

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

FERNANDA FARISCO

**DOSAGEM DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, ANTOCIANINAS E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS DE *Richardia brasiliensis*
GOMES (POAIA-BRANCA) PRODUZIDOS POR MACERAÇÃO DINÂMICA OU
BANHO ULTRASSÔNICO**

**PATOS DE MINAS
DEZEMBRO DE 2019**

FERNANDA FARISCO

**DOSAGEM DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, ANTOCIANINAS E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS DE *Richardia brasiliensis*
GOMES (POAIA-BRANCA) PRODUZIDOS POR MACERAÇÃO DINÂMICA OU
BANHO ULTRASSÔNICO**

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

Prof^a. Dra. Enyara Rezende Morais.

**PATOS DE MINAS
DEZEMBRO DE 2019**

FERNANDA FARISCO

**DOSAGEM DE COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, ANTOCIANINAS E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS DE *Richardia brasiliensis*
GOMES (POAIA-BRANCA) PRODUZIDOS POR MACERAÇÃO DINÂMICA OU
BANHO ULTRASSÔNICO**

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:



Profa. Dra. Enyara Rezende Moraes – IBTEC - UFU
Presidente



Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes – IQ - UFU
Membro



Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira – IBTEC -UFU
Membro

Patos de Minas-MG, 06 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Gratidão primeiramente a Deus, por toda força e luz nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao meu amado pai Marco Farisco, por todo apoio de todas as formas possíveis para que esse sonho se realizasse, por sempre estar ao meu lado e sempre acreditar em mim.

A minha querida mãe Regina Farisco e a minha adorada avó Lourdes Farisco por serem além de mãe, as melhores amigas, que me deram todo o suporte, carinho e sempre torceram pelas minhas realizações.

A minha família, família Farisco, por toda paciência, por serem o alicerce de tudo, por todo o amparo e amor.

À minha prezada orientadora Dra. Enyara Moraes, por ter me acolhido de braços abertos e ter dado todo o auxílio para que essa monografia saísse com excelência, além de todo ensinamento que me passou com maestria.

Aos professores Dr. Marcos Gomes e Dra. Terezinha Teixeira por toda a colaboração que foi fundamental para a execução deste trabalho e por serem profissionais primorosos.

Aos técnicos de laboratório Carla, Lucas, Vanessa, e Renan por serem tão solícitos e prestativos a toda ajuda necessária para realização desse trabalho.

Ao meu namorado Pedro, por todo amor, carinho e compreensão e por estar presente em todos os momentos da minha vida dando apoio e proteção.

Aos meus queridos amigos, Beatriz, Bárbara e Bruno por me apoiarem emocionalmente e afetivamente em toda essa jornada, e por todo o companheirismo e carinho de sempre.

A minha querida colega de laboratório Priscila, por toda ajuda e apoio que foi fundamental para esse trabalho acontecer.

A todos meus professores que passaram diversos ensinamentos ao decorrer do curso e todas as entidades estudantis a qual fiz parte que contribuíram para minha experiência e aprendizado.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para que essa fase tão importante ocorresse de forma formidável.

RESUMO

Os metabólitos secundários tem sido alvo de pesquisas com plantas medicinais desde os primórdios, devido as suas propriedades benéficas a saúde, destacando-se ações antioxidante e antimicrobiana. A *Richardia brasiliensis* Gomes é uma planta ambientada no Cerrado, popularmente conhecida como Poaia-branca. É uma planta medicinal de uso popular e possui efeitos expectorante, emética, diaforética, vermífuga e para o tratamento de hemorroidas, sendo possível alvo para pesquisas com fins farmacológicos. O presente trabalho objetivou a extração etanólica dos compostos naturais da *R. brasiliensis* através de dois métodos de extração, a maceração dinâmica e o banho ultrassônico e a quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides, antocianina e atividade antioxidante. Os métodos extrativos utilizados interferiram nos resultados obtidos. Observou-se maior quantidade de compostos fenólicos totais através do método de extração por maceração dinâmica em relação ao banho ultrassônico. Porém, em relação aos flavonoides totais e antocianinas observou-se maior quantidade no extrato bruto produzido pelo método do banho ultrassônico em relação a maceração dinâmica. A atividade antioxidante foi igual nos extratos brutos obtidos pelos dois métodos. Dessa forma, a *R. brasiliensis* demonstra ser uma planta medicinal com perfil fitoquímico que deve ser investigado mais profundamente para aplicação farmacológica futura.

Palavras-chave: Planta medicinal. Metabólitos secundários. Etnofarmacologia. Medicina tradicional.

ABSTRACT

Secondary metabolites have been the target of research with medicinal plants since the early days, due to their beneficial health properties, highlighting antioxidant and antimicrobial actions. *Richardia brasiliensis* Gomes is a plant set in the Cerrado, popularly known as Poaia-Branca. It is a medicinal plant of popular use and has expectorant, emetic, diaphoretic, vermifuge effects and for the treatment of hemorrhoids, being possible target for research for pharmacological purposes. The present work aimed the ethanolic extraction of *R. brasiliensis* natural compounds through two extraction methods, the dynamic maceration and the ultrasonic bath and the quantification of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanin and antioxidant activity. The extractive methods used interfered in the obtained results. Higher total phenolic compounds were observed through the dynamic maceration extraction method in relation to the ultrasonic bath. However, in relation to the total flavonoids and anthocyanins, it was observed a higher amount in the crude extract produced by the ultrasonic bath method in relation to the dynamic maceration. The antioxidant activity was equal in the crude extracts obtained by both methods. Thus, *R. brasiliensis* proves to be a phytochemical profile medicinal plant that should be further investigated for future pharmacological application

Keywords: Medicinal plant. Secondary metabolites. Ethnopharmacology. Traditional medicine

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
Etnofarmacologia: uso de recursos naturais aplicados contra doenças	8
Compostos fenólicos.....	12
Flavonoides.....	12
Antocianinas	13
Antioxidantes.....	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo geral	15
Objetivos específicos.....	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Coleta, identificação e obtenção dos materiais vegetais.....	16
2.2 Obtenção dos extratos brutos dos materiais vegetais de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes por banho ultrassônico.....	16
2.3 Obtenção dos extratos brutos dos materiais vegetais de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes por maceração dinâmica	17
2.4 Determinação de Compostos Fenólicos nos extratos brutos	17
2.5 Determinação de Antocianinas e Flavonoides.....	17
2.6 Determinação da atividade antioxidante.....	18
2.7 Análises estatísticas	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1 Compostos fenólicos.....	19
3.2 Atividade antioxidante.....	21
3.3 Flavonoides.....	22
3.4 Antocianinas	24
4 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado, cuja extensão brasileira está localizada principalmente na região centro-oeste do país, constitui o segundo maior bioma da América Latina e é considerado rico em diversidade de flora, conhecido como a savana mais rica do planeta (BANDEIRA,2018). Destacando-se as plantas com propriedades terapêuticas, que tem chamado a atenção para possíveis estudos como espécies medicinais e agentes medicamentosos, muito embora ainda pouco estudadas.

