

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
DO AMBIENTE**

CLAUDIANE LIMA RIBEIRO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS  
DE *Virola sebifera* (Aubl.)**

PALMAS-TO  
2020

CLAUDIANE LIMA RIBEIRO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS  
DE *Virola sebifera* (Aubl.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisandra Scapin.

Linha de Pesquisa: Biodiversidade e Recursos Naturais

PALMAS-TO  
2020

CLAUDIANE LIMA RIBEIRO

**ANÁLISE FITOQUÍMICA, TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS  
DE *Virola sebifera* (Aublet)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.



---

Professora Dr<sup>a</sup> Elisandra Scapim  
Orientadora – Universidade Federal do Tocantins



---

Professor Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento  
Universidade Federal do Tocantins



---

Professora Dr<sup>a</sup>. Carla Simone Seibert  
Universidade Federal do Tocantins

## Dedicatória

De maneira especial, dedico esta obra aos meus pais Aldenora e José, ao meu filho Tomás e meu esposo Márcio por estarem sempre ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida em todos os momentos me dando força e coragem para superar todos os desafios, sendo, sempre, meu porto seguro.

Aos meus pais, José e Aldenora, e aos meus irmãos Carliane, José Carlos, Maria Cristiane pelo apoio, estímulo e amparo nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Márcio de Jesus da Conceição pelo amor, apoio e confiança depositada em mim durante todo esse tempo de pós-graduação distante.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Elisandra Scapin, pelo acolhimento, paciência, por ser minha mestra e dividir comigo seus conhecimentos durante essa caminhada.

À técnica do laboratório de química Me. Rachel Nunes pela disponibilidade e auxílio na realização deste trabalho e pela amizade.

A todos os colegas do Mestrado em Ciências do Ambiente pelos momentos agradáveis de convivência.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente e seu corpo docente, pela contribuição e responsabilidade pela minha formação, em especial aos professores da banca Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento, Dr<sup>a</sup> Carla Simone Seibert e Dr<sup>a</sup> Adriana Malvásio por participarem da realização desse trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Juliana Fonseca Moreira da Silva do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada pela disponibilidade, acolhimento e ensinamentos repassados.

Ao Instituto Federal do Maranhão (IFMA) do qual eu tenho orgulho de fazer parte.

A todos que participaram de forma direta ou indireta nesses dois anos de mestrado me apoiando e incentivando para realização desse sonho.

A todos meus sinceros agradecimentos.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

## RESUMO

O cerrado é rico em plantas medicinais em razão de suas características morfológicas, apresentando constituintes químicos diversificados com potenciais biológicos. Porém, estudos com espécies medicinais do cerrado no estado do Tocantins, Brasil, ainda são escassos. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo contribuir com a ampliação do conhecimento químico e biológico da espécie *Virola sebifera*, coletadas no estado do Tocantins. A *V. sebifera*, conhecida popularmente como mucuíba, é uma espécie típica do cerrado, utilizada na medicina popular por suas propriedades medicinais. Os extratos obtidos pelos métodos à quente (soxhlet) e à frio (ultrassom) utilizando os solventes hexano, metanol e etanol foram submetidos a triagem fitoquímica e caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus epidermidis* (NEWP 0128) e *Salmonella typhimurium* (NEWP 0028) pelo método de difusão em poço e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de DPPH, determinação dos fenólicos totais e flavonoides totais e a toxicidade foi avaliada pelo modelo de *Allium cepa* e pelo ensaio de fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE). A triagem fitoquímica evidenciou a presença de classes de compostos fenólicos como taninos, flavonoides, antraquinonas e alcaloides, e a CLAE identificou catequina, ácido siríngico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, naringina, rutina, hesperidina, morina e quercetina. A CG/EM identificou compostos fenólicos, lignanas, cetonas, aminoácidos, éteres e aminas. Todos os extratos apresentaram resultados satisfatórios para a atividade antioxidante, com destaque para o extrato hidroalcoólico que apresentou um valor de  $IC_{50} = 26,46 \pm 0,58 \mu\text{g/ml}$ , próximo ao padrão rutina. Nos bioensaios antimicrobianos os extratos foram sensíveis à *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Salmonella*. O ensaio toxicológico revelou que os extratos induziram inibição no sistema radicular da *A. cepa* e que não houve atividade tóxica com os eritrócitos. Portanto os constituintes químicos encontrados na *V. sebifera* direcionam para estudos futuros sobre seu potencial bioativo que justifiquem as indicações terapêuticas empíricas.

**Palavras-chave:** mucuíba, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, toxicidade, caracterização química.

## ABSTRACT

The cerrado is rich in medicinal plants due to its morphological characteristics, presenting diversified chemical constituents with biological potentials. However, studies with medicinal species from the Cerrado in the state of Tocantins, Brazil, are still scarce. In this context, this study aimed to contribute to the expansion of chemical and biological knowledge of the species *Virola sebifera*, collected in the state of Tocantins. The *V. sebifera*, popularly known as mucuíba, is a typical species of the cerrado, used in folk medicine for its medicinal properties. The extracts obtained by hot (soxhlet) and cold (ultrasound) methods using hexane, methanol and ethanol solvents were submitted to phytochemical screening and characterized by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). Antimicrobial activity was assessed using strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus epidermidis* (NEWP 0128) and *Salmonella typhimurium* (NEWP 0028) using the well diffusion method minimum inhibitory concentration (MIC). The antioxidant activity was evaluated by the DPPH method, determination of total phenolics and total flavonoids and toxicity was assessed by the *Allium cepa* model and by the erythrocyte osmotic fragility test (EOF). Phytochemical screening showed the presence of classes of phenolic compounds such as tannins, flavonoids, anthraquinones and alkaloids, and HPLC identified catechin, syringic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, rosmarinic acid, naringin, rutin, hesperidin, morin and quercetin. The GC/MS identified phenolic compounds, lignans, furan, amino acids, ether, aldehyde. All extracts showed satisfactory results for antioxidant activity, with emphasis on the hydroalcoholic extract, which presented an IC<sub>50</sub> value = 26,46 ± 0,58 µg/ml, close to the rutin standard. In the antimicrobial bioassays the extracts were sensitive to *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Salmonella*. The toxicological test revealed that the extracts induced inhibition in the root system of *A. cepa* and that there was no toxic activity with the erythrocytes. Therefore, the chemical constituents found in *V. sebifera* direct to future studies on its bioactive potential that justify the empirical therapeutic indications.

**Keywords:** mucuíba, antioxidant activity, antimicrobial activity, toxicity, phytochemical screening.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CG/EM	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAT	Equivalentes de ácido tânico
ER	Equivalentes de rutina
FOE	Fragilidade osmótica eritrocitária
g	Grama
ml	Mililitro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
p/v	Peso por volume
R	Marca registrada
R <sup>2</sup>	Coefficiente de linearidade
SUS	Sistema Único de Saúde
UFT	Universidade Federal do Tocantins
UV-Vis	Ultravioleta e visível
v/v	Volume por volume
µg/ml	Micrograma por mililitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. ....	23
<b>Figura 2</b> - Árvore (A), folha e fruto (B) da espécie <i>Virola sebifera</i> .....	35
<b>Figura 3</b> - Extração dos metabólitos secundários das folhas de <i>V. sebifera</i> . (A) método a quente (soxhlet) e (B) método a frio (ultrassom). ....	36
<b>Figura 4</b> - Fluxograma da obtenção dos extratos das folhas de <i>V. sebifera</i> . ....	37
<b>Figura 5</b> - Curva de calibração dos padrões ácido tânico (A) e rutina (B). ....	49
<b>Figura 6</b> - Atividade antioxidante dos extratos medidas no ensaio DPPH, em três concentrações diferentes (30, 60 e 120 µg/ml). Os valores representam a porcentagem da eliminação de radicais. EBU: extrato bruto, etanol 70%, Ultrassom; EB: extrato bruto, Etanol 70%, Soxhlet; EH: extrato hexânico, Soxhlet, EM: extrato metanólico, Soxhlet e EE: hidroetanólico, Soxhlet.....	51
<b>Figura 7</b> - Perfil cromatográfico via CLAE dos extratos da folha de <i>V. sebifera</i> , detectados a 280 nm. EBU extrato obtido pelo método a frio (Ultrassom); EB, EH, EM e EE extratos obtidos pelo método a quente (Soxhlet). Pico 1: catequina, Pico 2: ácido siríngico, Pico 3: ácido clorogênico, Pico 4: ácido <i>p</i> -cumárico, Pico 5: naringina, Pico 6: rutina, Pico 7: hesperidina, Pico 8: morina, Pico 9: ácido rosmarínico e Pico 10: quercetina.....	55
<b>Figura 8</b> - CG/EM do extrato bruto etanólico EBU das folhas de <i>V. sebifera</i> obtido pelo método de extração a frio, em Ultrassom. ....	57
<b>Figura 9</b> - CG/EM do extrato bruto etanólico EB das folhas de <i>V. sebifera</i> obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet. ....	58
<b>Figura 10</b> - CG/EM do extrato hexânico EH das folhas de <i>V. sebifera</i> obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.....	59
<b>Figura 11</b> - CG/EM do extrato metanólico EM das folhas de <i>V. sebifera</i> obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet. ....	60
<b>Figura 12</b> - CG/EM do extrato etanólico EE das folhas de <i>V. sebifera</i> obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.....	61
<b>Figura 13</b> - Testes de toxicidade dos extratos EBU no Ultrassom e dos extratos EB, EH, EM e EE no soxhlet da <i>V. sebifera</i> frente à raiz da <i>Allium cepa</i> .....	64
<b>Figura 14</b> - Teste de fragilidade osmótica em amostras de sangue tratadas e não tratadas com extratos das folhas de <i>V. sebifera</i> obtidos pela extração a frio EBU e extração a quente EB, EH, EM e EE nas concentrações 2,5%, 5% e 15% em diferentes concentrações (0,12%, 0,24%, 0,48%, 0,60%, 0,72% e 0,9%) de NaCl. ....	67

**Figura 15** - Imagem microscópica do esfregaço sanguíneo, coradas com o Leishman, demonstrando a morfologia da membrana celular, após contato com os extratos pelo método a frio EBU e a quente EB, EH, EM e EE das folhas de *V. sebifera*..... 69

