

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

THAIS OLIVEIRA SILVA VELOSO

**COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, ANTOCIANINAS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS DE *Croton antisiphiliticus* Mart (PÉ-DE-
PERDIZ) PRODUZIDOS POR MACERAÇÃO DINÂMICA E ULTRASSOM**

PATOS DE MINAS
SETEMBRO 2020

THAIS OLIVEIRA SILVA VELOSO

**COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES, ANTOCIANINAS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS DE *Croton antisiphiliticus* Mart (PÉ-DE-
PERDIZ) PRODUZIDOS POR MACERAÇÃO DINÂMICA E ULTRASSOM**

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

Prof^ª. Dra. Enyara Rezende Moraes.

PATOS DE MINAS

SETEMBRO 2020

THAIS OLIVEIRA SILVA VELOSO

Compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e atividade antioxidante de extratos brutos de *Croton antisiphiliticus* Mart (pé-de-perdiz) produzidos por maceração dinâmica e ultrassom

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

Banca examinadora:



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



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



Me. Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz – PPGGB - UFU
Membro

Patos de Minas-MG, 28 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva de concluir mais uma etapa tão importante e sonhada da minha vida.

Aos meus pais José Adão e Dália, por ter sonhado comigo, investindo incansavelmente em minha educação me incentivado a ir sempre além. Amo vocês!

Aos meus irmãos Edvan e Edilene por todo incentivo, compreendendo sempre as minhas ausências e me animando sempre.

Ao meu amor Deivison por tudo! Pela paciência, dedicação, incentivo, correções e por viver comigo intensamente todas as alegrias e dificuldades dessa jornada.

A Profa Dra Enyara Rezende Moraes obrigada por aceitar conduzir esse trabalho que com seu jeito espontâneo me ensinou tanto. Obrigada pela paciência, dedicação e amizade. Você é exemplar!

Ao Prof Dr Marcos de Souza Gomes obrigada por passar tanto conhecimento e colaborar com esse trabalho.

À Profa Dra Terezinha Aparecida Teixeira pela ajuda com material para que fosse possível a realização deste trabalho e pelas conversas que me ajudou muito emocionalmente.

Aos meus colegas e amigos, Michelle, Thaillyne, Higor Donizete e Thais, que me socorreram por diversas vezes durante a difícil trajetória de trabalhar e estudar.

Aos meus colegas de curso Thalia e Gabriel por toda a ajuda durante os experimentos.

Aos técnicos do laboratório, LBBM, que com toda paciência me auxiliou por muitas vezes.

À todos os amigos, familiares, colegas e professores que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão dessa jornada.

Minha eterna gratidão a todos!

RESUMO

As plantas do gênero *Croton* destacam-se por sua riqueza e diversidade em metabolitos secundários, sendo alvo de muitos estudos. A planta *Croton antisiphiliticus* Mart (Pé-de-perdiz), na medicina é usada popularmente para o tratamento de algumas doenças sexualmente transmissíveis e de infecções do sistema reprodutor feminino e masculino. Sabendo que o potencial terapêutico de uma planta pode estar relacionado à presença de metabolitos secundários, o presente trabalho visou quantificar o conteúdo de metabolitos secundários tais como flavonoides, antocianinas, e compostos fenólicos totais, além da atividade antioxidante, no extrato bruto obtido tanto pela extração em banho ultrassônico, quanto por maceração dinâmica da planta *C. antisiphiliticus* Mart oriunda de duas localidades distintas. O método de extração por maceração dinâmica apresentou resultados estatisticamente significativos sendo mais eficiente que o método de banho ultrassônico. Embora houve oscilação das médias para as duas localidades diferentes, estatisticamente não houve interferência nos resultados considerando o local de coleta. A planta *C. antisiphiliticus* Mart apresentou teor de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas em seu extrato bruto e também demonstrou ter capacidade antioxidante em todas as partes analisadas. Durante todo o trabalho o extrato bruto das folhas demonstrou-se mais promissor do que as outras partes e em sua maioria os extratos obtido pelo processo de maceração dinâmica obteve médias maiores. . Desta forma, diante de todas as análises realizadas, sugere-se que a planta medicinal *C. antisiphiliticus* Mart deva continuar a ser investigada para uma futura utilização para obtenção de novos fármacos e também ser utilizada na indústria alimentícia devido ao seu potencial antioxidante.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Medicina tradicional. Bioprospecção. Farmacognosia.

ABSTRACT

Plants of the genus *Croton* stand out for their richness and diversity in secondary metabolites being the target of many studies. The *Croton antisiphiliticus* Mart (Pé-de-perdiz) plant, in medicine, is popularly used for the treatment of some sexually transmitted diseases and infections of the female and male reproductive system. Knowing that the therapeutic potential of a plant may be related to the presence of secondary metabolites, the present work aimed to quantify the content of secondary metabolites such as flavonoids, anthocyanins, and total phenolic compounds, in addition to the antioxidant activity, in the crude extract obtained by both extraction in ultrasonic bath, or by dynamic maceration of the *C. antisiphiliticus* Mart plant from two different locations. The method of extraction by dynamic maceration showed statistically significant results, being more efficient than the ultrasonic bath method. Although the means fluctuated for the two different locations, there was no statistical interference in the results considering the collection site. The *C. antisiphiliticus* Mart plant had a content of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins in its crude extract and also demonstrated to have antioxidant capacity in all parts analyzed. Throughout the work, the raw extract of the leaves showed to be more promising than the other parts and in its majority the extracts obtained by the process of dynamic maceration obtained greater averages. . Thus, in view of all the analyzes carried out, it is suggested that the medicinal plant *C. antisiphiliticus* Mart should continue to be investigated for future use to obtain new drugs and also be used in the food industry due to its antioxidant potential.

Keywords: Medicinal plants. Traditional medicine. Bioprospecting. Pharmacognosy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	12
Objetivo geral	12
Objetivos específicos	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Obtenção dos materiais vegetais.....	12
2.2 Preparação dos extratos metanólicos	13
2.3 Método DPPH.....	14
2.4 Determinação do teor dos fenólicos totais	14
2.5 Determinação do teor das antocianinas e flavonoides totais	15
2.6 Análise Estatística.....	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1 Atividade antioxidante.....	17
3.2 Compostos Fenólicos Totais	22
3.3 Flavonoides totais	27
3.4 Antocianinas totais.....	30
4 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia, que é a utilização das plantas para prevenção e cura de doenças é uma prática antiga da medicina popular. Segundo Cardoso e Amaral (2019), desde a sua origem, a humanidade tem buscado nas plantas a cura de diversas doenças. Ainda hoje, apesar da grande variedade de medicamentos disponíveis, a fitoterapia permanece bastante popular em todo o mundo e tem tido a sua demanda aumentada em muitas regiões.

O aumento da popularidade da fitoterapia nos diferentes estratos da população mundial é, em muitos casos, encorajado pela crença popular de que as preparações fitoterapêuticas são de origem natural e, portanto, são mais seguras e menos tóxicas (CARDOSO; AMARAL, 2019). No entanto, o caráter "natural" de tais produtos não é garantia da isenção de reações adversas e outros problemas decorrentes de tal prática (LANINI *et al.*, 2009), dependendo da dose administrada o efeito deixa de ser terapêutico e passa a ser tóxico (REZENDE *et al.*, 2016).

Nas plantas existe um conjunto de reações químicas que ocorrem constantemente dentro das células denominado metabolismo. Todos os vegetais possuem um metabolismo geral, que é chamado metabolismo primário. Ele é responsável pela produção dos componentes essenciais para o funcionamento e sobrevivência do organismo (WINK, 2015). Enquanto isso, o metabolismo secundário atua na produção de compostos que são os chamados princípios ativos vegetais, graças às substâncias ativas com atividade farmacológica. Esses compostos apresentam valor comercial, tanto para a indústria farmacêutica, como para a indústria alimentar (REZENDE *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2010). Eles têm origem no processo de conversão da energia luminosa em energia química, permitindo que a planta responda aos diferentes fatores ambientais, físicos e biológicos, possibilitando-a comunicar e interagir com diferentes organismos aumentando a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, devido à diversidade de atividades biológicas como, por exemplo, atuando como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos (ALMEIDA, 2017). Os compostos secundários de plantas são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética (HARBONE, 1999).

Embora os produtos secundários possuam uma variedade de funções nos vegetais, é provável que a sua importância ecológica tenha alguma relação com potencial efeito medicinal para os seres humanos (VIZZOTTO *et al.*, 2010). Essas moléculas podem ser divididas em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e componentes que contêm nitrogênio (SIMÕES *et al.*, 2007; VIZZOTTO *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e quimicamente são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais (ANGELO, 2007; MALACRIDA; MOTTA, 2005). Dentre as suas subclasses, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos (LUTHRIA, 2006).

Os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é notável por suas diversificadas ações biológicas, dentre elas a capacidade de agir sobre a inflamação e sobre o sistema imunológico, o que lhes confere um enorme potencial farmacológico (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Outro importante composto fenólico dentro da classe dos flavonoides são as antocianinas, um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. São responsáveis por atribuir uma diversidade de cores nos vegetais, frutos, flores e raízes que variam do vermelho ao violeta e azul (LIMA *et al.*, 2002). Possuem diversas funções demonstradas nas plantas, como atividade antioxidante, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica (LOPES *et al.*, 2007).

Foi demonstrado que compostos fenólicos de origem vegetal, tais como, flavonoides, antocianinas e terpenos agem como antioxidantes inibindo e/ou reduzindo os efeitos dos radicais livres. Esses compostos secundários podem ser oxidados no lugar de componentes importantes para a célula, prevenindo assim o dano celular (MARKS *et al.*, 2007). Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (ANGELO, 2007).

Esses metabólitos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação (BRANDWILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Portanto, os compostos antioxidantes são de grande interesse para a indústria farmacêutica e alimentícia, pela sua capacidade de preservar alimentos e cosméticos através do retardamento da deterioração decorrentes da autoxidação por isso, muitos estudos são desenvolvidos a fim de encontrar essas substâncias em espécies vegetais (VANDAMME; REVUELTA, 2016).

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o Cerrado, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo infecções fúngicas e bacterianas (DUARTE, 2006). O bioma Cerrado tem extensão aproximada de 2.036.448 quilômetros quadrados e detém 5% da biodiversidade do planeta (BRASIL, 2009; MINISTÉRIO DO MEIO

AMBIENTE, 2012). Abrange aproximadamente 22% do território nacional, apresentando-se como o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado apenas pela Amazônia. É considerada a savana mais rica do mundo, abrigando mais de 11.000 espécies vegetais, das quais 4.400 são endêmicas (MEDEIROS, 2011), porém um dos biomas mais ameaçados do país (BRASIL, 2009; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Um exemplo de planta medicinal do Cerrado é a *Croton antisiphiliticus* Mart, representada na **Figura 1**.

