formulação de pomadas (LIMA, 2017).

A busca de novas moléculas com propriedades terapêuticas, é facilitada pelo vasto potencial da biodiversidade e pelo uso da bioprospecção no Brasil. O gênero *Senna* tem sido utilizado na medicina popular por suas atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiabética e antitumoral (CAMPOS, 2016). Alguns exemplos de espécies são a *Senna rugosa* e a *Senna velutina*, em que alguns estudos demonstram atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos ou compostos de alguns de seus órgãos (EBERHARDT, 2012;

SANTOS, 2016). A *Senna rugosa* pode ser encontrada desde a região norte até o sul do país, sendo mais comum na região centro-oeste, no Cerrado (SILVA, 2018). Dentre seus usos populares podemos citar a infusão de suas folhas e raízes como vermífugo e como de tratamento de mordedura de cobra e rouquidão (RODRIGUES et al., 2001; VILA VERDE et al, 2003). No entanto, ao contrário de outras espécies do gênero, existem poucos estudos na literatura a respeito das propriedades farmacológicas de *Senna rugosa*.

2.2 Compostos fenólicos totais e flavonoides

O metabolismo primário das plantas é responsável pela produção de seus componentes essenciais para o funcionamento e sobrevivência do organismo (WINK, 2015). Enquanto isso, o metabolismo secundário atua na produção de compostos responsáveis pela defesa das plantas contra agressões do meio ambiente, infecções de patógenos, defesa contra herbívoros, atrativos para polinizadores, agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (VIZZOTTO, 2010). Os metabólitos secundários das plantas são amplamente utilizados pelo homem como aditivos alimentares, aromatizantes, compostos bioquímicos de importância industrial, ou até mesmo fármacos (AKULA, 2011). Muitos destes, são utilizados na defesa contra patógenos e são potenciais antimicrobianos, podendo ser utilizado em diversas áreas da sociedade e gerar um impacto econômico significativo (SILVA, 2013).

Os compostos fenólicos estão entre os mais abundantes e importantes grupos de metabólitos secundários de plantas, com finalidade associada à inibição ou ativação de uma diversidade de sistemas enzimáticos, como quelantes de metais ou sequestro de radicais livres (SCHAFRANSKI, 2019). Dentre as suas subclasses, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos (LUTHRIA, 2006). Esses compostos são responsáveis por características específicas dos vegetais como o sabor, o odor e a cor, o que é passado às bebidas como os vinhos e os chás (SOUSA et al., 2007).

Flavonoides são polifenóis naturais onipresentes em plantas no geral, além de constantes em alimentos como frutas, legumes e chás. Sendo que destes já foram caracterizados nas últimas décadas (GEORGE et al., 2017). Estes produtos naturais são bem conhecidos por seus efeitos benéficos para a saúde e esforços estão sendo gastos para isolá-los. O número de artigos e pesquisas em torno de flavonoides aumentou de forma exponencial ao longo dos anos, muito mais rápido do que outros campos em constituintes de alimentos. Esse aumento parece estar relacionado à explosão contemporânea de interesse em nutracêuticos e na própria saúde em geral (PEREZ-VISCAINO, 2018).

Os flavonoides são agora considerados como um componente indispensável em uma variedade de aplicações nutricionais, farmacêuticas, medicinais e cosméticas. Isto é atribuído às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas. As pesquisas a respeito dessa classe ainda receberam um impulso após a descoberta de seu envolvimento na redução na taxa de mortalidade cardiovascular e na prevenção da doença isquêmica coronariana (DIC), mesmo que os mecanismos ainda não sejam bem compreendidos (PANCHE, 2016).

2.3 Atividade antioxidante em plantas medicinais

Há tempos já é sabido dos benefícios dos antioxidantes em plantas e alimentos, como por exemplo no vinho. Os franceses do sul têm uma incidência muito baixa de doença cardíaca coronária, apesar da dieta rica em gorduras e tabagismo, fenômeno que pode ser atribuído, no mínimo parcialmente, ao alto consumo de vinho tinto na região (RICE-EVANS, 1997). Antioxidantes são compostos envolvidos no mecanismo de defesa do organismo contra patologias associadas ao ataque de radicais livres. Embora o oxigênio desempenhe um papel importante nos sistemas biológicos das formas aeróbicas de vida, seus derivados são altamente tóxicos (DIMITROVA, 2017). Os radicais livres são produzidos como subprodutos ou produtos finais de algumas reações bioquímicas que contribuem para o desenvolvimento e manutenção das células. Altos níveis de radicais livres em sistemas normais resultam em desequilíbrio entre antioxidantes e radicais livres, o que leva a várias doenças patológicas (MASOKO, 2017).