**Figura 16** - Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* do extrato etanólico bruto EBU obtido pelo método a frio da *V. sebifera*, micro-organismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubas a 37°C por 24 horas. .... 71

**Figura 17** - Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* (C) *Salmonella* do extrato etanólico bruto EB obtido pelo método a quente das folhas da *V. sebifera*, micro-organismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubas a 37°C por 24 horas..... 71

**Figura 18** - Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* (C) *Salmonella* do extrato metanólico EM obtido pelo método a quente das folhas *V. sebifera*, micro-organismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubas a 37°C por 24 horas..... 72

**Figura 19** - Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* do extrato etanólico EE obtido pelo método a quente das folhas da *V. sebifera*, micro-organismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubas a 37°C por 24 horas. .... 72

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Prospecção fitoquímica dos diferentes extratos das folhas de *Virola sebifera* obtidos pelo método de Ultrassom assistida EBU (extrato etanólico 70%) e no soxhlet EB (Extração Etanol 70%), EH (Extração Hexano), EM (Extração Metanol), EE (Extração Etanol 70%). .....47
- Tabela 2** - Valores médios e desvio padrão dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais, expresso como miligramas de equivalente de ácido tânico (mg EAT/g) e equivalente de rutina (mg ER/g) dos extratos da espécie *V. sebifera* .....49
- Tabela 3** - Valores médios e desvio padrão da concentração eficiente necessária para reduzir a absorbância do DPPH em 50 % dos extratos de *V. sebifera*. Resultados expressos em µg/mL. ....51
- Tabela 4** - Compostos fenólicos identificados por CLAE nos extratos da folha de *V. sebifera*. .....53
- Tabela 5** - Composição química do extrato bruto etanólico EBU das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a frio em Ultrassom.....58
- Tabela 6** - Composição química do extrato bruto etanólico EB das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.....59
- Tabela 7** - Composição química do extrato hexânico EH das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.....60
- Tabela 8** - Composição química do extrato metanólico EM das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.....61
- Tabela 9** - Composição química do extrato etanólico EE das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.....62
- Tabela 10** - Atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *V. sebifera* pelo método a frio EBU e a quente EB, EH, EM e EE frente aos micro-organismos *S. aureus*, *Salmonella*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans* pela técnica difusão em poço. ....70
- Tabela 11** - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os extratos das folhas de *V. sebifera*, pelo método a frio EBU e a quente EB, EH, EM e EE.....71

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Plantas medicinais .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Cerrado.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Metabólitos secundários.....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Compostos fenólicos .....	24
3.3.2 Flavonoides.....	25
3.3.3 Taninos .....	25
3.3.4 Alcaloides .....	26
3.3.5 Antraquinonas.....	27
<b>3.4 <i>Viola sebifera</i> (Aubl.) .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5 Atividade antioxidante .....</b>	<b>30</b>
<b>3.6 Atividade citotóxica .....</b>	<b>31</b>
<b>3.7 Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>32</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Material Vegetal .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Preparação dos extratos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Triagem Fitoquímica.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Determinação do teor total de compostos fenólicos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Determinação do teor total de flavonoides.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6 Avaliação da atividade antioxidante .....</b>	<b>40</b>
<b>4.7 Caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</b>	<b>41</b>
<b>4.8 Caracterização por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM).....</b>	<b>42</b>
<b>4.9 Ensaios Toxicológicos .....</b>	<b>42</b>
4.9.1 Teste em Raiz <i>Allium Cepa</i> .....	42
4.9.2 Teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE).....	43
<b>4.10 Atividade Antimicrobiana .....</b>	<b>43</b>

4.10.1	Preparo e padronização da suspensão bacteriana e leveduriforme.....	44
4.10.2	Teste de difusão em poço .....	44
4.10.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)- Técnica de Microdiluição em Caldo.....	45
<b>4.11</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Triagem Fitoquímica Preliminar .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação da atividade Antioxidante .....</b>	<b>50</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise por CLAE .....</b>	<b>53</b>
<b>5.5</b>	<b>Análise por CG/EM.....</b>	<b>57</b>
<b>5.6</b>	<b>Teste em Raiz <i>Allium Cepa</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>5.7</b>	<b>Teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) .....</b>	<b>65</b>
<b>5.8</b>	<b>Atividade Antimicrobiana .....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas sempre tiveram grande importância em meio às práticas difundidas pela cultura popular. A tradição do uso de plantas medicinais é bastante divulgada nos países em desenvolvimento, devido à facilidade de aquisição, e muitas vezes, por serem o único recurso terapêutico de muitas comunidades (AMOROZO, 2002; CALIXTO, 2000; LEÃO; FERREIRA; JARDIM, 2007; MACIEL *et al.*, 2002; SOUZA; FELFILI, 2006; VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O potencial terapêutico das plantas medicinais, perpetuado ao longo das gerações, é justificado pela presença de componentes bioativos que apresentam muitas atividades biológicas comprovadas (BADKE *et al.*, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013; FIRMO *et al.*, 2011). A investigação fitoquímica tem por objetivo verificar a presença de grupos de metabólitos secundários, estudar a caracterização estrutural, avaliar as propriedades e investigar a biossíntese de compostos naturais (BRAZ FILHO, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2017).

Um dos efeitos terapêuticos dos metabólitos secundários de elevada importância é a atividade antioxidante. Esta atividade protege o organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças (OLIVEIRA, 2015). Os compostos fenólicos e flavonoides estão diretamente relacionados com o potencial antioxidante das plantas (ANDRADE *et al.*, 2007).

Outra atividade biológica de interesse farmacêutico é a antimicrobiana. A busca por antimicrobianos de origem vegetal avançou devido à preocupação com a resistência microbiana confirmada nos últimos anos (ALTANLAR, 2003; BARTZ, 2011; GERMANO; GERMANO, 2011; WILLIAMS; HEYAMN, 1998; SILVA *et al.*, 2010; TONDO; CITOGLU; HAMILL *et al.*, 2003).

Apesar do uso tradicional de plantas medicinais, visando garantir a segurança do uso de quaisquer espécies, são necessários testes de toxicidade, utilizando bioindicadores como bactérias, microcrustáceos, insetos e vegetais, para avaliar os efeitos prejudiciais das substâncias químicas das plantas ao organismo vivo (LESSA *et al.*, 2017), como é o caso da *Allium cepa*. Outro teste bastante utilizado é o da fragilidade osmótica que avalia ação da droga em membranas de células sanguíneas quando expostas ao estresse osmótico (ALDRICH; SAUNDERS, 2001; MOUSINHO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2007).

A crença da população no potencial terapêutico das plantas medicinais é evidente. Nos últimos anos, tem aumentado o interesse no aproveitamento de fontes naturais, principalmente, no que se refere às plantas para o uso farmacêutico, sendo que, na última década houve um significativo crescimento no uso de medicamentos fitoterápicos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Diversos foram os fatores que contribuíram para o crescimento do mercado de fitoterápicos, desde a falta de acesso aos medicamentos sintéticos, preços relativamente altos dos que estão disponíveis no mercado e até a baixa disponibilidade de medicamentos distribuídos pela rede pública. Cita-se também a crença de que remédios naturais são inócuos, mais baratos e menos tóxicos. Outro fator muito importante, a pesquisa científica, dedicada aos estudos de plantas medicinais, pode produzir resultados que irão melhorar a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos (CAPASSO *et al.*, 2000; CALIXTO, 2000; VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2016).

O Ministério da Saúde disponibiliza opções terapêuticas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), através da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, implantada por meio do Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que tem como objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS, 2006).

Tendo o Brasil a maior biodiversidade mundial, cerca de 20% do número total de espécies do planeta, é de se esperar que essa diversidade tenha um valor econômico estratégico em vários setores, mas é no campo dos fitomedicamentos onde está sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003). No entanto, somente 71 espécies estão na lista de Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (MS, 2009). Já as patentes depositadas por pesquisadores e indústrias farmacêuticas nacionais, na área de plantas medicinais, são ínfimas (CALIXTO, 2003).

Isto pode ser resultado de vários fatores, como a falta de incentivo às pesquisas e à inovação tecnológica, à inexistência de estudos organizados e integrados, aliados à ausência de uma política governamental atuante (FIRMINO; BINSFELD, 2013), sendo indispensável uma maior integração entre governo, centros de pesquisas e indústrias farmacêuticas, para o aproveitamento sustentável da biodiversidade, visando a produção de fitomedicamentos (CALIXTO, 2003).

Um dos biomas brasileiros, o bioma Cerrado, é considerado um *hotspot* de biodiversidade (MEYERS *et al.*, 2000) qualificando o mesmo como a savana mais rica do mundo, onde 44% dessa flora é endêmica, além de deter cerca de 5% da biodiversidade do planeta (KLINK; MACHADO, 2005; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA, 2009; RODON NETO *et al.*, 2010; SANTOS; NOVAK, 2013).

O cerrado é rico em plantas medicinais em razão de suas características morfológicas, que acumulam reservas de substâncias bioativas, sendo uma fonte riquíssima de moléculas das diferentes classes de metabólitos secundários (BOLZANI *et al.*, 2016; SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

O cerrado também tem uma grande importância social, sendo que muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais dentre elas etnias indígenas, quilombolas e ribeirinhos (MMA, 2007), que detém o conhecimento tradicional das potencialidades alimentares, medicinais e artesanais das espécies nativas do Cerrado. O conhecimento dessas populações tradicionais é uma ferramenta para a preservação da cultura, dos modos de vida tradicionais e da biodiversidade do Cerrado (RIGONATO; ALMEIDA, 2003). Neste sentido, o estudo da química de produtos naturais é um forte argumento conservacionista pela preservação dos ecossistemas (ELISABETSKY; SOUZA, 2010).