Os produtos naturais têm sido utilizados desde os primórdios na busca por alívio e cura e para diversas doenças. Dentre estes, destacam-se os metabólitos secundários que são compostos orgânicos não essenciais às plantas, porém são biologicamente importantes para sua defesa, desenvolvimento ou crescimento.

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários que são os compostos fenólicos, os terpenos e os alcaloides. O foco deste estudo foi nos compostos fenólicos que são alvo de grande interesse na ciência, porque além de estarem presentes no dia-a-dia, alguns possuem propriedades antioxidantes, o que é de suma importância para avanço de estudos contra o estresse oxidativo. Além disso, alguns possuem atividade antimicrobiana, sendo importante no atual cenário farmacêutico de falta de antimicrobianos efetivos.

Nas pesquisas com produtos naturais é importante a escolha da metodologia para a extração dos metabólitos de interesse. Para a retirada dos compostos fenólicos são utilizadas inúmeras técnicas, porém a eficiência do processo deve ser primordial. No presente trabalho foram utilizados os métodos extrativos por maceração dinâmica e de banho ultrassônico, ambos empregados com o propósito de uma extração superior, visto que possuem uma melhor capacidade de transferência de massa, em que se tem o maior proveito dos compostos na passagem para o solvente, garantindo eficiência na quantificação dos compostos (TOMA et al., 2001).

REFERENCIAL TEÓRICO

Etnofarmacologia: uso de recursos naturais aplicados contra doenças

O homem busca no meio ambiente, desde a antiguidade, meios para melhorar a qualidade de vida, destacando-se o uso de medicamentos a partir de plantas, contudo não

existem estudos suficientemente aprofundados da eficiência dos vegetais empregados (ANDRADE et al., 2018).

A etnofarmacologia é considerada o estudo dos fármacos tradicionais a partir das plantas medicinais (SASSAKI et al., 2016). É considerada a ciência que associa os conhecimentos populares referentes a essas espécies vegetais com os aprendizados químicos e farmacológicos das mesmas (VASCONCELOS et al., 2016). Para mais, pode-se classificar também como a investigação científica interdisciplinar de fontes biologicamente ativas, aplicadas e observadas pelo homem (SASSAKI et al., 2016).

Conforme definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), a etnofarmacologia está relacionada com a combinação de informações obtidas de usuários de plantas medicinais juntamente com os estudos químicos e farmacológicos, podendo estimular as pesquisas e aumentar a produção de novos medicamentos a partir da descoberta de determinadas estruturas e princípios ativos vegetais (SASSAKI et al., 2016).

Atualmente, no Brasil, considera-se ampla a diversidade de espécies vegetais, e a utilização de plantas medicinais é bastante expressiva (SASSAKI et al., 2016). Aproximadamente 20% do total de espécies vegetais do mundo, se encontram no Brasil e destes, em torno de 55 mil espécies tem potencial medicinal (SASSAKI et al., 2016). A partir do estudo das plantas medicinais nota-se que a ligação do saber popular ao meio ambiente são essenciais para o desenvolvimento sustentável (VASCONCELOS et al., 2016).

As plantas medicinais compreendem todas as espécies vegetais que exibem determinadas particularidades químicas, como a de antioxidante, por exemplo, além de um relato de aplicação tradicional como agente terapêutico. Sendo que para uma planta ser qualificada como medicinal ela não pode somente dispor de precursores químicos de fármacos entre seus componentes, precisa também ter sido relatada com usos populares (MENEGUELLI et al., 2017).

As mesmas são amplamente utilizadas na medicina popular e são consideradas medicamentos tradicionais, uma vez que vem desempenhando um papel fundamental na saúde há milhares de anos. Elas têm sido empregadas no tratamento de diversos problemas de saúde e esse vasto consumo é feito através de óleos, pós, gomas, chás e demais formas associadas. A pesquisa científica envolvendo plantas medicinais aumentou significativamente como alternativa terapêutica para diversas patologias (CARDOZO et al., 2018).

Embora haja um progresso na ciência e na produção de fármacos comercializados, a utilização de plantas medicinais como tratamento para afecções ainda é habitualmente empregada popularmente. A Organização Mundial de Saúde (OMS), recentemente, estimou

que cerca de 80% da população mundial fazia uso de produtos naturais e medicinais (KOZERA et al., 2018). As plantas medicinais, bem como as pesquisas científicas envolvendo suas aplicações, utilizações e princípios ativos, têm sido alvo de investimento de países fortemente produtivos, nos quais, os meios de comunicação enfatizam o emprego de produtos naturais, baseados no argumento de que esses compostos oferecem uma vida mais saudável e conveniente (KOZERA et al., 2018).

Nessa perspectiva, o uso de compostos ativos biológicos isolados de plantas medicinais, tem atraído enorme atenção, na profilaxia e tratamento de doenças infecciosas (GIBBONS, 2008). Frequentemente, tem sido relatada na literatura científica a ação inibitória de determinados extratos vegetais contra microrganismos, e como possíveis agentes de controle alternativo para a redução de cepas resistentes (RIBEIRO et al., 2018).

***Richardia brasiliensis* Gomes**

A *Richardia brasiliensis* Gomes é uma espécie vegetal popularmente conhecida como poaia-branca (TORRES-LEITE et al., 2018). É uma planta ambientada no bioma brasileiro do Cerrado, daninha, anual e herbácea, nativa da América do Sul e no Brasil ocorre com predominância em regiões do Centro-Oeste, Sudeste e Sul, sendo corriqueira em solos de textura média, com boa umidade (FIGUEIREDO et al., 2009).

Pertence à família Rubiaceae, que por compreender aproximadamente 620 gêneros e 13.200 espécies, é considerada a quarta maior família dentre as angiospermas (TORRES-LEITE et al., 2018). Ocorrendo predominantemente em regiões tropicais do Brasil, salientando enorme relevância para as indústrias alimentícia, ornamental e farmacêutica (PINTO et al., 2008).

É notável a importância desta família no Brasil, para as indústrias alimentícias, ornamentais e farmacêuticas. Além da produção de diversos metabólitos secundários como alcalóides, taninos, saponinas, esteróides, terpenos e flavonoides. Dentre eles ressaltam-se os terpenóides e os flavanóides que são encontrados nas espécies do gênero *Richardia* (BADOC; PATOUILLE; LACOMBLEZ, 2005).

Os triterpenos são considerados o grupo mais importante dos terpenóides, dentre suas propriedades medicinais se destacam os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais. Ademais, os flavonoides são compostos fenólicos que dispõem dentre diversos efeitos a ação antioxidante (PINTO et al., 2008).

Na medicina popular, a poaia-branca é empregada como planta medicinal através do uso de sua folha com efeitos antieméticos e para tratamento do diabetes. Além disso, dispõem de utilização por meio de infusão ou decocção da raiz, como expectorante, emética, diaforética, vermífuga, para o tratamento de hemorroidas e propriedades antimicrobianas (FIGUEIREDO et al., 2009).