Nos seres humanos, essas patologias podem levar ao desenvolvimento e/ou se caracterizarem como cânceres, doença coronariana, obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão, catarata, doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson (BARBORA, 2010). A prevenção dessas doenças poderia ser possível com o uso de plantas que contenham antioxidantes naturais, e com isso seriam candidatas terapêuticas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos. Uma vez que as propriedades antioxidantes de uma espécie podem ser provenientes de compostos fenólicos, é importante avaliar o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides, além de sua atividade antioxidante (TOHMA, 2016). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides de extratos metanólicos preparados a partir da raiz, casca, folhas e flores de *S. rugosa*, bem como as suas atividades antioxidantes.

3 OBJETIVOS

Determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides dos extratos metanólicos preparados a partir da raiz, casca, folhas e flores de *Senna Rugosa*, bem como determinar o IC50 e avaliar sua atividade antioxidante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal e preparo dos extratos metanólicos (EMs)

A coleta do material vegetal e preparação dos extratos foi realizado por Sousa (2017). A coleta ocorreu em uma área da zona rural de Patos de Minas, e o preparo dos extratos metanólicos (EMs) realizado de acordo com o protocolo descrito a seguir.

Após a coleta, a planta foi separada em órgãos vegetais de raiz, casca, folha e flor, e congelados em ultrafreezer a -80°C por pelo menos 48h. Posteriormente, os órgãos foram liofilizados por 48 h, e triturados em um moinho de facas até serem reduzidos em um pó fino. Para a produção dos extratos de cada órgão vegetal foi utilizado metanol (CH_3OH , 99% de pureza) como solvente. O volume de metanol, em mililitros (ml), foi de 10X a massa em grama (g) da amostra triturada de cada órgão. A mistura formada pelo pó e o solvente foi acomodada em um béquer por 72h, a temperatura ambiente e livre de luz, com agitação a cada 24h. Em seguida, solução obtida foi filtrada em papel filtro e com o auxílio de uma bomba a vácuo. A solução filtrada foi armazenada em um frasco âmbar, e a porção sólida ressuspensa novamente em metanol, sendo estas etapas repetidas por cinco vezes para a extração dos constituintes químicos da planta. As frações líquidas obtidas de cada etapa de extração, foram submetidas à evaporação rotativa a 55°C , com pressão constante e reduzida de 500 pascal (Pa). Ao final do processo de rotaevaporação, os extratos obtidos em cada uma das cinco etapas foram unidos e armazenados a -80°C até a realização dos experimentos posteriores.

4.2 Dosagem de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o reagente e o método Folin–Ciocalteu (FC) pelo método descrito por George et al. (2005). O reagente de FC

se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo compostos de cor azul que absorvem luz no comprimento de onda de 760 nm. Para a construção da curva padrão foi utilizada solução de ácido gálico.

Em tubos eppendorf foram adicionados 100 µL de água e os EMs dos quatro órgãos já mencionados de *Senna rugosa*, em uma concentração de 20 mg/mL. O ácido gálico diluído nas concentrações de 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L e 40 mg/L foi utilizado como um padrão experimental para a construção da curva de calibração. Uma solução de FC foi então preparada em um balão volumétrico de 50 mL, em uma concentração de 20% (v/v). Posteriormente, foram adicionados 400 µL de uma solução de carbonato de sódio (75g/L), agitada em um vortex (PHOENIX, AP 59) e deixada repousando em banho-maria (CIENITEC, CT-248) a 50°C durante 15 minutos. Os tubos foram então esfriados rapidamente em um banho de gelo e levados a um espectrofotômetro (Gehaka, UV-340G) para que seu conteúdo pudesse então ser avaliado à 760 nm de comprimento de onda. O teor de compostos fenólicos dos extratos foi calculado utilizando a **Equação 1**, e expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/g). Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados são valores médios obtidos para cada extrato.

Equação 1: (X) teor de compostos fenólicos totais em mgEAG/g; (Y) absorbância da amostra; (CoeL) coeficiente linear da curva do ácido gálico em µg; (CoeA) coeficiente angular da curva do ácido gálico em µg; (Ext) concentração do extrato usado no teste em µg/mL; (1000) fator de conversão de µg para mg.

$$X = \frac{\left[\frac{Y + CoeL}{CoeA} \right]}{Ext} \times 1000$$

4.3 Dosagem de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Hossain e Rahman (2011). Este método se baseia no uso do cloreto de alumínio, uma vez que o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Desse modo, evita-se a interferência de outras substâncias fenólicas, sendo possível determinar a quantidade de flavonoides, principalmente os ácidos fenólicos. Quercetina foi utilizada como flavonoide padrão para a construção da curva de calibração.

