

Universidade Federal de Uberlândia

Érica Karoline dos Reis

Atividade antioxidante de extratos das folhas da *Psidium myrtoides* O. Berg

Uberlândia-MG

2019

Érica Karoline dos Reis

Atividade antioxidante de extratos das folhas da *Psidium myrtoides* O. Berg

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

Professor Orientador: Dr. Francisco José Tôrres de Aquino

Uberlândia-MG

2019

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e tranquilidade para conseguir realizar esse trabalho;

Aos meus pais, Celso e Marilda, por terem me amado e cuidado de mim por toda a vida. Obrigada por me incentivarem os estudos e terem se dedicado cada dia para que minha formação acadêmica fosse possível. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, me amando, apoiando e ajudando;

Aos meus irmãos, Lucas e Augusto, por sempre me apoiarem e ajudarem no que necessito. Obrigada por sempre compartilharem comigo minhas lutas e conquistas, e obrigada em especial, ao meu irmão mais velho, Lucas, por todo apoio e amparo em Uberlândia;

Aos meus avós, Cedina e Agostinho, por sempre me incentivarem a estudar, sempre me apoiarem e darem muito amor durante toda minha vida e não foi diferente durante a graduação e em todos os momentos que nos encontrávamos;

Ao meu Orientador e Professor Dr. Francisco José Tôrres de Aquino por todo o apoio no período de Iniciação Científica e durante a execução e escrita deste trabalho. Obrigada por toda a ajuda, conselhos e ensinamentos me passados durante a graduação e também na execução desse trabalho;

Aos professores Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa e Dr. Welington de Oliveira Cruz pelo aceite de participar da banca examinadora e poderem me avaliar nessa etapa de formação;

Ao laboratório Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPpEN) da UFU, pelo espaço, reagentes e equipamentos cedidos a mim durante toda a pesquisa;

A MSc. Vanessa Ellen Xavier Martins, do NuPpEN-UFU, por toda ajuda com as metodologias e trabalho em laboratório;

Ao professor Dr. Foued S. Espíndola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, campus Umuarama, por ter disponibilizado seus alunos, equipamentos, reagentes e o espaço do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – LABIBI para os testes de atividade antioxidante;

Ao mestre e doutorando Allisson Benatti Justino, do LABIBI - UFU, campus Umuarama, pela execução do teste de ação antioxidante pelo método de DPPH;

A Júlia Silveira Queiroz, do LABIBI - UFU, campus Umuarama, pelo apoio na realização e tratamento de dados dos demais testes antioxidantes (FRAP e ORAC);

A minha amiga, mestre e doutoranda, Gabriela Ciribelli Santos Pômpeu, pela ajuda oferecida nesse trabalho e por todo o apoio emocional que me confiou nesse momento; Àqueles que, de alguma forma, me ajudaram durante a execução e escrita do trabalho, MSc. Daiane Maria Oliveira, MSc Renieidy Flávia Clemente Dias, MSc Tiara da Costa Silva e ao mestrando Frank dos Santos da Silva, todos do NuPPEN-UFU;

Aos meus amigos de graduação, Claudiane, Maurício e Brenda, por terem me acompanhado, ouvido e ajudado durante todo o curso e realização dessa pesquisa. Sem vocês esse curso não seria o mesmo para mim e, com certeza, para além da graduação espero sempre tê-los comigo;

Ao meu amigo Patrik que mesmo depois de mudar de curso esteve ao meu lado durante esses anos, sempre com sorrisos e abraços disponíveis para me acalmar e alegrar, me apresentando pessoas maravilhosas na UFU;

Aos meus amigos da QuímEJ - Empresa Júnior de Soluções em Química – UFU; aqueles que já saíram e aos que permanecem, no qual cada um com seu jeito especial colaborou de alguma forma comigo nesse período. Essa família azul, sem dúvida, foi um dos melhores acontecimentos desses anos todos;

A todos os professores do Instituto de Química - UFU que me deram aulas e ensinamentos utilizados na pesquisa e que também servirão por toda a vida;

A todos os funcionários, técnicos e servidores da UFU que possibilitaram a execução do trabalho;

Ao Hugo Salgado, secretário do curso de Química Industrial, que sempre esteve muito disposto a ajudar, orientar e conversar durante os momentos de maiores dificuldades da graduação;

Ao órgão de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pela bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa CNPq e à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil, com código de financiamento 001.

*“Entendi que educação era mais do que ler e escrever. Era sobre empoderamento e emancipação”*

*Malala Yousafzai*

*“Seja a mudança que você quer ver no mundo”*

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

*Psidium myrtoides* O. Berg, conhecida popularmente como araçá ou araçá-roxo é uma planta predominantemente do cerrado brasileiro, mas é encontrada em três domínios fitogeográficos dentro do Brasil: Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Seu nome científico possui alguns sinônimos como *Psidium myrsinoides*, *Guajava myrsinoides*, *Guajava myrtoides*, *Myrtus corynantha*, *Psidium turbinatum*, *Psidium corynanthum* e *Corynemyrtus corynantha*. A necessidade de se estudar essa planta se dá pelo fato de outras espécies do mesmo gênero possuir atividades biológicas, dentre elas a atividade antioxidante. Assim, o objetivo desse trabalho foi realizar a análise antioxidante dos extratos e partições das folhas da *Psidium myrtoides*. Para essa determinação realizou-se a prospecção fitoquímica a fim de avaliar as classes de compostos presentes nas amostras, detectando-se a presença de compostos fenólicos, terpenos, esteroides e açúcares. Foram quantificados os teores dos compostos fenólicos totais, os flavonoides e os taninos condensados por métodos espectrofotométricos. A quantificação da atividade antioxidante das amostras foi realizada por três métodos diferentes: métodos de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH), método de Capacidade de Absorbância de Radical Oxigênio (ou “*Oxygen Radical Absorbance Capacity*”, ORAC) e também pelo Poder Antioxidante Redutor Férrico (ou “*Ferric Reducing – Antioxidant Power*”, FRAP). A amostra com maior capacidade antioxidante observada para os métodos utilizados foi a partição acetato de etila com  $CE_{50} 3,45 \pm 0,48 \mu\text{g mL}^{-1}$  (DPPH), com 916,13  $\mu\text{mol}$  equivalente de trollox por grama de extrato (ORAC) e com 2636,8  $\mu\text{mol}$  equivalente de trollox por grama de extrato (FRAP). Esses resultados de atividade antioxidante das folhas da *P. myrtoides* são promissores e deve-se fazer uma investigação química e farmacológica mais aprofundada para melhor uso dessa planta do Cerrado para o uso humano.

Palavras-chave: *Psidium myrtoides*. Extrato. Prospecção fitoquímica. Atividade antioxidante.

## ABSTRACT

*Psidium myrtoides* O. Berg, popularly known as araçá or purple araçá is a predominantly Brazilian savannah plant, but is found in three phytogeographic domains within Brazil: Caatinga, Cerrado and Mata Atlântica. Its scientific name has some synonyms like *Psidium myrsinoides*, *Guajava myrsinoides*, *Guajava myrtoides*, *Myrtus corynantha*, *Psidium turbinatum*, *Psidium corynanthum* and *Corynemyrtus corynantha*. This plant was studied due to the fact that other species of the same genus have biological activities, including antioxidant activity. Thus, the objective of this work was to perform the antioxidant analysis of extracts and partitions of *Psidium myrtoides* leaves. For this determination, the phytochemical prospecting was performed in order to evaluate the classes of compounds present in the samples, detecting the presence of phenolic compounds, terpenes, steroids and sugars. The contents of total phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins were quantified by spectrophotometric methods. The antioxidant activity of the samples was quantified by three different methods: 2,2-diphenyl-1-picrihidrazila (DPPH) radical sequestration methods, Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) method and also by the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). The partition with the highest antioxidant capacity observed for the methods used was the ethyl acetate partition with  $EC_{50} 3,45 \pm 0.48 \mu\text{g mL}^{-1}$  (DPPH), with 916,13  $\mu\text{mol}$  trollox equivalent (ORAC) and with 2636,8  $\mu\text{mol}$  trollox equivalent (FRAP) These results of antioxidant activity of *P. myrtoides* leaves are promising and deserve further chemical and pharmacological investigation, for better use of this Cerrado plant for human use.

Keywords: *Psidium myrtoides*. Extract. Phytochemical prospecting. Antioxidant activity.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de alguns terpenos e respectivas quantidades de unidades isoprênicas	18
Tabela 2 - Diferentes classes de compostos fenólicos	20
Tabela 3 - Especificações dos equipamentos utilizados	29
Tabela 4 - Massas e rendimento das extrações dos extratos brutos	38
Tabela 5 - Massa e rendimento das partições feitas com EE bruto	38
Tabela 6 - Prospecção fitoquímica dos extratos e frações das folhas da <i>Psidium myrtoides</i>	39
Tabela 7 - Determinações dos teores de compostos fenólicos e as duas principais classes nas folhas da <i>Psidium myrtoides</i>	45
Tabela 8 - Resultados comparativos da literatura para quantificação de compostos fenólicos	46
Tabela 9 – Resultados de CE50 pelo método de sequestro do radical DPPH	49
Tabela 10 - Correlação da AA e concentração efetiva pelo método de DPPH	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo dos fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários nas plantas	17
Figura 2- Representação estrutural do isopreno	18
Figura 3 - Fórmula estrutural da morfina	19
Figura 4 - Estrutura do fenol	20
Figura 5 - Exemplos de compostos fenólicos	21
Figura 6 - Estrutura geral dos flavonoides	21
Figura 7 – Estrutura química das classes de flavonoides	22
Figura 8 - Mapa dos estados brasileiros (em cor escura) onde se encontram a espécie de <i>Psidium myrtoides</i>	27
Figura 9 - Fotografia dos detalhes da <i>Psidium myrtoides</i>	27
Figura 10 - Fotografia da árvore do araçá-roxo ( <i>Psidium myrtoides</i> ) utilizada neste estudo	30
Figura 11 - Fluxograma representativo do processo de extração e partição de metabólitos das folhas da <i>P. myrtoides</i> . Em destaque as etapas de obtenção das amostras desse trabalho.	32
Figura 12 - Curva analítica do ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais	41
Figura 13 - Reação entre ácido gálico e reagente Folin-Ciocalteu	41
Figura 14 - Esquema representativo da reação de determinação de flavonoides	42
Figura 15 - Curva analítica de quercetina para determinação de flavonoides	43
Figura 16 – (a) estrutura química da Catequina (estrutura básica de um tanino condensado), (b) estrutura modelo de tanino condensado	43
Figura 17 - Curva analítica de catequina para determinação de taninos condensados	44
Figura 18 - Reação de determinação dos teores de taninos condensados na planta <i>Psidium myrtoides</i>	44
Figura 19 – Estruturas de ressonância do radical DPPH <sup>•</sup>	47
Figura 20 - Reação geral do método do sequestro do radical DPPH	8
Figura 21 - Interação da molécula de DPPH e o solvente metanol	48
Figura 22 - Representação gráfica dos resultados de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH	49

Figura 23 - Fórmulas estruturais (a) AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobi-2-metilpropionamida); (b) Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)	51
Figura 24 - Curva de calibração de Trolox para determinação da Capacidade antioxidante dos extratos e partições da <i>P. myrtoides</i> pelo método ORAC	52
Figura 25 - Resultados da Capacidade Antioxidante pelo método ORAC	52
Figura 26 – Molécula de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina)	53
Figura 27 -Curva analítica de Trolox para determinação da atividade antioxidante pelo método de FRAP	53
Figura 28 - Resultados da atividade antioxidante de cada amostra pelo método FRAP	54
Figura 29 -Reação do complexo TPTZ-Fe <sup>3+</sup> com compostos antioxidantes	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Atividade Antioxidante	FAPEMIG: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais
AAPH: Dicloridrato de 2,2'-azobi-2-metilpropionamida	FAE: Fração acetato de etila
CA: Capacidade antioxidante	FB: Fração n-butanol
CCD: Cromatografia de Camada Delgada	FD: Fração Diclorometano
CE <sub>50</sub> : Concentração Efetiva de 50%	FH: Fração Hexânica
CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de Espectrômetro de Massas	FRAP: <i>Ferric Reducing – Antioxidant Power</i>
CLAE-EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de Espectrômetro de Massas	ICPt: IodoCloroPlatinado
CNPq: Centro Nacional de Pesquisa	IV: Infravermelho
DPPH: 2,2-difenil-1-picrihidrazila	MP: Metabolismo Primário
EACg: Equivalente de Ácido Clorogênico	MS: Metabolismo Secundário
EAG: Equivalente de Ácido Gálico	NP/PEG: Difenilboriloxietilamina/ Polietilenoglicol
EC: Equivalente de Catequina	ORAC: <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
EE: Extrato Etanólico	PA: Partição Acetato de Etila
EH: Extrato Hexânico	PAq: Partição Aquosa
EM: Extrato Metanólico	PD: Partição Diclorometano
EMf: extrato metanólico das folhas	PN: Produtos Naturais
EMg: extrato metanólico nos galhos	RFC: Reagente Folin-Ciocalteu
EQ: Equivalente de Quercetina	RMN: Ressonância Magnética Nuclear
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio	SisGen:
	TPTZ: 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
	UV: Ultravioleta/ Visível

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. O bioma Cerrado e sua biodiversidade .....	15
1.2. Metabolismos nas plantas .....	16
1.2.1. Terpenos .....	18
1.2.2. Alcaloides .....	19
1.2.3. Compostos Fenólicos.....	19
1.2.3.1. Flavonoides .....	21
1.2.3.2. Taninos.....	23
1.3. Espécies reativas e antioxidantes .....	23
1.4. Família Myrtaceae .....	24
1.4.1. Gênero <i>Psidium</i> e sua potência medicinal .....	25
1.4.1.1. <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg .....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3. METODOLOGIAS .....</b>	<b>29</b>
3.1. Equipamentos e reagentes utilizados .....	29
3.2. Identificação e coleta do material vegetal.....	29
3.3. Preparo do material vegetal .....	30
3.4. Preparo dos extratos e partições .....	30
3.5. Prospecção Fitoquímica para análise qualitativa de metabólitos secundários .....	33
3.6. Atividade antioxidante.....	34
3.6.1. Quantificação de metabólitos secundários .....	34
3.6.1.1. Fenóis totais.....	34
3.6.1.2. Flavonoides.....	35
3.6.1.3. Taninos condensados (Proantocianidinas).....	35
3.6.2. Determinação da atividade antioxidante.....	36
3.6.2.1. Método do sequestro do radical DPPH.....	36
3.6.2.2. Método de Capacidade Antioxidante de Radicais de Oxigênio (ou “ <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> ”, ORAC).....	36

3.6.2.3. Método do Poder Antioxidante da Redução Férrica (ou “Ferric Reducing – Antioxidant Power”, FRAP).....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>37</b>
4.1. Rendimento das extrações e partições .....	37
4.2. Prospecção Fitoquímica para análise qualitativa de metabólitos secundários ...	39
4.3. Atividade Antioxidante.....	41
4.3.2. Determinação da atividade antioxidante.....	47
4.3.2.1. Método do sequestro do radical DPPH .....	47
4.3.2.2. Método de Capacidade Antioxidante de Radicais Oxigenados (do inglês “Oxygen Radical Absorbance Capacity”, ORAC) .....	50
4.3.2.3. Método do Poder Antioxidante da Redução Férrica (do inglês “Ferric Reducing – Antioxidant Power”, FRAP).....	53
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1.O bioma Cerrado e sua biodiversidade**

O Brasil está entre os países com maior biodiversidade do planeta, abrigando cerca de 20% da diversidade mundial. O território brasileiro possui seis biomas, cada um com especificidades em espécies de plantas e animais. O Cerrado é o segundo maior deles, em extensão, atrás apenas da Floresta Amazônica, e está presente em 11 estados brasileiros e no Distrito Federal (MACHADO et al., 2004).