As folhas de *R. brasiliensis* apresentam diversos compostos isolados a partir de maceração dinâmica como alcalóides, flavonóides, esteróides, triterpenóides, cumarinas, resina (FIGUEIREDO et al., 2009) e compostos fenólicos (CANALE, 2012). Destacando os flavonoides que foram os mais encontrados nos trabalhos de Figueiredo (2009) e Canale (2012), assim como Souza (2009) que encontrou pela primeira vez o flavonoide canferol nessa espécie.

Dessa forma, pode-se perceber o amplo potencial do gênero da *Richardia brasiliensis* associado com a riqueza de metabólitos apresentados pela família Rubiaceae.

Métodos de extração

Nos trabalhos de Figueiredo et al (2009) e Canale (2012) utilizou-se o método de maceração dinâmica, no qual o solvente fica em contato com a espécie vegetal seca pulverizada com agitação constante. O uso deste método propicia condições consideradas eficazes, no que se diz respeito à relação da razão massa de solvente/massa de alimentação, demonstrando uma transferência do extrato da matriz vegetal para o solvente, aumentando a eficiência da extração (VEGGI, 2013).

A maceração dinâmica consiste em uma técnica de extração dos compostos da planta, em recipiente fechado e temperatura ambiente durante um período que pode ser de horas ou mais longo, o qual passa por agitação sem a renovação do solvente extrator, utilizando solventes em função da polaridade (JACQUES, 2005);

Já a extração com ultrassom, caracteriza-se pelo processo que usa energia de ondas sonoras transmitidas em frequências maior que a capacidade auditiva humana, provocando cavitações e estresse mecânico das células, aumentando a capacidade de transferência de massa e ruptura celular para melhor resultado de extração, devido a passagem dos compostos para o solvente (TOMA et al., 2000).

Visto que os métodos extrativos citados são eficazes para a melhor transferência dos compostos de interesse para o solvente (GRAY et al., 2006), os mesmos foram utilizados.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários vegetais, que compreendem um grupo extenso de moléculas que são produzidas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Frequentemente são identificados em fontes vegetais e considerados substâncias que possuem ao menos um anel benzênico hidroxilado (BRANDÃO et al., 2019).

São originados no metabolismo secundário dos vegetais, derivados da fenilalanina e tirosina. Além disso, são fundamentais para o crescimento e reprodução das plantas e encontram-se na forma livre ou de glicosídeos e proteínas (ROCKENBACH, 2008).

Há uma diversidade de efeitos biológicos relacionada aos compostos fenólicos, entre elas, a atividade antioxidante, a qual acarreta um grande impacto nos setores industriais (BRANDÃO et al., 2019). Tal atividade, deve-se à capacidade dos compostos fenólicos de doar hidrogênio ou elétrons e em arranjar elétrons desemparelhados nos anéis aromáticos; em relação a ácidos fenólicos, a atividade antioxidante tem relação direta ao número de hidroxilas livres no anel aromático (MORAIS, 2017).

A prevenção da auto-oxidação está relacionada com a inclusão dos compostos fenólicos na classe de neutralizadores de radicais livres. A maior ocorrência natural desses compostos é como um ou mais grupos fenólicos, em conjugados com mono e polissacarídeos, intercorrendo também como ésteres e metil ésteres (BALASUNDRAM, 2006).

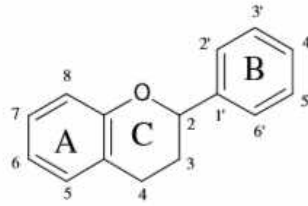
Há aproximadamente 8.000 compostos fenólicos diferentes, e são divididos de acordo com a sua estrutura química, dentre eles encontramos os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos (NEVES, 2015).

Flavonoides

A maior classe de compostos fenólicos de plantas é composta por flavonoides, os quais são polifenóis, encontrados naturalmente em diversas espécies vegetais. Advêm principalmente de plantas superiores e originam a coloração das flores e dos frutos. Além disso, podem encontrar-se em algumas algas e também em fungos (PETERS, 2008).

Dispõem de baixo peso molecular, resumindo-se a 15 átomos de carbono arranjados em uma configuração C6-C3-C6 e sua estrutura consiste de dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos, na forma de anel heterocíclico (**Figura 1**) (HAVSTEEN, 2002).

Figura 1. Estrutura geral dos flavonoides



Fonte: ROCKENBACH, 2008

Algumas variações de configurações da estrutura dos flavonoides podem gerar subclasses, como é caso da permuta do anel C, gerando: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas (MERKEN; BEECHER, 2000). A pluralidade estrutural dos flavonoides está diretamente relacionada com o nível de oxidação e as alterações no esqueleto carbônico básico, propiciada por reações de glicosilação, oligomerização e alquilação (COUTINHO et al., 2009).

São compostos importantes, dentre os compostos fenólicos, pois possuem diversas funções farmacológicas, como atividade antioxidante e no tratamento de doenças degenerativas mediadas por estresse oxidativo (ALVES; FERREIRA, 2019). Dentre essas se destacam a atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória, conferindo-lhe significativa importância farmacológica (CAZAROLLI et al., 2008).

Antocianinas

As antocianinas são pigmentos responsáveis por atribuir uma diversidade de cores nos vegetais, frutos, flores e raízes que variam do vermelho ao violeta e azul. Quimicamente esses pigmentos são considerados compostos fenólicos pertencentes aos flavonoides (LIMA et al., 2002).

Apresentam-se na natureza, na maioria das vezes, glicosadas com açúcares que possuem a capacidade de estabilização da molécula, além de serem solúveis em água e sensíveis ao calor (TEIXEIRA et al., 2008). Estão localizadas próximas à superfície das plantas e podem ser extraídas através de materiais vegetais por solventes orgânicos (HOWARD, 2003). Ademais, retratam diversas funções nas plantas, como atividade antioxidante, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. (LOPES et al., 2007).

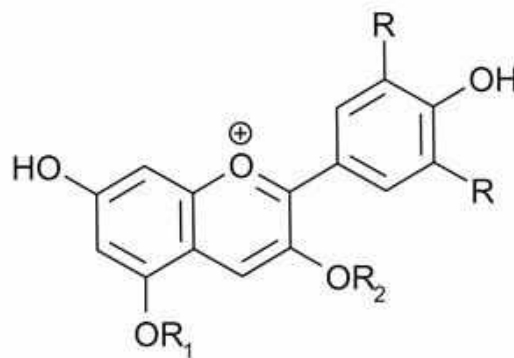
As antocianinas têm despertado interesse nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, nas quais podem ser aplicadas como corantes, principalmente de cor vermelha,

sendo uma das cores mais difícil de ser encontrada na natureza. Em relação ao seu potencial farmacêutico, apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, inibição da oxidação do LDL, diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares e de câncer (CARDOSO et al., 2011).

A atividade antioxidante das antocianinas se caracteriza desde a capacidade de doação de elétrons e átomos de hidrogênio, até a de quelar cátions metálicos e de capturar radicais livres, bem como é dependente do número e da posição dos grupos de hidrogênio e da sua própria configuração (BALASUNDRAM, 2006).