Os extratos foram testados a uma concentração de 1 mg/mL, diluídos em água destilada, sendo que 100 µL de cada extrato foi adicionado a um tubo eppendorf, acrescido de 20 µL de cloreto de alumínio 10% (m/v) e 20 µL de acetato de potássio a 1 M, e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram então levados ao espectrofotômetro para determinar as absorvâncias a 415 nm. Enquanto isso, a quercetina foi utilizada em concentrações duplo seriadas de 6,25 mg/mL a 200 mg/mL, para a construção da curva de calibração da absorvância a 415 nm. No branco foram utilizados 100 µL de água destilada.

4.4 Atividade antioxidante do radical livre DPPH

A capacidade antioxidante dos extratos pode ser determinada por diferentes metodologias, sendo que neste estudo foi empregado o método colorimétrico previamente descrito por Brand-Williams et al. (1995). Este método se baseia na transferência de elétrons para o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) em solução de metanol. A redução do DPPH por antioxidantes presentes na amostra é acompanhada pela redução da absorvância a 515 nm, alterando sua coloração de púrpura para amarelada e tendo a formação de difenil-picril-hidrazina. Essa diferença gerada é proporcional à atividade antioxidante do composto (SOUSA et al, 2007).

Para a realização do ensaio foram pesados 6 mg de DPPH, sendo transferido para um balão volumétrico e o volume foi completado com 250 mL do metanol 80%, gerando uma solução de DPPH a 60 µM. O balão foi então coberto com papel alumínio por se tratar de uma solução fotossensível. Para a construção da curva de calibração de DPPH, foram preparadas soluções nas concentrações 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM.

Para o ensaio, foram utilizados 25 µL de cada um dos quatro extratos, diluídos a 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL e 50 mg/mL, adicionados a 975 µL da solução do radical DPPH preparada anteriormente. Em seguida os tubos foram cuidadosamente homogeneizados e armazenados no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. Para a amostra controle, foi pipetado 25 µL de água destilada. Por fim, determinadas as absorvâncias a 515 nm e o metanol 80% foi utilizado para zerar o espectro. O porcentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos de porcentagem e expresso como atividade antioxidante (AA%), conforme a **Equação 2:**

Equação 2: (%AA) atividade antioxidante; (A^{CN}) absorvância do DPPH com o metanol; (A^{AM}) absorvância do DPPH com a amostra; (100) fator de conversão para porcentagem.

$$\%AA = \frac{A^{CV} - A^{AM}}{A^{CV}} \times 100$$

Os resultados foram plotados em gráfico de atividade antioxidante (AA%) versus concentração e os valores de IC50 (concentração dos extratos necessária para capturar 50% do radical livre DPPH) estimados de acordo com a equação da curva. As análises foram realizadas em triplicata e os valores do gráfico foram apresentados como média \pm desvio padrão.

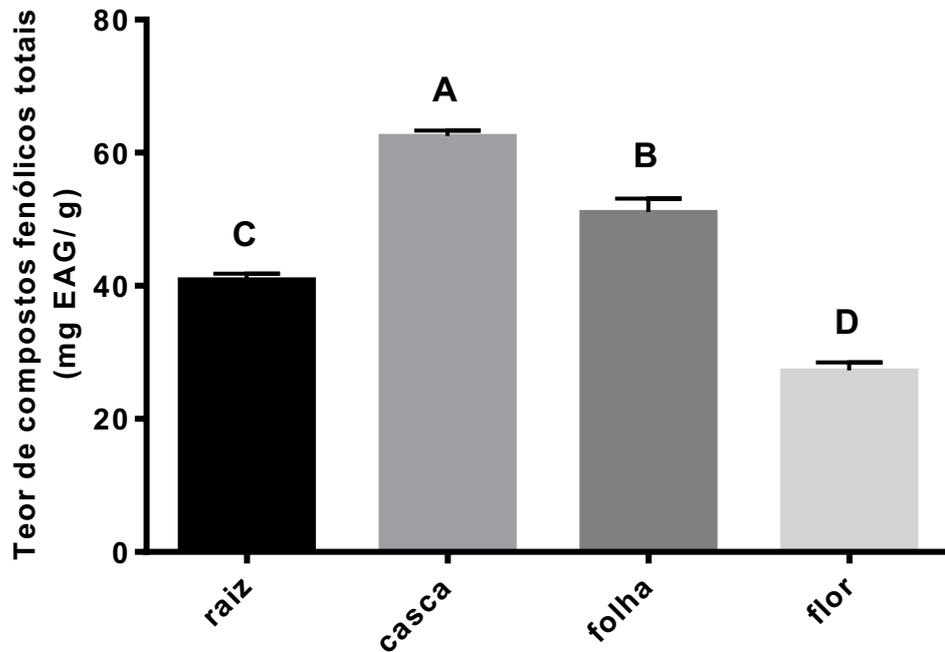
4.5 Análises estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 5.01. A análise de variância (ANOVA) do teor de compostos fenólicos totais e flavonoides foi realizada e utilizou-se do teste de Tukey para múltiplas comparações. Diferenças apresentando valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi determinado o teor de compostos fenólicos totais presentes nos diferentes extratos metanólicos utilizando o método de Folin-Ciocalteu, que apresentou os valores de 62,5 mg EAG/g na casca, 51,1 mg EAG/g nas folhas, 41,0 mg EAG/g na raiz e 27,3 mg EAG/g nas flores (**Figura 1**).