Esse bioma possui localização estratégica, região central do país limitada pelos demais biomas Caatinga, Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Pantanal. Desse modo, ele possui papel crucial na continuidade dos demais biomas (MASCARENHAS, 2010) e é conhecido como a savana brasileira, a mais rica em biodiversidade do mundo, possuindo alta diversidade de fauna e flora. O Cerrado abriga mais de 12 mil plantas nativas de espécies já catalogadas, das quais mais de 40% delas são consideradas endêmicas (DE MEDEIROS et al., 2015; BRASIL, 2018).

Associa-se a grande diversidade do Cerrado aos seus diversos ambientes que esse possui. Isso não ocorre nos biomas da Amazônia ou Mata Atlântica, por exemplo. Dessa maneira, é possível observar alguns tipos de espécies vegetais e animais apenas em determinados tipos de ambientes do Cerrado (MACHADO et al., 2004). O Cerrado compreende em seu território as nascentes de três diferentes bacias hidrográficas inclusive as três maiores da América do Sul, são elas: as Bacias Amazônica, São Francisco e Prata. Além disso, é composto por diferentes variedades de vegetação e relevos (BRASIL, 2018). Com isso, a alta biodiversidade desse bioma é justificada.

Segundo o Brasil (2018), o Cerrado abriga cerca de 5% da biodiversidade do planeta. Esse bioma recobre mais de 20% do território brasileiro, porém, 40% deste já foram devastados. Isso aconteceu porque nessa região do país houve alto desenvolvimento urbano e agrário. Desta forma, sem planejamento ambiental estes fatos podem acarretar perda de recursos naturais muito importantes, comprometendo as riquezas naturais deste bioma. A ação antrópica é um fator importante na degradação desta região, quando se discute a devastação desse bioma, pois, nas áreas compreendidas como Cerrado há intensas atividades pecuárias e agrícolas, como o intenso plantio de grãos para exportação. Assim, nesse sentido, o Cerrado é conhecido também como o celeiro do mundo (MASCARENHAS, 2010).

Devido às características do Cerrado, com árvores de troncos retorcidos, sem sequer alguma beleza natural e solos com deficiência de minerais e alta acidez, esse bioma foi deixado em segundo plano pelos órgãos de preservação ambiental, e a sua preservação foi negligenciada. Aliás, constitucionalmente, no artigo 225 (§ 4º), não se declara o Cerrado como patrimônio nacional, reforçando a devastação deste bioma ao longo dos anos (MACHADO et al., 2004; MASCARENHAS, 2010; BRASIL, 1988). Essa região sofreu um aumento da urbanização nas últimas décadas, acompanhando o ritmo do país, o que causou sua maior devastação. Essa destruição também oferece ameaça aos recursos genéticos dessa região (FRANZON et al., 2009). É importante destacar que a sua proteção e preservação devem ser vistas como prioridades, uma vez que muito do material genético dos biomas pode ser perdido, o que pode ser nocivo, já que várias espécies apresentam alto potencial alimentício, econômico e medicinal, além de afetar a manutenção dos demais biomas.

Além das colaborações ambientais, este bioma possui bastante relevância social. Muitas populações se utilizam de seus recursos naturais mencionados para os seus sustentos e para atividades econômicas. Os povos, indígenas, geraizeiros, ribeirinhos ou quilombolas habitantes do Cerrado detêm bastante conhecimento tradicional sobre a biodiversidade desses locais. É sabido que muitas espécies podem ser usadas medicinalmente e muitas outras para recuperações dos solos (INSTITUTO SOCIEDADE, POPULAÇÃO E NATUREZA, 2019).

## **1.2. Metabolismos nas plantas**

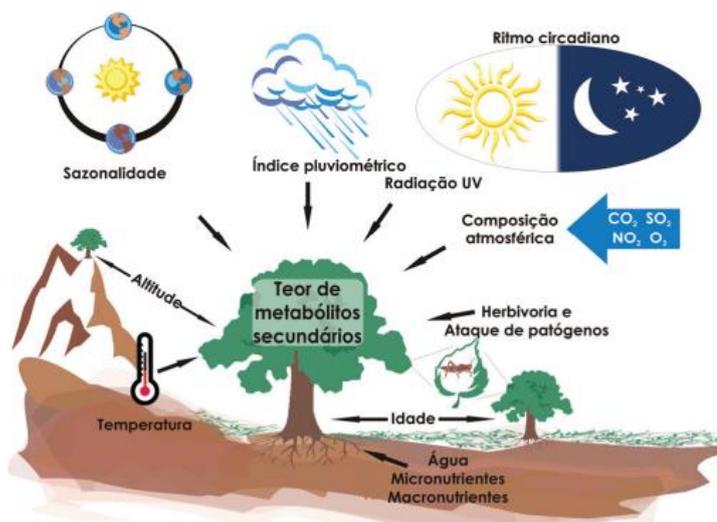
O metabolismo são todas as reações químicas que ocorrem nas células dos organismos vivos, os quais precisam realizar transformações constantemente para que consigam sobreviver, crescer e reproduzir (DEWICK; 2002; MOREIRA, 2015). Os produtos dessas reações são chamados de metabólitos. Nas plantas, existe o metabolismo primário e o secundário (ou também chamado de especial). As rotas sintéticas dos metabólitos, primários e secundários, se relacionam. Não há diferenciação bioquímica ou estrutural, e distingue-se um tipo do outro por suas funcionalidades (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

O metabolismo primário (MP) são todas as reações essenciais para a vida do organismo vegetal, como por exemplo, a respiração celular, pela fotossíntese. Os metabólitos primários das plantas são os mesmos e em mesmas quantidades daqueles

encontrados em animais, e eles são essenciais para a vida. São eles: os carboidratos, os ácidos nucleicos e as proteínas. Já o metabolismo secundário (MS) refere-se à produção de substâncias que auxiliam as plantas na percepção do meio externo e colaboram com sua sobrevivência, desempenhando funções específicas, como atrair polinizadores, proteger da ação de herbívoros e também atribuir coloração a seus frutos, flores e folhas (ALVES, 2001; PERES, 2004; SIMÕES et al., 2010). Os metabólitos secundários são classificados dessa maneira por serem derivados do metabolismo primário, como por exemplo, estruturas de aminoácidos (unidade básica das proteínas) nas estruturas de alguns alcaloides (metabólitos secundários da classe substâncias nitrogenadas) (SIMÕES et al., 2017).

Em cada espécie e estágio de desenvolvimento, as plantas possuem combinações e concentrações diferentes de metabólitos especiais (DELGODA; MURRAY, 2017). Isso ocorre porque a produção deles se dá de acordo com a demanda biológica da planta. Há fatores bióticos e abióticos (idade, sazonalidade, índice pluviométrico, disponibilidade de micro e macro nutrientes e outros) que influenciam nesse processo, como ilustrado na Figura 1 (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 1- Esquema representativo dos fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários nas plantas



Fonte: Gobbo-Neto; Lopes (2007)

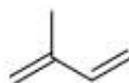
Dentre as substâncias produzidas pelas plantas podem-se destacar três grandes classes químicas: terpenos, compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinolatos e cianidrininas) e compostos fenólicos (flavonoides, xantonas, cumarinas, ligninas, entre

outros). Os terpenos, incluindo alguns metabólitos primários, são cerca de 25.000 compostos. Dos compostos nitrogenados 12.000 são alcaloides e por volta de 8.000 são aqueles chamados de compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Nesse trabalho, os compostos fenólicos mereceram um destaque maior, já que foram quantificados para o estudo da atividade antioxidante.

### 1.2.1. Terpenos

Os terpenos ou terpenoides provavelmente é a maior classe de produtos naturais (PN) conhecidas. Todos os terpenos são biossintetizados a partir da fusão entre unidades isoprênicas (2-metilbuta-1,3-dieno) (Figura 2) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Figura 2- Representação estrutural do isopreno



Isopreno

Fonte: a autora

A classificação dos terpenos relaciona-se com a quantidade de isoprenos presentes em sua estrutura, como mostrado na Tabela 1 (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Tabela 1 - Classificação de alguns terpenos e respectivas quantidades de unidades isoprênicas

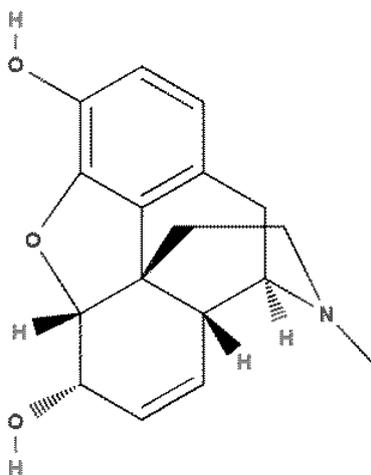
<b>Terpeno</b>	<b>Quantidade de unidades isoprênicas</b>
Hemiterpeno	1
Monoterpenos	2
Sesquiterpenos	3
Diterpenos	4
Tetraterpenos	8

Fonte: a autora, adaptado de Croteau, Kutchan, Lewis (2000)

### 1.2.2. Alcaloides

Os alcaloides são produtos naturais que possuem nitrogênio em suas moléculas. Também são compostos farmacologicamente ativos e com caráter básico devido à presença de nitrogênio. O seu estudo remete-se há anos, e teve como marco inicial a descoberta da morfina (1806), composto presente no ópio, amplamente utilizado na época (Figura 3).

Figura 3 - Fórmula estrutural da morfina



Fonte: a autora

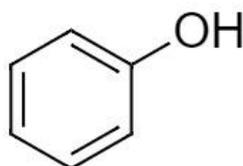
Inicialmente, acreditou-se que os alcaloides eram provenientes apenas de plantas. Mais tarde, depois de quase 200 anos de estudos, percebeu-se a capacidade de isolar esses compostos de alguns animais também. Os alcaloides são os responsáveis pelo sabor amargo em algumas plantas (BUSSNELI et al. 2007), e têm bastante importância na medicina moderna, tendo colaborado com a produção de drogas sintéticas como os antimaláricos e dilatadores de pupilas usados em exames oftalmológicos. Além disso, essas moléculas possuem atividade antifúngica e antiviral e constituem importantes absorvedores de radiação ultravioleta (UV) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

### 1.2.3. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos possuem em sua estrutura a unidade básica do fenol (Figura 4). Há várias classes de biocompostos fenólicos entre eles as xantonas, flavonoides, cumarinas, ligninas, taninos e outros mostrados na Tabela 2. Desses, os

mais importantes são os flavonoides e os taninos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Essas substâncias são os metabólitos mais presentes na alimentação humana (SELEEM; PARDI; MURATA, 2017).

Figura 4 - Estrutura do fenol



Fonte: a autora

Tabela 2 - Diferentes classes de compostos fenólicos

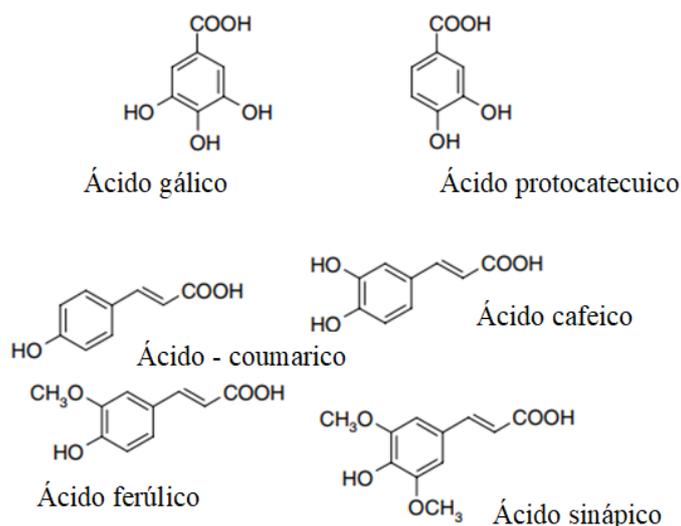
<b>Classes</b>	<b>Nº Carbonos</b>
Compostos fenólicos simples, benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácidos Hidroxibenzóicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Naftoquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Lignanás, neoglignanás	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Biflavonoides	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Lignanás	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos Condensados (ou proantocianidinas)	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

Fonte: a autora, adaptado de Balasundram; Sundram; Samman (2006)

A presença de compostos fenólicos nas plantas pode indicar maior capacidade antioxidante, devido a presença dos grupos hidroxilas. Nesse trabalho, os compostos fenólicos merecem um destaque maior, já que foram quantificados os teores de fenóis totais e suas duas classes mais importantes. Estruturalmente, esses compostos são formados por um anel aromático (C<sub>6</sub>) com uma ou mais substituições de hidroxilas. Além disso, podem ser de biomoléculas simples até altamente polimerizados, como é

o caso das proantocianidinas e das ligninas. Na Figura 5 a seguir estão representados alguns compostos fenólicos conhecidos.