FIGURA 1 – Fotografia da planta *Croton antisiphiliticus* Mart



Fonte: Disponível em <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/15724085687/in/photostream/>

Esta espécie é pertencente à família Euphorbiaceae e é popularmente conhecida como Pé de Perdiz, Alcanforeira ou Curraleira (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Há diversos relatos de uso na medicina popular da *C. antisiphiliticus* Mart através do preparo de chás,

garrafadas das folhas e raízes (extrato hidroalcoólico) para tratamento de cólicas, reumatismos, contra sífilis, fungos, úlceras e inflamações, em especial das vias urogenitais e infecções do sistema reprodutor feminino e masculino (LIMA, 2016; VILA VERDE *et al.*, 2003).

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae. As espécies da família Euphorbiaceae têm destaque na atividade econômica e, segundo o conhecimento popular, ela também demonstra notoriedade na medicina. Diante da necessidade da descoberta de novos agentes terapêuticos e protótipos para que, futuramente, novos fármacos sejam desenvolvidos, atualmente as plantas da família Euphorbiaceae tem sido alvo de estudo do seu conteúdo de produtos bioativos (TRINDADE, 2015). Apesar de esta família ser amplamente distribuída no Brasil, algumas de suas espécies nunca foram estudadas quanto à sua utilização e devido a isso muitas plantas medicinais não estão classificadas.

Trindade (2015) elaborou uma revisão sobre o uso das espécies da família Euphorbiaceae a fim de pontuar quais foram mais usadas no período de 1824 a 2012. Para isso, foram pesquisados livros, sites, artigos científicos e diferentes bases de dados. Foram apresentadas 149 espécies, distribuídas em 35 gêneros. O gênero *Croton* foi o mais citado, 58 citações com indicação de uso na área de perfumaria, reflorestamento, extração de óleos, látex, madeira, inseticida e principalmente o uso medicinal. Além disso, a planta *C. antisiphiliticus* Mart foi citada como uso medicinal sendo ela de ocorrência em vários estados incluindo Minas Gerais. Justificando assim, a importância do presente estudo utilizando essa espécie para a produção dos extratos brutos. O grande leque de atividades descritas para plantas do gênero *Croton* é reflexo da alta diversidade dos compostos químicos produzidos por esse grupo particularmente rico em metabólitos secundários (LOPES *et. al.*, 2012). Considerando a grande quantidade de espécies de *Croton* existente, a quantidade estudada ainda é muito pequena.

Segundo Maciel *et al.* (2013) o portal capes realizou um amplo levantamento sobre o gênero *Croton* durante o período de 1970 a 2006 com objetivo de verificar quais espécies foram alvos de pesquisas multidisciplinares documentadas envolvendo estudos etnobotânicos, químico e farmacológico. No estudo *Croton cajucara* Benth, que é de origem Brasileira, se destacou com 60 artigos publicados seguido de *Croton tiglium* Klotzsch (20 artigos publicados), *Croton lechleri* Muell. Arg. (17 artigos), *Croton zehntneri* Pax e Hoffm. (15 artigos), *Croton sonderianus* Müll Arg. (11 artigos), *Croton zambesicus* Muell Arg. (11 artigos), *Croton nepetaefolius* Baill (10 artigos), *Croton sublyratus* Kurz (9 artigos), *Croton schiedeianus* Schltdl (8 artigos), *Croton eluteria* Bennett (7 artigos), *Croton*

urucurana Baillon (8 artigos), *Croton megalocarpus* Hutch (5 artigos). Tendo em vista que muitas espécies do gênero *Croton* ainda não foram estudadas, como consequência, o número de substâncias já isoladas neste gênero também é muito pequeno. A planta *C. antisiphiliticus* Mart já foi estudada anteriormente por outros autores. Alguns trabalhos envolvendo essa planta foram usados para comparar com os resultados obtidos neste presente estudo. Muitos deles realizaram apenas a prospecção química da planta, não dosando a quantidade de metabolito presente na mesma. Diante desses dados fica claro a importância da quantificação de metabolitos secundários na planta *C. antisiphiliticus* Mart e também salienta a importância de que novos estudos em diversas outras plantas do gênero sejam efetuado.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas e a atividade antioxidante do extrato bruto obtidos pelos métodos de banho ultrassônico e maceração dinâmica da planta *C. antisiphiliticus* Mart (pé-de-perdiz) oriunda de duas localidades diferentes.

Objetivos específicos

- I. Realizar a coleta e produção da exsicata da espécie vegetal *C. antisiphiliticus* Mart para o estudo;
- II. Preparar os extratos brutos das folhas, caule e flor da planta selecionada por banho ultrassônico e maceração dinâmica;
- III. Determinar o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais nos extratos brutos produzidos;
- IV. Determinar a atividade antioxidante nos extratos brutos produzidos;
- V. Comparar os resultados obtidos nos extratos a fim de avaliar a influência do método de extração e do local de coleta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos materiais vegetais

As folhas, flores e caule de *C. antisiphiliticus* Mart foram coletados manualmente em duas localidades distintas no mês de outubro de 2019 sendo uma na Fazenda Paulista, no município de Patos de Minas - MG (18°30'06.1"S e 46°31'36.3"W) denominada ao longo deste presente estudo como Localidade 1 (L1). E a outra em um sítio no município de Patrocínio – MG cujas coordenadas são 19°03'05.477"S 47°09'40.783"W sendo denominada Localidade 2 (L2).

A planta foi identificada baseada em suas características morfológicas pela Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira, Engenheira Agrônoma e docente do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - Campus Patos de Minas. Uma amostra representativa foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia-UFU, sob o registro HUFU79879.

Após a coleta, os materiais vegetais foram levados para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) da UFU - Campus Patos de Minas. Os materiais vegetais tanto de L1 como L2 foram devidamente higienizadas em água corrente. As partes da planta coletadas em L1 (folhas, caule e flores) e L2 (caule e folha) foram separadas e armazenadas em ultrafreezer (Marca: Cold Lab Modelo: CL 520-86V) a temperatura de -80°C para posterior liofilização. Posteriormente, as amostras da planta foram retiradas rapidamente do ultrafreezer e seguiram para o liofilizador (Marca: LioTop Modelo: L101) onde permaneceram por 48 horas. Por fim, os órgãos liofilizados foram triturados no moinho de facas (marca: Fortinox, modelo: Willye Star FT 50) para obtenção do pó fino que foi utilizado para a preparação dos extratos brutos.

2.2 Preparação dos extratos metanólicos

Separadamente, foram pesados 1,8 g do pó de caule, 2,5 g do pó de flor e 3,0 g do pó de folha que posteriormente foram misturados com metanol (Marca: Êxodo Científica) na proporção de 1:50 (planta/metanol). As soluções para cada órgão foram preparadas em duplicata, uma foi levada ao banho ultrassônico e a outra para maceração dinâmica.

As soluções contendo cada um dos pós e o solvente foram submetidas à extração por banho ultrassônico, a temperatura fixa de 40°C. A extração foi realizada em três ciclos de 15 minutos sob agitação constante, com intervalo de 5 minutos entre cada ciclo. Após a extração, a solução obtida foi filtrada a vácuo e levada ao evaporador rotativo (Marca: Fisatom Modelo: 802) para a retirada do solvente a temperatura de 55°C. As outras três soluções idênticas foram colocadas separadamente em Erlenmeyers revestidos com papel alumínio e deixadas

em um agitador magnético (Marca: Marconi Modelo: MA-085/5L) por 24 horas a temperatura ambiente. Após esse tempo, as soluções obtidas foram filtradas a vácuo, uma de cada vez, e levadas ao evaporador rotativo a temperatura de 55°C.

Para a retirada de cada extrato do balão do evaporador rotativo, foram adicionados 15 ml de água destilada para retirar o máximo do extrato aderido nas paredes do balão após o processo de evaporação. Então, cada um dos extratos foi colocado separadamente dentro de tubos tipo falcons revestido de papel alumínio e armazenados no ultrafreezer a temperatura de -80°C. Após 24 horas os extratos foram liofilizados durante 24 horas. Por fim, os extratos brutos secos devidamente tampados foram colocados na geladeira até o momento do uso.

2.3 Método DPPH

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz et al. (2008) e Guimarães et al. (2011), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 µg mL⁻¹. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição do extrato (500; 250; 125 e 62,5 µg mL⁻¹). Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro (Marca: Gehaka Modelo: UV – 340G) no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

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

Em que:

A_{Amo} = Absorbância do DPPH com a amostra.

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

100 = Fator de conversão para porcentagem.

2.4 Determinação do teor dos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu (Marca: Êxodo Científica) de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 0,50 mL do extrato diluído (1000 µg mL⁻¹) com 2,5 mL de 0,2 mol L⁻¹ do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente, 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75

g L⁻¹) foram adicionados à mistura reacional. As leituras de absorvância no espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de onda de 760 nm após incubação à temperatura ambiente durante 2 h. O ácido gálico (16,125; 31,25; 62,5; 125; 250 µg mL⁻¹) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.5 Determinação do teor das antocianinas e flavonoides totais

O teor de antocianinas e flavonoides totais foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Lees e Francis (1972), seguidas de pequenas modificações. Preparou-se a solução extratora que continha 15 ml de solução de HCl diluído (1,5 M) mais 85 ml de etanol 96%. O extrato foi diluído nessa solução extratora na concentração de 1000 µg mL⁻¹, deixado *over night* (12 horas no escuro). Foi realizada a leitura da absorvância do teor de antocianinas a 535 nm e do teor de flavonoides totais a 374 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 Análise Estatística

Para a avaliação dos dados da atividade antioxidante, os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (6 x 4), sendo 6 extratos (folha ultrassônico, folha agitador magnético, caule ultrassônico, caule agitador magnético, flor ultrassônico e flor agitador magnético) e 4 concentrações (500; 250; 125 e 62,5 µg mL⁻¹), com 3 repetições cada. Já para o teor de fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais o experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 6 tipos de extratos, considerando 3 repetições para cada ensaio.