Figura 1: Teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/g) presente nos extratos metanólicos obtidos de diferentes órgãos de *Senna rugosa*. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).



Fonte: Próprio autor.

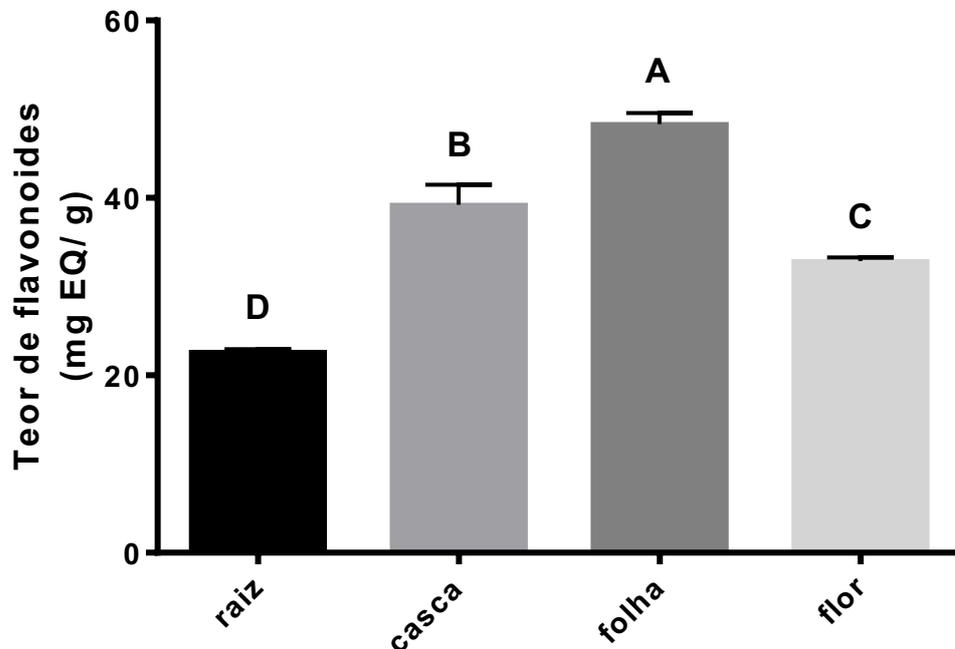
O metanol e o etanol estão entre os melhores solventes para a extração de compostos fenólicos (ROBY, 2013; SULTANA, 2007; SIDDHURAJU, 2002), indicando que o teor encontrado pode estar próximo à quantidade real presente nos diferentes órgãos da planta. No entanto, devemos levar em consideração que a metodologia empregando o reagente Folin-Ciocalteu possui limitações (SINGLETON e ROSSI, 1965), como por exemplo a sua inespecificidade, podendo reagir com outras classes de compostos, como o ácido ascórbico (HUDA-FAUJAN, 2009), triptofano, hidrazina, hidroxilamina, tampões biológicos contendo amina terciária, compostos N-hidroxila, compostos N-amino e N-heterociclos (IKAWA et al, 2003). Isso ocorre, pois, o método utilizando FC não mede exatamente o teor de fenóis e sim a capacidade redutora da amostra (HUANG et al, 2005). Além disso, a produção de polifenóis pelos organismos depende de fatores do meio como a luz e quantidade de água na planta, além dos fatores endógenos como o estágio de maturação (HABERMANN, 2016). Isto é possível observar na diferença de valores entre extratos de folhas jovens e maduras como foi demonstrado por Abdallah (2012).

O uso do reagente FC se deve ao fato do baixo custo e praticidade e outros métodos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou resinas de troca iônica (IKAWA et al, 2003), apesar de altamente eficientes são métodos bastante onerosos e por isso não foram empregados no presente estudo. Uma alternativa equiparável em vantagens ao método de FC mas que possui menos fatores limitantes é o da oxidação de fenóis catalisada por peroxidase em radicais fenoxila via peróxido de hidrogênio, que neste caso não é afetado por compostos como sulfitos e o ácido ascórbico, o que poderia ter resultado em uma análise de maior qualidade (NARDINI, 2018). Mas dada a frequência com que o método de FC é utilizado na literatura, contamos com uma enorme quantidade de dados para comparar e nos basear, tornando os resultados mais fidedignos.