Figura 5 - Exemplos de compostos fenólicos

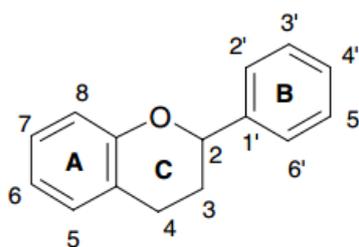


Fonte: a autora; adaptado de Balasundram; Sundram; Samman (2006)

### 1.2.3.1. Flavonoides

Os flavonoides representam cerca da metade de todos os compostos fenólicos conhecidos. Possuem baixa massa molecular e sua estrutura básica é C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, nos quais os anéis de seis carbonos são usualmente denominados de anéis A e B e, o anel heterocíclico de anel C (Figura 6) (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). As substituições nos anéis C dão origem às diferentes classes dos flavonoides.

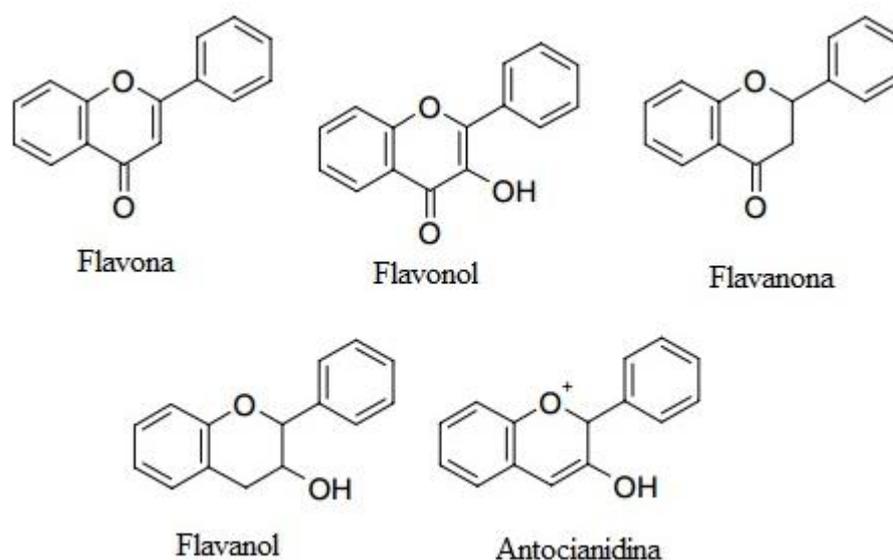
Figura 6 - Estrutura geral dos flavonoides



Fonte: Balasundram; Sundram; Samman (2006)

A classificação dos flavonoides se dá de acordo com sua biossíntese e isso se torna um desafio, já que algumas classes (chalconas, flavanonas e flavan-3-ols) são consideradas intermediárias das reações, e outras (flavonas e flavonóis) como produtos finais do processo de biossíntese (ANDRAE-MAROBELA, GHISLAIN, OKATCH, & MAJINDA, 2013 apud SELEEM; PARDI; MURATA, 2017). Aqui não foram consideradas essas diferenciações biossintéticas, e a representação estrutural das subdivisões dos flavonoides estão na Figura 7.

Figura 7 – Estrutura química das classes de flavonoides



Fonte: a autora, adaptado de Balasundram; Sundram; Samman (2006)

Há cerca de 10 anos o estudo dos compostos antioxidantes vem ganhando força após a descoberta dos fitonutrientes com capacidade protetora de doenças degenerativas. Os efeitos oxidativos podem ser danosos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos presentes no corpo humano, pois podem afetar órgãos, por exemplo, o coração e também causar doenças como o câncer. Esses fitonutrientes possuem componentes antioxidantes diversos e muitos deles tratam-se de flavonoides presentes em frutas e vegetais (YIĞIT; YIĞIT; MAVI, 2009).

### 1.2.3.2. Taninos

Os taninos são substâncias produzidas pelas plantas e nelas são as responsáveis pelos sabores adstringentes, devido a precipitação de substâncias que fazem com que haja perda de lubrificação. Eles possuem massa molecular de 500 a 3000 unidades de massa atômica, são solúveis em água e, estruturalmente, são classificados em dois tipos mais comuns em plantas: hidrolisáveis e condensados.

Os taninos hidrolisáveis tratam-se de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados. Os taninos condensados, ou proantocianidinas, são substâncias poliméricas de flavonoides e a unidade básica trata-se do flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol.

### 1.3. Espécies reativas e antioxidantes

Nos processos fisiológicos dos organismos vivos, como a respiração celular mitocondrial, são produzidas algumas substâncias reativas, as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs) e de enxofre (EREs). Essas espécies podem ou não ser radicais livres. Os radicais livres são aqueles que possuem elétrons desemparelhados em suas estruturas, como por exemplo:  $\text{OH}\cdot$  (radical hidroxila),  $\text{ROO}\cdot$  (radical peroxila), óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) e, as não radicalares são espécies reativas neutras, por isso mais estáveis que os radicais livres, como exemplo pode-se citar:  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio),  $\text{HOCl}$  (ácido hipocloroso),  $\text{HNO}_2$  (ácido nitroso). Além das fontes endógenas, essas espécies podem ser adquiridas de maneira externa ao organismo por meio de atitudes como tabagismo, exposição à radiação UV, pesticidas e uso de drogas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; SOARES et al., 2015).

O organismo humano possui o sistema de defesa com várias enzimas e compostos antioxidantes (AOX), porém, esses também podem ser adquiridos por meio da alimentação. Segundo Oliveira (2009), antioxidantes são substâncias que protegem as biomoléculas de oxidações degenerativas quando presentes em quantidades menores que os substratos. O desequilíbrio na produção de espécies reativas ou da ação defensiva dos compostos antioxidantes pode ocasionar o que é chamado de estresse oxidativo.

Esse desequilíbrio é prejudicial ao organismo e há estudos que relacionam várias patologias ao excesso dessas espécies no organismo, tais como artrite, catarata, disfunções cognitivas, câncer, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (MACHADO et al., 2009; SOARES et al., 2015). As espécies reativas, em excesso, muitas vezes podem reagir com lipídeos, proteínas e com o DNA. Já algumas delas atacam apenas lipídeos, e ainda há aquelas que são menos reativas, no entanto, podem gerar espécies danosas ao organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005).

A alimentação é um dos principais fatores ambientais externos a que o ser humano é submetido. Na indústria de alimentos utiliza-se de AOX para ajudar na conservação dos produtos, os mais utilizados são butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), e galato de propila (GP). Há estudos, porém, sobre a possibilidade desses compostos possuírem efeitos tóxicos ao organismo humano (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010; SOUSA et al., 2007). Por esse motivo, os compostos fenólicos estão sendo estudados nas últimas duas décadas, por serem fortes fontes de AOX. Esses apresentam capacidade antioxidante por impedir ou retardar a oxidação das células vivas do ser humano.

Dessa maneira, substituir os alimentos industrializados por aqueles naturais pode ser vantajoso em questões de saúde. É importante se ter uma alimentação saudável, não apenas por questões nutritivas, e também, pela ação que os compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos, presentes nos alimentos, podem exercer no organismo (BIERHALS et al., 2009; SOARES et al., 2015).

#### **1.4.Família Myrtaceae**

Para se estudar essas espécies antioxidantes importantes aos seres humanos são observadas as características de plantas para melhor direcionar a investigação. A família Myrtaceae é considerada uma das maiores famílias botânicas conhecidas. Possui mais de 3500 espécies no mundo, sendo quase mil delas endêmicas. As plantas dessa família podem ser encontradas na Austrália, no sudeste da Ásia e na América. No Brasil encontram-se cerca de 1000 de todas essas espécies, compreendendo mais de 20 gêneros (DURÃES; PAULA; NAVES, 2015; GIULIETTI; HARLEY, 2005). A família distingue-se por uma combinação das seguintes características: folhas inteiras

com glândulas sebáceas, ovário meio inferior, floema interno e, no geral, estames numerosos. (DIAS, 2019).

No entanto, dentre toda essa diversidade na família das mirtáceas apenas quatro gêneros possuem importância econômica, são eles: *Eugenia*, *Acca*, *Myrciaria* e *Psidium*. Isso porque são utilizadas na alimentação de diversas maneiras, como: geleia, suco, doces e também consumo *in natura*, por exemplo a goiaba (*Psidium guajava* L.) e a pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (FRANZON et al., 2009).

Essas plantas estão sujeitas a muitos estresses abióticos e, por isso, há intensa produção de metabólitos secundários, os quais apresentam ações contra algumas enfermidades. Já que seus frutos são amplamente aceitos para consumo humano por seus sabores e consistência, as plantas dessa família se tornam importantes fontes de substâncias bioativas que, majoritariamente possuem ação contra distúrbios gastrointestinais, doenças infecciosas e diabetes, além de ser considerado diurético. (CRUZ; KAPLAN, 2004; DURÃES; PAULA; NAVES, 2015). Além disso, há a contribuição ecológica por serem plantas com frutos carnosos e servirem como alimentos também para os animais silvestres, os mesmos que contribuem para a dispersão e perpetuação das espécies (NASCIMENTO, et. al. 2014).

#### **1.4.1. Gênero *Psidium* e sua potência medicinal**

*Psidium* é originário da palavra grega ‘psídion’, que significa morder, aludindo sobre o gosto agradável dos frutos. O gênero *Psidium*, segundo Franzon et al. (2009), é considerado neotropical com ocorrências entre o sul do México até Buenos Aires, na Argentina. Possui mais de 100 espécies e a mais importante delas trata-se da *Psidium guajava* (a goiabeira). Ademais existem várias plantas comestíveis, ornamentais e madeiras nesse gênero. As espécies desse gênero são usadas frequentemente na medicina tradicional para vários fins. Essas plantas possuem alto teor de vitamina C, até 5 vezes mais que frutas cítricas em sua composição e com isso possuem elevada atividade antioxidante (FRANZON et al., 2009; MEDEIROS et al., 2015).

Há alguns estudos sobre as espécies desse gênero nos quais as propriedades medicinais foram avaliadas. Oliveira et al (2012) estudaram quase 70 espécies comestíveis nativas do Brasil e verificaram a atividade contra diabetes e poder antiglicante na goiaba (*Psidium guajava* L.). Isso porque possuem compostos fenólicos e flavonoides em seus extratos, o que diminui significativamente o acúmulo de

gordura nos tecidos hepáticos e os níveis de glicoses no sangue. Também confirmaram ação antioxidante, naqueles conhecidos como araçazeiro (*Psidium guineense* Sw. e *P. rufum* DC.) (OLIVEIRA et al., 2012). Também sobre a goiaba (*P. Guajava*) diz-se que ela é abundantemente utilizada na América Latina no tratamento da diarreia e dores do estômago. No Panamá usa-se contra disenteria e como adstringente na Venezuela. Os tratamentos podem ser por decocção das folhas, cascas e até mesmo das flores da planta, como é usado na Costa Rica para ação anti-inflamatória (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008).

Diferentes estudos mostram que a espécie *P. cattleiarum* Sabine, o araçá, também possui atividades anticarcinogênica, antimicrobiana, anti-inflamatória e efeitos antienvhecimento. Em recente revisão, Pereira et al. (2018) avaliaram as concentrações de diversas substâncias, estudando assim a composição química dessa espécie nos seus genótipos vermelho e amarelo e concluíram que ela, de fato, possui algumas ações farmacológicas e têm grandes chances de ser utilizadas no gerenciamento da doença de diabetes mellitus tipo 2. As plantas desse gênero podem ser usadas medicinalmente, uma vez que, possui frutos atrativos pelo sabor, aroma e baixo teor calórico e, além disso, há compostos fenólicos com bastante correlação antioxidante, os quais podem prevenir doenças crônicas degenerativas (DAMIANI et al., 2011; MEDINA et al., 2011; PEREIRA et al., 2018).

#### **1.4.1.1. *Psidium myrtoides* O. Berg**

Essa espécie é conhecida popularmente como araçá-roxo ou simplesmente araçá. Seu nome científico possui sinônimos tais como: *Psidium myrsinoides*, *Guajava myrsinoides*, *Guajava myrtoides*, *Myrtus corynantha*, *Psidium turbinatum*, *Psidium corynanthum*, e *Corynemyrtus corynantha* (SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA, 2019). Essa espécie está presente predominantemente no Cerrado, mas é compreendida em três domínios fitogeográficos dentro do Brasil: Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, (REFLORA, 2019) tal como mostrado na Figura 8.

Essa espécie manifesta-se como árvores de 6 a 12 metros de comprimento, as cascas do tronco são esfoliantes, com lâminas papiráceas, ou seja, descamações como folhas de papel. Folhas opostas, que nascem no mesmo nó do caule, com tamanho entre 2,5 e 7,5 centímetros. Flor com botão abertos com 4 lobos; frutos verdes quando

imaturos e quando maduros tem coloração violeta (DIAS, 2019). A Figura 9 mostra alguns desses detalhes.

Figura 8 - Mapa dos estados brasileiros (em cor escura) onde se encontram a espécie de *Psidium myrtoides*



Fonte: Sistema de Informação Sobre a Biodiversidade Brasileira (2019)

Figura 9 - Fotografia dos detalhes da *Psidium myrtoides*



Fonte: a autora

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do trabalho consistiram em realizar o estudo fitoquímico das folhas da *Psidium myrtoides*, conhecida popularmente como araçá-roxo, bem como avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos e partições.

Os objetivos específicos foram:

- Identificar a classe de metabólitos secundários dos extratos e partições, por meio da prospecção fitoquímica;
- Quantificar os teores de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides dos extratos e partições por método espectrofotométrico;
- Avaliar as atividades antioxidantes por três métodos diferentes: método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), método de Capacidade de Absorbância de Radical Oxigênio (ou “*Oxygen Radical Absorbance Capacity*”, ORAC) e também pelo método Poder Antioxidante Redutor Férrico (ou do inglês “*Ferric Reducing – Antioxidant Power*”, FRAP).

### 3. METODOLOGIAS

#### 3.1. Equipamentos e reagentes utilizados

A Tabela 3 apresenta os equipamentos do Laboratório de Produtos Naturais utilizados neste estudo.