Pode-se explicar a atividade antioxidante das antocianinas através de sua estrutura química. Em sua constituição há três anéis que possuem ligações duplas conjugadas juntamente com hidroxilas ao longo da estrutura, essas hidroxilas provocam o sequestro de radicais livres, que estão relacionados aos danos celulares (CANELHAS, 2012).

Figura 2. Estrutura geral das antocianinas



Fonte: FREITAS et al., 2013.

Antioxidantes

Todo átomo ou molécula que possui elétrons não pareados na sua camada externa é considerado um radical livre, os quais são substâncias relativamente instáveis que fazem multiplicação em cascata e podem ter uma vida curta, podendo ser interrompidos pelos antioxidantes ou por meio de oxirredução, quando dois radicais são interligados. A constituição de radicais livres é equilibrada pela ação dos antioxidantes, cujo impedem o efeito lesivo dos radicais livres (JUNQUEIRA; CARDOSO, 2012).

Os antioxidantes são essenciais para neutralizar a ação oxidante dos radicais livres (RODRIGUES et al., 2017), e são classificados como compostos químicos que possuem eficácia de contrapor-se aos radicais livres e dessa forma delimitar os seus efeitos negativos ao organismo. São compostos que detêm a velocidade de oxidação, por meio de diversos mecanismos, como a complexação de metais e inibição de radicais livres (PIMENTEL; FRANCKI; BOIAGO, 2005).

A competência de estabilizar a ação dos radicais livres é o que garante a eficiência de um antioxidante, os compostos fenólicos são incumbidos da transferência de hidrogênio que elimina a ação desses radicais (SOETHE; STEFFENS; VIDAL, 2016).

Em relação à classificação dos antioxidantes, eles podem ser primários, que impedem o procedimento de iniciação provocado pelos radicais livres, nessa organização encontram-se os compostos fenólicos. Os flavonoides, por exemplo, podem efetuar funções antioxidantes no organismo. Ou podem ser classificados como secundários, quando atuam no bloqueio da decomposição de peróxidos e hidroperóxidos, impedindo a reação em cadeia, encontram-se nessa classe os antioxidantes, como as vitaminas A, C e E (DONNELLY; ROBINSON, 1995).

Os compostos antioxidantes são amplamente estudados por serem além de importante para a saúde humana, também serem muito presentes em fontes vegetais (RODRIGUES, et al., 2017).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, antocianinas e a atividade antioxidante do extrato bruto etanólico

da planta *Richardia brasiliensis* Gomes (poaia-branca) produzidos pelos métodos de banho ultrassônico ou maceração dinâmica, visando a descoberta de novos agentes terapêuticos e/ou protótipo para o desenvolvimento futuro de novos fármacos.

Objetivos específicos

- I. Realizar a coleta e produção da exsicata da espécie vegetal *Richardia brasiliensis* Gomes para o estudo;

- II. preparar os extratos brutos das folhas da planta selecionada por banho ultrassônico ou maceração dinâmica;
- III. determinar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas nos dois extratos brutos produzidos;
- IV. determinar a atividade antioxidante nos dois extratos brutos produzidos;
- V. comparar os resultados obtidos nos dois extratos a fim de avaliar o método de extração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta, identificação e obtenção dos materiais vegetais

Os materiais vegetais da espécie selecionada, *Richardia brasiliensis* Gomes, foram coletados no município de Patos de Minas - Minas Gerais – Brasil (latitude -18.584573 S, longitude -46.511545 W) e a identificação da planta foi feita com o auxílio da Professora Doutora Terezinha Aparecida Teixeira. As exsiccatas do vegetal foram confeccionadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia, MG). Após a coleta, as folhas foram separadas, higienizadas e congeladas no ultrafreezer a -80°C por 48 horas. Em seguida, foram secas no liofilizador por 48 horas. Após, as folhas secas foram armazenadas em sacos limpos devidamente identificados e ao abrigo da luz até a próxima etapa.

2.2 Obtenção dos extratos brutos dos materiais vegetais de *Richardia brasiliensis* Gomes por banho ultrassônico.

Para a produção dos extratos brutos, por banho ultrassônico, as folhas secas de *R. brasiliensis* Gomes foram pulverizadas em moinho de facas para obtenção dos pós. As 2 gramas do pó obtido foram submetidos à extração por banho ultrassônico, a temperatura fixa de 40°C, utilizando 100 mL de etanol 96% como solvente. A extração foi realizada em três ciclos de 15 minutos, com intervalo de 2 minutos entre cada ciclo. Após a extração, a solução obtida foi filtrada a vácuo e levada ao rotoevaporador para a retirada do solvente a temperatura de 55°C. Por fim, o extrato foi levado ao liofilizador para obtenção do extrato bruto final.

2.3 Obtenção dos extratos brutos dos materiais vegetais de *Richardia brasiliensis* Gomes por maceração dinâmica

Para a produção dos extratos brutos, por maceração dinâmica, folhas de *R. brasiliensis* Gomes secas foram pulverizadas em moinho de facas para obtenção do pó. As 2 gramas do pó obtido foram submetidos à maceração dinâmica, a temperatura ambiente, utilizando 100 mL de etanol 96% como solvente líquido extrator. A extração aconteceu no agitador magnético, o frasco envolto em papel alumínio, pelo período de 24 horas. Após esse tempo, a solução obtida foi filtrada a vácuo e levada ao rotaevaporador a temperatura de 55°C. Por fim, o extrato foi levado ao liofilizador para obtenção do extrato bruto final.

2.4 Determinação de Compostos Fenólicos nos extratos brutos

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 5 mg da amostra diluída (5 mg L^{-1}) com 0,5 mL de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente, 0,4 mL de solução saturada de carbonato de sódio foram adicionados à mistura reacional. Após incubação à temperatura ambiente durante 2 h, as leituras de absorvância foram realizadas a 760 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão de referência (16,125; 31,25; 62,5; 125; 250 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de extrato bruto de folhas de *R. brasiliensis*. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.5 Determinação de Antocianinas e Flavonoides

O teor de Antocianinas e Flavonoides foi determinado através do método descrito por Lima e Melo (2003). Foi utilizada uma solução extratora que continha 15 mL de solução de HCl (1,5 M) diluído mais 85 mL de etanol 96%. Foi realizada uma diluição de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foram utilizados 600 μL da amostra (extrato de *R. Brasiliensis*) para 2400 μL de solução extratora, considerando a concentração inicial do extrato utilizada de 5 mg mL^{-1} . As leituras de absorvância foram realizadas a 535 nm para antocianinas e a 374 nm para Flavonoides. As determinações foram efetuadas em triplicata.

2.6 Determinação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Lopes-Lutz et al. (2008), seguida de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o ensaio, 0,9 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,1 mL de cada diluição ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), de cada extrato bruto de folhas de *R. brasiliensis*, preparado por maceração dinâmica ou por banho ultrassônico. Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Após 90 minutos de reação no escuro, as leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{Amo} = Absorbância do DPPH com o extrato bruto.

A_{CN} = Absorbância do DPPH com o etanol.