Em função da grande diversidade vegetal e características morfológicas das espécies desse bioma, é de se esperar que seus constituintes químicos sejam diversificados e com enormes potenciais biológicos. No entanto, até hoje, ainda tão pouco explorados (BOLZANI *et al.*, 2016) e com o agravante de ser uma flora comprometida em função do desmatamento, avanço da fronteira agrícola levando a perda dessa biodiversidade medicinal (BESSA *et al.*, 2013; PAIVA; REZENDE; PEREIRA, 2011). A perda da biodiversidade e do saber tradicional associado a ela, acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber (ELISABETSKY; SOUZA, 2010). Isto legitima a necessidade de pesquisas com plantas medicinais, aproximando o saber popular do saber científico, contribuindo para melhorar o uso dos recursos vegetais pela população local (BADKE *et al.*, 2012).

O Estado do Tocantins encontra-se na zona de transição geográfica entre o cerrado e a floresta amazônica, onde 91% do território é ocupado pelo Bioma Cerrado (SILVA, L., 2007).

Diversas espécies do cerrado, de uso popular local, são utilizadas por suas propriedades medicinais (AQUINO; OLIVEIRA, 2006) e dentre elas destaca-se a *Virola sebifera* (Aubl.), conhecida popularmente como mucuíba, ucuíba, bicuíba (RODRIGUES, 1980). A *V. sebifera* é uma espécie da família Myristicaceae que ocorre nos cerrados da América Central e do Sul (DENNY *et al.*, 2007).

As indicações terapêuticas populares dessa espécie são para furúnculo, gastrite, desordens intestinais, cólicas, dispepsia, tumor artrítico, dor reumática e infecções (BREITBACH *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2008; FENNER *et al.*, 2006). Estudos descrevem a utilização de diversas formas extrativas da *V. sebifera* e seus metabólitos secundários como lignanas, neolignanas, flavonoides, policetídeos e outros (BICALHO, 2011; DENNY *et al.*, 2008; HARROWEN *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 1985; MARTINEZ, 1999). E as atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa e inseticida (BARRETO *et al.*, 2011; BICALHO *et al.*, 2012; DENNY *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010; REZENDE *et al.*, 2005).

No entanto, cabe ressaltar a necessidade, sempre, pela busca de novas moléculas bioativas com ação biológica. As pesquisas encontradas na literatura com a *V. sebifera* no Brasil, se concentram nas regiões de São Paulo, Goiás e Belém e, segundo Bessa *et al.* (2013), os metabólitos secundários podem apresentar, para a mesma planta, alterações a partir das diferenças ambientais como solo, condições climáticas, índice pluviométrico.

Ainda são escassos os relatos descritos na literatura dos constituintes químicos e atividades biológicas com a *V. sebifera* no Estado do Tocantins e a necessidade de estudos neste sentido se concentra não apenas, na falta de dados químicos e biológicos da espécie no cerrado tocantinense, mas também pelo vasto uso da mesma pela população. Portanto o presente trabalho investiga as principais classes de metabólitos secundários, a atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *V. sebifera* a fim de validar as indicações terapêuticas empíricas referentes a esta planta.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento químico e biológico da espécie *Virola sebifera*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos de *V. sebifera* para identificar as principais classes de metabólitos secundários;

- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *V. sebifera*;

- Realizar a identificação dos principais compostos químicos presentes nos extratos da *V. sebifera* usando os métodos cromatográficos de análises.

- Determinar a toxicidade dos extratos de *V. sebifera* frente à *Allium cepa* e a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE);

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *V. sebifera* e obter a concentração inibitória mínima (CIM).

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Plantas medicinais

Registros datados de 500 a.C. por civilizações como Egito, Grécia, China demonstram que a procura pelos recursos terapêuticos para o tratamento de doenças concentravam-se nos recursos da natureza, principalmente nas plantas (ALVES, 2013; CALIXTO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008; FIRMO *et al.*, 2011). No entanto, foi somente no século XIX que começaram as buscas por constituintes ativos em plantas medicinais para produção de medicamentos (DUTRA *et al.*, 2016).

A literatura científica tem mostrado vários relatos sobre a história do uso de plantas medicinais para a cura, prevenção e tratamento de doenças (CARNEIRO, 2011; CRAGG; NEWMAN, 2013; CRAGG *et al.*, 2014; FIRMO *et al.*, 2011; LORENZI; MATOS, 2008; PINTO *et al.*, 2002; SCHENKEL *et al.*, 2010). As plantas medicinais são uma fonte de criação para a medicina tradicional há séculos e muitos foram os fármacos oriundos de produtos naturais (AVANCINI *et al.*, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2004; OLIVEIRA, 2016). Como exemplos têm-se os fármacos salicina (1827), morfina (1832), codeína (1848), efedrina (1887) dentre outros, obtidos fundamentalmente de plantas medicinais no século XIX (YUNES; FILHO, 2016).

O conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos diferentes grupos étnicos, trouxe contribuições importantes para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Cerca de 74% dos produtos naturais, obtidos de plantas, foram descobertos através da orientação de estudos etnofarmacológicos (BRAZ FILHO, 2010). Inicialmente as plantas foram usadas na sua forma natural (chás, emplastos e outros) e no início do século XIX foram fontes de matérias-primas para a síntese de fármacos e atualmente são peças-chave para as descobertas de protótipos para o desenvolvimento de medicamentos (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2016).

O Brasil é detentor de uma diversidade biológica extremamente rica, com um potencial único e uma incomparável fonte de novos quimiotipos e fármacos (CRAGG; NEWMAN, 2016). O mercado brasileiro de fitoterápicos, representou cerca de 261 milhões de dólares americanos em 2014, sendo considerado, ainda, muito modesto. Isso representa menos de 5% do mercado mundial de medicamentos brasileiros, estimados em 28 bilhões de

dólares (DUTRA *et al.*, 2016). Com isso pesquisas para a descoberta de fármacos e fitofármacos propiciam avanços na pesquisa básica multidisciplinar e para o desenvolvimento tecnológico nacional, principalmente porque a diversidade dos biomas brasileiros ainda é pouco explorada como fonte de substâncias ativas de interesse farmacológico (BARREIRO, BOLZANI, 2009).

Mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais continuaram como fonte alternativa de tratamento (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Existe, atualmente, uma tendência mundial crescente de revalorização dos remédios baseados em recursos naturais, isto, deve-se a crença de que remédios naturais são mais baratos, menos tóxicos e com menos efeitos colaterais (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2016). Estima-se que cerca de 40% dos medicamentos desenvolvidos de fontes naturais, 25% são de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. E que em média 70% dos fármacos derivados a partir da natureza são anti-infecciosos e anticancerígenos (CALIXTO, 2003; NEWMAN *et al.*, 2003).

Segundo Firmino e Binsfeld (2013), a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que é necessário resgatar as práticas tradicionais e populares de uso das plantas medicinais para a promoção da saúde.

E do ponto de vista ecológico, o estudo da química de produtos naturais é um forte argumento conservacionista pela preservação dos ecossistemas. Do ponto de vista social, a preservação de plantas medicinais e o saber a elas associado, inclui atividades econômicas ligadas ao plantio à comercialização, novos modelos para a síntese de fármacos, conservação de recursos genéticos como fonte potencial de fármacos para doenças ainda desconhecidas e micro-organismos resistentes (ELISABETSKY; SOUZA, 2010).

A perda da biodiversidade, do saber tradicional associado a ela e o próprio processo de mudança cultural pelos povos tradicionais, resultam na perda de inúmeros produtos naturais completamente desconhecidos, com isso, acrescentando um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico (BOLZANI *et al.*, 2016; ELISABETSKY; SOUZA, 2010).

### **3.2 Cerrado**

O Cerrado, segundo maior bioma do país, perdendo somente para a Amazônia, ocupa 22% do território nacional, estando presente em parte nos estados do Goiás, Tocantins,

Maranhão, Bahia, Paraná, Rondônia, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e o Distrito Federal (MMA, 2007). As fitofisionomias no cerrado são a savana, predominantemente, formações florestais, arbustivas e herbáceas (SANO *et al.*, 2007).

Essas diferenças nas fitofisionomias do cerrado acontecem em função da sua relação com a fertilidade do solo, geomorfologia do relevo, nível do lençol freático (RIGONATO; ALMEIDA, 2003). Mecanismos de desenvolvimento radicular, ajustamento osmótico e alterações fenológicas contribuíram para a sobrevivência das espécies vegetais desse bioma (FURQUIM *et al.*, 2018). No decorrer da história evolutiva do bioma cerrado, as espécies se adaptaram à sazonalidade ao nível morfológico e fenológico, para garantir a sobrevivência e diversidade das espécies (MALHEIROS, 2016). Enquanto savana, a vegetação é adaptada a altas temperaturas, baixa umidade e menor disponibilidade de água, acumulando características peculiares e estratégias de adaptação a seca (FURQUIM *et al.*, 2018).

As plantas do cerrado na maioria são xeromórficas, caracterizadas por troncos tortuosos, baixo porte, casca espessa e suberosa, folhas grossas, coriáceas e pilosas, sendo adaptadas a três principais fatores: clima sazonal, inverno seco e verão chuvoso, solo arenoso, pobre em nutrientes, e resistente ao fogo (SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1981; MMA, 2011). O cerrado é o segundo bioma mais rico em biodiversidade, inclusive, em plantas medicinais, que em função de sua adaptação morfológica, as plantas conseguem acumular reservas de substâncias bioativas de interesse farmacológico, sendo uma fonte abundante de compostos das inúmeras classes de metabólitos secundários (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010; BOLZANI *et al.*, 2016). Elevadas concentrações de metabólitos secundários podem resultar em uma planta mais resistente às adversidades (MAZID *et al.*, 2011).

O cerrado, como foi visto, além da importância ambiental, também tem grande importância social, muitas populações sobrevivem de seus recursos naturais dentre elas etnias indígenas, quilombolas e ribeirinhos (MMA, 2007). Elas detêm o conhecimento tradicional das potencialidades alimentares, medicinais e artesanais das espécies nativas do Cerrado. O conhecimento dessas populações tradicionais é uma ferramenta para a preservação da cultura, dos modos de vidas tradicionais e da biodiversidade do Cerrado (RIGONATO; ALMEIDA, 2003).

O Estado do Tocantins encontra-se na zona de transição geográfica entre o cerrado e a floresta amazônica, onde o Bioma Amazônia ocupa cerca de 9% do território do Estado de Tocantins e o restante do território, 91%, é ocupado pelo Bioma Cerrado (SILVA, L., 2007).