Tabela 3 - Especificações dos equipamentos utilizados

Equipamentos	Marca/Especificações
Balança analítica	SHIMADZU modelo AUW220D
Balança de IV	QUIMIS, modelo Kett FD-600
Evaporador rotatório	IKA <sup>®</sup> RV 10 basic
Banho-maria	IKA <sup>®</sup> HB 10 basic
Espectrofotômetro de UV/VIS	Genesys 10S UV-VIS Thermo scientific
Espectrofotômetro de UV/VIS	VERSA max Tunable Microplate Reader
Espectrofluorímetro	Perkin Elmer, modelo Multimode Plate Reader
Lavadora ultra-sônica	UltraSonic Cleaner
Liofilizador	LS3000 Terroni

Fonte: a autora

#### 3.2. Identificação e coleta do material vegetal

As folhas da *Psidium myrtoides* (Figura 9) foram coletadas no período da manhã, no bairro Jardim Karaíba, em Uberlândia, Brasil, nas coordenadas geográficas (18° 56'45.3"S e 48° 16'08.4"W), em março de 2018. Nesse período era final do verão e as temperaturas registradas no dia foram: a mínima de 21°C e a máxima de 31°C (ACCUWEATHER, 2018). A autorização de uso e estudo da planta obtida pelo CNPq/SisGen possui o código A1247B0, e a exsicata foi depositada na Universidade Federal de Uberlândia, onde está registrada com o código de coleta HUFU65831.

Figura 10 - Fotografia da árvore do araçá-roxo (*Psidium myrtaoides*) utilizada neste estudo



Fonte: a autora

### **3.3. Preparo do material vegetal**

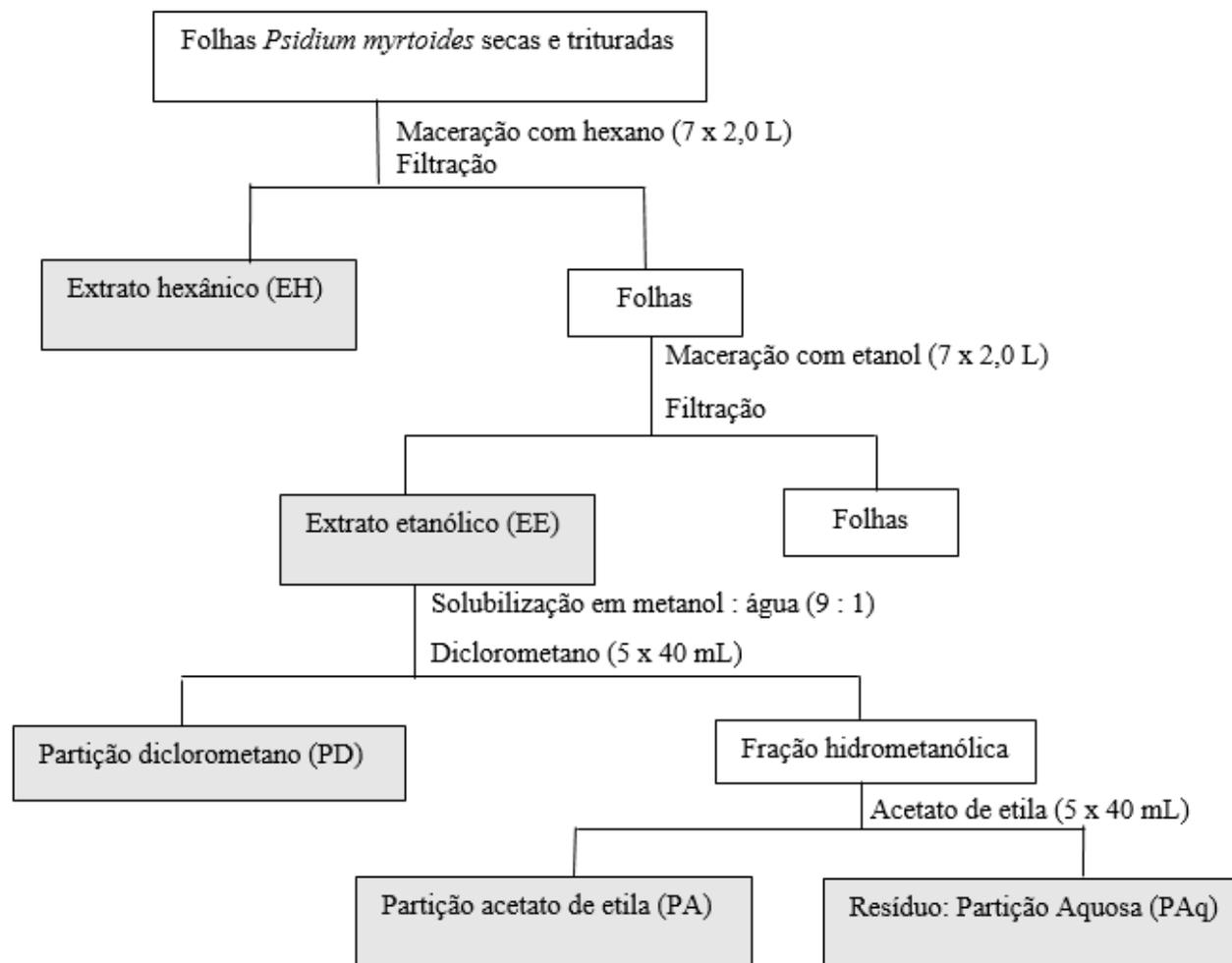
As folhas foram secas ao ar livre (18 dias) em caixas abertas e mediu-se diariamente a umidade até atingir valor constante e menor que 10 %, utilizando-se de uma balança de luz infravermelha. Essa balança aquece o material fazendo com que o mesmo perca água e, por diferença de massa, e fornece a porcentagem de umidade das folhas. Após a secagem, com 8,6 % de umidade, elas foram trituradas em liquidificador doméstico para início do estudo.

### **3.4. Preparo dos extratos e partições**

Os extratos foram preparados pelo método de maceração, à temperatura ambiente, utilizando-se 376,93 ( $\pm 0,01$ ) g de folhas trituradas. Primeiramente foram realizadas as extrações em hexano (2,0 L) destilado, deixando a mistura folhas-solvente em um erlenmeyer ao abrigo da luz. A cada 5 dias, fez-se a filtração e o solvente foi recuperado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e banho a 40 °C, para ser reutilizado no processo. Esse procedimento se repetiu por 7 vezes com o hexano e, em seguida, mais 7 vezes com o solvente etanol (2,0 L) também devidamente destilado.

Cerca de 15,0 g do extrato etanólico (EE) foi solubilizado em 76,0 mL de uma solução 9 : 1 (metanol : água). Utilizando um funil de extração, realizaram-se partições líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as partições diclorometano e acetato de etila (PD e PA, respectivamente). O material remanescente foi chamado de partição aquosa (PAq). Os solventes de cada partição também foram recuperados da mesma maneira que nos extratos. Por último, as amostras foram liofilizadas, a fim de se retirar residuais de água. Os extratos e partições foram armazenados em frascos de vidro a  $-18 \pm 5$  °C, no freezer. O processo de preparo dos extratos e partições líquido-líquido está representado com detalhes na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma representativo do processo de extração e partição de metabólitos das folhas da *P. myrtooides*. Em destaque as etapas de obtenção das amostras desse trabalho.



Fonte: a autora

### 3.5. Prospecção Fitoquímica para análise qualitativa de metabólitos secundários

Para esta análise foram preparadas soluções de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  em metanol das amostras, e realizou-se o estudo cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). A fase estacionária utilizada foi a placa de sílica gel 60, em duas diferentes fases móveis:

- a. Fase I:  $\text{NH}_4\text{OH} : \text{diclorometano} : \text{MeOH} (0,25 : 9 : 1)$
- b. Fase II:  $\text{AcOEt} : \text{MeOH} : \text{EtOH} : \text{H}_2\text{O} (10 : 1 : 1 : 2,5)$

Para identificar as classes dos metabólitos especiais foram utilizados diversos tipos de solventes e reveladores, como proposto por BLADT; WAGNER (1996).

- Determinação de compostos fenólicos totais

#### **Solução utilizada: sulfato cérico**

Preparou-se uma solução de 0,7 g de sulfato cérico  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  em 20,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Após a eluição da placa, foi borrifado solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 7% em  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{m v}^{-1}$ ).

- Determinação de flavonoides

#### **Soluções utilizadas: NP/PEG 4000 (Difenilboriloxietilamina/Polietilenoglicol 4000)**

Solução A: solução metanólica a 1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) de difenilboriloxietilamina (NP).

Solução B: solução etanólica a 5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000).

Para o preparo da solução estoque do revelador cromatográfico misturou-se a solução A e a solução B na proporção 10:8. Após a eluição das placas, essas foram visualizadas sob lâmpada de radiação ultravioleta (254 e 365 nm).

- Determinação de terpenos e esteroides

#### **Solução utilizada: Liebermann-Buchard**

Uma solução na proporção 5:5:50 dos reagentes: anidrido acético ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ ), ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) foi preparada, adicionando-se os reagentes, nessa ordem, em banho de gelo. Após a eluição, as placas foram aquecidas a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , de 5 a 10 minutos. A placa foi observada em câmara luz UV (365 nm).

- Determinação de terpenos, esteroides, fenóis e açúcares

**Solução utilizada: anisaldeído**

Preparou-se uma solução contendo anisaldeído 5% (v v<sup>-1</sup>) em ácido acético glacial. Em seguida, adicionou-se 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado em banho de gelo. Após a eluição as placas foram aquecidas a 100 °C de 5 a 10 minutos

- Determinação de alcaloides

**Soluções utilizadas:****Iodocloroplatinado (ICPt)**

Solução A: solução aquosa a 5% de ácido hexacloroplatínico (IV) (H<sub>2</sub>(PtCl<sub>6</sub>).6H<sub>2</sub>O) (m m<sup>-1</sup>).

Solução B: solução aquosa a 10% de iodeto de potássio (KI) (m m<sup>-1</sup>).

A solução reveladora foi obtida pela mistura das soluções A e B com H<sub>2</sub>O na proporção 1:9:10.

**Dragendorff**

Solução A: mistura de 10,0 mL de ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH) e 40,0 mL de H<sub>2</sub>O e acrescentou-se 0,8 g de subnitrito de bismuto (BiONO<sub>3</sub>)

Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio em 20,0 mL de H<sub>2</sub>O.

A solução spray foi preparada na proporção 1:1:2:10 de solução A, de solução B, de ácido acético glacial e de água.

**3.6. Atividade antioxidante****3.6.1. Quantificação de metabólitos secundários****3.6.1.1. Fenóis totais**

Reagiu-se 0,50 mL de solução das amostras em metanol (2, 8, 15, 18, 60, 90, 100 µg mL<sup>-1</sup>) com 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5 % (m v<sup>-1</sup>) e 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) 10 % (v v<sup>-1</sup>) em tubos de ensaio. Em seguida, deixou-se a mistura reacional em banho de 50 °C, durante 5 minutos, e posteriormente, fez-se a leitura da absorbância em 760 nm, em um espectrofotômetro. Para a quantificação fez-

se a construção de uma curva de calibração nas mesmas condições, substituindo-se as amostras por soluções de ácido gálico em diferentes concentrações (entre 2 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O branco da reação foi feito substituindo-se as amostras e o ácido gálico, por metanol. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (MORAIS et al., 2008).

### **3.6.1.2. Flavonoides**

Para a construção da curva de calibração, realizou-se uma reação de complexação entre uma solução de  $\text{AlCl}_3$  5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) e quercetina em diferentes concentrações conhecidas (1, 3, 5, 8, 10, 15, 18, 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), adicionando em um tubo de ensaio: 2 mL de quercetina em metanol com concentrações conhecidas, 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) em metanol e 2 mL de metanol. Deixou-se a mistura em repouso de 30 minutos, a temperatura ambiente, e posteriormente, realizaram-se as leituras das absorvâncias em 425 nm, em um espectrofotômetro. Em seguida, submetem-se as amostras em triplicata às mesmas condições, fazendo a substituição da quercetina pelos extratos e partições. O branco foi feito adicionando-se 2 mL de metanol ao invés das amostras e quercetina. O resultado foi expresso em mg de equivalentes de quercetina (EQ) por g de extrato, (WOISKY; SALATINO, 1998).

### **3.6.1.3. Taninos condensados (Proantocianidinas)**

Para a quantificação das proantocianidinas realizou-se a reação de 2 mL de solução metanólica de catequina, em concentrações conhecidas (2, 6, 8, 10, 12, 14, 18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 3 mL de solução de vanilina 10  $\text{mg mL}^{-1}$ , 70 % ácida. O produto dessa reação possui cor avermelhada. Logo após, fez-se a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 500 nm em um espectrofotômetro. Realizou-se o mesmo com as amostras em triplicata. Assim, utilizando-se da curva de calibração, determinou-se a quantidade de taninos condensados na amostra em mg de equivalentes de catequina (EC) por g de extrato (MORAIS et al., 2008).

### 3.6.2. Determinação da atividade antioxidante

#### 3.6.2.1. Método do sequestro do radical livre DPPH•

O método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH•) (YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001) foi realizado fazendo-se a reação dos compostos fenólicos presentes em cada uma das amostras e o respectivo radical. O branco é realizado com a substituição do DPPH• por metanol e o controle é feito com a substituição das amostras por metanol. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo.

O ensaio foi iniciado com 75 µL de amostras em metanol (3 mg mL<sup>-1</sup>), solubilizadas em 225 µL de solução metanólica de DPPH• (0,06 mmol L<sup>-1</sup>). A mistura foi incubada a 30° C, ao abrigo da luz, por 20 min. A redução na absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. O cálculo da porcentagem da capacidade antioxidante (CA), correspondente à porcentagem de DPPH• “sequestrado”, foi determinado pela Equação 1. Todas as leituras foram feitas em duplicatas e os resultados desse teste foram expressos em concentração efetiva (CE<sub>50</sub>), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH•.