2.7 Análises estatísticas

Os resultados para os metabolitos secundários avaliados (fenólicos totais, antocianinas e flavonoides totais), assim como a atividade antioxidante pelo método de DPPH, foram analisados estatisticamente. Realizaram-se análises de variância, seguida pelo teste F, para verificar a existência de diferença entre as amostras, de acordo com a aplicação de cada metodologia utilizada. As análises foram realizadas utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras e o *software* empregado foi o *GraphPad Prism* versão 5.01.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

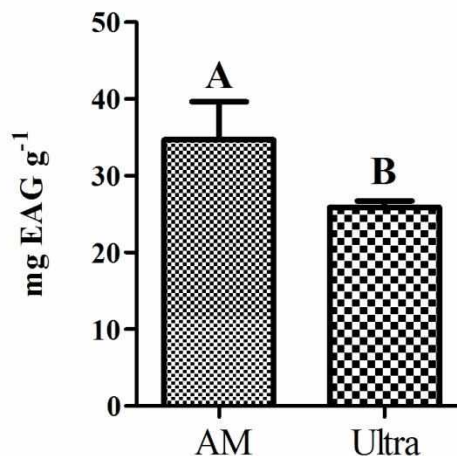
3.1 Compostos fenólicos

Os polifenóis representam um grupo com uma enorme disparidade química e abundância de funções. São divididos de acordo com o seu esqueleto principal, se em seu anel aromático há uma ou mais hidroxilas, uma de suas principais funções é sua capacidade antioxidante, que está relacionada à capacidade redutora do grupo hidroxila aromático que pode reduzir os radicais livres (DORNELLES, 2015).

Os compostos fenólicos têm uma gama muito elevada de atividade biológica, como a ação antimicrobiana, por exemplo, por isso é de extrema importância para esse estudo, devido ao fato de ser voltados a estudos farmacológico. Os resultados obtidos na determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG g⁻¹) por grama de matéria seca peso do material vegetal, são apresentados na **Figura 3**.

Os ensaios com o reagente Folin-Ciocalteu baseiam-se em um método espectrofotométrico ocorrido através da interação de substâncias redutoras com o reagente. Sua composição química é constituída de ácido fosfotúngstico e de ácido fosfomolibdico, que depois de reduzidos, na presença de substâncias redutoras. No caso compostos fenólicos, fazem com que a coloração passe de amarelo típica para azul, o qual é detectável no comprimento de onda de 760 nm, permitindo a quantificação dos compostos do presente estudo (PIRES et al., 2017).

Figura 3. Dosagem de fenóis totais nos extratos em estudo por meio do reagente Folin-Ciocalteu. Médias dos teores de compostos fenólicos totais dos extratos de *Richardia brasiliensis* pelo método de agitador magnético (AM) e banho ultrassônico (Ultra). Médias seguidas por letras diferentes, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Foi observado que o extrato bruto das folhas de *R. brasiliensis* preparado pelo método de maceração dinâmica apresentou um teor de $37,6 \pm 0,1$ mg EAG g⁻¹, superior ao apresentado pelo extrato preparado pelo método de banho ultrassônico ($26 \pm 1,2$ mg EAG g⁻¹).

Os dois métodos empregados nas extrações, maceração dinâmica e o banho ultrassônico, foram utilizados com intuito de melhorar a extração dos compostos pelo solvente. Em relação ao banho ultrassônico, são empregadas, ondas ultrassônicas por rotação, que fazem com que haja a transferência dos compostos ativos desejáveis para o solvente utilizado de uma forma mais eficaz. Apesar do extrato produzido por maceração dinâmica apresentar dosagem de compostos fenólicos maior que o outro método empregado, é sabido que ambos os métodos garantem a eficácia de transferência de massa e energia (SOUSA, 2018).

Ao comparar os resultados, o método de maceração dinâmica demonstrou melhores resultados do que o de banho ultrassônico, sendo estatisticamente diferente. Demonstrando que para esse tipo de composto ativo, o melhor método a ser utilizado é a maceração dinâmica. O agitador magnético garante uma grande transferência de massa, onde os analitos não-carregados são extraídos da fase doadora para a fase orgânica, e simultaneamente a fase receptora extrai os compostos da fase orgânica, garantindo desse modo uma melhor passagem dos compostos para o solvente (QUEIROZ; COLLINS, 2001).

A detecção de compostos fenólicos no presente estudo é diferente do encontrado na literatura científica. Segundo Canale (2012), no extrato etanólico produzido por banho ultrassônico foi possível encontrar a presença de compostos fenólicos (0,69 mg/g) nas partes áreas (folhas e caules) de *R. brasiliensis*. Figueiredo (2010) encontrou diversos compostos fenólicos no extrato etanólico produzido por maceração dinâmica das partes áreas de *R. Brasiliensis*, como os flavonoides e cumarinas, por exemplo. Ambos os trabalhos citados anteriormente utilizaram os métodos extrativos discutidos no presente trabalho. Porém, ainda não foi descrito na literatura a comparação dos métodos para compostos fenólicos. Assim, no presente trabalho, evidencia-se que para a extração de compostos fenólicos, a melhor metodologia é a de maceração dinâmica, visto os resultados superiores do teor destes metabólitos. O fato de utilizar temperatura ambiente também é uma vantagem da maceração dinâmica, sendo menos provável a degradação dos metabólitos termolábeis (GREY, 2006).

Além disso, um fator importante descrito por Cardoso et al (2017) é a reprodutibilidade, que é medida através do desvio padrão, em que se verifica a dispersão entre os dados amostrais. Segundo o autor, o método de maceração dinâmica é mais reprodutível que o método de extração por ultrassom. Neste trabalho o desvio padrão do método por maceração dinâmica foi

maior e mesmo assim o teor de compostos fenólicos foi superior estatisticamente ao outro método. Assim, reafirma-se que para a extração desta classe de compostos o método extrativo por maceração dinâmica é o melhor.

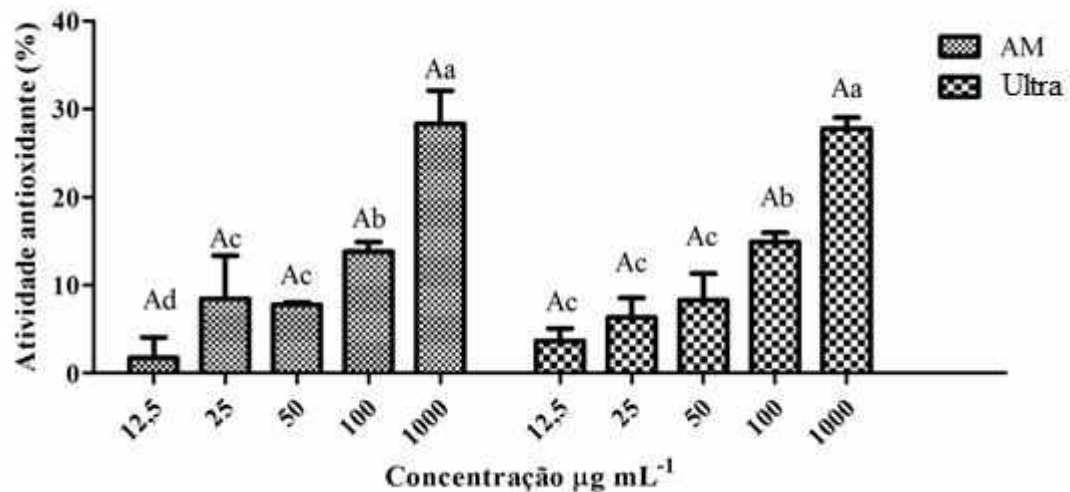
3.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes possuem a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de algumas moléculas, impedindo que haja a disseminação das reações em cadeia de oxidação. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é, sobretudo proveniente dessa capacidade de óxido-redução, propriedade essa que pode exercer uma função importante na absorção e neutralização de radicais livres, fazendo com que o oxigênio seja quelado ou permitindo a decomposição de peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