Pesquisas em algumas regiões do cerrado tocantinense sobre plantas com fins terapêuticos apontaram algumas espécies utilizadas pela população no tratamento de enfermidades como a erva cidreira, hortelã, capim santo, erva doce, malva do reino, gengibre, boldo dentre outros (ARRAIAS *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2017; ROCHA-COELHO, 2009; SILVA; RORIZ; SANTOS, 2012; VALE *et al.*, 2015). Também há estudos com várias espécies como *Dipteryx alata*, *Ouratea spectabilis*, *Apuleia molaris*, *D. alata*, *Terminalia fagifolia*, *Eucalyptus globulus*, *Siparuna guianensis*, *Mauritia flexuosa* demonstrando atividades leishmanicida, antimicobacteriana, antitumoral, antifúngicas e antibacteriana, respectivamente (CARDOSO, 2017; CEZARI, 2010; LIMA, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SANTOS; CURSINO, 2012).

Estudos de plantas com finalidades terapêuticas, segundo indicação popular, reforçam a importância da preservação do bioma Cerrado diante da sua biodiversidade, porém as pesquisas com espécies desse bioma ainda são escassas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Nesse contexto tem-se a espécie *V. sebifera*, com raras pesquisas sobre seus constituintes químicos e suas atividades biológicas no cerrado tocantinense.

### 3.3 Metabólitos secundários

Denominam-se metabólitos primários os compostos envolvidos nas funções básicas essenciais da vida do vegetal tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos, já os metabólitos secundários, são específicos das espécies, atuam em processos de atração e defesa da planta, mantendo a sobrevivência nas condições ambientais favoráveis (BRAZ FILHO, 2010; PERES, 2004).

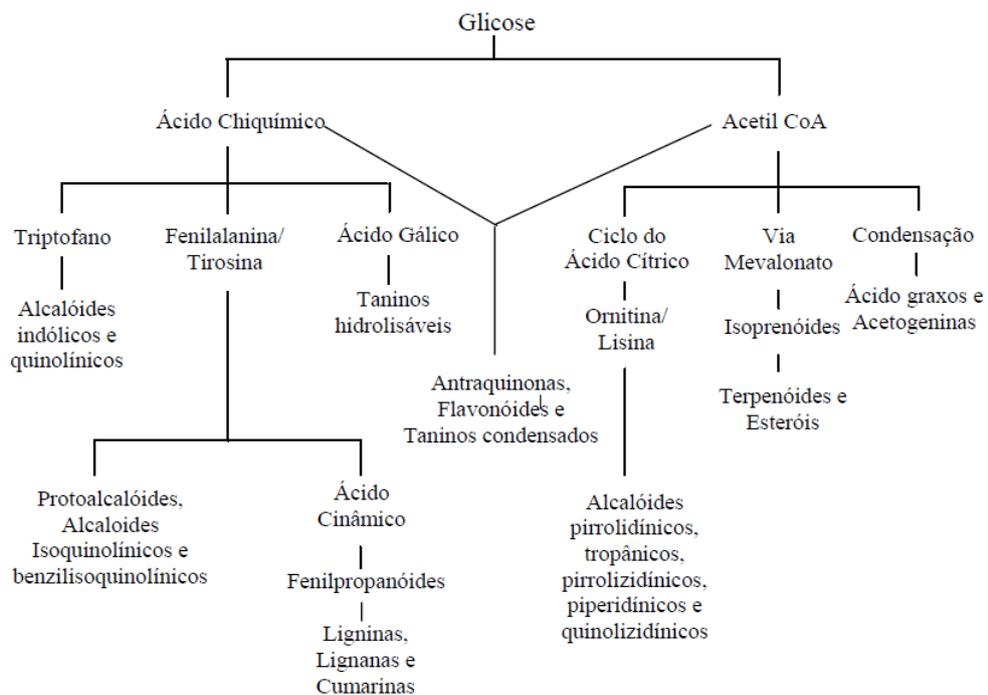
A produção de metabólitos secundários pelas plantas é influenciada por fatores intrínsecos e ambientais, uma vez que desempenham importante papel quanto à interação planta-ambiente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; ESQUINCA; MORENO, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2016). A função terapêutica correspondente a plantas medicinais baseia-se, principalmente, na presença de uma gama de metabólitos secundários (MACEDO *et al.*, 2007) que tem sido avaliado quanto a sua atividade farmacológica (SIMÕES *et al.*, 2017).

Uma das características inerentes aos metabólitos secundários é a adaptação a fatores bióticos e abióticos, sendo caracterizados como expressão da individualidade das espécies vegetais, encontrados apenas em alguns organismos ou grupos de organismos específicos,

sendo muitos deles marcadores taxonômicos de famílias e gêneros (GARCÍA, 2004; LEITE, 2009; REZENDE *et al.*, 2016; WINK; MOHAMED, 2003). Os metabólitos secundários também têm o papel de reprodução das plantas, determinam propriedades como sabor, cor e odor nos alimentos e possuem importantes atividades biológicas (GARCÍA; CARRIL, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Nas plantas, os metabólitos secundários, são armazenados em quantidades menores do que os metabólitos primários, sendo, às vezes, ativados nos processos de crescimento e desenvolvimento ou em momentos de estresse, ocasionados por restrições nutricionais ou ataque microbiológico. A sua biossíntese e armazenamento ocorrem em diferentes compartimentos da célula vegetal, o que muitas vezes dificultam sua extração e purificação (BERG; LUBERT, 2008; SANTOS, 2003; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ; PORTA-DUCOING; ROCHA-SOSA, 2003). Por isto, os metabólitos secundários cada vez mais vêm se tornando uma fonte de moléculas bioativas úteis para o homem, com um amplo interesse nos setores alimentícios, cosméticos e farmacológicos (CHAVES, 2012).

Os metabólitos secundários são sintetizados por quatro vias de biossíntese, através das quais são formados os três principais grupos de metabólitos secundários: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (REZENDE *et al.*, 2016). Sua origem pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via o ácido chiquímico e o acetato (SIMÕES *et al.*, 2010) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. **Fonte:** Santos (2010).

Os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados deles, terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos e o ácido chiquímico é precursor de cumarinas, taninos hidrolisáveis, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides (LEITE, 2009).

### 3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias com pelo menos um anel aromático com uma ou mais substituintes hidroxilas, são um grupo muito diversificado que varia de moléculas simples como os ácidos fenólicos a polímeros complexos como taninos e lignina (ANGELO; JORGE, 2007; GARCÍA; CARRIL, 2009; TORRAS-CLAVERIA *et al.*, 2012; REZENDE *et al.*, 2016). Podem ser sintetizados por vias distintas: a via do ácido chiquímico e a do acetato, derivados do metabolismo secundário de plantas (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os compostos de fenol são metabólitos secundários com importância fisiológica e metabólica considerável nas plantas (ABE *et al.*, 2010) e que se desenvolvem em situações de estresse (ANGELO; JORGE, 2007). São muitos estudados especialmente por apresentarem propriedades antioxidantes, ao que é atribuído a sua capacidade de quelar metais, inibir a lipoxigenase e eliminar os radicais livres, trazendo vários benefícios à saúde (DECKER, 1997; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; GRACE; LOGAN, 2000; SOARES, 2002; YANG *et al.*, 2001). Em função da elevada atividade antioxidante tem o poder de atuar sobre o estresse oxidativo relacionado a doenças como diabetes, câncer e processos inflamatórios (ATOUI; MANSOURI; BOSKOU, 2005; CARTEA *et al.*, 2011; GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011; SOARES *et al.*, 2008).

Diante desse cenário, ao longo dos anos, diversas pesquisas estão sendo realizadas para aproveitar a capacidade antioxidante de fontes naturais como os compostos fenólicos dos vegetais (SOARES *et al.*, 2014). Alguns estudos têm demonstrado evidências de que antioxidantes fenólicos existentes em frutas e vegetais, diminuem a incidência de doenças crônicas e degenerativas (BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010; RESTIVO *et al.*, 2014; ROESLER, 2007).

Os compostos fenólicos são divididos em flavonoides e não flavonoides. Os não flavonoides (ácidos fenólicos) são derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico, *p*-

cumárico, ferúlico, clorogênico, dentre outros) e do ácido hidroxibenzoico (ácido gálico, salicílico, elágico, entre outros) (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SOARES, 2002).

### 3.3.2 Flavonoides

Os flavonoides são polifenóis, amplamente distribuídos em muitas espécies vegetais, presentes em folhas, frutos, sementes e raízes das plantas (SIMÕES *et al.*, 2017), são substâncias compostas por um esqueleto de difenil propano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) com dois anéis aromáticos (ANGELO; JORGE 2007; BEHLING *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2015). São ácidos fracos, solúveis em metanol, etanol ou combinações de solventes com água, por possuir características polares (BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010). Classificam-se conforme suas estruturas químicas em: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas. Cerca de 10.000 estruturas de flavonoides já foram descobertas (AGATI *et al.*, 2012).

Os estudos já demonstraram que os efeitos farmacológicos e bioquímicos dos flavonoides são extensos: antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antimicrobiana, antivirais (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001; CLAVIN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2009). Dentre a variedade de atividades biológicas já confirmadas, está a capacidade de agir sobre a inflamação e sobre o sistema imunológico. Logo, os flavonoides representam uma opção promissora frente aos processos inflamatórios (COUTINHO *et al.*, 2009).

Estudos com espécies vegetais típicas do cerrado vêm sendo realizados objetivando a determinação do teor total de compostos fenólicos e o seu potencial antioxidante (ROESLER, 2007).

### 3.3.3 Taninos

Os taninos são polifenóis, classificados em taninos hidrolisáveis e condensáveis conforme a sua estrutura química (SILVA; ARMELIM; SILVA, 1999; SOARES, 2002; OSZMIANSKI, 2007). Os taninos hidrolisáveis são encontrados em abundância em folhas, frutos e vagens de dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, formados a partir da via do chiquimato (ZUANAZZI *et al.*, 2000). Os taninos condensados são encontrados em gimnospermas e angiospermas, sobretudo em plantas lenhosas e outras classes de vegetais,

derivados do metabolismo dos fenilpropanoides, com isso constituindo a segunda fonte de polifenóis em espécies vegetais, perdendo somente para a lignina (QUEIROZ *et al.*, 2002).