Equação 1 - Capacidade antioxidante

$$CA (\%) = \frac{Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \cdot 100$$

Fonte: a autora, adaptado de Yildirim, Mavi, Kara (2001)

#### 3.6.2.2. Método de Capacidade Antioxidante de Radicais de Oxigênio (do inglês “*Oxygen Radical Absorbance Capacity*”, ORAC)

Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato, pH 7,4 (75 mmol L<sup>-1</sup>). As amostras foram diluídas em metanol 0,1 mg mL<sup>-1</sup> e então 150 µL foram incubados em microplaca preta, com 25 µL de fluoresceína (8,5 x 10<sup>-5</sup> mmol L<sup>-1</sup>) em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, 30 µL de AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobi-2-metilpropionamidina) (153 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados à mistura para iniciar a reação.

A fluoresceína é utilizada nesse ensaio como uma sonda para indicação da reação. A intensidade de fluorescência ( $485 \text{ nm}_{\text{ex}} / 528 \text{ nm}_{\text{em}}$ ) foi medida a  $37^\circ \text{C}$  a cada um minuto e meio, durante 90 minutos e o decaimento da fluorescência dessa molécula foi medida calculando a área sob a curva. As leituras foram realizadas em triplicata, a capacidade antioxidante foi determinada usando uma curva de calibração analítica, construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano2-carboxílico) no lugar das amostras e, o ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo (PRIOR et al., 2003).

### **3.6.2.3. Método do Poder Antioxidante da Redução Férrica (do inglês “Ferric Reducing – Antioxidant Power”, FRAP)**

Para o experimento prepara-se uma solução tampão acetato de sódio ( $\text{pH} = 3,6$ ) e uma solução de cloreto férrico  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ . Também é preparado uma solução de HCl  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ , e uma de 2,4,6-tris(2-priridil)-s-traizina (TPTZ)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  em HCl. O preparo do reagente de FRAP é realizado misturando-se na proporção 10 : 1 : 1 as soluções tampão acetato, TPTZ ácido e cloreto férrico. Para a quantificação se faz necessário uma curva analítica que foi realizada com Trolox. Ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Um branco foi realizado com as amostras / controles para reduzir a contribuição da cor para a absorbância.

Na microplaca transparente reagiu-se  $10 \mu\text{L}$  amostra  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (ou Trolox em diferentes concentrações conhecidas) +  $25 \mu\text{L}$  água +  $250 \mu\text{L}$  do reagente de FRAP e, essa mistura foi deixada incubada por 6 minutos a  $37^\circ \text{C}$ . A absorbância foi medida a  $593 \text{ nm}$  no espectrofotômetro e a atividade antioxidante foi determinada usando uma curva analítica, em  $\mu\text{mol}$  de equivalente de trolox por grama de extrato ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) (BENZIE; STRAIN, 1996).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Rendimento das extrações e partições**

Partindo-se da massa de  $376,93 (\pm 0,01) \text{ g}$  de folhas secas e trituras realizou-se as extrações por maceração utilizando os solventes hexano e etanol sequencialmente.

Obteve-se o extrato hexânico e etanólico, EH e EE brutos, respectivamente. As massas e rendimentos das extrações estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Massas e rendimento das extrações dos extratos brutos

<b>Amostra</b>	<b>Massa obtida (<math>\pm 0,0001</math>) g</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>EH</b>	12,6760	3,36
<b>EE</b>	17,2378	4,57

EH: Extrato hexânico; EE: Extrato etanólico

Fonte: a autora

No procedimento utilizando-se solvente hexano é esperado que todos os compostos orgânicos apolares de cadeia longa, como os ácidos graxos, sejam extraídos. Já no EE, é esperada a extração de todos os outros compostos com caráter mais polares presentes no material vegetal. Sendo assim, para um melhor direcionamento nas análises e estudo subsequentes fez-se partições do EE bruto com diferentes solventes para separar os compostos em uma escala de polaridade.

Armazenou-se 2,0053 ( $\pm 0,0001$ ) g do EE bruto e, com 15,2325 ( $\pm 0,0001$ ) g realizaram-se as partições líquido-líquido desse extrato em diclorometano e acetato de etila, nessa ordem, fazendo uma escala crescente de polaridade dos compostos já presentes no EE. Ao final desses procedimentos, obteve-se um resíduo que foi denominado partição aquosa (PAq). Nessa partição são esperados os compostos mais polares encontrados nas folhas da planta estudada. A Tabela 5 resume os resultados obtidos nas partições realizadas.

Tabela 5 - Massa e rendimento das partições feitas com EE bruto

<b>Partição</b>	<b>Massa obtida (<math>\pm 0,0001</math>) g</b>	<b>Rendimento alcançado (%)</b>
<b>PD</b>	5,4125	35,53
<b>PA</b>	1,1859	7,79
<b>PAq</b>	3,1286	20,54

PD: partição diclorometano; PA: partição acetato de etila; PAq: partição aquosa

Fonte: a autora

Considerando os percentuais de rendimento mássico apresentado nas Tabelas 4 e 5, o EE bruto apresentou maior rendimento que o EH, mostrando a maior quantidade de substâncias polares no material vegetal. A amostra com maior rendimento é a PD, seguida pela PAq, constatando a presença de substâncias polares.

#### 4.2. Prospecção Fitoquímica para análise qualitativa de metabólitos secundários

Realizou-se a prospecção fitoquímica como forma de mapear as possíveis classes de metabólitos especiais presentes na planta estudada. Dessa forma, foi feita uma análise qualitativa utilizando a CCD para identificar as classes presentes em cada uma das amostras. A fase estacionária utilizada em todos os testes foi placa de sílica gel 60 G e as fases móveis foram utilizadas duas combinações de solventes em proporções diferentes dando a característica de mais ou menos polar. O resultado desses ensaios está exposto na Tabela 6 a seguir, mostrando a intensidade de resposta de cada uma das classes.

Tabela 6 - Prospecção fitoquímica dos extratos e frações das folhas da *Psidium myrtaoides*

Amostras	Compostos fenólicos gerais	Flavonoides	Terpenos, esteroides	Terpenos, esteroides, fenóis e açúcares	Alcaloides	
	Sulfato Cérico	NP/PEG	Liebermann-Buchard	Anisaldeído	ICPt	Dragendorff
<b>EH</b>	+	+	+	+	-	-
<b>EE</b>	+	+	++	+++	-	-
<b>PD</b>	+	+	++	+++	-	-
<b>PA</b>	++	+++	+	++	-	-
<b>PAq</b>	+	+	+	++	-	-

EH: Extrato hexânico; EE: Extrato etanólico; PD: partição diclometano; PA: partição acetato de etila; PAq: partição aquoso; NP/PEG = difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol 4000; ICPt = iodocloroplatinado. - ausente; + intensidade fraca; ++ intensidade média; +++ intensidade forte

Fonte: a autora

Analisando a Tabela 6 observa-se que em todas as amostras foi detectada a presença de compostos fenólicos, utilizando o sulfato cérico como revelador. É

importante destacar que a partição acetato de etila demonstrou maior intensidade de sinal frente às outras amostras. Além disso, não foi notada a presença de alcaloides em nenhuma das amostras de *P. myrtoides* pelos métodos utilizados.

Ao utilizar o revelador NP/PEG, foi possível perceber que PA é a amostra com maior quantidade de flavonoides, seguida por todas as outras amostras em mesma intensidade. A grande quantidade de flavonoides na PA pode ser explicada pela polaridade dos compostos presentes nessa amostra. A PAq é mais polar que a PA, no entanto, trata-se de uma partição residual dos processos de fracionamento do EE bruto, podendo conter uma diversa quantidade de compostos residuais decorrente das extrações líquido-líquido anteriores.

Terpenos e esteroides foram detectados nos dois reveladores utilizados para tal análise, Liebermann-Buchard e Anisaldeído. É interessante ressaltar que com o uso do segundo revelador a intensidade da resposta foi maior em quase todas as amostras, exceto no extrato hexânico. A diferença na intensidade pode ser explicada porque o anisaldeído também revela açúcares e alguns compostos fenólicos. Esse perfil na intensidade de sinais ocorreu pelo aumento da quantidade de classes de substâncias reveladas nesse ensaio fazendo com que o a intensidade do sinal aumentasse. A justificativa para não ocorrer o mesmo no extrato hexânico pode ser pelo fato de que essa amostra possui os compostos mais apolares das folhas da *P. myrtoides*, e, por isso, o sinal observado trata-se majoritariamente dos açúcares ali extraídos. Isso pode ser verificado também analisando a intensidade fraca (+) em todos os ensaios positivos realizados com o EH bruto, qualquer que seja o revelador e classes analisadas.

De modo geral, pode-se afirmar que o EH é a amostra mais pobre em metabólitos secundários e a PA é aquela mais rica destes. A partição acetato de etila foi a amostra com o menor rendimento mássico percentual dentre as partições e mesmo assim obteve bons resultados no que diz à identificação de classes de metabólitos secundários.

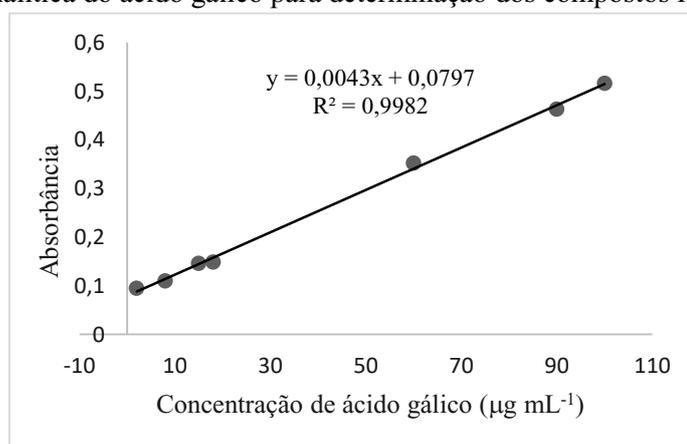
### 4.3. Atividade Antioxidante

Para a análise de atividade antioxidante fez-se necessariamente a quantificação de compostos fenólicos presentes nas amostras de *P. myrtoides*. Em seguida, foram realizados ensaios de atividade antioxidante por três métodos diferentes.

#### 4.3.1. Quantificação de metabólitos secundários

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com a metodologia apresentada em 3.6.1. e a curva de calibração utilizando o ácido gálico está representada na Figura 12, com equação de reta  $y = 0,0043x + 0,0797$  e correlação linear boa ( $R^2 = 0,9982$ ).

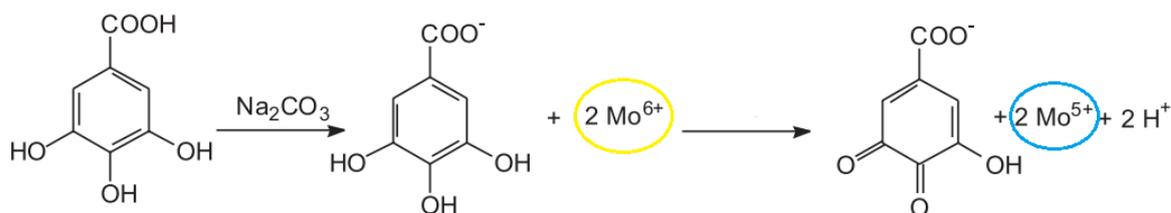
Figura 12 - Curva analítica do ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais



Fonte: a autora

A reação característica entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico estão representadas na Figura 13.

Figura 13 - Reação entre ácido gálico e reagente Folin-Ciocalteu

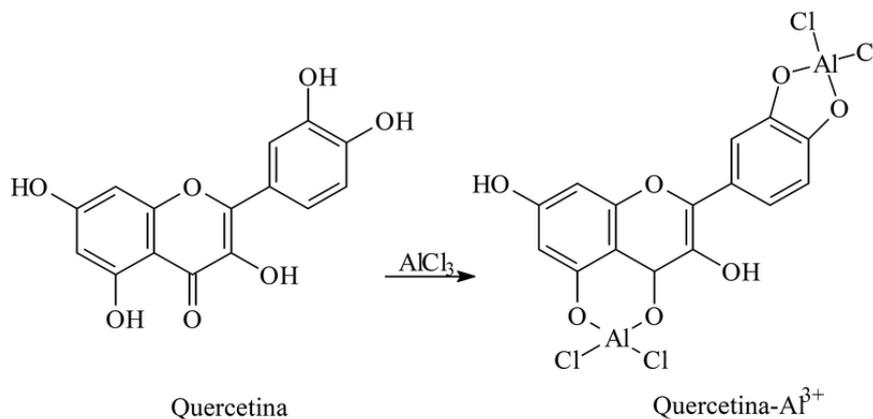


Fonte: a autora, adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2009

O reagente de Folin-Ciocalteu possui em sua composição química o ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e o ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), que possuem coloração amarela (PIRES et al., 2017). A química que acontece nessa reação não é trivial (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), porém, basicamente o que acontece é a sequência de várias reduções e formação de óxidos de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ). E, a adição de um elétron, de forma radicalar, a um orbital não ligado provoca a redução de unidades nominais de cor azul (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Portanto, de modo geral, essa reação trata-se de uma oxirredução em que carbonos com estado de oxidação +1, se torna +2 e, íons  $Mo^{6+}$ , proveniente do RFC, são reduzidos a  $Mo^{5+}$ . A ocorrência da reação é observada pela mudança de cor de amarelo para azul quando há a formação do íon  $Mo^{5+}$ .

A reação que ocorre na quantificação de flavonoides está mostrada na Figura 14. Essa reação consiste na complexação entre o cloreto de alumínio e a quercetina, na qual os átomos de oxigênio faz um ataque nucleofílico ao  $Al^{3+}$ , um ácido de Lewis.

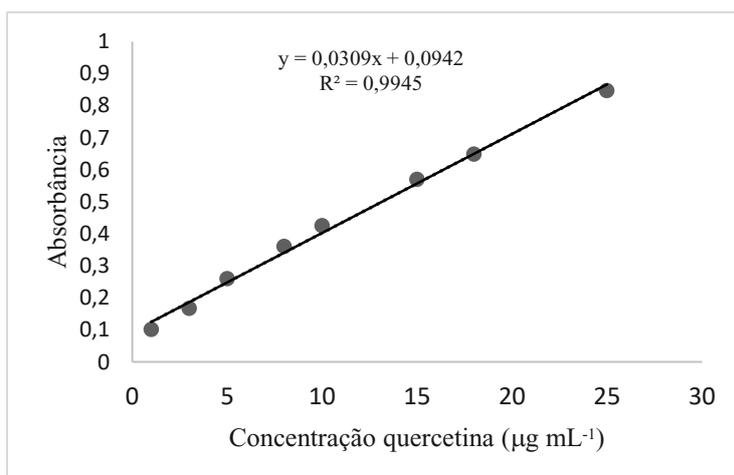
Figura 14 - Esquema representativo da reação de determinação de flavonoides



Fonte: Mabry et al. (1970) apud Peixoto Sobrinho et al. (2012)

A curva de calibração foi realizada utilizando da quercetina como padrão. Ela está representada da Figura 15, com correlação linear de  $R^2 = 0,9945$  e equação de reta  $y = 0,0309x + 0,0942$ .