Nestes resultados, o teor de compostos fenólicos totais para a casca e folha foram os mais altos, e os da raiz e flor mais baixos, o que reforça a necessidade desta variável ser estudada em extratos separados para cada órgão. Como casca e folha são órgãos externos das plantas, estes são mais susceptíveis aos danos foto-oxidativos causados por radiação UV. Além disso, os compostos fenólicos e flavonoides estão entre alguns dos componentes responsáveis pela proteção dos tecidos das plantas contra os danos da radiação, o que pode justificar o teor encontrado nestes órgãos, principalmente em plantas como a *Senna rugosa* que são oriundas do Cerrado, um bioma com alta incidência de raios solares (NUNES, 2018). Enquanto que para a flor, apesar de também ser um órgão externo e mesmo assim ter apresentado uma baixa quantidade de compostos fenólicos, isto pode ser devido aos indícios de que mesmo em menor quantidade geral, os compostos mais frequentemente encontrados nas flores, são justamente aqueles capazes de lhes proporcionar pigmentação como os próprios flavonoides, mais especificamente as antocianinas e, portanto, um certo grau de proteção aos raios UV (AGATI, 2012). Padrões de absorção de UV característicos de flavonóis são encontrados em plantas da mesma espécie como na *Senna velutina*. Além disso, as proantocianidinas diméricas e triméricas são raras na natureza, mas são frequentemente relatadas no gênero *Senna* e são até mesmo utilizadas como marcadores para o mesmo e são pertencentes ao grupo dos flavonoides (CAMPOS, 2016).

A quantidade de flavonoides presente nos extratos foi determinada pelo método colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio, e o extrato preparado a partir das folhas foi o que apresentou maiores valores sendo 48,30 mg EQ/g, a casca apresentou 39,22 mg EQ/g, as flores apresentaram 32,86 mg EQ/g, enquanto o extrato das raízes apresentou os menores valores de 22,66 mg EQ/g (**Figura 2**).

Figura 2: Teor de flavonoides (mg EQ/g) presente nos extratos metanólicos obtidos de diferentes órgãos de *Senna rugosa*. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).



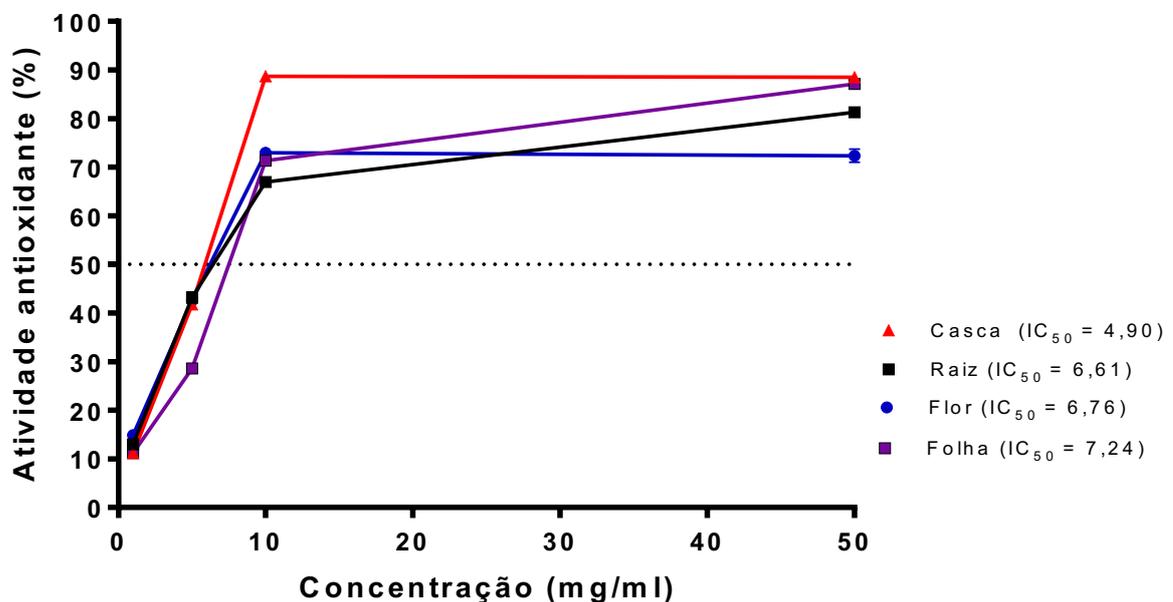
Fonte: Próprio autor.