O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem de atividade antioxidante em relação às concentrações analisadas (DPPH). Para o teste de quantificação do teor de fenólicos totais, os resultados foram plotados em gráficos de barras com a dosagem de compostos fenólicos totais expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de material. Para o teor de flavonoides totais e antocianinas totais, os resultados foram plotados em gráficos de barras com a quantidade destes expressos

em miligramas de flavonoides ou antocianinas por 100 gramas de material. O software empregado para a construção dos gráficos foi o *GraphPad Prism* versão 5.01.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias para a preparação de extratos vegetais são utilizadas a fim de obter metabolitos secundários das plantas de forma eficiente, rentável e sem que estes sejam degradados. Neste presente trabalho, que se propõe a dosar os produtos secundários da *C. antisiphiliticus* Mart foi usado dois métodos de extração, a maceração dinâmica e o banho ultrassônico. A maceração dinâmica é um método simples, porém eficiente no qual há uma difusão do solvente, que nesse caso foi o metanol, através das partes do vegetal. O extrato é mantido em agitação durante um período prolongado, no presente estudo foi por 24h. A extração por banho ultrassônico é baseada na ação de ondas mecânicas de baixa frequência às quais resultam na cavitação, fenômeno responsável pela formação e colapso de bolhas de cavitação, facilitando o processo de extração dos elementos (FREITAS, 2015).

Os dois métodos distintos foram empregados com o proposito de comparar qual deles obtém maior sucesso de extração com o solvente metanol. De acordo com Pandey e Tripathi (2014) a escolha dos solventes para realizar uma determinada extração depende dos conhecimentos químicos relacionados principalmente com a polaridade dos metabólitos secundários. Ainda segundo eles, o metanol é um dos solventes mais utilizados, considerando que este pode ser empregado para extrair uma gama de metabolitos secundários como Antocianinas, Terpenos, Saponinas, Taninos, Flavones, Polifenóis, dentre outros.

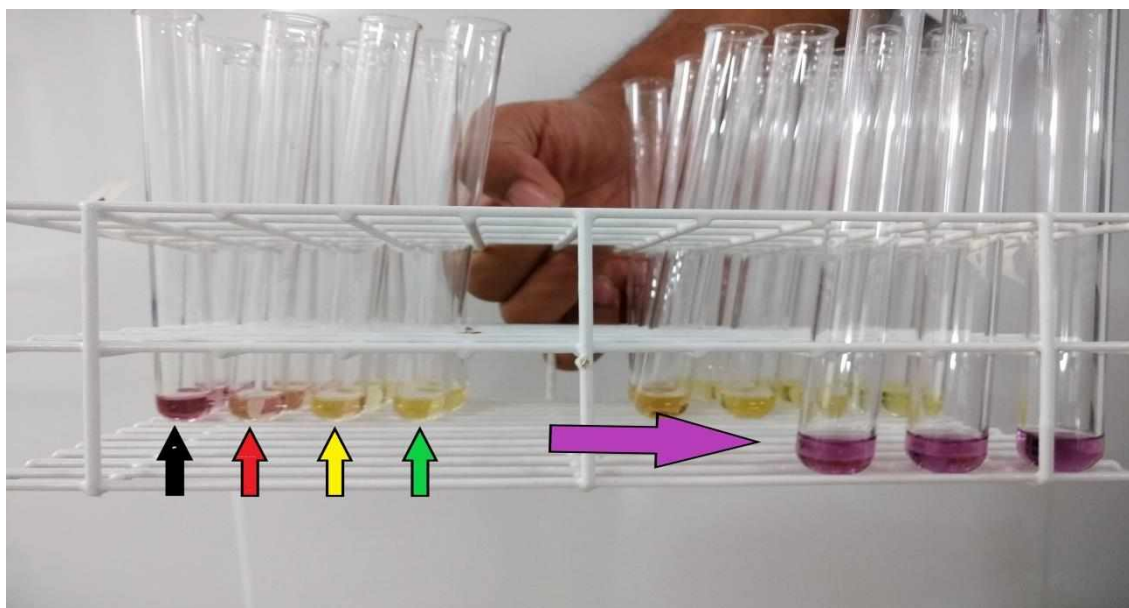
Além da disparidade em que diferentes métodos de extração podem causar nos extratos produzidos de uma mesma planta, a coleta do material vegetal em locais diferentes pode afetar a quantidade de metabolitos secundários que essa planta possui. Isso porque os metabolitos secundários estão correlacionados à adaptação das plantas e a defesa que ela tem que desenvolver para a sobrevivência no local onde ela esta inserida. Sendo assim, a quantidade de metabolito secundário está vinculada a necessidade de cada planta de acordo com o ambiente em que está situada. Segundo Gobbo-Neto (2007) os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais, tais como a época em que é coletado, o ciclo do dia/noite, a idade e o desenvolvimento da planta. Geralmente, tecidos mais novos possuem maior taxa biossintética de metabólitos.

3.1 Atividade antioxidante

Um antioxidante pode ser amplamente definido como qualquer substância que atrasa ou inibe o dano oxidativo a uma molécula alvo (MAHDI-POUR; JOTHY; LATHA; CHEN; SASIDHARAN, 2012). Há um crescente interesse pelos antioxidantes naturais provenientes dos extratos vegetais, principalmente a partir de plantas aromáticas e medicinais, consideradas fontes de antioxidantes naturais (SILVA; RAPOSO; CAMPOS; CONCEIÇÃO; OLIVEIRA; MOURÃO, 2018). Antioxidantes são compostos envolvidos no mecanismo de defesa do organismo contra patologias associadas ao ataque de radicais livres (DIMITROVA, 2017). Uma vez que as propriedades antioxidantes de uma espécie vegetal podem ser provenientes de compostos fenólicos, é importante avaliar o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides, além de sua atividade antioxidante (TOHMA, 2016).

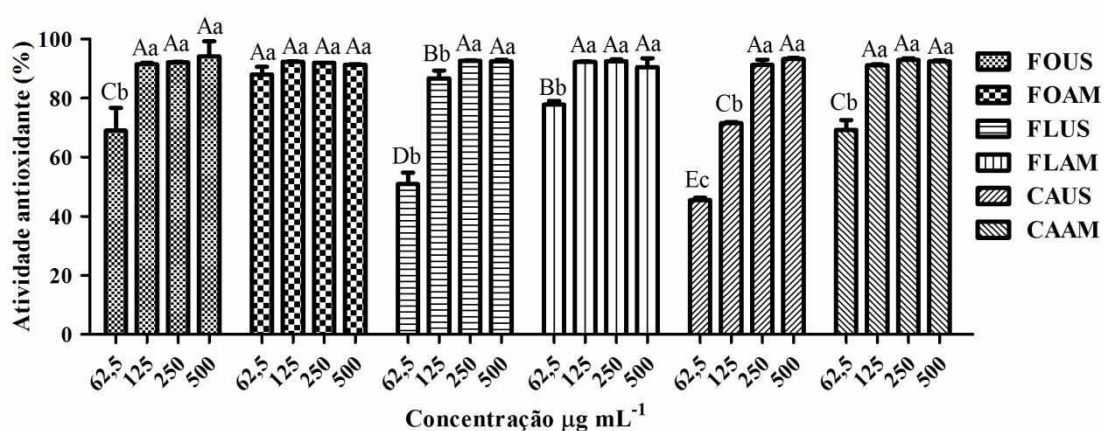
Desta forma, uma das técnicas atualmente utilizada para detectar a capacidade antioxidante de compostos, é o método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil popularmente conhecido como DPPH (OLIVEIRA, 2015). A solução de DPPH possui a cor violeta quando o radical possui um elétron livre. Quando uma substância como, por exemplo, um antioxidante doa um elétron para o radical DPPH, ela o recebe para adquirir uma conformação estável. Esse processo faz com que a coloração seja alterada para cores mais claras, de violeta claro até amarelo. A mudança da cor, que resulta na diminuição da absorbância do radical DPPH, pode ser monitorada por um espectrofotômetro UV/visível para a determinação da capacidade antioxidante da amostra analisada (OLIVEIRA, 2015). A mudança de cor no ensaio utilizando o DPPH no presente estudo pode ser observada através da **Figura 2**.

Figura2 - Ensaio utilizando o radical DPPH com o extrato metanólico bruto produzido por banho ultrassônico do caule da *Croton antisiphiliticus* Mart. A seta maior (lilás) indica o controle negativo do teste (sem amostra). As setas menores indicam o extrato metanólico de CAUS nas concentrações de 62,5 (preta), 125 (vermelha), 250 (amarela) e 500 (verde) $\mu\text{g mL}^{-1}$. CAUS: Caule por banho ultrassônico.



Os testes DPPH realizados nas diferentes partes da planta de *C. antisiphiliticus* Mart no presente estudo estão representados nas **Figuras 3 e 4**. A **Figura 3** apresenta os resultados da planta coletada em L1.

Figura 3 - Atividade antioxidante dos extratos de *C. antisiphiliticus* Mart determinada pelo método de DPPH coletadas em L1. As letras maiúsculas são usadas para comparar a concentração entre os extratos e as letras minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extratos. As médias seguidas por letras diferentes, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. L1: Localidade de coleta 1 FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. FLUS: Flor por banho ultrassônico. FLAM: Flor por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.



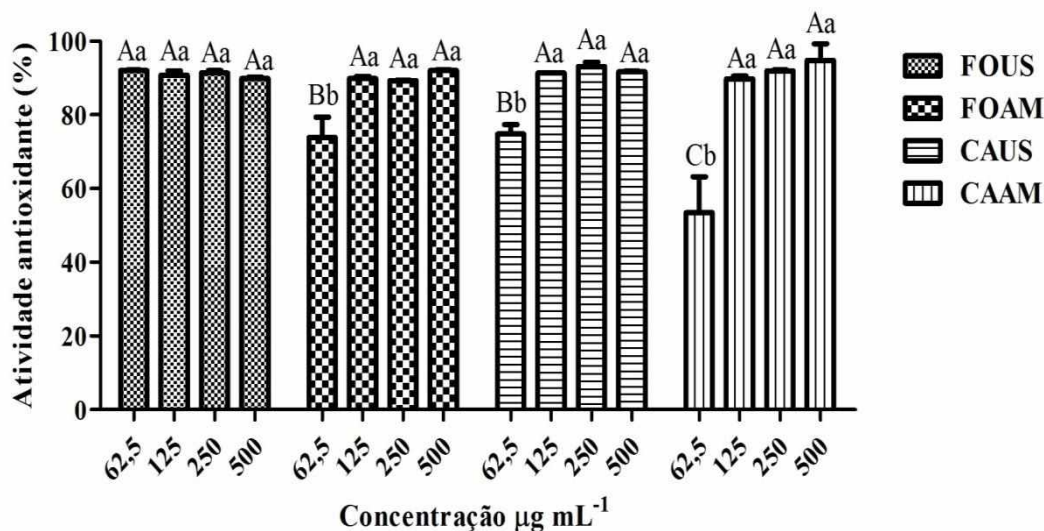
Através do gráfico da **Figura 3** é possível observar que na concentração de 62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ houve um aumento proporcional, ou seja, aumentou a concentração do extrato

ocasionando o aumento da atividade antioxidante. FOAM mesmo na concentração mais baixa de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ já apresentou atividade com média de $87,93 \pm 2,56 \%$, mantendo nas demais concentrações testadas. Observando os valores a partir de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, os extratos que mostraram maior atividade foram as folhas seguido das flores e caule, respectivamente.