De acordo com Zuanazzi *et al.* (2000) os taninos têm sido estudados por acreditar que seu papel biológico esteja envolvido na defesa das plantas contra ataque de herbívoros e microrganismos patogênicos.

As atividades farmacológicas dos taninos são em função de algumas características como a habilidade de complexar com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a capacidade de complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos. Seu efeito sobre o processo de cura de feridas, queimaduras, úlceras pépticas está diretamente relacionado à formação do complexo tanino/proteína, que gera uma camada protetora sobre a área lesada, possibilitando que ocorra o processo fisiológico de cura (SANTOS; MELLO, 2010).

A concentração e o tipo de tanino vão depender da espécie vegetal e das condições ambientais, sendo geralmente maiores em solos pobres como o que ocorre em regiões tropicais (OTERO; HIDALGO, 2004). Ainda existe uma relação dependente entre radiação solar e produção de taninos, onde as concentrações são maiores nas partes vegetais expostas ao sol (HEIL *et al.*, 2002).

Plantas ricas em taninos são utilizadas no tratamento de diversas doenças, como diarreia, reumatismo, hemorragias, hipertensão arterial, problemas renais e doenças inflamatórias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (HASLAN, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2005; SANTOS; MELLO, 2010). Taninos têm propriedades antimicrobianas com ação inibidora de fungos filamentosos, leveduras e bactérias (COWAN, 1999). Estudos realizados com extratos ricos em taninos têm evidenciado ação bactericida, fungicida, antiviral, moluscicida, antitumoral, inibição da peroxidação de lipídeos, sequestrador de radicais livres (FONSECA; LIBRANDI, 2008; SANTOS; MELLO, 2010).

#### 3.3.4 Alcaloides

Os alcaloides são agrupados por apresentarem um caráter básico, conferido pela presença de um ou mais átomos de nitrogênio, dentro de um ou mais anéis heterocíclicos, derivados de aminoácidos (REZENDE *et al.*, 2016). Desde o início da civilização os alcaloides foram utilizados como medicamentos, venenos e em porções mágicas. Em função

do seu elevado número de atividades biológicas foram continuamente alvos de estudos (HENRIQUES *et al.*, 2010).

Cerca de 14% dos gêneros de plantas superiores possuem alcaloides e sua maior ocorrência são observadas nas angiospermas, mas também em microrganismos e animais marinhos. Podem ser encontrados em todas as partes da planta, com acúmulo em um ou mais órgãos, atuam como um mecanismo de defesa contra insetos em função do seu amargor e toxicidade (HENRIQUES *et al.*, 2010; KITTAKOOP; MAHIDOL; RUCHIRAWAT, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010). As maiores concentrações de alcaloides, nas plantas, foram encontradas nas células epidérmicas, onde a intensidade da luz é mais alta, absorvendo a radiação ultravioleta (CHÁVEZ; PLAZA; UGAZ, 1996).

Possui acentuado efeito no sistema nervoso, por isso é utilizado como veneno ou alucinógenos por populações indígenas (VIZZOTTO *et al.*, 2010). Em doses altas os alcaloides podem ser tóxicos, contudo, em doses baixas tem poder terapêutico (GARCÍA; CARRIL, 2009). Pesquisas evidenciaram ação vermífida, anestésica, hipertensiva e hipotensiva, antitumoral e de estimulantes do sistema nervoso central (TAN *et al.*, 2011; BESSA *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2014).

### 3.3.5 Antraquinonas

As antraquinonas são metabólitos de composição química formada a partir da via do ácido chiquímico e da via do acetato, fazem parte do grupo das quinonas. Sua ação terapêutica é laxativa. Provoca irritações no intestino grosso aumentando a motilidade. Este mecanismo está associado à liberação ou ao aumento da síntese de histamina e diminuição da reabsorção de água, sendo que isto acontece com a inativação da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (FERRO, 2006; ROSÁRIO; ALMEIDA, 2016).

As antraquinonas possuem atividades antibacterianas e antifúngicas, muito usadas na indústria farmacêutica (MALIK; MULLER, 2016). No campo industrial são utilizadas como corantes (ANDREI; BRAZ FILHO, 1989).

Tonial (2010) sugere que os efeitos antimicrobianos das substâncias associadas a aroeira podem estar vinculados as antraquinonas ou heterosídeos antraquinônicos, uma vez que foram identificados tanto nos extratos brutos como nas frações ativas.

### 3.4 *Viola sebifera* (Aubl.)

A espécie *V. sebifera* pertence à família Myristicaceae e ao gênero *Viola*. O interesse pela família Myristicaceae foi inspirado em sua etnofarmacologia, onde Gottlieb, em 1979, fez uma revisão descrevendo as pesquisas sobre essas plantas indicando a necessidade de estudos fitoquímicos e farmacológicos desta família (MARTINEZ, 2000). A família Myristicaceae é composta por 18 gêneros e aproximadamente 500 espécies, com uma vasta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, essa família é representada pelos gêneros *Compsonera*, *Iryanthera*, *Osteophloeum*, *Otoba* (syn. *Dialyanthera*) e *Viola*, que se concentram na região Amazônica (LOUREIRO *et al.*, 1989; MORAIS *et al.*, 2009; QUINTANILHA; LOBÃO, 2017).

Investigações fitoquímicas realizadas com a espécie Myristicaceae mostraram uma variedade de lignoides como as neolignanas ariltetralinas e ariltetralonas, e as neolignanas do tipo benzofurano, dihidrobenzofurano, tetrahydrofurano (MORAIS *et al.*, 2009; SALAZAR *et al.*, 2007). A ocorrência de flavonoides em sete gêneros de Myristicaceae sugere que essa classe de metabólitos é uma característica geral desta família (MARTINEZ, 2000).

Dentre os gêneros pertencentes a esta família, o com maior número de espécies é o *Viola* (RODRIGUES, 1980; ADRIANZÉN, 2015), que no Brasil possui as seguintes espécies: *Viola calophylla* var. *calophylloidea* (Mgf.) W. Rodr., *Viola duckei* A. C. Smith., *Viola elongata* (Benth.) Warb., *Viola mollissima* (Poepp. ex A. DC.) Warb., *Viola multinervia* Ducke, *Viola pavonis* (A. DC.) A. C. Smith., *Viola polyneura* W. Rodr., *Viola rugulosa* (Spruce) Warb., *Viola sebifera* (Aubl.), *Viola venosa* (Benth.) Warb., *Viola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb. (SARAIVA, 2012).

O termo virola, escolhido por Aublet, vem do nome vulgar de *Viola sebifera*, usado pelos índios Sinemari da Guiana Francesa. Sua distribuição vai da Guatemala e Antilhas Menores à Bolívia e Brasil Meridional (Rio Grande do Sul) e da costa ocidental da Colômbia e Equador ao Oceano Atlântico, no Brasil.

No Brasil as espécies de *Viola* são conhecidas por "ucuuba" na região amazônica, "urucuba" no nordeste, e "bicuiba" na região sul. Dentre as espécies mais conhecidas deste gênero estão a *V. surinamensis* e *V. sebifera* pela produção do "sebo de ucuúba", gordura proveniente das sementes destas espécies, que normalmente têm alto teor de ácido mirístico, explorado pela indústria cosmética para a produção de sabonetes e velas (LEITE; LLERAS, 1993; REZENDE *et al.*, 2005; RODRIGUES, 1980).

A *V. sebifera* é uma árvore de porte pequeno a grande, com até 30 m de altura, com tonalidade alaranjada de suas folhas e flores, conhecida popularmente como ucuúba ou pau de sebo. É uma espécie de formas muito variáveis dependendo da região que se encontra. No Brasil, caracteriza-se, por apresentar folhas grandes, nervuras secundárias espaçadas, tomentosa na parte inferior e os frutos são pilosos, com uma cápsula fibrosa com semente cinza envolta por um arilo vermelho (RODRIGUES, 1980; ARTEAGA, 2008).

Sua ocorrência no Brasil vai do Pará até São Paulo, sendo comum em Cerrados, Mata de Galeria, Mata Mesofíticas, e Savanas Amazônicas (LORENZI, 2000; MMA, 2011). Os meses entre fevereiro e maio se destacam pela floração e entre maio e outubro pela frutificação (LENZA; OLIVEIRA, 2006; RODRIGUES, 1980).

Rodrigues (1980); Bernal e Suárez (2007) destacam ainda que algumas espécies de ucuúba são úteis, na medicina popular, para a cura de reumatismo, artrite, cólicas, dispepsias, malária, dores musculares e erisipelas.

Diversos metabólitos secundários como ácidos graxos, alcaloides, flavonoides, lignoides, policetídeos dentre outros, foram isolados e identificados das sementes, folhas e cascas das espécies de *Virola* (GOTTLIEB, 1979; MARTINEZ *et al.*, 1999, 2000; BARATA *et al.*, 2000; REZENDE; KATO, 2002).

As espécies pertencentes ao gênero *Virola* apresentam lignoides com uma variedade de esqueletos de carbono (MORAIS *et al.*, 2009). Das folhas, frutos e sementes de *V. sebifera* já foram isolados lignanas e neolignanas (BAQUERO *et al.*, 2015; BICALHO, 2011; ENDERS *et al.*, 2005; HARROWEN *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 1985; LOPES; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1982, 1983, 1984a, 1984b; MARTINEZ *et al.*, 1999; REZENDE *et al.*, 2005). Martinez *et al.* (1999) identificaram a dibenzilbutirolactona e o dibenzilbutano como os principais compostos nas folhas. As lignanas dibenzilbutano e ariltetralona foram identificadas por Rezende e Kato (2002) a partir do extrato de sementes de *V. sebifera*.

Um estudo realizado com plântulas (sementes, folhas, epicótilos, hipocótilos e raízes) de *V. sebifera* isolou e identificou a lignana hidroxí-otobaina como composto majoritário nas mudas (DANELUTTE; CAVALHEIRO; KATO, 2000). A lignana do tipo furofurano foi isolada da casca e folhas de *V. sebifera* (MARTINEZ *et al.*, 1985).