Como reportado na literatura, as condições do meio, variações sazonais e fatores genéticos podem influenciar a quantidade de flavonoides que pode ser encontrada nas plantas (ARYAL, 2019). Mas, tipicamente este teor nas folhas e flores tende a ser maior quando comparado aos demais órgãos das plantas (DOKHANI, 2005; SABOONCHIAN, 2014). Os flavonoides possuem uma enorme gama de funções nas plantas como proteger a integridade dos cloroplastos nas folhas e proteger contra o dano oxidativo causado pela radiação UV, sendo as folhas geralmente as mais expostas (AGATI, 2012), o que poderia justificar o maior teor destes compostos nas folhas em relação aos demais órgãos analisados. Outra função dos flavonoides está relacionada à capacidade de coloração nas flores (IWASHINA, 2015), e isto, poderia indicar que boa parte dos polifenóis encontrados nas flores seriam flavonoides e um teor semelhante ao determinado neste estudo já foi observado em flores de *Senna splendida*, com $48,70 \pm 3,25$ (MAIA, 2017).

A atividade antioxidante (AA%) foi avaliada pelo método do sequestro dos radicais livres DPPH pelos extratos de *S. rugosa*. A partir da regressão não linear dos resultados obtidos para as diferentes concentrações foi possível determinar o IC₅₀ dos extratos sendo o preparado a partir das folhas o que apresentou o maior valor com 7,24, a raiz e flor apresentaram valores

de respectivamente 6,61 e 6,76, enquanto a casca o menor valor com 4,90. O IC_{50} é uma medida quantitativa que indica o quanto de uma substância inibidora específica é necessária para inibir, *in vitro*, um determinado processo biológico ou componente biológico em 50%, sendo comumente usados para indicar e determinar a potência das capacidades inibidoras de uma substância, neste caso a da oxidação. Então o menor valor encontrado, indica que o órgão em questão possui componentes com maior potência antioxidante, enquanto o de maior indica a maior impotência dentre os órgãos testados (**Figura 3**).

Figura 3: Atividade antioxidante (%) dos extratos metanólicos obtidos de diferentes órgãos de *Senna rugosa*.



Fonte: Próprio autor.

Como os fenóis totais, e dentre eles os flavonoides, são conhecidos na literatura como compostos com atividade antioxidante, os resultados encontrados neste estudo foram abaixo do visto anteriormente em outros trabalhos. Apesar dos teores de fenóis totais e flavonoides encontrados nos extratos de *S. rugosa* apresentarem valores próximos aos encontrados para outras plantas, principalmente considerando a grande variação observada entre indivíduos e condições (MAIA, 2017), este está dentro de uma faixa encontrada previamente para plantas do mesmo gênero *Senna*, como $79,37 \pm 4,46$ para os fenóis totais nas flores de *Senna siamea* (BARNABY, 2016) e $87,04 \pm 0,0071$ para os flavonoides do caule de *Senna cana* (MONTEIRO, 2018). Entretanto, a atividade antioxidante apresentou valores relativamente baixos, sendo necessárias altas concentrações, entre 10 e 50 mg/mL para que os extratos

apresentassem seu efeito antioxidante máximo, enquanto existem trabalhos que detectaram tal atividade com $\mu\text{g/mL}$ com *Senna splendida*, *Senna geórgica*, *Senna gardneri*, *Senna cana*, *Senna pendula* (MAIA, 2017; MONTEIRO, 2018). No trabalho de Eberhardt (2012), a atividade antioxidante máxima comparável ao padrão de ácido ascórbico foi observada em uma concentração de apenas 25 $\mu\text{g/mL}$ para as folhas de *Senna rugosa*.

Uma das possíveis causas para a grande diferença na atividade antioxidante observada pode ter sido o longo tempo de armazenamento dos extratos, em que fatores conhecidos como a possível exposição a luz e temperaturas não ideais podem desestabilizar os polifenóis e flavonoides, além de reduzir a atividade antioxidante (LIZETTE et al, 2015). Além disso, o método DPPH também é conhecido por apresentar variações no cálculo de IC50, influenciado pelas diferentes concentrações de DPPH, tempo de incubação e volume de amostra. A natureza da reação desse método com o antioxidante difere dependendo da natureza dos antioxidantes, ou seja, em alguns casos a reação pode levar até horas para reagir totalmente e tendem a mostrar valores de IC50 significativamente mais baixos em um tempo de reação fixo (TAN, 2015). O que pode ser solucionado em caso de um monitoramento da reação em determinados intervalos de tempo ou relatar os resultados em porcentagem de redução do DPPH (TAN, 2015; ALAÑÓN et al, 2011).