O ensaio de DPPH é comumente utilizado para avaliação da capacidade que os compostos considerados antioxidantes têm de eliminação de radicais livres, os quais são caracterizados como um fator de importância nos danos causados por estresse oxidativo. Esse ensaio é empregado por permitir a confiabilidade das informações sobre a competência antioxidante dos compostos testados. Seu princípio baseia-se na mudança de cor da solução DPPH de roxo para amarelo conforme o radical é neutralizado pelo antioxidante, demonstrando sua presença (PARTHASARATHY et al., 2009).

O ensaio de atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método do sequestro dos radicais livres pelo DPPH apresentou resultados significativos como observados na **Figura 4**. Os resultados de ambos os métodos de extração utilizados são muito semelhantes, demonstrando que para esse tipo de ensaio, a agitação magnética ou o banho ultrassônico, não influencia na sua atividade. Nas concentrações de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ambos os extratos apresentaram em torno de 30% de atividade antioxidante, demonstrando que embora seja baixa, a atividade antioxidante está presente nos extratos de *R. brasiliensis*.

Figura 4. Atividade antioxidante dos extratos de *Richardia brasiliensis*, produzidos por Agitação Magnética (AM) ou Banho Ultrassônico (Ultra) pelo método de DPPH. Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Os resultados da atividade antioxidante coincidem com os resultados de Barros et al. (2008), em que através de maceração com o solvente metanol, avaliaram os extratos de *Chomelia obtusa* Cham. & Schldl., planta da família Rubiaceae, seguindo o mesmo método de DPPH, demonstrando atividade antioxidante da espécie avaliada.

Os metabólitos responsáveis pela atividade antioxidante identificados por Barros et al (2008) são flavonoides e ácidos clorogênicos. Foi encontrado um número relevante de flavonoides que pode estar associados à atividade antioxidante.

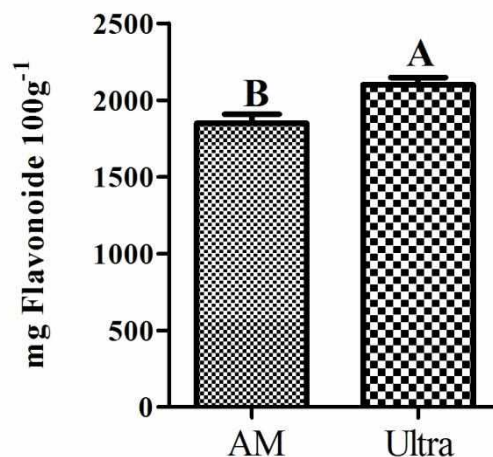
3.3 Flavonoides

Os compostos fenólicos de fontes vegetais são divididos em dois grupos classificados como flavonoides e não flavonoides, sendo ambos os metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais. Os flavonoides apresentam a estrutura química descrita como C6-C3-C6 e de acordo com possíveis alterações no terceiro anel podem adquirir diversas outras formas como flavonas, flavonóis, flavononas e isoflavonas (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os flavonoides são considerados compostos polifenólicos produzidos a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, responsáveis por preceder diversos grupos de substâncias, como terpenóides e ácidos graxos. Estão envolvidos em processos de crescimento, progresso e proteção dos vegetais contra patógenos. Além disso, possuem atividade antioxidante quando relacionados a função de defesa e no tratamento de doenças resultantes de estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2008).

O teor de flavonoides dos extratos estudados está demonstrado na **Figura 5**. Ambos os extratos preparados pelos dois métodos empregados possuem resultados estatisticamente diferentes.

Figura 5. Teor de flavonoides totais utilizando os extratos de *Richardia brasiliensis* por método de Agitador Magnético (AM) e Banho Ultrassônico (Ultra), respectivamente. Médias seguidas por letras diferentes, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



O extrato produzido por uso do banho ultrassônico significativamente extraiu melhor os flavonoides desta espécie ($2098,778 \pm 47,5354$ mg flavonoide/100 g), enquanto que o extrato produzido por maceração dinâmica apresentou $1849 \pm 58,2$ mg flavonoide/100g. Demonstrando assim, que o método de extração influenciou nos resultados obtidos, com o banho ultrassônico demonstrando ser mais eficaz.

Porém, o resultado de teor de flavonoides apresentou-se de forma oposta ao encontrado com compostos fenólicos totais. Isso pode ser devido ao fato de que o método utilizado, o banho ultrassônico, apresenta muitas vantagens para extração de compostos, como o aumento da permeabilidade das paredes celulares e do estresse mecânico das células, facilitando a extração dos compostos. A maior transferência de massa e uma melhor distribuição de energia nas paredes celulares facilita o rompimento das mesmas e transfere de forma mais eficaz os compostos de interesse para o solvente (JACQUES, 2005).

Além disso, o método de maceração dinâmica possui desvantagem em relação ao uso do banho ultrassônico, a solubilidade dos compostos a temperatura ambiente influencia no processo de extração (GRAY et al., 2006).

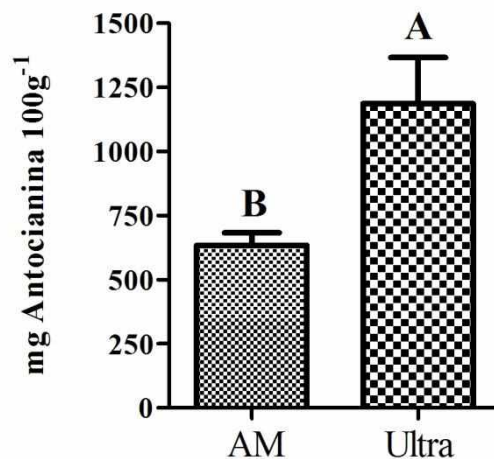
O teor expressivo de flavonoides presentes nos extratos de *R. brasiliensis* coincidem com os achados de Ramalho (2013), cujo estudo realizado com extrato das folhas de *Psychotria carthagenensis* e *Psychotria leiocarpa*, ambas pertencentes à família Rubiaceae, demonstrou a presença de flavonoides (2300 mg/g amostra e 8300 mg/g amostra, respectivamente). Nesse estudo os extratos foram produzidos através de maceração com metanol. Demonstrando que o mesmo método utilizado é eficaz para a extração de flavonoides.