Ainda existem relatos da presença de alcaloides na casca e folhas (DENNY *et al.*, 2007; KAWANISHI *et al.*, 1985), policetídeos (BICALHO, 2011; DENNY *et al.*, 2008; FERREIRA, 2009; KATO *et al.*, 1985; LOPES; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1982),  $\beta$ -sitosterol (KAWANISHI; HASHIMOTO, 1987), diarilpropano (VON ROTZ *et al.*, 1990). A maior parte

destes trabalhos foram produzidos no Brasil, oriundas das regiões de São Paulo, Belém, Goiás e a outra parte da Colômbia e Japão.

Conforme Saraiva *et al.* (2009), óleos e gorduras de espécies vegetais são constituídos (cerca de 95%) de uma mistura complexa de triacilgliceróis (TAG). A gordura da semente de ucuúba possui a composição TAG, derivados dos ácidos láurico (13 a 15%) e mirístico (64 a 73%). Nas sementes da espécie *V. sebifera* foram encontrados ácidos graxos e algumas lignanas, que podem ser usadas para fins de controle de qualidade e eficácia dos produtos cosméticos, conforme preconiza a Resolução - RDC n. 14/2010 - da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA (FUNASAKI *et al.*, 2016).

A casca de *V. sebifera* é usada na preparação de bebidas alcoólicas e bebidas alucinógenas na Venezuela (KAWANISH *et al.*, 1985) e sua resina é utilizada contra aftas, reumatismo, gripe, dor de dente, erisipelas. O sebo das amêndoas é usado contra cólicas, dispepsias e tumores artríticos (LOUREIRO *et al.*, 1989).

Segundo Carlos *et al.* (2017) o material vegetal, usado por formigas cortadeiras, é usado como substrato para o cultivo de fungos simbióticos e a quantidade de tricomas e a idade da folha podem influenciar na preferência das formigas cortadeiras. Em seu estudo ele mostrou que as preferências das formigas foram por folhas jovens com poucos tricomas. Isto se deve aos compostos químicos presentes em folhas jovens de *V. sebifera*.

O extrato metanólico das folhas de *V. sebifera* e suas frações hexânica, diclorometânica e aceto de etila apresentaram atividade inseticida frente às operárias de formigas cortadeiras e potencial fungicida de lignanas, principalmente, a lignana (-)-kusunokinina (100%) frente ao fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* (BICALHO *et al.*, 2012).

Resultados demonstram que a lignana grandisina, extraída da espécie *Virola Surinamensis*, possui atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (CARVALHO *et al.*, 2010). Algumas neolignanas isoladas de *V. surinamensis* e *V. pavonis* foram testadas *in vitro* apresentando atividade contra parasitas de *Leishmania donovani* (BARATA *et al.*, 2000).

### 3.5 Atividade antioxidante

A oxidação é uma ação vital do organismo, pois produz energia, no entanto, durante esse processo são originados os radicais livres, o que gera no organismo o estresse oxidativo, que é prejudicial às células (RIBEIRO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2017).

Os radicais livres são espécies químicas que contém um ou mais elétrons não pareados extremamente instáveis, podendo se ligar a qualquer outro elétron para obter estabilidade (ALI *et al.*, 2008). São formados naturalmente por processos biológicos no organismo humano ou por ação de fatores ambientais como tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).

O estresse oxidativo, causado pelo excesso de radicais livres, está associado ao envelhecimento, a doenças como câncer, cardíacas e degenerativas como Alzheimer (DIAZ *et al.*, 1997; SMITH, 2000; SILVA *et al.*, 2016; VINSON, 2001; WEISBURGER, 1999). A produção de radicais livres nos seres vivos é controlada por substâncias antioxidantes, neutralizando suas ações (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004) que podem ser procedentes da dieta alimentar e outras fontes ou de origem endógena (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Os antioxidantes agem em diferentes graus na proteção do organismo e podem atrasar ou inibir a oxidação lipídica, são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes externas, impedindo a formação de lesões e a perda da integridade celular (FUKUMOTO; MAZZA, 2000; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os antioxidantes mais comuns de fonte natural, entre os compostos fenólicos, são os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis (OLIVEIRA *et al.*, 2009). As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são fundamentais no equilíbrio oxidativo do corpo, fornecendo proteção contra oxidantes, reações oxidativas e espécies reativas (KALA *et al.*, 2016).

Vários são os métodos empregados para determinar a atividade antioxidante, sendo o mais usado o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). A quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante é representada pela porcentagem de atividade antioxidante (%AA), a concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) é a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, ou seja, quanto maior o consumo de DPPH menor será seu IC<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante (ARBOS; STEVANI; CASTANHA, 2013; SOARES, 2002).

### **3.6 Atividade citotóxica**

Diversos sintomas são tratados com o uso de plantas medicinais por muitas culturas, principalmente, em países em desenvolvimento. Essas plantas são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (BAGATINI; SILVA;

TEDESCO, 2007; MACIEL *et al.*, 2002; SOUZA; FELFILI, 2006). Entretanto, boa parte das plantas medicinais populares não tem sua eficácia comprovada cientificamente e podem até ser tóxicas (AURICCHIO; BACCHI, 2003), sendo comum a crença errônea de que os fitoterápicos, por serem provenientes de plantas, não representam quaisquer riscos à saúde (FRANCO *et al.*, 2011).

É também comum casos de ocorrência de intoxicação, não serem associadas a utilização de plantas medicinais (CAMPOS *et al.*, 2016) em função de que a maioria das plantas medicinais é auto-prescrita e que geralmente as pessoas não informam aos médicos o uso de medicamentos a base de plantas (CAPASSO *et al.*, 2000).

Para garantir o uso seguro das plantas medicinais são realizados testes de citotoxicidade e mutagenicidade utilizando bioindicadores como bactérias, microcrustáceos, insetos e vegetais como é o caso da *Allium cepa* (LESSA *et al.*, 2017). Os testes de citotoxicidade com *A. cepa* se apresentam como um bioindicador ideal para o primeiro *screening* da genotoxicidade de plantas medicinais em função do seu baixo custo e exatidão (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Outro teste *in vitro* muito utilizado para avaliar a citotoxicidade de extratos vegetais é o da fragilidade osmótica. A membrana plasmática das hemácias é composta por uma bicamada lipídica e proteína, onde a ação de substâncias naturais pode ocasionar alterações estruturais. O estudo de como se comporta a membrana da hemácia quando exposta ao estresse osmótico é chamado de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE) (ALDRICH; SAUNDERS, 2001; MOUSINHO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2007).

Os radicais livres são capazes de acarretar várias alterações nos eritrócitos e a hemólise é uma delas (BEGUM; TERAQ, 2002; SADHU; WARE; GRISHAN, 1992; SANTOS *et al.*, 1995). A hemólise é caracterizada pela lise dos eritrócitos que ao ser rompido libera hemoglobina no plasma (CARVALHO *et al.*, 2007).

Portanto, a FOE é uma análise para avaliar a forma, o tamanho das hemácias e a estabilidade da membrana, normalmente é utilizada pelo seu baixo custo e eficiência (CAIRES; GILENO, 2012; NARENDRA *et al.*, 2007).

### **3.7 Atividade antimicrobiana**

As bactérias são seres microscópicos, prejudiciais à saúde do homem, podendo causar inúmeras patologias, podendo ser encontrada em vários tipos de ambientes, sendo

classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicano, proteínas e ácidos teicóicos que facilitam a regulação da entrada e saída de cátions na célula. Já as Gram-negativas, em sua parede celular, possuem lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, lipoproteínas e membrana externa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O gênero *Staphylococcus*, bactérias Gram-positivas, é comumente associado ao quadro de pneumonia, meningite e procedimentos invasivos em humanos, sendo o *Staphylococcus aureus*, entre o gênero, a espécie de maior poder patogênico (BRASIL, 2008). O *Staphylococcus aureus* faz parte da microbiota normal dos seres humanos, no entanto cepas multirresistentes aos antibióticos têm causado infecções com conseqüente agravamento na saúde (GARCIA *et al.*, 2011).

*Escherichia coli* é uma espécie da família Enterobacteriaceae, definida como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados e que tem como habitat natural o trato intestinal do homem e animais de sangue quente (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

*Salmonella* é um gênero de bactérias da família Enterobacteriaceae. São Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formam esporos, têm forma de bastonetes curtos (FORSYTHE, 2013). Sendo contraída por meio do consumo de alimentos contaminados como carne bovina, aves, ovos e o leite, os sorotipos mais importantes na transmissão dessas salmoneloses de animais para humanos é a *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* (SILVA *et al.*, 2010).

A *Salmonella* tem se tornado resistente aos antibióticos, e em alguns países asiáticos, mais de 90% das *Salmonellas* isoladas é resistente aos antibióticos mais comuns. O aumento da resistência a antibióticos e a disseminação desses organismos resultou em cepas multirresistentes como a *S. Typhimurium* (FORSYTHE, 2013).

Os fungos são micro-organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), conhecidos tanto por seus benefícios quanto pelos malefícios (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As infecções fúngicas também causam sérios riscos à saúde. O gênero *Candida* apresenta espécies com diferenças genômicas e variações fenotípicas. Diferenças fenotípicas se dão em relação à morfologia, tamanho da célula, composição da parede celular, fatores de virulência. Quanto à morfologia, o gênero *Candida*, é predominantemente leveduriformes. A *Candida albicans* é considerada polimórfica, por possuir a capacidade de formar leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (SILVA *et al.*, 2012; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

De acordo com Papon *et al.* (2013) a candidíase subdivide-se em 3 grupos principais: candidíase superficial (pele, pelo e unha), candidíase de mucosas (orofaringe, esôfago e região vulvovaginal), candidíase sistêmica (candidemia e outras). A candidíase sistêmica, no geral, ocorre em pacientes imunodeprimidos e em alguns casos em pacientes imunocompetentes (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; OSKI *et al.*, 2014).