Outro possível problema está relacionado ao uso do DMSO para a preparação dos extratos no trabalho de Sousa (2017), uma vez que este atua como um solvente e permite a dissolução de várias classes de moléculas orgânicas. Existem diversos indicativos de que o DMSO tem capacidade doar e receber elétrons e artigos mostram que pode atuar como antioxidante ou mesmo como pro-oxidante, com a habilidade de interagir com algumas moléculas do metabolismo secundário das plantas (SIQUEIRA, 2017; KHANAVI, 2015), atuando como um solvente que permite a dissolução de moléculas orgânicas e assim interferindo nos resultados obtidos, e é por conta destas suas propriedades que o DMSO representa um problema quando usado como solvente no desenvolvimento de novas drogas antioxidantes (SANMARTÍN-SUÁREZ, 2010; DAMASCENO, 2015; KABEYA, 2013). No estudo realizado por Sanmartín-Suárez (2011), a reação de redução causada pelo DMSO foi estatisticamente significativa para todas as concentrações testadas. Então é de se questionar o motivo do reagente ter sido utilizado, mas isso se deve ao fato de que no trabalho anterior de Sousa (2017), os extratos foram diluídos em DMSO para que fossem feitas análises microbiológicas.

Tendo em vista os resultados de atividade antioxidante, sugere-se que estudos futuros utilizem extratos preparados com menor tempo antes do início dos ensaios e com um outro

solvente como o etanol puro e sem que haja o contato com compostos capazes de interferir nas AAs como o DMSO (DO et al., 2014). Além disso, a avaliação de outras classes de componentes do metabolismo secundário de *S. rugosa* e derivados da glicose poderiam complementar o estudo. De qualquer forma, trabalhos como este, auxiliam no mapeamento dos possíveis potenciais dos recursos naturais e que podem ser complementados e aprofundados futuramente.

6 CONCLUSÕES

Os teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides encontrados em cada órgão estão dentro de proporções vistas anteriormente na literatura, neste caso com o teor de compostos fenólicos totais sendo encontrado em maior quantidade na casca da planta e em menor nas flores, enquanto o teor de flavonoides sendo encontrado em maior quantidade nas folhas e em menor nas raízes. Uma vez que estes são conhecidos por sua atividade antioxidante, a mesma encontrada neste estudo pode ser considerada atípica com o que é observado em outros estudos. Dentre os motivos para isto, se destaca o longo tempo de armazenamento dos extratos metanólicos e a utilização do DMSO em todos os extratos para a realização de análises microbiológicas no trabalho de Sousa (2017), uma vez que este possui comportamento tanto de pró-oxidante quanto de antioxidante. Sendo recomendado que em estudos futuros evite-se o contato com este tipo de interferente e que se realize o preparo dos extratos e os ensaios em prazos menores.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, S.B. et al. Distribution of phenolic compounds and antioxidant activity between young and old leaves of *Carthamus tinctorius* L. and their induction by salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1161-1169, nov. 2012.

AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, n. 1, p. 67-76, nov. 2012.

ALANÓN, M. E. et al. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. **Food Chemistry**, v. 128 n. 4, p. 997-1002, oct. 2011.

ARYAL, S. et al. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. **Plants**, v. 8, n. 4, p. 96, abr. 2019.

BARNABY, A. G. et al. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Fatty Acid Profile of *Delonix regia*, *Cassia fistula*, *Spathodea campanulata*, *Senna siamea* and *Tibouchina granulosa*. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 56, 2016.

BONANOMI, J. et al. Protecting forests at the expense of native grasslands: Land-use policy encourages open-habitat loss in the Brazilian Cerrado biome. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 17, n. 1, p. 26-31, jan. 2019.

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

CAMPOS, J. F. et al. The Chemical Profile of *Senna velutina* Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2016, n. 1, p. 1-12, set. 2016.

DAMASCENO, J. P. L. et al. Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 395-400, jul. 2015.

DIMITROVA, L. et al. Antimicrobial and antioxidant potential of different solvent extracts of the medicinal plant *Geum urbanum* L. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, nov. 2017.

DO, Q. D. et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 296-302. set. 2014.

DOKHANI, S. et al. Analysis of Aroma and Phenolic Components of Selected *Achillea* Species. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 55-62, jul. 2005.

EBERHARDT, G. N. **Atividade antioxidante, antidiabética e antimicrobiana de Senna Rugosa (G. Don) HS Irwin & Barneby (1982) E Senna velutina (Vogel) HS Irwin & Barneby**. 2012. 83 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde, Dourados, 2012.

ELLER, S. C. W. S. et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 36, n. 1, jan. 2015.

GEORGE, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, jan. 2005.
GEORGE, V. C. et al. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: Role in genome stability. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 1-14, jul. 2017.

HABERMANN, E. et al. Antioxidant activity and phenol content of extracts of bark, stems, and young and mature leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 898-904, nov. 2016.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 672-676, abr. 2011.
HUANG, D. et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, mar. 2015.