3.4 Antocianinas

As antocianinas são consideradas pigmentos vegetais que são responsáveis pela grande variedade de cores presentes em flores, frutos, algumas folhas, raízes e caules de plantas, podem variar do violeta/azul ao vermelho. Sua coloração depende de diversos fatores como pH, luminosidade, presença de íons e de açúcares. Sua molécula é composta por três grupos, uma aglicona (antocianidina), o grupo de açúcares e um grupo de ácido orgânico (CASTAÑEDA, 2009).

No presente estudo, podemos observar que a presença de antocianinas no extrato obtido pelo método de banho ultrassônico ($1186,3 \pm 180,8$ mg antocianina/100g) foi estatisticamente maior que a presença de antocianinas no extrato obtido por agitação magnética ($634,7 \pm 48,4$ mg antocianina/100g) (**Figura 6**). Demonstrando que o método utilizando ultrassom para esse tipo de composto é bem mais eficaz, visto que encontrou praticamente o dobro de quantidade de antocianinas, isso pode ser devido a algumas propriedades do ultrassom.

Figura 6. Teor de antocianinas totais utilizando os extratos de *Richardia brasiliensis* produzidos pelo método de Agitador Magnético (AM) e Banho Ultrassônico (Ultra). Médias seguidas por letras diferentes, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Segundo Meregalli (2017) foi demonstrado que o banho ultrassônico possui capacidade de intensificar a extração por meio de um processo denominado cavitação, pelo qual as ondas ultrassônicas geram ciclos de bolhas de gás juntamente com cavidades no solvente líquido. Quando a cavitação ocorre próxima a parede celular da matriz vegetal, a energia que foi formada faz com que haja um impacto grande sobre a superfície sólida, conseqüentemente, aumenta a permeabilidade celular e favorece a entrada do solvente, bem como o calor liberado pelas bolhas aumenta a solubilidade e ambos evidenciam maior eficiência na extração. Esses fatores podem justificar a diferença dos resultados no teor de antocianinas, visto que o banho ultrassônico demonstrou ser superior à maceração dinâmica.

Embora o processo de maceração dinâmica seja eficiente para a extração de metabólitos secundários, nesse caso, o processo utilizando o ultrassom demonstrou ser melhor para extração dos flavonoides e antocianinas, isso pode se justificar também devido ao fato do auxílio das ondas ultrassônicas em lisar a célula, aumentando conseqüentemente a solubilização dos metabólitos no solvente (GRAY, et al, 2006).

Considerando a diferença dos resultados utilizando o método de extração por maceração dinâmica, os quais foram maiores em compostos fenólicos, comparados com flavonoides e antocianinas, sendo que ambos são classificados como compostos fenólicos. Isso pode ser explicado pelo fato de que na quantificação de compostos fenólicos, estarem presentes outras substâncias fenólicas, além de flavonoides e antocianinas, como as cumarinas e ácidos fenólicos. Souza (2009) isolou do extrato etanólico de folhas, caules e raízes de *R. brasiliensis*, através de maceração, dentre seus compostos, grande presença das cumarinas (cedrelopsina, norbraylina, braylina e cumarineletefina). Já Dornelles (2015) verificou a presença de ácido clorogênico, rutina, taninos e cumarinas em extrato etanólico de folhas de *R. brasiliensis*.

4 CONCLUSÃO

Concluem-se através dos resultados obtidos que os métodos de maceração dinâmica e de banho ultrassônico, apesar de diferirem entre si, são ambos eficazes para extração de metabólitos secundários. A *Richardia brasiliensis* Gomes se apresentou como uma planta com a presença de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e antioxidantes, demonstrando ser um possível alvo de estudos farmacológicos futuros.

REFERÊNCIAS

ALVES, R.; FERREIRA, A. Uso da Metodologia de Superfície de Resposta na Otimização da Extração de Compostos Fenólicos da Casca dos Frutos de *Hymenaea courbaril* L. (jatobá). **Brazilian Journal of food technology**. p. 1–13, 2019. DOI: 10.1590/1981-6723.08918.

ANDRADE, I. G. C; et al. Etnofarmacologia E Etnobotânica De Plantas Medicinais Com Ação Parasitária. **Revista da Saúde Viva Multidisciplinar da Ajes**. Mato Grosso.p. 48–71, 2018. ISSN: 2595-8615.

ANVISA, RDC 48/04, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília.

BADOC, A., et al. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**. v. 66, p. 549–559, 2005. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.12.021

BALASUNDRAM, N. Food chemistry phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity , occurrence , and potential uses. **Food Chemistry**. v. 99, p. 191–203, 2006. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.

BANDEIRA, M, CAMPOS, F., bioma cerrado: relevância no cenário hídrico brasileiro. **III CIPEEX - Ciência para a redução das desigualdades**, v. 2, p. 399 – 409, 2018.

BARROS, M. P., et al. Constituintes Químicos e Avaliação do Potencial Antiinflamatório e Antioxidante de Extratos das Folhas de *Chomelia obtusa* Cham. & sChltdl. (Rubiaceae). **Química Nova**, Vol. 31, No. 8, 1987-1989, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000800013.

BRANDÃO, T. S. O., et al. Optimization of a technique to quantify the total phenolic compounds in jambolan (*Syzygium cumini* Lamark) pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 1–9, 2019. ISSN: 1981-6723.

CANALE, F. S. **Ação Fungicida E Bactericida De Extratos E Frações De *Richardia brasiliensis* Gomes**. Dissertação. Universidade Anhanguera- Uniderp. p. 1-20,2012.

Disponível em:

<https://repositorio.pgsskroton.com.br/handle/123456789/3735?locale=pt_BR>. Acesso em: 09/10/19.

CANELHAS, B. B. **Estudo Químico, Análise do Óleo Essencial e Avaliação das Atividades Antioxidante e Antibacteriana do Marmelinho [*Cordia sessilis* (vell.) kuntze (rubiacae)].** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.2012. Disponível em:
<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/5095/browse?type=type&sort_by=1&order=ASC&rpp=20&etal=-1&value=Disserta%C3%A7%C3%A3o&offset=140>. Acesso em: 09/10/19.

CARDOSO, L. M, et al. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**. vol. 40, 116-138, 2011. ISSN: 0034-7418.

CARDOZO, C. M. et al. Therapeutic potential of Brazilian cerrado campomanesia species on metabolic dysfunctions. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1–17, 2018.

CASTAÑEDA, L. M. F. Antocianinas: o que são? Onde estão? Como atuam? Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 2–3, 2009. Disponível em:
<<https://www.ufrgs.br/agronomia/materiais/userfiles/Leticia.pdf>>. Acesso em: 15/10/19.

CAZAROLLI, L. H, et al. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. p. 1429–1440, 2008. DOI: 10.2174/138955708786369564.

COUTINHO, M. A. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório Coutinho. **Revista Virtual Química**. v.1 (3), p. 241-256. 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos Antioxidants. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v5i1.540>.

DONNELLY, J. K.; ROBINSON, D. S. Invited Review Free Radicals In Foods. **Free Radical Research**. v. 22, n. 2, p. 147–176, 1995. DOI: 10.3109/10715769509147536.