Foram escolhidos os dois métodos de extração para evidenciar qual deles possui a capacidade de extrair melhor os compostos, porém, de acordo com os resultados obtidos não é possível afirmar estatisticamente que o método de extração interferiu nos resultados. No entanto, através do método de maceração dinâmica todos os extratos alcançaram a saturação em $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto pelo método de ultrassom a saturação só ocorreu a saturação para os extratos de flores e caule em $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na **Figura 4**, está demonstrada graficamente a capacidade antioxidante de *C. antisiphiliticus* Mart colhida na L2. É possível ressaltar a semelhança entre a atividade antioxidante das plantas de ambas as localidades de coleta.

Figura 4. Atividade antioxidante dos extratos de *C. antisiphiliticus* Mart pelo método de DPPH colhida em L2. As letras maiúsculas foram usadas para comparar a concentração entre os extratos. As letras minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato. As médias seguidas por letras diferentes, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. L2: Localidade de coleta 2. FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.



Os extratos da planta oriunda da localidade L2 foram produzidos apenas das folhas e caule, a quantidade de flores obtidas não era suficiente para a extração.

Assim, verifica-se que a partir da concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ todos os extratos apresentaram saturação da capacidade antioxidante. O extrato FOUS obteve capacidade total observada mesmo na concentração mais baixa de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ com média de $92 \pm 0,194 \%$,

apresentando um melhor resultado seguido por CAUS ($74,8 \pm 2,53$ %), FOAM ($73,9 \pm 5,50$ %), e por último CAAM ($53,5 \pm 9,79$ %), todos na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir dos dados da **Figura 4**, assim como na **Figura 3**, não houve diferenças significativas em relação ao método de extração ou o local de coleta. Em comparação dos dois gráficos, os extratos obtidos das folhas foram os que demonstraram maior atividade antioxidante.

Há relato na literatura científica de testes para verificar a capacidade antioxidante de plantas do gênero *Croton*. Aquino *et al.*, em 2017, demonstrou a presença de metabólitos secundários e ação antioxidante nas folhas de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. Os extratos etanólicos das folhas foram obtidos pelo método de extração exaustiva a frio onde as folhas frescas das duas espécies foram trituradas e deixadas 72 horas para extração com etanol e após esse período, o solvente foi destilado em evaporador rotatório a 80°C . Nos extratos etanólicos brutos foram realizadas as análises do sequestro de radicais livres, usando também o método do DPPH. Os extratos foram diluídos nas concentrações de 5, 10, 25, 50, $125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Mesmo na concentração mais baixa, de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ os extratos das duas plantas apresentaram atividade antioxidante, sendo *Croton blanchetianus* apresentando $34,42 \pm 2,38$ % e *Croton heliotripifolius* $9,35 \pm 3,78$ %. Nos extratos obtidos das folhas na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ obteve média de $98,12 \pm 1,85$ % para *C. blanchetianus* e $48,43 \pm 8,15$ % para *C. heliotropiifolius*. No presente estudo, na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FOAM e FOUS de L1 (**Figura 3**) foi obtido, respectivamente, $87,93 \pm 2,56$ % e $68,9 \pm 7,79$ %. Na localidade L2 (**Figura 4**) FOAM teve média de $73,9 \pm 5,50$ % e FOUS $92,0 \pm 0,19$ %. Nota-se semelhança entre a atividade antioxidante nas três espécies de *Croton*. Essa semelhança ainda prevalece quando comparadas as médias na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, para *C. blanchetianus* ($93,29 \pm 0,96$ %), *C. heliotropiifolius* ($92,06 \pm 0,5$ %), FOAM-L1 ($92,3 \pm 0,1$ %), FOUS-L1 ($91,5 \pm 0,26$ %), FOAM-L2 ($89,9 \pm 0,5$ %) e FOUS-L2 ($90,8 \pm 1,16$ %). Assim sendo, os resultados deste trabalho corroboram com os achados de Aquino *et. al* (2017).

Santos *et al.* (2018) testou a capacidade antioxidante de caules do *Croton linearifolius* que foram previamente secos em estufa de circulação de ar por um período de 72 horas na temperatura de 40°C e a extração aconteceu por percolação exaustiva com solução hidroalcoólica a 70%. O método do sequestro de radicais livres (DPPH) foi realizado para monitorar a capacidade antioxidante das amostras. Observou-se que para o extrato bruto na concentração de $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (10 mg mL^{-1}) a média da atividade antioxidante foi de $74,85 \pm 0,36$ %. Sendo assim, demonstra-se a presença de substâncias antioxidantes no caule de *C. linearifolius*. Em comparação com o estudo de Santos *et al.* (2018) observa-se que mesmo

em concentração menores (250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), tanto CAUS-L1 (91,26 $\pm$ 1,73% e 93,2 $\pm$ 0,30%), CAAM-L1 (92,9 $\pm$ 0,55% e 92,46 $\pm$ 0,30%), quanto CAUS-L2 (93,1 $\pm$ 1,19% e 91,7 $\pm$ 0,22%), CAAM-L2 (91,9 $\pm$ 0,29% e 94,8 $\pm$ 4,53%) apresentaram atividades antioxidantes maiores. Esse fato pode ser explicado devido aos métodos de secagem, extração e pelo solvente utilizado.

Em um estudo realizado por Galvão (2016), ficou claro a interferência do tempo e também a temperatura da estufa de circulação de ar para obtenção de metabolitos secundários. A autora em seu trabalho testou e discutiu o efeito da secagem no rendimento de flavonoides na planta *Plectranthus amboinicus* Lour., provando que na temperatura de 50°C a 45 minutos promoveu um melhor rendimento do teor de flavonoides. Já em uma temperatura mais elevada e deixando a um maior tempo, houve perda expressiva de compostos, possivelmente por se tratar de compostos sensíveis a temperatura. Embora os testes de Galvão (2016) não foram para uma planta do gênero estudado neste trabalho e no de Santos *et al.* (2018), a observação feita pela autora ainda sim se aplica pois em todos os trabalhos se trata de metabolitos secundários. Segundo Almeida *et al.* (2006) a temperatura do ar é um dos parâmetros de maior influencia na taxa de secagem sendo assim é fundamental explorar as temperaturas ideais neste processo quando se trata de amostras vegetais, principalmente quando leva em consideração a troca de ar no interior da estufa. O uso da temperatura pode ser favorável para extração de fenólicos. O calor pode tornar as paredes celulares permeáveis, aumentando a solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos e diminuindo a viscosidade dos solventes, facilitando dessa forma a extração. No entanto temperaturas extremas podem degradar os compostos fenólicos (Oliveira, 2014). O calor não foi uma influencia para este presente trabalho já que todo o material foi seco em liofilizador. A liofilização é um processo de sublimação que consiste, em retirar a água contida nos produtos que estão sendo liofilizados. Toda água do material passa diretamente do estado sólido para o gasoso - sem passar pelo estado líquido. A principal vantagem de liofilizar sobre outros tipos de desidratação como a por aquecimento, é a manutenção de todas as características e propriedades da amostra. Neste processo, apenas a água é retirada.

O solvente utilizado e a polaridade dele podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na extração de polifenóis e consequentemente na capacidade antioxidante (Rockenbach *et al.*, 2008). Segundo Andreo e Jorge (2006), a extração dos compostos fenólicos, o rendimento e a determinação da atividade antioxidante dependem do tipo de solvente e depende também da polaridade do solvente empregado. Isso é devido a diferença nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos. A utilização de

diferentes solventes para se extrair um mesmo composto antioxidante, por exemplo, vem sendo realizada frequentemente por vários autores (Barbi, 2016; Mattos, 2013; Rockenbach *et al.*, 2008) com o intuito de apontar qual é o melhor solvente para realizar de forma mais eficaz a extração de algum composto fenólico. Essa variação de solvente se torna necessário porque a natureza química de cada composto também muda de uma planta para outra. Muitas pesquisas tem utilizado metanol, etanol e outros para comparar o melhor em termos de extração e o metanol tem se destacado muito positivamente. O metanol é um dos solventes mais utilizados, considerando que ele pode ser útil na extração de vários tipos de metabolitos secundários (PANDEY E TRIPATHI, 2014). No entanto, o uso do metanol não deve ser aplicado em análises de alimentos, tendo em vista a toxicidade do mesmo sendo necessária uma substituição pelo etanol ou outro menos tóxico (MARÇO *et al.*, 2008). Embora a polaridade dos álcoois não se altere tanto, o metanol possui uma polaridade um pouco superior ao etanol, por exemplo, pois a sua cadeia hidrocarbônica é menor que a do etanol, tornando assim um solvente mais eficiente para extrair um número maior de compostos antioxidantes com polaridade elevada (ANDREO E JORGE, 2006).

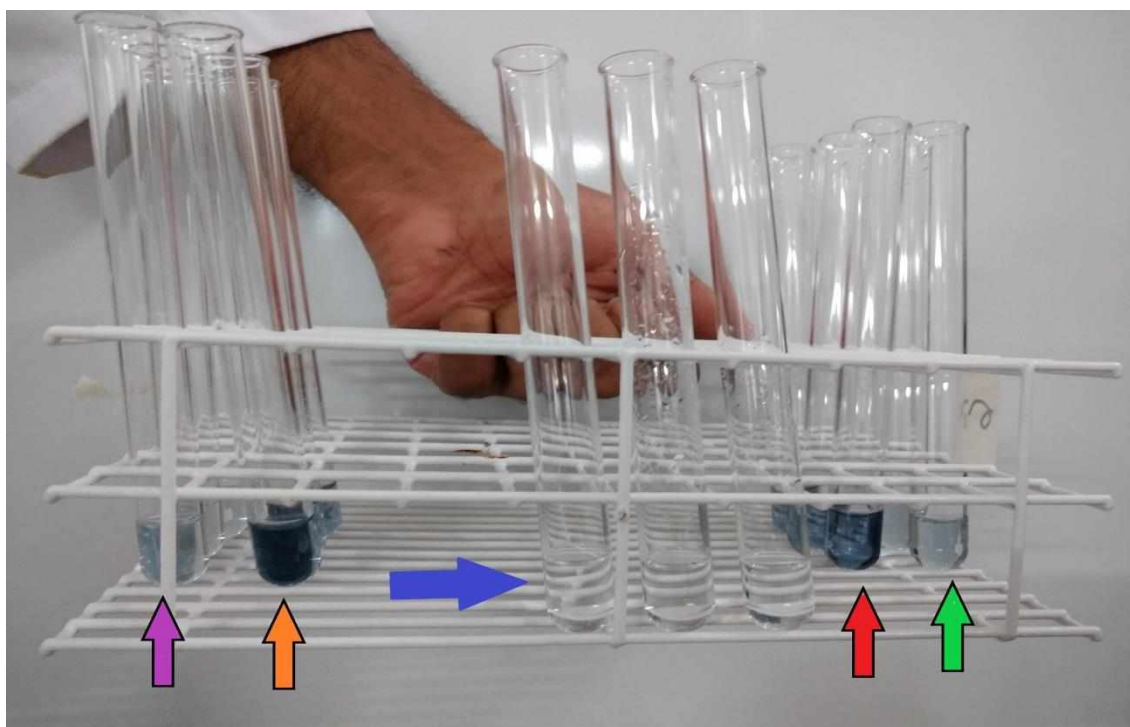
Sabendo que as substâncias com núcleo fenólico, como por exemplo, os flavonoides e ácidos fenólicos, apresentam função antioxidantes (LIMA NETO *et al.*, 2015), é possível atribuir o potencial antioxidante à presença destes compostos. A diferença das médias de atividade antioxidante entre os extratos brutos pode ser relativa à diferença de concentração de compostos fenólicos e/ou flavonoides nos diferentes locais coletados, levando em consideração que a divergência de concentração pode ser devido à necessidade de cada planta ao local em que ela se encontra inserida. Analisando estatisticamente, é possível declarar divergência na atividade antioxidante entre os extratos brutos vegetais das diferentes partes da planta, mas não quanto à localidade onde foram realizadas as coletas.