IKAWA, M. et al. Utilization of FolinCiocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811-1815, mar. 2003.

IWASHINA, T. Contribution to Flower Colors of Flavonoids Including Anthocyanins: A Review. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 3, p. 529-544, mar. 2015.

KABEYA, L.M. et al. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in hypochlorous acid and taurine chloramine scavenging assays: interference of dimethyl sulfoxide and other vehicles. **Analytical Biochemistry**, v. 437, n. 2, p. 130–132, jun. 2013.

KHANA VI, M. et al. Comparison of antioxidant activity and total phenols of some date varieties. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 2, p. 104-108, dec. 2015.

KUSUMA, I. W. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of medicinal plants used by the Bentian tribe from Indonesia. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3, p. 191–196, set. 2014.

LIMA, T. C. D. de et al. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 329-338, fev. 2017.

LUTHRIA, D. L. et al. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 9, p. 1350–1358, mar. 2006.

MAIA, I. R. O. et al. Content of total phenolic compounds, flavonoids and tannins in methanol extracts of the genus *Senna* Mill. from the northeast of Brazil and evaluation of antioxidant capacity. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 5, p. 1321-1325, jun. 2017.

MASOKO, P. Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Spilanthes mauritiana* Used Traditionally in Limpopo Province, South Africa. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 22, n. 4, p. 936- 943, dez. 2017.

MONTEIRO, J. A. et al. Bioactivity and Toxicity of *Senna cana* and *Senna pendula* Extracts. **Biochemistry Research International**, v. 2018, n.1, p. 1–10, abr. 2018.

NARDINI, M. et al. Effect of Sulfites on Antioxidant Activity, Total Polyphenols, and Flavonoid Measurements in White Wine. **Foods**, v. 7, n. 3, p. 35, mar. 2018.

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potential of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, n.1, p. 119-123, dec. 2018.

PANCHE, A. N. et al. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 6, n. 5, p. 1-15, dez. 2016.

PEREZ-VIZCAINO, F. et al. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, n. 1, p. 107–112, mai. 2018.

RICE-EVANS, C. et al. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, abr. 1997.

RODRIGUES, V.E.G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência Agrotécnica**, v.25, n.1, p.102-123, fev. 2001.

RODRÍGUEZ, F. M. et al. Cuban collaboration with the Program for Applied Research and Diffusion of Medicinal Plants in the Caribbean (TRAMIL). **Revista Cubana Plantas Medicinales**. v. 14, n.4, out. 2009.

ROSSATTO, D. R. et al. An evergreen neotropical savanna tree (*Gochnatia polymorpha*, Asteraceae) produces different dry- and wet-season leaf types. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 5, p. 439-443, jan. 2009.

SABOONCHIAN, F. et al. Phenolic and flavonoid content of *Elaeagnus angustifolia* L. (leaf and flower). **Avicenna J. Phytomed**, v. 4, n. 4, p. 231-238, jul. 2014.

SANMARTÍN-SUÁREZ, C. et al. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 63, n. 2, p, 209–215, mar. 2011.

SANO, E. E. et al. Land use dynamics in the Brazilian Cerrado in the period from 2002 to 2013. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, n. 1, abr. 2019.

SANTOS, L. E. et al. Leaf Extract from *Senna Velutina* Promotes Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect in Leukemic Cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, n.1, p. S129–S130, nov. 2016.

SCHAFRANSKI, K. et al. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**. 100 p. Dissertação de Mestrado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

SIDDHURAJU, P. P. et al. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flower and fruit pulp. **Food Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 61-67, out. 2002.

SILVA, C.M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos**. 2013. 109 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife, 2013.

SILVA, M. J. et al. Sinopse taxonômica do gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae) na Região Centro-Oeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 733–763, abr. 2018.

SIQUEIRA, R. M. P. et al. Antioxidant Activity Assay In vitro of Polysorbate 80 and Dimethyl Sulfoxide (DMSO) through DPPH Method. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 5, p. 371-376, jun. 2017.

SOUSA, C. M. M. S. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, jan. 2007.

SOUSA, H. A. **Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica do extrato metanólico total de *Senna rugosa***. 26 p. Monografia – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.

STRASSBURG B. B. et al. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology Evolution**, v. 1, n. 4, p. 99, mar. 2017.

SULTANA, B. et al. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1106–1114, dez. 2007.

TAN, J. B. L. et al. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 814–822, abr. 2015.

TOHMA, H. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/. **Food Measure**, v. 11, n. 1, p. 556 566, jan. 2017.

VILA VERDE, G.M. et al. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognisia**, v. 13, n. 1, p. 64-66, jun. 2003.

VIZZOTTO, M. et al. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251-286, set. 2015.