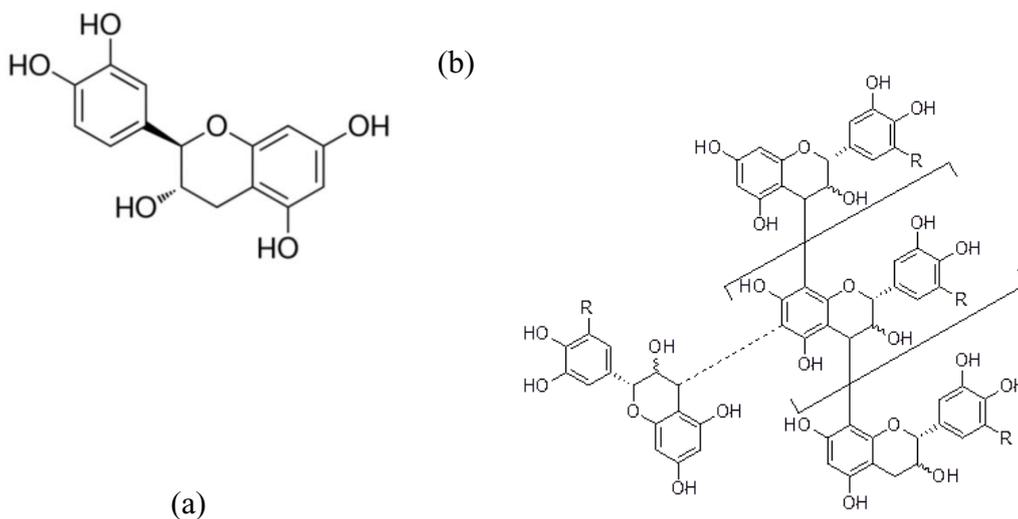
Figura 15 - Curva analítica de quercetina para determinação de flavonoides



Fonte: a autora

Para a determinação dos teores de taninos condensados foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de catequina, uma substância dessa classe de compostos fenólicos (Figura 16).

Figura 16 – (a) estrutura química da Catequina (estrutura básica de um tanino condensado), (b) estrutura modelo de tanino condensado



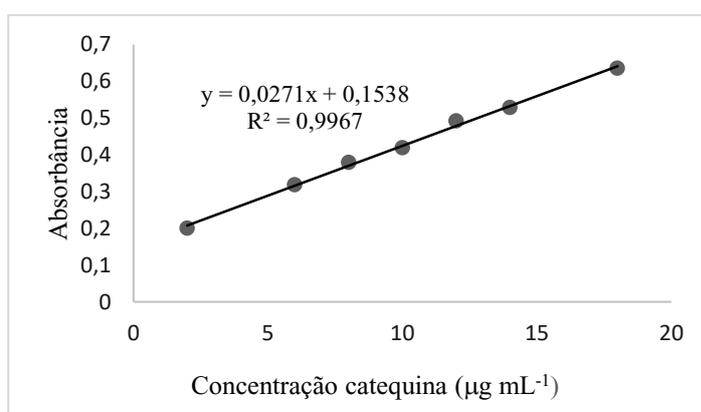
Fontes: (a) Sigma-Aldrich,

(b) a autora, adaptado de Salminen; Karonen;

O método da vanilina é empregado com o objetivo de detectar uma classe mais

limitada de compostos fenólicos que apresentam uma ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A, embora possa detectar tanto flavonoides monoméricos quanto poliméricos. Neste método, tanto as leucoantocianidinas (catequinas) quanto as proantocianidinas (taninos condensados) reagem com a vanilina na presença de  $H_2SO_4$  para produzir um produto de condensação vermelho, que é detectado espectrofotometricamente. A curva está representada na Figura 17 com boa correlação linear de  $R^2 = 0,9967$  e equação de reta  $y = 0,0271x + 0,1538$ .

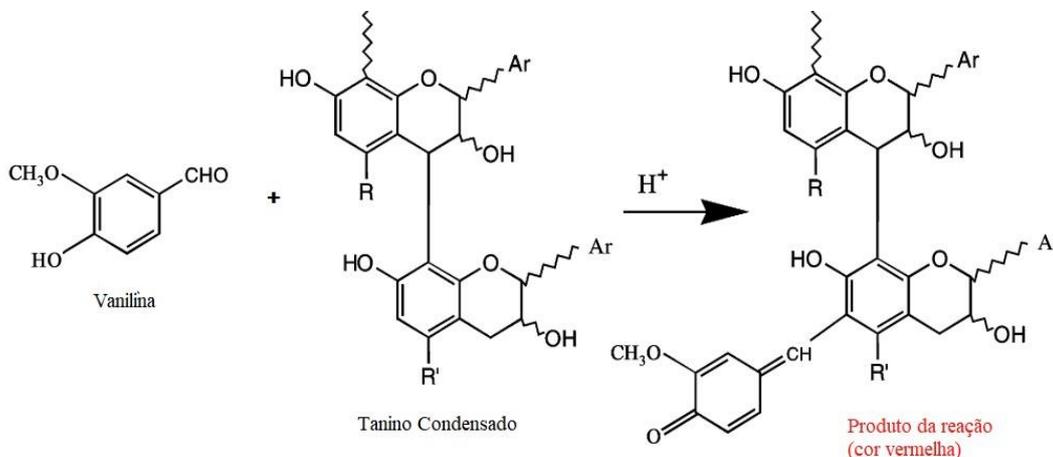
Figura 17 - Curva analítica de catequina para determinação de taninos condensados



Fonte: a autora

A reação entre a vanilina e um composto geral dessa classe está representada na Figura 18, exemplificando o que aconteceu no meio reacional para a determinação desses teores.

Figura 18 - Reação de determinação dos teores de taninos condensados na planta *Psidium myrtiloides*



Fonte: a autora, adaptado de SCHOFIELD, 2001

Os resultados dos teores de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados de cada amostra estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7 - Determinações dos teores de compostos fenólicos e as duas principais classes nas folhas da *Psidium myrtoides*

	<b>Fenóis Totais</b>	<b>Flavonoides</b>	<b>Taninos Condensados</b>
<b>Amostras</b>	<b>mg EAG/g extrato ± Desvio Padrão</b>	<b>mg EQ/g extrato ± Desvio Padrão</b>	<b>mg EC/g extrato ± Desvio Padrão</b>
<b>EH</b>	302,3 ± 29,5	190,2 ± 2,0	1440,6 ± 33,8
<b>EE</b>	643,3 ± 80,1	310,2 ± 20,7	1744,6 ± 103,3
<b>PD</b>	364,1 ± 63,6	366,3 ± 71,0	827,2 ± 53,1
<b>PA</b>	1948,1 ± 53,7	682,3 ± 71,2	547,7 ± 118,1
<b>PAq</b>	605,0 ± 77,3	71,1 ± 5,4	941,3 ± 60,3

EH: Extrato hexânico; EE: Extrato etanólico; PD: partição diclometano; PA: partição acetato de etila; PAq: partição aquoso

Fonte: a autora

Com esses dados, é possível perceber que, comprovando o mapeamento realizado na prospecção fitoquímica, foram encontrados compostos fenólicos em todas as amostras em maior ou menor grau. Entre os extratos, o EE foi aquele que apresentou maior teor dessas substâncias. Isso é explicado pelo fato de que o etanol, sendo um solvente mais polar, extraiu os compostos com as características de polaridade mais acentuadas frente ao hexano. Desse modo, o teor de fenóis totais no EE bruto é mais que o dobro do teor encontrado no EH (solvente apolar).

Seguindo este raciocínio, é possível perceber que, todas elas possuem significativos teores de compostos fenólicos. A PA apresentou maiores taxas de compostos fenólicos totais e de flavonoides. Por outro lado, a PAq é a partição que possui maiores teores de taninos condensados, seguida da PD.

Uma investigação pertinente a ser feita é comparar o perfil dos teores dos metabólitos secundários da espécie estudada ou, pelo menos, do gênero e família da mesma. Isso seria importante para confrontar os resultados dos teores quantificados com a literatura. Há alguns estudos nesse sentido. Entretanto, há diversidades nos

procedimentos de extração e quantificação desses metabólitos e também na amostra biológica utilizada.

Fetter et al. (2010) fizeram os extratos dos frutos de duas espécies do gênero *Psidium*; araçá-amarelo e araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e araçá-pera (*P. acutangulum* D.C.) e determinaram a quantidade de composto fenólicos totais também com a reação com RFC, mas utilizando o ácido clorogênico como padrão. Já Nascimento, Araújo, Melo (2010) trabalharam com os resíduos agroindustriais da goiaba (*Psidium guajava* L.) e os teores de fenólicos totais foram expressos em  $\mu\text{g}$  equivalente de catequina  $\text{mL}^{-1}$  de extrato. Nesse trabalho, os autores utilizaram outros solventes para a extração dos compostos presentes nos resíduos (acetona, metanol, etanol e água). Carvalho Junior et.al. (2014) também quantificaram os teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides nas folhas e nos galhos da *Eugenia copacabanensis* Kiaersk, da família Myrtaceae. Os resultados encontrados nesses estudos citados estão expostos na Tabela 8, a seguir.

Tabela 8 - Resultados comparativos da literatura para quantificação de compostos fenólicos

Referência	Material utilizado	Planta Utilizada	Extrato	Resultados	Unidade
(FETTER et al., 2010)	Frutos	A	Metanólico	294,51	$\text{mg EACg}$ $100\text{g}^{-1}$ amostra fresca
		B		668,63	
		C		1851,38	
(NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010)	Resíduo agro-industrial	D	Hidroacetônica	5317,27	$\mu\text{g em EC mL}^{-1}$ de extrato
			Hidrometanólico	2176,46	
			Hidroetanólico	514,23	
			Aquoso	498,8	
(CARVALHO JUNIOR et al., 2014)	Folhas	E	EMf	375,49	$\text{mg EAG g}^{-1}$ folhas
			FH	58,28	
			FD	118,99	
			FB	855,76	
	Galhos		EMg	779,90	$\text{mg EAG g}^{-1}$ galhos
			FD	635,19	
			FAE	970,32	
			FB	845,57	

A: Araçá-amarelo (*P. cattleianum* Sabine); B: Araçá-vermelho (*P. cattleianum* Sabine); C: Araçá-pera (*P. acutangulum* D.C.); D: *Psidium guajava* L.; E: *Eugenia copacabanensis*; EM: extrato metanólico; EACg: equivalente de ácido clorogênico; EC: equivalente de catequina; EMf: extrato metanólico das folhas; FH: fração hexânica; FD: fração diclorometano; FB: fração n-butanol; EMg: extrato metanólico nos galhos; FAE: fração acetato de etila; EAG: equivalente de ácido gálico

Fonte: a autora

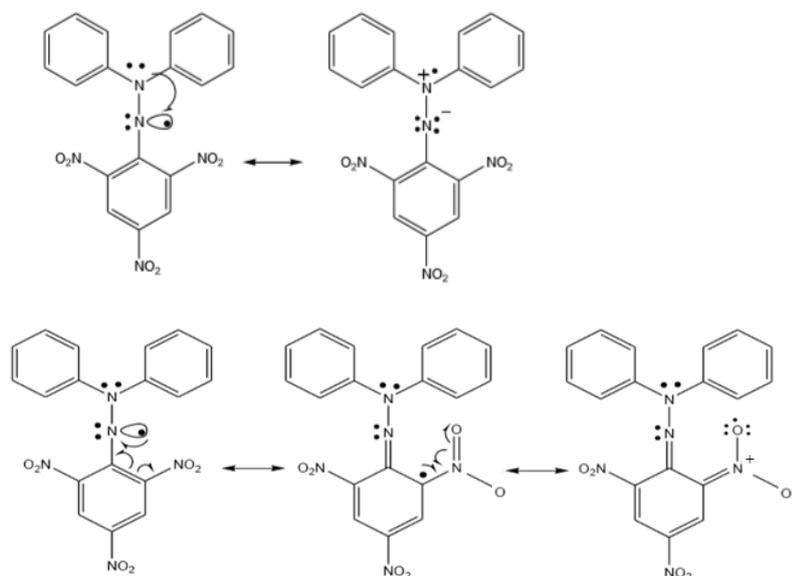
A partir destes resultados, observa-se que os resultados dos teores de compostos fenólicos das folhas de *P. myrtoides*, do presente trabalho, são superiores, de forma geral, aos teores das folhas de *Eugenia copacabanesis*, bem como dos demais materiais mostrados na Tabela 8. Esse mesmo perfil é observado nos teores de flavonoides quantificados por Carvalho Junior et al. (2014).

### 4.3.2. Determinação da atividade antioxidante

#### 4.3.2.1. Método do sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup>

O radical livre DPPH<sup>•</sup> é um radical estável, que pode se estabilizar fazendo conjugação com os átomos de nitrogênio e também por meio da ressonância com os anéis aromáticos da sua estrutura. Na Figura 19 é mostrada as possíveis estabilizações do radical DPPH.