Dentre as espécies de *Candida* associadas à candidíase sistêmica tem-se *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. No entanto, a espécie com maior frequência é a *Candida albicans*, representando em média 40 a 50% dos casos de infecção (PFALLER *et al.*, 2015). A *Candida albicans* causa infecção vaginal em cerca de 95% das mulheres (HERRERO-MARTÍNEZ, 2014).

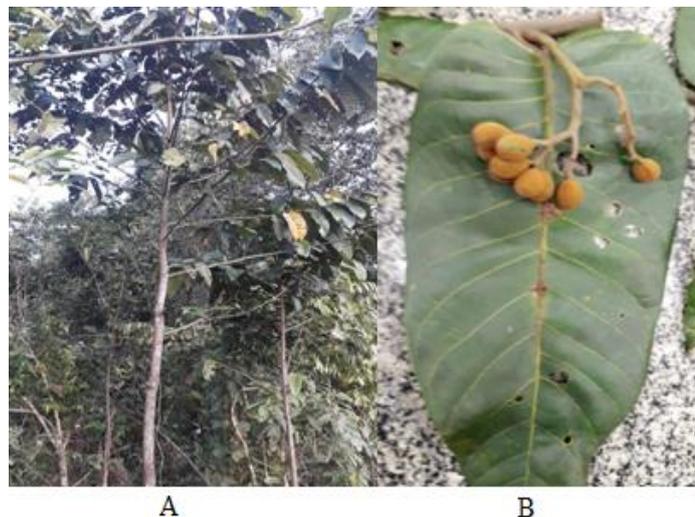
Infecções que se mostram resistentes aos antibióticos e quimiossintéticos disponíveis são um problema generalizado, por isso, torna-se cada vez mais necessário procurar novas alternativas como os produtos naturais (BASTOS *et al.*, 2017; FENNER *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2006; WAGNER, 2016).

Inúmeros são os estudos com extratos vegetais que possuem atividade antibacteriana devido à capacidade de resistência aos antibióticos (DUARTE *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2015). As plantas provaram ser um enorme reservatório de compostos bioativos, dentre eles, substâncias antimicrobianas, podendo ser utilizadas para o desenvolvimento de fitofármacos (SALAZAR *et al.*, 2007). Pesquisas já comprovaram a eficácia de extratos do gênero *Virola* como atividade antimicrobiana (SARAIVA, 2012; VELASCO *et al.*, 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material Vegetal

As folhas da espécie *Virola sebifera* foi coletada na sub-bacia do Ribeirão São João em Porto Nacional, estado do Tocantins, Brasil, entre as coordenadas S 10°25'12" e O 48°16'47" em junho de 2018, em seguida levada ao Laboratório de Química da UFT, onde foi produzida a exsicata e depositada no Herbário Tocantins (HTO) no Campus de Porto Nacional da Universidade Federal do Tocantins, sob o número de registro HTO 1202. O acesso foi cadastrado no SISGEN sob o número A53BF6B (Figura 2).



**Figura 2.** Árvore (A), folha e fruto (B) da espécie *Virola sebifera*. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A folha, parte da planta utilizada neste estudo, foi submetida à secagem em estufa a 50°C e em seguida triturada em moinho de facas tipo Willey (modelo star FT 50, marca Fortenox). O pó obtido foi armazenado em frascos âmbar e mantido à temperatura ambiente, protegido da luz e umidade até a preparação dos extratos.

### 4.2 Preparação dos extratos

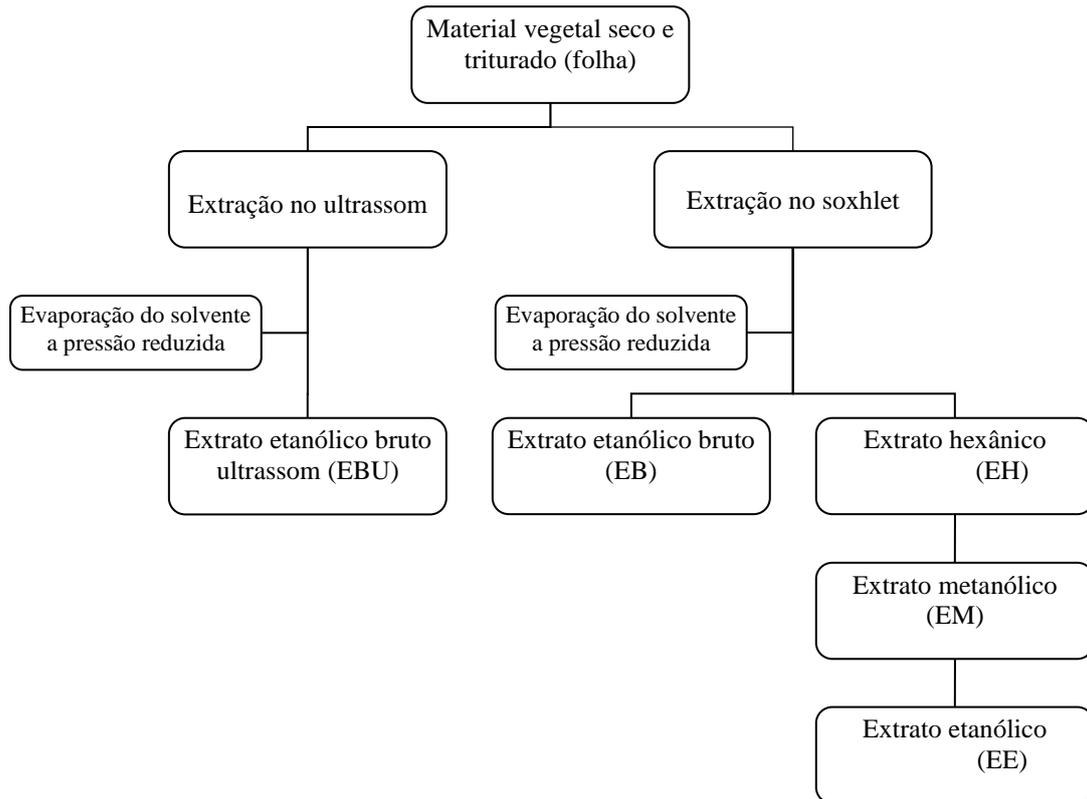
A obtenção dos extratos das folhas da *V. sebifera* foi realizada empregando duas metodologias: à quente usando o extrator Soxhlet e à frio por Ultrassom assistida (USC1600, ultrasonic cleaner, frequência 40 kHz, 135 W) (Figura 3).



**Figura 3.** Extração dos metabólitos secundários das folhas de *V. sebifera*. (A) método a quente (soxhlet) e (B) método a frio (ultrassom). **Fonte:** Arquivo pessoal.

Para os dois métodos foram utilizadas 5 gramas do pó das folhas. Na extração em Soxhlet foram utilizados 200 mL de solvente no balão fervente, por um período de seis horas. Usando o método descrito por Soares *et al.* (2017) com modificações, foi realizada uma extração com apenas etanol 70% originando o extrato bruto EB. Por este mesmo método foi realizado também uma extração sequencial iniciando com hexano, seguido por metanol e etanol 70%, originando respectivamente o extrato hexânico EH, extrato metanólico EM e extrato etanólico EE de *V. sebifera* (Figura 4). Antes de realizar a extração com o solvente seguinte, o pó foi seco a temperatura ambiente durante 24 horas.

Na extração por Ultrassom, o pó das folhas foi misturado com 80ml de etanol 70% em um béquer, o qual foi imerso em um banho de limpeza ultrassônico (USC1600, ultrasonic cleaner, frequência 40 kHz, 135 W) programado para ciclos de 1 hora. O processo foi repetido por 10 vezes e o sobrenadante foi recolhido e renovado em cada ciclo, combinado e filtrado ao final. Isto originou o extrato bruto por ultrassom de *V. sebifera* (EBU) (Figura 4). Os solventes dos extratos foram removidos em evaporador rotativo a -600 mmHg a 45°C, depois disso os extratos foram liofilizados e armazenados em frascos estéreis até as análises.



**Figura 4.** Fluxograma da obtenção dos extratos das folhas de *V. sebifera*.

### 4.3 Triagem Fitoquímica

A prospecção fitoquímica preliminar permite conhecer o comportamento químico dos extratos, e com isso possibilita adaptar técnicas de fracionamento, isolamento e caracterização de moléculas ativas nos extratos conforme a natureza dos constituintes previamente descobertos, facilitando o isolamento e purificação dos constituintes mais interessantes (MATOS, 2009).

A caracterização das principais classes de metabólitos foi efetuada por meio de reações químicas que resultam na mudança de cor e/ou formação de um precipitado. A triagem fitoquímica foi realizada com todos os extratos por meio de testes qualitativos para a identificação de grupos de metabólitos secundários (Tabela 1).

#### Taninos

A presença/ausência de taninos foi determinada por meio de quatro reações indicativas (MOUCO *et al.*, 2003).

1. Teste com Cloreto Férrico (Taninos 1): Em um tubo de ensaio foi colocado 1,0 ml da solução extrativa e adicionado 5,0 ml de água destilada e uma gota de cloreto férrico 2%. Reação positiva: formação de um precipitado ou aparecimento das colorações: preta, verde, azul, conforme o tipo de estrutura química.
2. Teste com Acetato Neutro de Chumbo (Taninos 2): Em um tubo de ensaio foi colocado 1,0 ml da solução extrativa diluída na proporção 1:5. Adicionado 1 ou 2 gotas de solução aquosa de acetato neutro de chumbo a 10%. Reação positiva: formação de um precipitado castanho avermelhado volumoso e denso.
3. Teste com Solução de Acetato de Cobre (taninos 3): Em um tubo de ensaio colocou-se cerca de 1 ml de solução extrativa diluída na porção de 1:5. Adicionou 1 ou 2 gotas de solução aquosa de acetato de cobre a 5%. Reação positiva: formação de um precipitado castanho avermelhado.
4. Teste com acetato de chumbo e ácido acético glacial (Taninos 4): Em um tubo de ensaio colocaram-se cerca de 3 ml de solução extrativa e adicionado 2 ml de ácido acético glacial a 10% e 3 ml da solução de acetato de chumbo a 10%. Reação positiva: formação de um precipitado castanho avermelhado (indicação da presença de taninos gálicos).