3.2 Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (MALACRIDA; MOTTA, 2005). Estes podem agir como antioxidante e é devido a seus radicais intermediários estáveis, e também em virtude da sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons (SOARES *et al.*, 2008). Um dos métodos comumente utilizado para dosar e quantificar compostos fenólicos é o ensaio com o reagente Folin-Ciocalteu. O método baseia-se na interação entre o reagente Folin-Ciocalteu com as substâncias redutoras presentes na

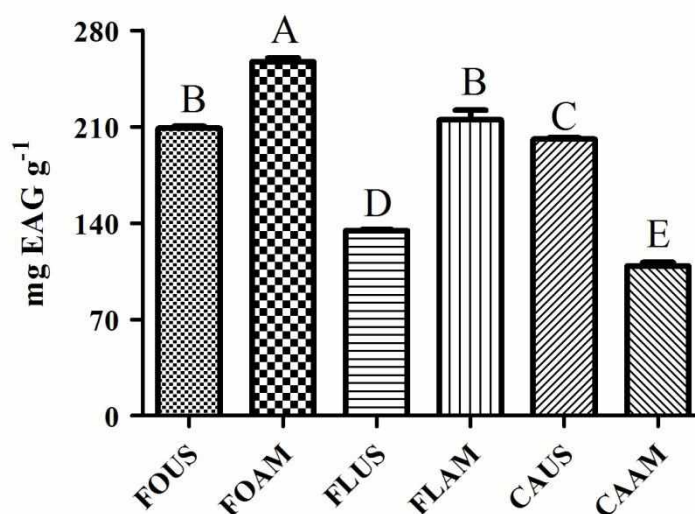
amostra, mudando assim a coloração da solução de amarelo para a azul (PIRES et al., 2020), como ilustrado na **Figura 5**.

Figura 5. Foto tirada do teste de folin-ciocalteu de extratos metanólicos bruto produzido por maceração dinâmica e banho ultrassônico do caule da *Croton antisiphiliticus* Mart. A seta maior (azul) indica o controle negativo do teste (sem amostra). As setas rosa e laranja indicam o extrato metanólico de CAAM nas concentrações de 62,5 (rosa) e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (laranja) respectivamente. As setas das cores vermelha e verde indicam o extrato metanólico de CAUS também nas concentrações de 62,5 (vermelha) e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (verde) respectivamente. CAUS: Caule de *C. antisiphiliticus* Mart por banho ultrassônico. CAAM Caule de *C. antisiphiliticus* Mart por maceração dinâmica.



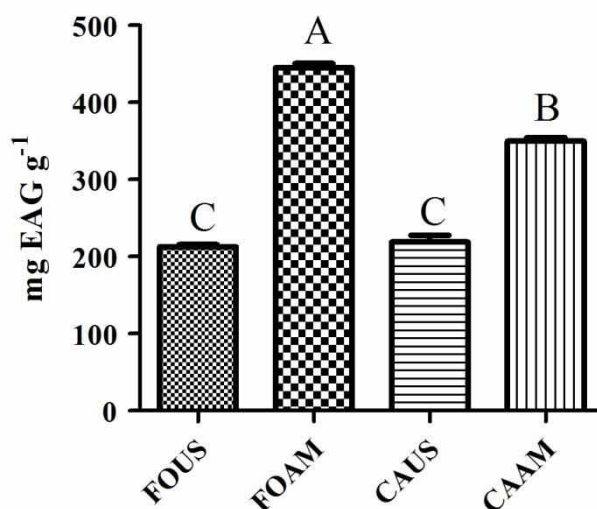
A coloração da reação vai de um tom azul claro para azul escuro, sendo impossível identificar o limite na qual a concentração de fenólicos pode atingir. Devido a isso, a quantidade de fenólicos totais é relativa a um padrão conhecido em concentrações definidas, que neste caso é o ácido gálico. Os valores são expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (mg EAG g^{-1}). As **Figuras 6 e 7** apresentam os resultados encontrados da planta oriunda de L1 e L2.

Figura 6 – Teor de compostos fenólicos totais de *C. antisiphiliticus* Mart coletado na Localidade 1 (L1) utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. FLUS: Flor por banho ultrassônico. FLAM: Flor por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.



Na planta coletada em L1 (**Figura 6**) FOAM foi o extrato que apresentou a maior concentração de fenólicos, com média de $257,35 \pm 4,48$ mg EAG g⁻¹, seguido de FOUS e FLAM ($208,97 \pm 2,23$ e $215,12 \pm 12,05$ mg EAG g⁻¹, respectivamente). Nos extratos das folhas produzidos por maceração dinâmica utilizando o agitador magnético houve maior quantidade de fenólicos totais. Nos extratos das flores produzidos por maceração dinâmica também apresentou um conteúdo elevado de compostos fenólicos ($215,12 \pm 12,05$ mg EAG g⁻¹) em comparação ao método de extração por ultrassom utilizando o banho ultrassônico com média de $134,44 \pm 1,29$ mg EAG g⁻¹. Já no extrato do caule, o método que se mostrou mais eficiente foi utilizando o banho ultrassônico ($201,11 \pm 1,64$ mg EAG g⁻¹) em comparação ao método de maceração dinâmica ($108,80 \pm 4,65$ mg EAG g⁻¹).

Figura 7 – Teor de compostos fenólicos totais de *C. antisiphiliticus* Mart coletada na Localidade 2 (L2) utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.



Na mesma espécie, porém coletada em L2 (**Figura 7**) observa-se assim como na coletada em L1 (**Figura 6**) que o extrato FOAM apresenta a maior média de fenólicos totais ($445,04 \pm 9,34$ mg EAG g⁻¹). Observa-se ainda que a média do extrato FOAM encontrada em L2 praticamente dobrou quando comparada com a L1 ($257,35 \pm 4,48$ mg EAG g⁻¹). Ao contrário do ocorrido para o caule de *C. antisiphiliticus* Mart coletado em L1, onde o banho ultrassônico mostrou ser mais eficaz em comparação a maceração dinâmica, nos caules da mesma planta recolhidos em L2 a maceração dinâmica mostrou mais eficiência. Considerando todos os extratos avaliados para essa espécie foi possível perceber que, o método de extração por maceração dinâmica mostrou-se melhor do que a extração por uso do banho ultrassônico, exceto no caule de L1, assim como as folhas obtidas por maceração dinâmica apresentou uma concentração mais elevada de compostos fenólicos quando confrontada com as flores e o caule.

Estudos para dosar compostos fenólicos em folhas de espécies do gênero *Croton* já foram realizados anteriormente, como no trabalho realizado por Morais *et al.* (2013) que coletou partes aéreas de 18 espécies de plantas medicinais incluindo a *Croton zenhtneri*. Os materiais vegetais secos foram submetidos à maceração com etanol 95% por 7 dias. O teor de compostos fenólicos, dosados através do reagente Folin-Ciocalteu, encontrado para *C. zenhtneri* foi de $120,27$ mg EAG g⁻¹ de extrato. No presente estudo, as médias obtidas folhas e flores (partes aéreas) são superiores, independente da localidade, às encontradas no estudo de Morais e colaboradores (2013). Portanto, a espécie *C. antisiphiliticus* Mart apresenta teor de compostos fenólicos totais maiores que a espécie *C. zenhtneri*, fato este independentemente do método de extração e do local de coleta.

Costa e colaboradores (2017) analisou o teor de fenólicos totais em extrato etanólico de caule de *Croton argyrophyllus*. O extrato foi produzido por percolação com uma solução hidroetanólica 95% e então fracionado por partição líquido-líquido. O teor de fenólicos totais presentes no extrato foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu. O extrato etanólico apresentou um teor de fenólicos totais de $269,72 \pm 6,25$ mg EAG g⁻¹ de extrato. Enquanto que no presente estudo o CAAM e CAUS de L1 obtiveram $108,80 \pm 4,65$ e $201,11 \pm 1,64$ mg EAG g⁻¹, respectivamente. Para L2, CAAM apresentou $349,66 \pm 8,49$ mg EAG g⁻¹ e CAUS $218,89 \pm 15,00$ mg EAG g⁻¹. Assim, considerando o extrato bruto de caule há diferenças entre as localidades e métodos, sendo que o caule da planta proveniente de L2 apresentou teor de fenólicos totais maiores que a L1 e o método de maceração dinâmica foi mais eficiente na extração destes compostos. Diferentemente da maceração dinâmica, no processo de percolação, o solvente, denominado extrator, passa continuamente no extrato fazendo com que o princípio ativo seja arrastado. A percolação normalmente é escolhida para extrair substâncias com pouca solubilidade (Costa *et al.* 2017). Além disso, o solvente utilizado foi diferente e sabe-se que o metanol, que foi utilizado no presente trabalho é frequentemente mais utilizado para extração de compostos fenólicos possuindo maior eficiência de extração devido a sua polaridade (TSAO; DENG, 2004).