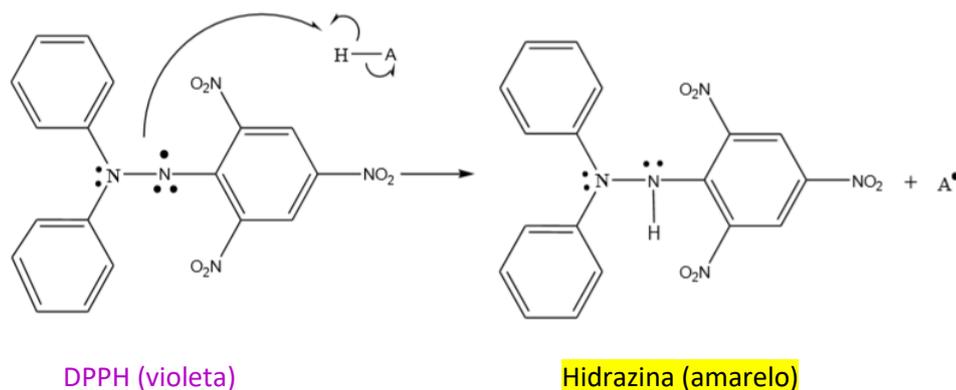
Figura 19 – Estruturas de ressonância do radical DPPH<sup>•</sup>



Fonte: adaptado de Oliveira (2015) apud (NUNES, 2016)

A reação que ocorre no método do sequestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> pode se dar de duas formas, seja pela transferência de elétron ou pela transferência de H. Quando há a transferência de um átomo de hidrogênio, a solução de DPPH<sup>•</sup> de cor violeta escuro reage na presença de uma substância antioxidante resultando na hidrazina (DPPH-H) de cor amarela. Na Figura 20, mostra-se uma reação geral do que ocorre nesse ensaio.

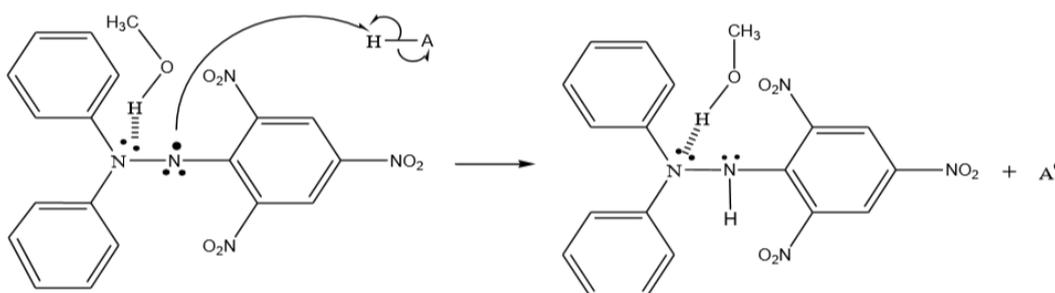
Figura 20 - Reação geral do método do sequestro do radical DPPH



Fonte: adaptado de Oliveira (2015) apud (NUNES, 2016)

Ao que diz respeito a solução de DPPH<sup>•</sup>, nesse experimento foi utilizada a solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> e, isso é mostrado como vantagem na revisão de Oliveira (2015), isso porque há uma interação com o hidrogênio do álcool e o nitrogênio entre os anéis aromáticos (Figura 21), deixando a carga eletrônica do radical mais concentrada no outro átomo de nitrogênio apenas aumentando a reatividade do radical.

Figura 21 – Interações do radical livre DPPH<sup>•</sup> com o solvente metanol e com moléculas antioxidante



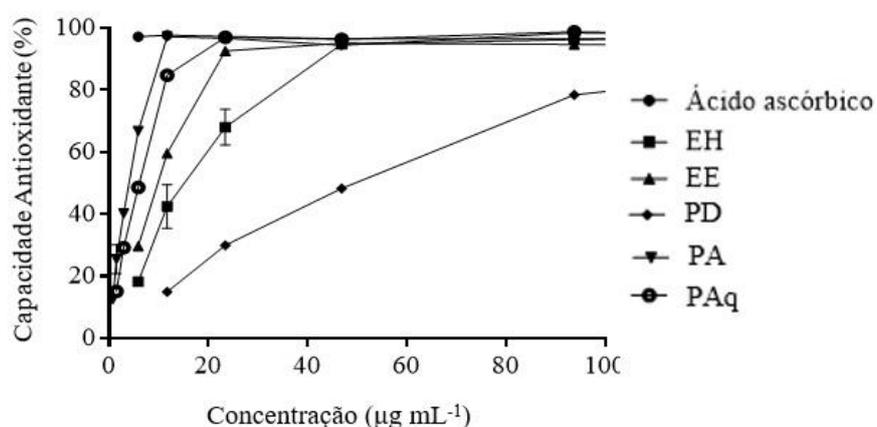
Fonte: adaptado de Oliveira (2015) apud (NUNES, 2016)

O método do sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> é bastante empregado para a análise da capacidade antioxidante de compostos porque não é necessária a geração de espécies radicalares, é bastante sensível, preciso, rápido e simples. Esse método foi desenvolvido por Blois em 1958 e modificado em 1995 por Brand-Williams; Cuvelier; Berset, os

quais implementaram o termo concentração eficaz ou efetiva ( $CE_{50}$ ), ou seja, a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de  $DPPH^{\bullet}$ .

Os valores de  $CE_{50}$  de cada amostra estão mostrados na Tabela 9. As análises mostraram que tanto o extrato quanto as partições, apresentaram índices muito bons de concentrações efetivas ( $CE_{50}$ ). Na Figura 22, podem-se observar, graficamente, também os resultados das análises.

Figura 22 - Representação gráfica dos resultados de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical  $DPPH^{\bullet}$



Fonte: a autora

Tabela 9 – Resultados de  $CE_{50}$  pelo método de sequestro do radical  $DPPH^{\bullet}$

Amostras	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Grau de atividade antioxidante*
Ácido ascórbico (controle positivo)	$0,03 \pm 0,02$	–
EH	$15,63 \pm 2,99$	Elevada
EE	$8,26 \pm 1,76$	Elevada
PD	$61,02 \pm 8,69$	Moderada
PA	$3,45 \pm 0,48$	Elevada
PAq	$5,45 \pm 0,81$	Elevada

Fonte: a autora; \* Reynertson, Basile e Nennely (2005).

Nesse experimento foi possível determinar que a amostra com maior capacidade antioxidante se trata da PA, já que a  $CE_{50}$  para sequestrar radicais  $DPPH^{\bullet}$  foi a menor

(3,45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguida da PAq e EE, significando que com pouca quantidade de extrato de *P. myrtooides* é possível ter ação antioxidante intensa. Isso pode ser explicado pela possível presença de maior quantidade de substâncias redutoras nessas amostras (carotenoides, compostos fenólicos, vitaminas A, C e E, por exemplo) e assim, os radicais livres as oxidam.

Os resultados também indicam que, aumentando a polaridade do solvente, o potencial antioxidante do extrato/partição também aumenta. Tanto o extrato etanólico quanto as partições mais polares (acetato de etila, e o resíduo metanol-água) apresentaram valores elevados  $\text{CE}_{50}$  para a folha de *P. myrtooides*. A partição em diclorometano foi a que apresentou menor atividade antioxidante, ainda que em grau moderado. Segundo Reynertson, Basile e Nennely (2005), a intensidade da atividade antioxidante pode ser correlacionada com o valor obtido de  $\text{CE}_{50}$ , de acordo com o mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Correlação da AA e concentração efetiva pelo método de DPPH\*

$\text{CE}_{50}$ DPPH ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Intensidade da AA
< 50	Elevada
50 -100	Moderada
100 - 200	Baixa
> 200	Inativa

AA: atividade antioxidante

Fonte: a autora, adaptado de Reynertson, Basile e Nennely (2005)

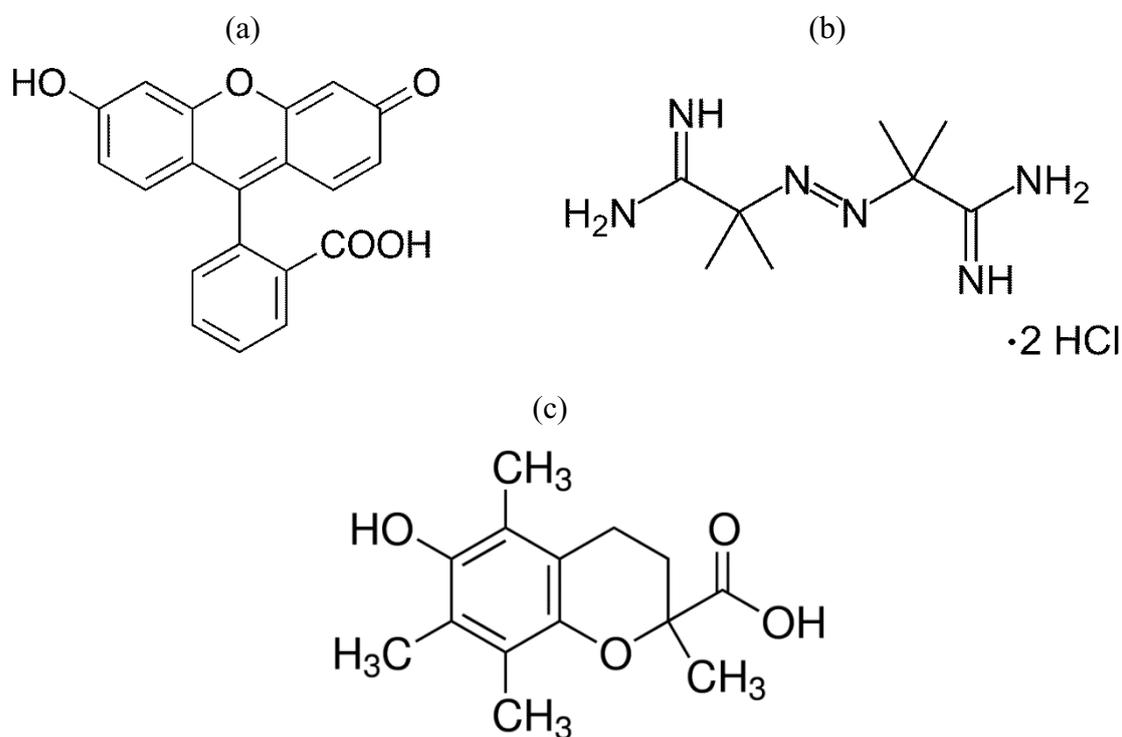
Dessa forma, com exceção da PD todas as amostras obtiveram AA elevada. O extrato hexânico (apolar) também apresentou elevada atividade antioxidante pelo método do sequestro de radicais DPPH\*, em concordância com o teor de fenóis totais encontrado neste extrato.

#### 4.3.2.2. Método de Capacidade Antioxidante de Radicais Oxigenados (do inglês “Oxygen Radical Absorbance Capacity”,- ORAC)

O método ORAC analisa a capacidade antioxidante desconhecida de determinada substância. Este ensaio usa a molécula de fluoresceína (Figura 23-a) como

uma sonda fluorescente, isso porque seu sinal de fluorescência diminui na presença de oxidantes. Então, é utilizado um gerador de espécies reativas de oxigênio (ERO), o AAPH (Figura 23, b), que após sua decomposição térmica produz radicais livres peróxil ( $\text{ROO}\cdot$ ). A adição de um antioxidante faz com que haja a absorção das EROs que foram geradas e, com isso o sinal de fluorescência da sonda não decaia. O antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Figura 23, c), é utilizado como padrão para a determinação da capacidade antioxidante das amostras.

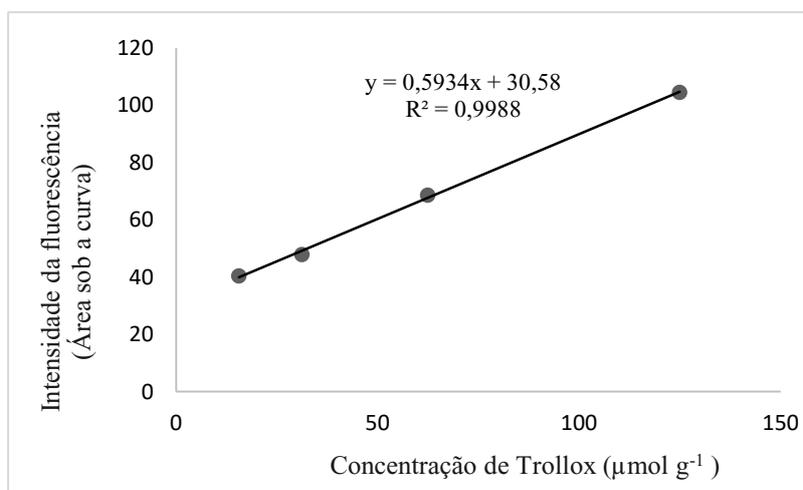
Figura 23 - Fórmulas estruturais (a) Fluoresceína; (b) AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobi-2-metilpropionamida); (c) Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)



Fonte: NIST - National Institute of Standards and Technology

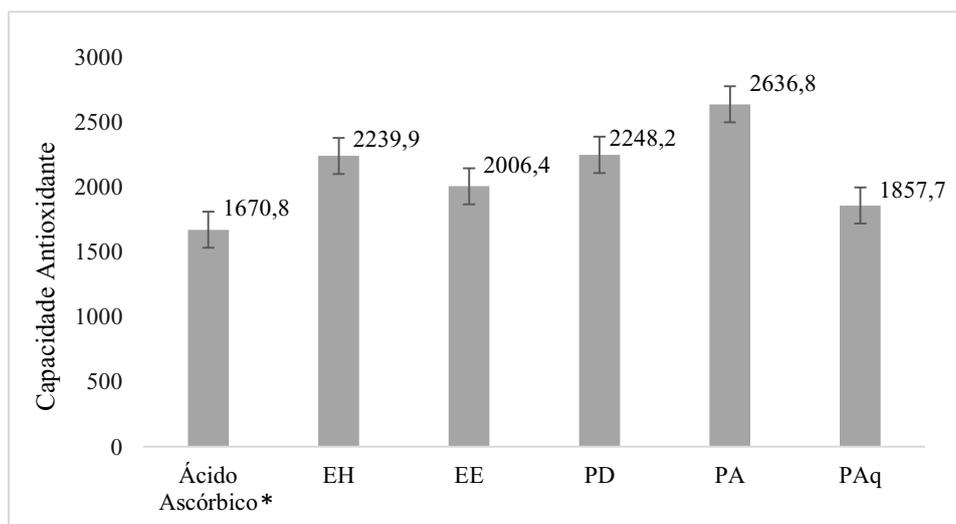
A curva analítica construída com o Trolox está representada na Figura 24 e, os resultados estão na Figura 25, a seguir.