DORNELLES, R. C. **Potencial Antiproliferativo, Genotóxico e Fitoquímica de *Richardia brasiliensis* Gomes**. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia). Universidade Federal de Santa Maria. p.30-64. Santa Maria. 2015. Disponível em:
<<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/4897>>. Acesso em: 04/09/2019.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, et al. Avaliação Da Atividade Antimicrobiana Das Partes Aéreas (Folhas E Caules) E Raízes De *Richardia Brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, n. 2, p. 193–196, 2009. ISSN: 1808-4532.

FREITAS, A., et al. O Experimento Da Extração Da Antocianina Presente No Repolho Roxo Como Motivador Da Aprendizagem Em Química. **11º SIMPEQUI**. 2013. ISBN: 978-85-85905-05-7.

GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. **Planta Med.**, v. 74, p. 594–602, 2008.

GRAY, A. I., et al. **Natural Products Isolation**, 2 ed. Methods in Biotechnology. Humana Press. Totowa, NJ. 2006. 515p. ISBN 1-59259-955-9.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 96, p. 67–202. 2002. DOI: 10.1016/s0163-7258(02)00298-x.

HOWARD, L. R.; JU, Z. Y. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52. 2003. DOI: 10.1021/jf0302106.

JACQUES, R. S. **Caracterização Química Da Erva Mate (*Ilex Paraguariensis*): Aplicação De Diferentes -Processos De Extração E Influência Das Condições De Plantio Sobre A Composição Química**. Tese de doutorado (Doutorado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2005.

JUNQUEIRA, R.; CARDOSO, G. Metabólitos Secundários Vegetais e Benefícios Antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. November, p. 146–152, 2012. ISSN: 2179-4804.

KOZERA, C. et al. Plantas medicinais utilizadas pelos funcionários da Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina – Palotina - PR. **Revista Extensão em Foco**. Palotina. n. 15, p. 15 – 27, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/ef.v1i15.52776>.

LIMA, V. L. A. G., et al. Polpa Congelada De Acerola: Efeito Da Temperatura Sobre Os Teores De Antocianinas E Flavonóis Totais. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 1, p. 669–670, 2002. DOI: 10.1590/S0100-29452002000300024.

LOPES, J. T., et al. Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais e da Estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, 2007. ISSN 0104-8996.

LOPES-LUTZ, D. *et al.* Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oil. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1732-1738, 2008

MENEGUELLI, A. Z., et al. A Utilização De Plantas Medicinais E Fitoterápicos Na Saúde Pública Brasileira. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva**, Faculdade São Paulo – FSP, São Paulo, p. 2–12, 2017. DOI: 10.1590/1413-812320182311.23572016.

MEREGALLI, M. M. **Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos do araçá- vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões. Rio Grande do Sul. 2017. Disponível em: <http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/3425.pdf>. Acesso em 17/10/19.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000. DOI: 10.1021/jf990872o.

MORAIS, F. P. R. **Digestibilidade e Atividade Antioxidante de Complexos de Isolado Proteico de Soro de Leite com Compostos Fenólicos Antes e Após a Digestão in vitro**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2017. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/332801>>. Acesso em: 07/10/19.

NEVES, P. D. O. **Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde**. Monografia (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa. Porto. Portugal. 2015. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5241/1/PPG_15639.pdf>. Acesso em: 07/10/19.

OLIVEIRA, D. W. C., et al. Flavonóides : potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**. v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007. ISSN 1808-4532.

PARTHASARATHY, S, et al. Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. **Molecules**. p. 3964–3974, 2009. ISSN 1420-3049.

PETERS, V. M. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008. Disponível em: <<https://periodicos.ufjf.br/index.php/boletimcbr/article/view/17024>>. Acesso em: 11/10/2019.

PINTO, D. S. et al. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n. March, p. 367–372, 2008. ISSN: 0102-695X.

PIMENTAL, C. V. M. L., et al. Alimentos Funcionais – Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. 1ª ed. **Metha**, 95. 2005.

PIRES, J. S. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo. p. 1–5, 2017. ISBN 978-85-85658-70-0.

QUEIROZ, S. C. N., et al. Métodos De Extração E/Ou Concentração De Compostos Encontrados Em Fluidos Biológicos Para Posterior Determinação Cromatográfica. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001. DOI: 10.1590/S0100-40422001000100013.

RAMALHO, S. R. **Avaliação da Atividade Antioxidante e Quantificação do Teor de Fenóis, Flavonóides e Taninos Condensados de *Psychotria carthagenensi* e *P. leiocarpa***. Monografia (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Grande Dourados. Dourados. 2013.

RIBEIRO, I. C., et al. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus spp.* and *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research**. 2018. DOI 10.1186/s12917-018-1351-1

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.)**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2008.

RODRIGUES, L. S., et al. Noni (*Morinda citrifolia* linn.): Determinação Fitoquímica e Potencial Antioxidante pelo Método DPPH. **Revista conexões - Ciência e Tecnologia**. Fortaleza/CE, v.11, n. 4, p. 47-54, 2017. DOI: 10.21439/conexoes.v11i4.921.

ROSSETO, R. R., et al. A. Estimativa da Área Foliar de Plantas Daninhas: Poaia-Branca. **Planta Daninha**. p. 25–29, 1997. DOI: 10.1590/S0100-83581997000100003.

SASSAKI, B., et al. Levantamento etnofarmacológico de espécies medicinais na reserva de desenvolvimento sustentável da Barra do uma. **UNISANTA Bioscience** . vol. 5, n. 1 ,p.112 – 119,2016. Disponível em: < <http://periodicos.unisanta.br/index.php/bio/article/view/642>>. Acesso em: 16/10/2019.

SINGLETON, V. L; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.16, p. 144-158, 1965.

SOETHE, C., et al. Qualidade, Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante de Amoras-Pretas 'Tupy' e 'Guarani' Armazenadas a Diferentes Temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.51, n.8, p.950-957, 2016. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000800007.

SOUSA, J, R, M. **Extração De Compostos Fenólicos da Casca Do Café Por Diferentes Métodos**. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Uberlândia. Patos de Minas. 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/22834>>. Acesso em: 16/10/19.

SOUZA, F. H. T. **Estudo Fitoquímico e Farmacobotânico de Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2009.

TEIXEIRA, et al. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**. vol. 55, pp. 297-304. n. 4, 2008. ISSN: 0034-737X.

TOMA, M., et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 8, p. 137–142, 2000. DOI: 10.1016/S1350-4177(00)00033-X.

TORRES-LEITE, F., et al. Florística de Rubiaceae em um remanescente de Floresta Atlântica do Espírito Santo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 561–576, 2018. DOI: 10.1590/2175-7860201869222.

VASCONCELOS, L. S., et al. Potencial Antibacteriano De Plantas Do Semiárido: Um Estudo Etnofarmacológico Em Santa Luzia , Tejuçuoca-Ce. **Encontros Universitários da UFC**. p. 4017, 2016. Disponível em: < <http://periodicos.ufc.br/eu/article/view/16057>>. Acesso em 17/10/2019.

VEGGI, P. C. Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2013.