No estudo de Alves (2017), a quantidade de fenólicos totais foi dosada em cascas do caule *Croton cordiifolius* Bail. O extrato das cascas do caule foi obtido por meio da maceração em etanol por um período de 24 horas. O teor de fenólicos totais do extrato das cascas de *C. cordiifolius* Bail revelou a presença de $135,8 \pm 7,62$ mg EAG g⁻¹ de extrato. Assim, considerando o método de extração utilizado por Alves (2017) e o método de maceração dinâmica utilizado no presente estudo, pode-se concluir que permitir a agitação durante o processo extrativo possibilitou maior extração dos compostos fenólicos em relação ao local de coleta L2 (CAAM $349,66 \pm 8,49$ mg EAG g⁻¹). Provavelmente, esse achado deve-se a agitação durante a maceração e não ao uso do solvente metanol porque na planta proveniente de L1 o teor de fenólicos totais (CAAM $108,80 \pm 4,65$ mg EAG g⁻¹) é menor em relação ao apresentado por Alves (2017). E também, demonstra-se que a extração por utilização do banho ultrassônico é mais eficiente considerando a localidade L1 (CAUS $201,11 \pm 1,64$ mg EAG g⁻¹) e com valor muito próximo para L2 (CAUS $218,89 \pm 15,00$ mg EAG g⁻¹).

Por fim, considerando os resultados obtidos em relação à dosagem de compostos fenólicos totais no presente estudo e comparando com os achados na literatura científica, é

possível demonstrar que o extrato metanólico bruto das folhas produzido por maceração dinâmica é mais promissor, independente da localidade.

3.3 Flavonoides totais

Dentre os compostos fenólicos, está a classe de flavonoides que são moléculas encontradas em diversas espécies do reino vegetal e possuem várias atividades biológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Possuem estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma $C_6-C_3-C_6$. (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). É considerado componente indispensável em uma variedade de aplicações nutricionais, farmacêuticas, medicinais e cosméticas, e isso é atribuído às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas e anti-carcinogênicas (PANCHE, 2016).

Diante das inúmeras atividades biológicas destes compostos, torna se imprescindível quantificar sua presença na planta em estudo. Assim, os teores de flavonoides encontrados estão demonstrados na **Figura 8** e **Figura 9**.

Figura 8 – Teor de flavonoides totais de *C. antisyphiliticus* Mart coletadas na Localidade 1 (L1). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. FLUS: Flor por banho ultrassônico. FLAM: Flor por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.

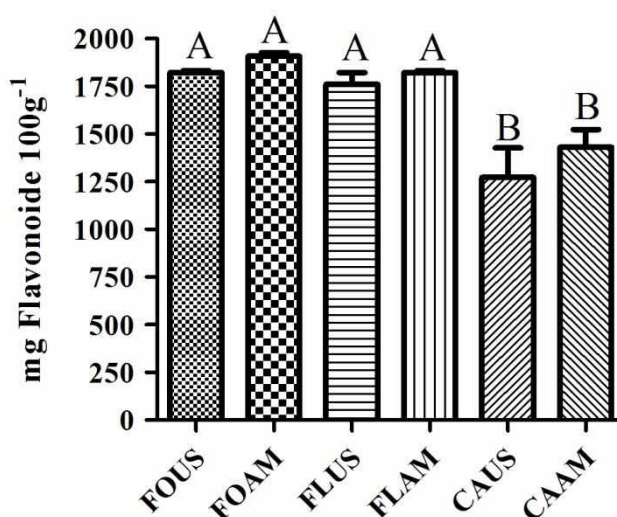
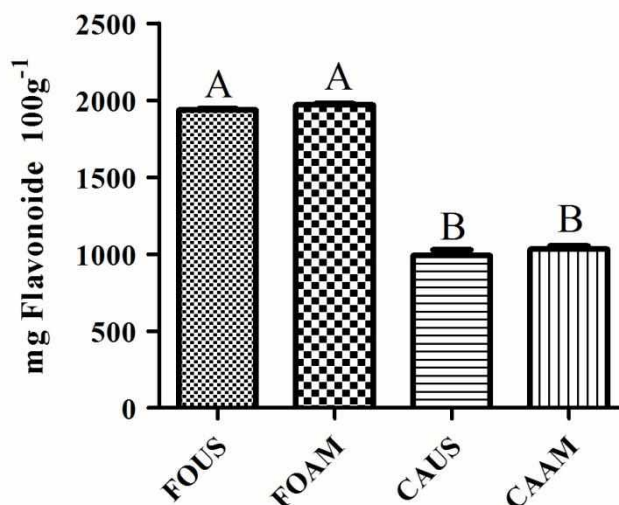


Figura 9 – Teor de flavonoides totais de *C. antisyphiliticus* Mart coletadas na Localidade 2 (L2). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.



É possível identificar através dos gráficos demonstrados nas **Figuras 8 e 9** que todas as partes da planta *C. antisyphiliticus* das duas localidades demonstraram a presença de flavonoides. Há um grande leque de atividades descritas para plantas do gênero *Croton* e isso é reflexo da alta diversidade química produzida por esse grupo, particularmente rico em metabólitos secundários, especialmente terpenoides, alcaloides e flavonoides (LOPES, 2012).

Na planta oriunda da localidade L1, o maior teor médio de flavonoides totais foi achado no extrato bruto das folhas obtidos por maceração dinâmica (FOAM $1907,33 \pm 28,8$ mg 100 g^{-1}) seguido pelo extrato bruto das folhas obtido por banho ultrassônico (FOUS $1822,81 \pm 12,96$ mg 100 g^{-1}). O mesmo ocorreu para a espécie de L2 cujo FOAM exibiu teor de flavonoides totais de $1969,96 \pm 12,24$ mg 100 g^{-1} seguido por FOUS $1936,35 \pm 10,80$ mg 100 g^{-1} . O extrato bruto das flores de *C. antisyphiliticus* Mart coletadas em L1 apresentou quantidade média de flavonoides totais próxima das folhas, sendo FLAM $1822,81 \pm 12,96$ mg 100 g^{-1} e FLUS $1760,69 \pm 86,40$ mg 100 g^{-1} . Por fim, para o extrato bruto do caule os resultados para a espécie coletada em L1 foram maiores do que de L2, sendo o teor médio de flavonoides totais de CAUS-L1 $1272,40 \pm 219,62$ mg 100 g^{-1} , CAAM-L1 $1431,26 \pm 130,33$ mg 100 g^{-1} em oposição a CAUS-L2 $990,84 \pm 51,84$ mg 100 g^{-1} e CAAM-L2 $1031,57 \pm 31,68$ mg 100 g^{-1} . Portanto, o local de coleta não interferiu no conteúdo de flavonoides totais das folhas e flores, mas para o caule houve discreta discrepância. A **Tabela 1** sumariza as médias da concentração de flavonoides totais nos extratos brutos de cada um dos órgãos da planta das duas localidades de coleta divididas por 100, pois os resultados nos gráficos (**Figuras 8 para L1 e 9 para L2**) foram mostrados em mg de flavonoides em 100 g^{-1} de extrato, essa divisão foi feita para melhor comparação, principalmente com resultado de outros autores.

Tabela 1 – Teor médio de flavonoides da planta *C. antisyphiliticus* Mart considerando os diferentes métodos de extração e o local de coleta da planta. As médias encontradas no gráfico foram divididas por 100, apresentando assim o resultado em mg/g⁻¹ de extrato. FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. FLUS: Flor por banho ultrassônico. FLAM: Flor por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica. L1: Localidade de coleta 1. L2: Localidade coleta 2

EXTRATOS	L1	L2
FOUS	18,22±0,12 mgg ⁻¹ de extrato	19,36±0,10 mgg ⁻¹ de extrato
FOAM	19,07±0,28 mgg ⁻¹ de extrato	19,69±0,12 mgg ⁻¹ de extrato
CAUS	12,72±2,19 mgg ⁻¹ de extrato	9,90±0,51 mgg ⁻¹ de extrato
CAAM	14,31±1,30 mgg ⁻¹ de extrato	10,31±0,31 mgg ⁻¹ de extrato
FLUS	17,60±0,86 mgg ⁻¹ de extrato	---
FLAM	18,22±0,12 mgg ⁻¹ de extrato	---

Portanto, em relação ao método e diante dos resultados apresentados para esse ensaio, não é possível afirmar que houve interferência no teor de flavonoides totais, ou seja, considerando a mesma parte da planta, as médias tanto em um método quanto em outro foram muito próximas, porém os extratos oriundos das folhas mostraram resultados mais promissores em comparação às outras partes da planta *C. antisyphiliticus* Mart.

SANTOS *et al.* (2018) quantificou o teor de flavonoides totais em caule de *Croton linearifolius*. A extração do material vegetal ocorreu por meio da percolação exaustiva com solução hidroalcoólica a 70%. O extrato bruto (EB) apresentou teor de flavonoides de 15,67 mg de Equivalentes de Quercetina (EQ) / g extrato. Embora os métodos de extração e de dosagem de flavonoides sejam diferentes em relação ao presente estudo, para ambos os trabalhos os resultados para caule (CAAM-L1 14,31±1,30 mg/g⁻¹ ; CAUS-L1 12,72±2,19 mg/g⁻¹ e CAAM-L2 10,31±0,31 mg/g⁻¹ ; CAUS-L2 9,90±0,51 mg/g⁻¹) e os resultados encontrados por SANTOS *et al.* (2018) foram próximos.

Alves (2017) além de dosar a quantidade de fenólicos totais na espécie *croton cordiifolius* Bail, também dosou a quantidade de flavonoides. O teor de flavonoides apresentado foi de 21,24 ± 0,37 mg de EQ por g de extrato. Assim, tanto nos trabalhos de Santos *et al.* (2018) e Alves (2017) como no presente estudo, os resultados para teor de flavonoides totais no caule nas diferentes plantas do gênero *Croton* avaliadas foram próximos.

NUNES *et al.* (2018) em um estudo para analisar o potencial fotoprotetor de plantas medicinais do bioma Cerrado em relação a alguns metabolitos secundários dosou o conteúdo de flavonoides presentes em folhas da espécie *Croton sonderianus* Mull. Arg. Para isso, os

materiais vegetais secos foram macerados com etanol por 7 dias. Foi encontrado o teor de $7,94 \pm 0,09$ mg EQ/g de extrato das folhas. Quando comparados com o presente trabalho (FOAM-L1 $19,07 \pm 0,28$ mgg⁻¹ ; FOUS-L1 $18,22 \pm 0,12$ mgg⁻¹ e FOAM-L2 $19,69 \pm 0,12$ mgg⁻¹ ; FOUS-L2 $19,36 \pm 0,10$ mgg⁻¹), considerando a **Tabela 1** , verifica-se que Nunes e colaboradores encontrou menos da metade do teor de flavonoides, o que pode ser devido a diferença nos métodos de extração e solventes utilizados. Portanto, para as folhas a extração com metanol utilizando os métodos de maceração dinâmica ou banho ultrassom obteve-se maior teor de flavonoides totais do que o relatado na literatura científica.