Figura 24 - Curva de calibração de Trolox para determinação da Capacidade antioxidante dos extratos e partições da *P. myrtooides* pelo método ORAC



Fonte: a autora

Figura 25 - Resultados da Capacidade Antioxidante pelo método ORAC



(\*) Ácido Ascórbico: controle positivo

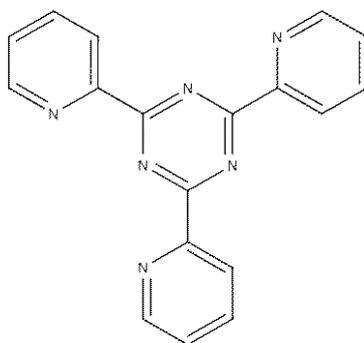
Fonte: a autora

Analisando os resultados apresentados anteriormente, observa-se que todas as amostras obtiveram capacidade antioxidante maior que o próprio controle positivo, realizado pelo ácido ascórbico. Sendo assim, demonstra-se que os extratos e partições da *P. myrtooides* são materiais bastante antioxidantes. Os extratos etanólico e aquoso poderiam ser formulados e investigados farmacologicamente para uso humano.

### 4.3.2.3. Método do Poder Antioxidante da Redução Férrica (do inglês “Ferric Reducing – Antioxidant Power”, FRAP)

O método de FRAP baseia-se na medida da capacidade de redução do íon ferro da forma férrica para a ferrosa ( $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , respectivamente), quelado com a molécula 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Figura 26), formando o complexo TPTZ- $\text{Fe}^{+2}$ . Esse complexo, quando formado, desenvolve uma coloração azul bem intensa, com máxima absorção em 593 nm.

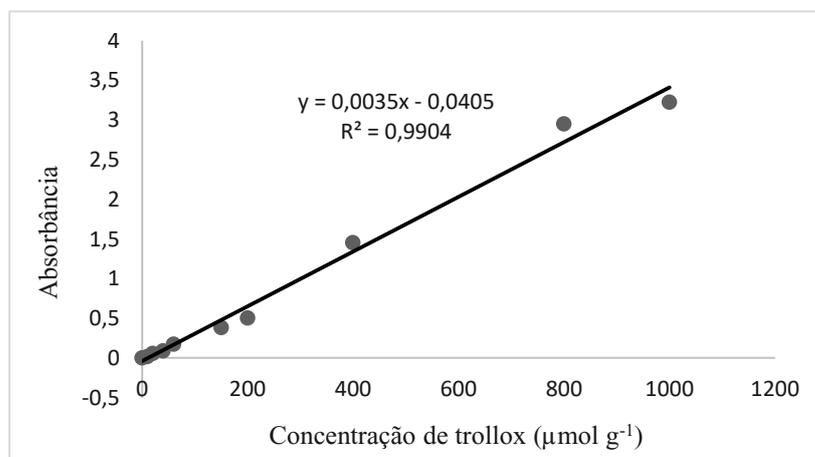
Figura 26 – Molécula de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina)



Fonte: a autora

Para a quantificação da capacidade antioxidante pelo método de FRAP, faz a construção de uma curva de calibração em que o padrão de antioxidante é o Trolox. Essa curva está representada na Figura 27 ótima correlação linear ( $R^2 = 0,9904$ ).

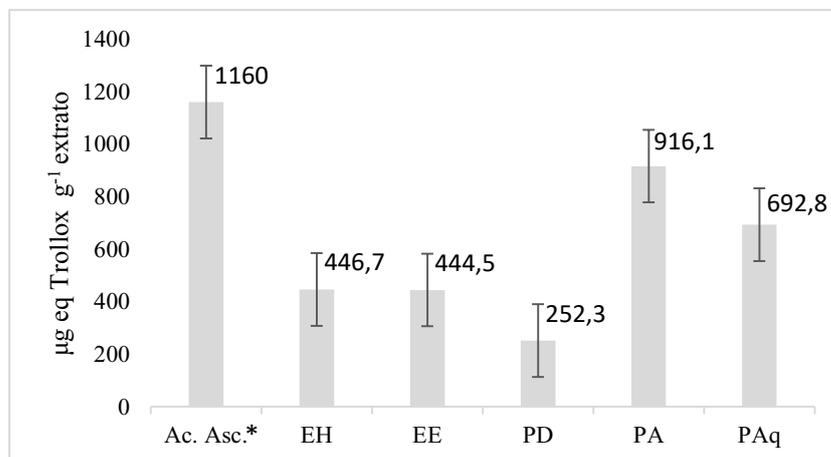
Figura 27 -Curva analítica de Trolox para determinação da atividade antioxidante pelo método de FRAP



Fonte: a autora

Após a realização dos testes, a capacidade antioxidante de cada amostra pôde ser quantificada e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g eq Trollox g}^{-1}$  extrato (Figura 28).

Figura 28 - Resultados da atividade antioxidante de cada amostra pelo método FRAP



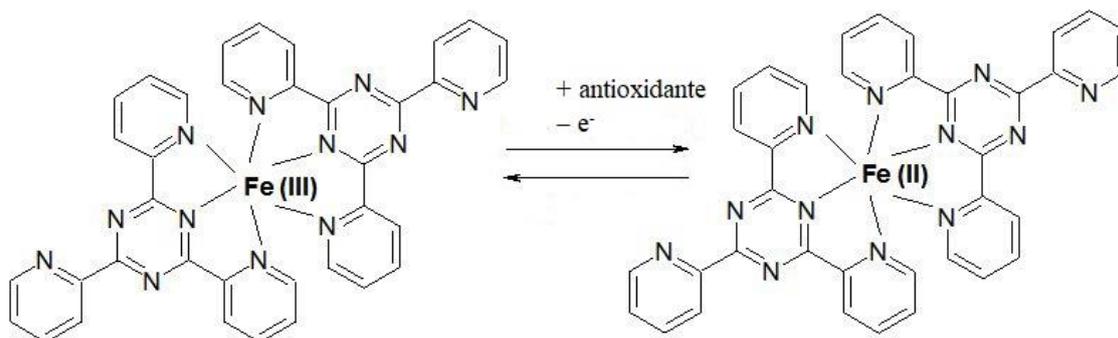
(\*) Ac. Asc.: Controle positivo de ácido ascórbico

Fonte: a autora

Nesse método, a amostra da partição acetato de etila também foi a amostra com maior atividade antioxidante, inclusive chegando próximo do valor da concentração ( $\mu\text{g eq Trollox g}^{-1}$  extrato) requerida pelo ácido ascórbico (controle positivo). Em seguida a amostra com maior atividade antioxidante é a PAq e isso pode ser explicado pela polaridade dos compostos presentes (compostos fenólicos) solubilizados nessas amostras polares.

Nesse ensaio, inicialmente as moléculas de TPTZ se quelam ao íon férrico formando o complexo férrico, o reagente de FRAP a esquerda na Figura 28. E então, o poder antioxidante das amostras é medido pela capacidade em que ele tem de se reduzir o íon à  $\text{Fe}^{2+}$ . Essa reação está representada na Figura 29.

Figura 29 - Reação do complexo TPTZ- $\text{Fe}^{3+}$  com compostos antioxidantes



Fonte: RESEARCHGATE, 2019

## 5. CONCLUSÕES

Algumas classes de metabólitos especiais (fenóis, flavonoides, terpenos, esteroides e açúcares, por exemplo) foram identificadas nos extratos e partições das folhas de *P. myrtooides* pela prospecção fitoquímica. A partição acetato foi aquela que apresentou maiores teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides, seguida da partição aquosa.

Nos testes para quantificação da capacidade antioxidante, a partição acetato de etila apresentou os melhores resultados dentre todas as amostras nos testes do sequestro do radical DPPH e também no método FRAP. No ensaio do método de ORAC, as partições acetato de etila e diclorometano foram aquelas com os melhores resultados.

Os resultados da atividade antioxidante das folhas de *P. myrtooides* são promissores e merecem uma maior investigação química e farmacológica, para melhor aproveitamento desta planta do Cerrado para uso humano.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse trabalho pode ser continuado em algumas frentes de estudo, por exemplo:

- Separação e isolamento dos compostos extraídos nessas amostras, usando cromatografia de coluna para realizar o fracionamento das partições e cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas (CG-EM) para realizar a separação e identificação das espécies;
- Caracterização dos compostos utilizando-se de técnicas com ressonância magnética nuclear (RMN);
- Avaliação da atividade dos compostos isolados com interesse em saber se as atividades antioxidantes e antimicrobianas possuem efeito sinérgico ou se trata apenas de um ou alguns compostos presentes ali em maiores concentrações
- Caracterização dos compostos presentes no extrato e frações por CLAE-EM

## REFERÊNCIAS

ACCUWEATHER. Disponível em:

<<https://www.accuweather.com/pt/br/uberlandia/33809/march-weather/33809>>. Acesso em: 23 Ago 2018

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

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2005.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIERHALS, V. DA S. et al. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 42–48, 2009.

BLADT, S.; WAGNER, H. **Plan Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. [s.l: s.n.].

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biomass: Cerrado**. Brasília, DF: MMA, 2018. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomass/cerrado>. Acesso em: 20 Ago 2018

BRASIL. [Constituição (1988)]. **Constituição da República Federativa do Brasil** : texto constitucional promulgado em 5 de outubro de 1988, com as alterações determinadas pelas Emendas Constitucionais de Revisão nos 1 a 6/94, pelas Emendas Constitucionais nos 1/92 a 91/2016 e pelo Decreto Legislativo no 186/2008. – Brasília: Senado Federal, Coordenação de Edições Técnicas, 2016.

BUSSNELI, G., BASSOLI, A. BORGONOVO, G. Alkaloids and the Bitter Taste. *In*: FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (ed.). **Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology**. [S.l.]: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. Cap. 3.

CARVALHO JUNIOR, A. R. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 477–482, 2014.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. p. 1250–1318, 2000.

CRUZ, A. V. DE M.; KAPLAN, M. A. C. Uso Medicinal de Espécies das Famílias Myrtaceae e Metastomaceae. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2004.

- DAMIANI, C. et al. Characterization of fruits from the savanna : Araça ( *Psidium guinnessis* Sw .) and. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 723–729, 2011.
- DE OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, SP. V. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.
- DELGODA, R.; MURRAY, J. E. **Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites**. [S.l.] Elsevier, 2017.
- DEWICK, P. M. **A Biosynthetic Approach**. [S.l.: s.n.]. V. 0471496405
- DIAS, R. F. C. **Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da *Psidium myrtiloides* O . Berg ( Araçá-roxo )**, Dissertação de Mestrado. Uberlândia, MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2019.
- DURÃES, E. R. B.; PAULA, J. A. M. DE; NAVES, P. L. F. Gênero *Psidium* : Aspectos Botânicos , Composição Química e Potencial Farmacológico. **Revista Processos Químicos**, p. 33–40, 2015.
- FETTER, M. DA R. et al. Propriedades funcionais de araçá-amarelo, araçá-vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e araçá-pera (*P. acutangulum* D.C.) cultivados em Pelotas/RS. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. EE01, p. 92–95, 2010.
- FRANZON, R. C. et al. **Araçás do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**, p. 48, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2009.
- GIADA, M. DE L. R. Food Phenolic Compounds: Main Classes , Sources and Their Antioxidant Power *In: Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. [S.l.] 2013. dx.doi.org/10.5772/51687
- GIULIETTI, A N. A M.; HARLEY, R. M. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52–61, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS Leonardo Gobbo-Neto e Norberto P. Lopes\*. **Química Nova**, São Paulo, SP. V. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 1–27, 2008.
- INSTITUTO SOCIEDADE, POPULAÇÃO E NATUREZA. **Biomás: Cerrado**. Brasília, DF: ISPN, 2019. Disponível em: <https://ispn.org.br/biomás/cerrado/>. Acesso em: 10 Out 2019
- MACHADO, L. P. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84–94, 2009.

- MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. ... **International do Brasil**, p. 1–23, 2004.
- MASCARENHAS, L. M. D. A. A TUTELA LEGAL DO BIOMA CERRADO. **Revista UFG**, v. ANO XII, n. N° 9, p. 19–25, 2010.
- MEDEIROS, F. C. M. et al. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 4, p. 289–292, 2015.
- MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, Londres, Reino Unido. V. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.
- MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da Química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, SP. V. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.
- MORAIS, S. A. L. DE et al. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. SUPPL., p. 198–207, 2008.
- MOREIRA, F. A.. **Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae)**. Tese de Doutorado. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo.. p. 93, 2015.
- NASCIMENTO, R. J. DO; ARAÚJO, C. R. DE; MELO, E. DE A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alim. Nutr.**, v. 21, p. 209–216, 2010.
- NASCIMENTO, L. M. F. M. G. M. DA C. J. DE M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica E Distribuição Geográfica De Uma Coleção Botânica. **Agrarian Academy**. Goiânia, GO: Centro Científico Conhecer. V.1, n.02; p. 125–140, 2014. p. 125–140, 2014.
- NUNES, B. C. **Prospecção química e avaliação biológica de *Banisteriopsis laevifolia* (Malpighiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Uberlândia, MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2016.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170–179, 2012.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 586–591, 2012.
- PEREIRA, E. DOS S. et al. *Psidium cattleianum* fruits: A review on its composition and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 258, p. 95–103, 2018.

PIRES, J. S. et al. **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas**. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo. P. 1–5, 2017.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.

REFLORA. **Psidium**: Flora do Brasil 2020 em construção. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2019. Disponível em: <http://reflorahmlg.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10874>. Acesso em: 30 Out 2019

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

SALMINEN, J.P.; KARONEN, M , SINKKONEN, J. Chemical Ecology of Tannins: Recent Developments in Tannin Chemistry Reveal New Structures and Structure – Activity Patterns. **Chemistry A European Journal**. DOI: 10.1002/chem.201002662.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins : a review. v. 91, p. 21–40, 2001.

SELEEM, D.; PARDI, V.; MURATA, R. M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 76, p. 76–83, 2017.

SIGMA-ALDRICH. **Catequina**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/43412?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 30 Out 2019.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. **Psidium myrtoides**: Ficha de Espécies. Brasília, DF: SiBBr, 2019. Disponível em: [https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/psidium\\_myrtoides](https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/psidium_myrtoides). Acesso em 28 Out 2019.

SOARES, E. D. R. et al. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. 3, p. 64–72, 2015.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis Totais e Atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, SP. V. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. **Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control**. [S.l.]. 1998. DOI:

10.1080/00218839.1998.11100961

YIĞIT, D.; YIĞIT, N.; MAVI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 4, p. 346–352, 2009.

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