3.4 Antocianinas totais

As antocianinas se encontram largamente distribuídas na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (MALACRIDA; MOTTA, 2005). As funções desempenhadas por elas nas plantas são variadas como antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. As cores vivas e intensas que elas produzem têm um papel importante em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes, já que suas cores são atrativas aos polinizadores e pássaros (LOPES *et al.*, 2007). Além de conferir coloração característica a diversos vegetais, as antocianinas apresentam propriedades que vinculam sua ingestão a hábitos saudáveis de alimentação. Segundo Narayan (1999), as antocianinas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos como corante natural já que existem evidências que indicam que as antocianinas não são tóxicas e nem mutagênicas e, além disso, possuem muitas propriedades terapêuticas positivas. O maior limitante para a substituição dos corantes sintéticos pelas antocianinas é a sua menor estabilidade.

No presente estudo, foi possível identificar a presença de antocianinas nos extratos metanólicos de caule, folhas e flores *C. antisiphiliticus* Mart das duas diferentes localidades de coleta, como demonstrado nas **Figura 10 e 11**.

Figura 10 – Teor de antocianinas totais da planta *C. antisiphiliticus* Mart coletada na Localidade 1 (L1). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. FLUS: Flor por banho ultrassônico. FLAM: Flor por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.

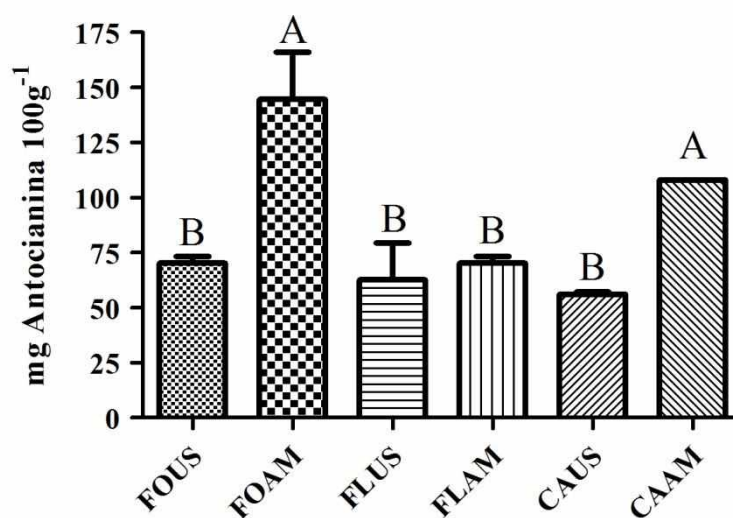
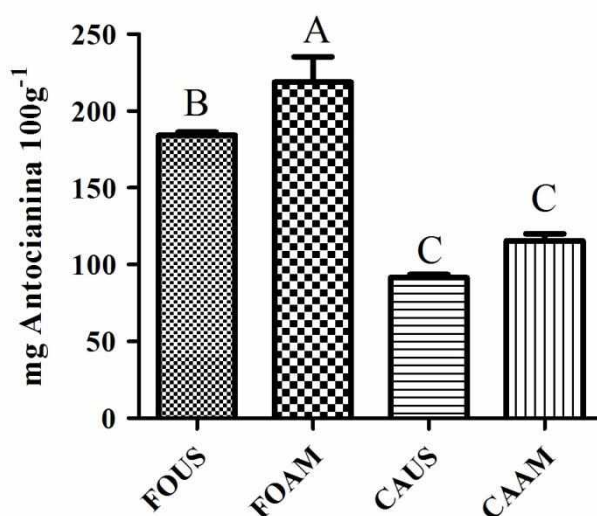


Figura 11 – Teor de antocianinas totais da planta *C. antisiphiliticus* Mart coletada na Localidade 2 (L2). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. FOUS: Folha por banho ultrassônico. FOAM: Folha por maceração dinâmica. CAUS: Caule por banho ultrassônico. CAAM: Caule por maceração dinâmica.



Todos os extratos das partes analisadas da planta apresentaram antocianinas em sua composição. Porém, os extratos das folhas de *C. antisiphiliticus* Mart, obtido pela maceração dinâmica, tanto de L1 ($144,60 \pm 30,24$ mg 100 g⁻¹) quanto de L2 ($218,94 \pm 23,04$ mg 100 g⁻¹), foram os que apresentaram maior teor de antocianinas. Assim, é possível observar, que os extratos das folhas obtidos por maceração dinâmica, demonstraram melhores resultados quando comparados com os extratos da mesma parte da planta obtido por banho ultrassônico. Para as flores de L1 (FLAM $70,26 \pm 4,32$ mg 100 g⁻¹ e FLUS $62,63 \pm 23,76$ mg 100 g⁻¹) o método não interferiu no teor encontrado. Já para o caule de L1 o valor da média encontrado

para o extrato obtido por maceração dinâmica dobrou em relação ao obtido por banho ultrassônico (CAAM: $107,94 \pm 0,00$ mg 100 g^{-1} e CAUS: $56,01 \pm 1,40$ mg 100 g^{-1}). Contudo, em L2 os resultados para o caule foram menos discrepantes do que L1, porém seguiram a mesma tendência, o extrato produzido pelo método de maceração dinâmica (CAAM $115,58 \pm 6,48$ mg 100 g^{-1}) se mostrou superior ao método ultrassônico (CAUS $91,65 \pm 2,88$ mg 100 g^{-1}), porém sem diferença estatisticamente.

Alguns trabalhos que realizaram a prospecção fitoquímica de espécies do gênero *Croton*, não apresentam dados da dosagem ou detecção de antocianinas (COSTA, *et. al* 2017; AQUINO *et. al.*, 2017). No presente trabalho, pela primeira vez, a presença e o teor de antocianinas foram demonstrados em todos os extratos de todas as partes analisadas da planta *C. antisiphiliticus* Mart. Além disso, pode-se concluir que o método de maceração dinâmica se mostrou mais eficiente, quando comparado ao método de banho ultrassônico, principalmente para o extrato das folhas de ambos os locais de coleta uma vez que essa diferença é estatisticamente significativa. Os extratos das folhas são os que apresentaram o maior teor de antocianinas.

4 CONCLUSÃO

Em uma abordagem geral, diante dos resultados apresentados desse estudo, a planta *C. antisiphiliticus* Mart é uma espécie que possui compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides e apresenta atividade antioxidante. Os extratos das folhas foram os que demonstraram maiores médias dos compostos avaliados, assim como atividade antioxidante. Quanto ao método de extração, na maioria dos testes, a maceração dinâmica demonstrou ser mais eficiente na extração dos compostos que o uso do ultrassom pelo banho ultrassônico. Embora o local de extração das plantas também é uma variável que pode interferir no conteúdo de metabolitos secundários de plantas, no presente trabalho, estatisticamente o local da coleta não foi uma variável importante na maioria dos resultados encontrados. Assim, o extrato das folhas produzido por maceração dinâmica (FOAM) foi o que apresentou, de forma geral, os melhores resultados. Portanto, a planta medicinal *C. antisiphiliticus* Mart é uma candidata potencial para estudos futuros para análise destes extratos contra microrganismos e outros modelos, como por exemplo, a utilização em indústrias alimentícias devido ao seu potencial antioxidante. Por fim, mais estudos são necessários para validar e provar que esta espécie possa ser utilizada para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e também na preservação da integridade dos alimentos prevenindo a oxidação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C.A.de; GOUVEIA, J.P.G.de; ALMEIDA, F.de A.C.; SILVA, F.L.H.da. Avaliação da cinética de secagem em frutos de acerola. **Revista de biologia e ciência da terra**, v.6, n.1, p.145-151, 2006.

ALMEIDA, Diogo F. L. d. S. **Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais**. Orientador: Doutora Ana Cristina Vinha. 2017. 61 f. Tese de pós graduação (Ciências Farmacêuticas) - Pos graduação, Porto, 2017.

ALVES, IASMINE ANDREZA BASILIO DOS SANTOS. **ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E ETNOFARMACOLÓGICO DE Croton cordiifolius BAIL. (EUPHORBIACEAE)**. Orientador: Dr. Rafael Matos Ximenes. 2017. 128 f. Tese de doutorado (Ciências Farmacêuticas) - Doutorado, Recife, 2017. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/23993/1/Tese_Doutorado_Iasmine_Alves.pdf. Acesso em: 27 jul. 2020.

ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais: técnicas de extração**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v.24, n.2, p.319-326, 2006.

ANGELO, Priscila Milene e JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** (Impr.) [online]. 2007, vol.66, n.1, pp. 01-09. ISSN 0073-9855.

AQUINO, Vitória Viviane Ferreira; COSTA, José Galberto Martins; ANGÉLICO, Elissandra Couras; MEDEIROS, Rosália Severo; LUCENA, Maria de Fatima Araujo; RODRIGUES, Onaldo Guedes. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de Croton heliotropifolius e Croton blanchetianus. **Acta Brasiliensis**, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 28-31, 26 set. 2017. Acta Brasiliensis. <http://dx.doi.org/10.22571/actabral3201730>.

ASM COMMUNICATIONS (Washington). American Society For Microbiology. **Off-Patent Drug Appears Promising as Broad-Spectrum Antifungal**. 2018. Disponível em: <<https://www.asm.org/Press-Releases/Off-Patent-Drug-Appears-Promising-as-Broad-Spectru>>. Acesso em: 13 abr. 2019.

BARBI, RAFAELA C. T. **EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIOXIDANTES DA CHIA (SALVIA HISPÂNICA L) USANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLVENTES**. Orientador: Ailey A. C. Tanamati. 2016. 21 p. Trabalho de conclusao de curso (Engenharia de Alimentos) - Graduação, CAMPO MOURÃO, 2016. Disponível em: http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5045/1/CM_COEAL_2016_1_11.pdf. Acesso em: 24 ago. 2020.

CARDOSO, Bruce Soares; AMARAL, Vanessa Cristiane Santana. O uso da fitoterapia durante a gestação: um panorama global. : um panorama global. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 1439-1450, abr. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232018244.07472017>.

COSTA, Matheus; SANTOS, Rândilla; GUALBERTO, Simone; SILVA, Sandra. FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Croton argyrophyllus* KUNTH (EUPHORBIACEAE). **Enciclopédia Biosfera**, [s.l.], v. 14, n. 25, p. 687-701, 20 jun. 2017. Centro Científico Conhecer. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2017a53.

COUTINHO, Marcela A. S.; MUZITANO, Michelle F.; COSTA, Sônia S.. Flavonoids: potential therapeutic agents for the inflammatory process. : Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20090024>.

DELARZE, E., SANGLARD, D., Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence., **Drug Resistance Updates** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.10.001>

DIEDRICH, Camila. **Otimização Multivariada de Extração de Compostos Bioativos em Folhas, Casca e Resíduos de Seiva de Croton Lechleri**. 2018. 135 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2018.

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

DUARTE, Marta Cristina Teixeira. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciencia**, Campinas, n. 8, p.3-7, 18 set. 2006. Semestral. Disponível em: <<https://www.multiciencia.unicamp.br/>>. Acesso em: 19 jun. 2020.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. Phytotherapy. In: HEINRICH, Michael. **Phytotherapy**. Reino Unido, 17 nov. 2017. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/phytotherapy>. Acesso em: 24 abr. 2020.

FAPESP (Ed.). **A maior diversidade de plantas do mundo**: Botânicos registram 46 mil espécies e identificam em média 250 por ano no Brasil. 2016. Post por Carlos Fioravanti. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/03/21/a-maior-diversidade-de-plantas-do-mundo/>>. Acesso em: 30 mar. 2019.

FREITAS, Paula Cristiana de et al . EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE FERRO EM SOLO: UMA COMPARAÇÃO COM ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 38, n. 4, p. 570-574, May 2015 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422015000400570&lng=en&nrm=iso>. access on 10 July 2020. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150021>

GALVÃO, Géssica Cruz. **Efeito da secagem no rendimento de Flavonoides contidos na Plectranthus amboinicus lour**. Orientador: Clessia Oliveira Pachu. 2016. 29 f. Trabalho de conclusao de curso (Farmacia) - Graduação, Campina Grande, 2016. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/bitstream/123456789/10060/1/PDF%20-%20G%C3%A9ssica%20Cruz%20Galv%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2020.

GISELDA DURIGAN (São Paulo). Icmbio Ministerio do Meio Ambiente (Ed.). **MANUAL PARA RECUPERAÇÃO DA VEGETAÇÃO DE CERRADO**. 2011. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/educacaoambiental/images/stories/biblioteca/permacultura/Manual_recuperacao_cerrado.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2019.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P.. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, Apr. 2007. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200026&lng=en&nrm=iso>. access on 10 July 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.

GOVERNO DO BRASIL (Ed.). **DIVERSIDADE BIOLÓGICA: Conheça os biomas brasileiros**. 2009. Atualizado em 29/12/2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/meio-ambiente/2009/10/biomas-brasileiros>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

Harborne JB 1999. **Classes and functions of secondary products**, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. London: Imperial College, p.1-25.

KOROLKOVAS, Andrejus; BURCKHALTER, Joseph H.. **Química Farmacêutica**. São Paulo: Guanabara Koogan S.a, [1982]. 747 p.

LABORATÓRIO PFIZER (São Paulo) (Ed.). **O que é resistência bacteriana?** [2018]. Disponível em: <<https://www.pfizer.com.br/noticias/O-que-%C3%A9-resist%C3%Aancia-bacteriana>>. Acesso em: 05 abr. 2019.

LIMA, Leticia Ribes de; PIRANI, José Rubens. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 8, n. 2, p.178-178, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v8n2/en/fullpaper?bn01108022008+pt>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

LIMA, Philipe Dias de Ávila. **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PLANTAS DO CERRADO: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M. KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB., *Miconia ferruginata* DC., E *Norantea adamantium* CAMB.** Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Rodrigues. 2016. 106 p. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Pos graduação, Diamantina, 2016. Disponível em: http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1185/1/philipe_dias_avila_lima.pdf. Acesso em: 10 jul. 2020.

LIMA NETO, G.A *et al.* Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 1069-1077, 2 jun. 2015. DOI 10.1590/1983-084x/14_161. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s3/1516-0572-rbpm-17-4-s3-1069.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2020.

LIMA, V. L. A. G., et al. Polpa Congelada De Acerola : Efeito Da Temperatura Sobre Os Teores De Antocianinas E Flavonóis Totais. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal** - SP, v. 1, p. 669–670, 2002.

LOPES, Elton Luz; ANDRADE NETO, Manoel; SILVEIRA, Edilberto Rocha; PESSOA, Otilia Deusdênia Loiola; BRAZ-FILHO, Raimundo. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 11, p. 2169-2172, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012001100012>.

LOPES, J. T., et al; Antocianinas : Uma Breve Revisão Das Características Estruturais E Da Estabilidade. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007

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

MACIEL, M. A. M. *et al.* O gênero *Croton* e Aspectos Relevantes de Diterpenos Clerodanos. **Revista Fitos**, Natal, RN, ano 2006, v. 2, n. 3, p. 54-73, 17 out. 2013. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/59/58>. Acesso em: 19 ago. 2020.

MAHDI-POUR, Badakhshan; JOTHY, Subramanion L; LATHA, Lachimanan Yoga; CHEN, Yeng; SASIDHARAN, Sreenivasan. Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v. 2, n. 12, p. 960-965, dez. 2012. Medknow. [http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691\(13\)60007-6](http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60007-6).

MALACRIDA, Cassia R.; MOTTA, Silvana da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 659-664, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612005000400006>.

MARÇO, Paulo Henrique; POPPI, Ronei Jesus; SCARMINIO, Ieda Spacino. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000500051>.

MATTOS, G. **Extração e quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides de eugenia pyriformiscambess usando diferentes solventes**. Trabalho de conclusão de curso. Campo Mourão, 2013.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (São Paulo) (Org.). **Fauna e Flora**. [ca 2012]. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado/fauna-e-flora.html>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

MORAIS, S.m; LIMA, K.s.b.; SIQUEIRA, S.m.c.; CAVALCANTI, E.s.b.; SOUZA, M.s.t.; MENEZES, J.e.s.a.; TREVISAN, M.t.s.. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 575-582, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722013000400014>.

NARAYAN, M.S.; AKHILENDER NAIDU, K.; RAVISHANKAR, G.A., *et al.* **Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n.1, p. 1-4, 1999.

NOGUEIRA, M. F. et al. *Klebsiella pneumoniae* prevents spore germination and hyphal development of *Aspergillus* species. **natureresearch journal**. Vienna, Austria, p. 1-2. 18 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-36524-8>>. Acesso em: 14 abr. 2019.

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

OLIVEIRA, D. S. Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos. 150f. 2014. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 2014.

OLIVEIRA, G.I.s.. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. : estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 36-44, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/12_165.

OLIVEIRA, Vanessa Patrocínio de et al. Flavonóides e doenças cardiovasculares: Ação antioxidante. **Revista Médica de Minas Gerais**, Minas Gerais, v. 4, n. 16, p. 234-237, 2016. Disponível em: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/580>. Acesso em: 06 maio 2020.

OLIVEIRA, V.B. et al . Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 18, n. 1, supl. 1, p. 230-239, 2016 Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722016000500230&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 22 ago. 2020. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106

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

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Conceptof stadardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of pharmacy phytochemitry*. v. 2, n. 5, p. 115-9, 2014. Disponível em: <http://www.phytojournal.com/vol2Issue5/11.1.html>. Acesso 13 julho 2020.

PIRES, Janaína Santos *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 23 ago. 2020. DOI 10.13140/RG.2.2.29127.80809. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324452676_Ensaio_em_microplaca_de_substancias_redutoras_pelo_metodo_do_Folin-Ciocalteu_para_extratos_de_algas?channel=doi&linkId=5ace3990aca2723a3341d6fb&showFulltext=true. Acesso em: 22 ago. 2020.

REIS, Gustavo Oliveira dos. **Estudo do efeito anti-inflamatório da *croton antispyhiliticus* mart. (euphorbiaceae) no modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.** 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Médicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/101061/317531.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 11 abr. 2019

REZENDE, Fernanda *et al.* Espécies reativas de oxigênio em plantas. **VI Botânica no inverno** : Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas, São Paulo, v. 5, 5. ed. p. 94-96, 20 jun. 2016. VI botânica de inverno 2016 São Paulo.

RODRIGUES, V.E.G; CARVALHO, D.A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio Cerrado na Região do Alto Rio Grande-Minas Gerais, Brasil. *Ciênc. Agrotec*, v. 25, n.1, p. 102-123, jan/fev., 2001.

ROCKENBACH, Ismael Ivan *et al.* Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, supl. p. 238-244, Dec. 2008. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000500036&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Aug. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000500036>.

SANTOS, Cleia T. *et al.* **FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONOÍDES TOTAIS DE EXTRATOS OBTIDOS DOS CAULES DE [I]CROTON LINEARIFOLIUS[I] (EUPHORBIACEAE).** 2018. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/7/1682-26583.html>. Acesso em: 04 maio 2020.

Santos, R. I. (2001). **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários.** In: Simões, C. M. O *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed.Universidade/UFRGS/Ed.UFSC.

SAUDE, Organização Mundial da (Ed.). **Resistência a antimicrobianos.** 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>>. Acesso em: 05 abr. 2019.

SILVA, Leomara Andrade da; RAPOSO, Juliana Divina Almeida; CAMPOS, Laila Portil Garcino; CONCEIÇÃO, Edemilson Cardoso da; OLIVEIRA, Ricardo Bezerra de; MOURÃO, Rosa Helena Veras. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 117-119, 2018. Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20180011>.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias.** Londrina, p. 669-682. 7 abr. 2010.

SILVA, Sarah Caroline de Souza; ALVES, Mônica Alcântara; SOUSA, Sabrina Araujo de; NOGUEIRA, José Ribamar de Souza; MARTINS, Diegue Henrique Nascimento; FONSECA-BAZZO, Yris Maria; GALDOS-RIVEROS, Alvaro Carlos. PERFIL FITOQUÍMICO, SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA E CAPACIDADE

ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 264-268, 25 set. 2017. Conselho Federal de Farmácia. <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v29.e3.a2017.pp264-270>.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007.

SOARES, Marcia; WELTER, Lucas; KUSKOSKI, Eugenia Marta; GONZAGA, Luciano; FETT, Roseane. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 59-64, mar. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452008000100013>.

TAVARES, Walter. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 745 p.

THOMAS, Gareth. **Química medicinal: Uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.a, 2003. 405 p. Tradução de Franklin David Rumjanek.

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

TRINDADE, Maria Trindade. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, [Sl], v. 19, n. 4 de janeiro 2015. ISSN 1028-4796. Disponível em: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/113/105> . Data de acesso: 29 de junho 2020

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, Washington, v. 812, p. 85-99, 2004

VANDAMME, E. J.; REVUELTA, J. L. (EDS.). **Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CANEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Maringá, v. 13, supl. 1, p. 64 - 66, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2003000300024;script=sci_arttext>. Acesso em: 12 out. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300024>

VIVEK-ANANTH, R. P. et al. Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Nature research Journal**. Chennai, India, p. 1-2. 26 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-25016-4#Abs1>>. Acesso em: 13 abr. 2019.

VIZZOTTO, Márcia et al. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância**. 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44093/1/documento-316.pdf>. Acesso em: 14 maio 2020.

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