#### Flavonoides

A presença/ausência de flavonoides foi determinada por meio de três reações indicativas (MOUCO *et al.*, 2003).

1. Reação de shinoda (Flavonoides 1): foi colocado 2 ml do extrato em um tubo de ensaio e adicionado dois fragmentos de magnésio (Mg) metálico. Adicionar 1 ml de ácido clorídrico (HCl). Reação positiva: coloração rósea a vermelha.
2. Reação com cloreto férrico (Flavonoides 2): Diluiu o extrato com água de 1:5, em seguida, colocaram-se em dois tubos de 5 ml do extrato diluído. Adicionou-se pela parede de um dos tubos 1 gota de cloreto férrico 2%. Reação positiva coloração variando entre verde, amarelo-castanho e violeta.
3. Reação com hidróxido de sódio (flavonoides 3): Diluiu-se o extrato na proporção de 1:5. Colocaram-se 5 ml desse extrato diluído em um tubo de ensaio e adicionaram-lhe 1 ou duas gotas de NaOH 5%. Reação positiva: coloração amarela, que varia de intensidade.

### Saponinas

A presença/ausência de saponinas foi realizada pelo teste qualitativo de espuma. Ferver 2 g da droga em pó com 10 ml de água destilada por 3 minutos. Agitar energicamente, no sentido vertical por 15 segundos. Deixar a solução em repouso por 15 minutos, marcar com caneta a altura da espuma. Observar a presença de espuma persistente (por 15 minutos). Reação positiva = permanência da espuma (MOUCO *et al.*, 2003).

### Fitoesteróis

A presença/ausência de fitoesteróis foi realizada pela reação com SPF (sulfato de fosfato férrico). Adicionou 500 microlitros do extrato e logo em seguida adicionou 500 microlitros do reativo SPF. O aparecimento da coloração vinho indica reação positiva (LIN *et al.*, 2009).

### Antraquinonas

A presença/ausência de antraquinonas efetuada pela reação com hidróxido de sódio. 0,5 g de droga foram colocadas em um vidro relógio e adicionadas algumas gotas de hidróxido de sódio a 0,5%. Reação positiva: aparecimento de uma coloração amarelada ou avermelhada (MOUCO *et al.*, 2003).

### Alcaloides

A presença/ausência de alcaloides foi determinada pela reação com o reagente de Dragendorff. Foi adicionado 500 microlitros do extrato, logo após adicionou 1 gota do reagente Dragendorff. Reação positiva: formação de um precipitado avermelhado (MOUCO *et al.*, 2003).

## **4.4 Determinação do teor total de compostos fenólicos**

Os fenóis totais foram quantificados usando o método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Amorim *et al.* (2008), com modificações, utilizando o ácido tânico como padrão de referência. Método baseado no princípio de que os compostos fenólicos são oxidados pelo reagente de Folin-Ciocalteu. Para quantificar o teor total de fenólicos totais, misturou-se 0,2 ml de soluções metanólicas dos extratos da *V. sebifera* (1 mg/ml, p/v) ou o padrão ácido tânico (3-100 µg/ml, p/v), 1 ml de carbonato de cálcio (75%, p/v), 0,5 ml de reagente de

Folin-Ciocalteu (10%, v/v) e 8,3 ml de água destilada, agitados suavemente e mantidos durante 30 min no escuro. A absorbância foi medida a 760 nm em um espectrofotômetro e usando a água destilada como sendo o branco. O teor fenólico total foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de ácido tânico em metanol ( $y = 0,005x + 0,007$ ,  $r^2$  ajustado = 0,980). O resultado foi expresso em mg de equivalentes de ácido tânico (TAE) por grama de extrato da planta estudada (mg TAE/g). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.5 Determinação do teor total de flavonoides

O conteúdo de flavonoides totais foi quantificado usando o método descrito por Soares *et al.* (2014) com modificações, utilizando a rutina como padrão de referência. Misturou-se soluções metanólicas (0,5 ml) dos extratos da *V. sebifera* (1 mg/ml, p/v) ou padrão de rutina (8-400 mg/ml, p/v), solução aquosa de ácido acético (0,5 ml a 60%, v/v), cloreto de alumínio (1 ml a 5%, p/v), solução metanólica de piridina (2 ml a 20%, v/v) e 6 ml de água destilada. O branco foi preparado com substituição do cloreto de alumínio por metanol. As misturas foram agitadas suavemente e mantidas no escuro por 30 min, sua absorbância medida a 420 nm em um espectrofotômetro. O conteúdo de flavonoides totais foi determinado interpolando a absorbância das amostras contra uma curva de calibração ( $y = 0,002x + 0,012$ ,  $r^2$  ajustado = 0,999), construída com diferentes concentrações de rutina e expressa em miligramas de equivalentes de rutina (RE) por grama de extrato seco (mg RE/g). As reações foram realizadas em triplicata.

#### 4.6 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante foi determinada pelo método DPPH estabelecido por Brand-Williams *et al.* (1995) e modificado por Peixoto Sobrinho *et al.* (2011), tendo o padrão rutina como controle positivo. Foram misturados 0,5 ml de diferentes concentrações dos extratos ou padrões (20–200 µg/ml, p/v) a uma solução metanólica de DPPH (3 ml a 40 µg/ml, p/v). O branco foi preparado substituindo o DPPH por metanol no meio reacional. O complexo reacional e o branco foram agitados e mantidos no escuro por 30 min, as absorbâncias medidas a 517 nm em espectrofotômetro calibrado com metanol. Como controle negativo foi utilizado a solução de DPPH a 40 µg/mL. A atividade de remoção de

radicais livres ou atividade antioxidante foi expressa como a porcentagem de inibição determinada pela equação:

$$\% \text{ AA} = \text{ABS}_{\text{Scn}} - (\text{ABS}_{\text{amostra}} - \text{ABS}_{\text{branco}}) / \text{ABS}_{\text{Scn}} \times 100$$

onde % AA é a porcentagem de atividade antioxidante;  $\text{ABS}_{\text{Scn}}$ , a absorbância do controle negativo;  $\text{ABS}_{\text{amostra}}$ , a absorbância da amostra;  $\text{ABS}_{\text{branco}}$ , a absorbância do branco. Utilizou-se as curvas de calibração obtidas pela plotagem das diferentes concentrações em relação à % AAs, e foi calculada a concentração eficiente, quantidade de amostra necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ), que foi expressa em  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.7 Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos foram analisados por CLAE, utilizando um cromatógrafo Shimadzu® (série LC-10 Avp, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-10AD, desgaseificador DGU-14A, Detector UV-VIS SPD-10A, forno coluna CTO-10A, injetor manual Rheodyne (circuito de 20  $\mu\text{L}$ ) e um integrador CLASS SLC-10A. A separação foi realizada utilizando uma coluna Phenomenex Luna de fase reversa C18 5  $\mu\text{m}$  (250 mm  $\times$  4,6 mm) com cartuchos C18 Phenomenex Security Guard de conexão direta (4  $\times$  3,0 mm<sup>2</sup>) preenchidos com material semelhante ao da coluna principal a 22 °C de temperatura. A fase móvel consistiu em 0,1% de ácido fosfórico em água (fase A) e 0,1% de ácido fosfórico em água/acetonitrila/metanol (54:35:11 v/v (fase B) sob o seguinte perfil de gradiente: 0-5 min, 0% B; 5-10 min, 30% B, 10-20 min, 40% B, 20-60 min, 40% B, 60-70 min, 50% B, 70-90 min, 60% B, 90-100 min 80% B. Quociente de vazão: 1 ml/min; temperatura: 22°C. Detecção UV foi feita a 280 nm.

Os compostos foram identificados pela comparação entre os tempos de retenção das amostras com os padrões autênticos, tais como ácido gálico, rutina, naringina, miricetina, morina hidratada, catequina, vitexina, isorhamnetina, hesperidina, quercetina, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico e ácido clorogênico, ácido elágico, naringenina e kaempferol (Sigma®). Antes de serem injetados no equipamento, as amostras (1 mg/mL) e substâncias de referência (5-300  $\mu\text{g/mL}$ ) foram dissolvidas em solução de metanol-acetonitrila (80:20 v/v) e filtradas através de um filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de polivinilideno difluoreto (PVDF).

#### 4.8 Caracterização por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG/EM)

As análises foram realizadas por meio do equipamento de CG/EM, modelo QP2010 Ultra da marca Shimadzu® equipado com uma coluna ZB-5HT (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Foi realizada nas seguintes condições: aquecimento a 60°C por 1 min, até atingir 280°C em 35 min. Temperatura de injeção: 280°C; Temperatura da interface: 280°C; gás de arraste (Hélio): 1 ml/min; A energia do elétron era de 70 eV e a temperatura da fonte de íons era de 280°C; modo de varredura. Sendo injetados 1µL de cada extrato, na qual os constituintes foram identificados por comparação com os espectros de massa da biblioteca NIST107.

#### 4.9 Ensaios Toxicológicos

As análises das atividades citotóxicas foram realizadas no Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LACIBS) da Universidade Federal do Tocantins, no Campus de Palmas (TO).

##### 4.9.1 Teste em Raiz *Allium Cepa*

Para a análise da citotoxicidade dos extratos foi utilizada a técnica recomendada por Meneguetti *et al.* (2011) com adaptações. Inicialmente preparou-se a solução estoque pesando-se 0,5g de cada extrato, dissolvendo-se em 10 ml de água mineral, considerando 100% do extrato liofilizado. A partir da solução estoque foram realizadas três diluições, resultando nas concentrações de extratos: 2,5%, 5% e 15%, as quais foram utilizadas no experimento da citotoxicidade.

As espécies de *Allium cepa* (cebola) utilizadas foram de tamanho uniforme, não germinadas e saudáveis, adquiridas no supermercado da cidade de Palmas, Tocantins. Primeiro as cebolas (bulbos) foram submersas em 50 ml de água mineral durante 72 horas em incubadora BOD a 25°C para crescimento das raízes. Após 72 horas as cebolas tiveram suas raízes aparadas para, então, serem submersas em 50 ml de extratos das folhas da *V. sebifera* nas diferentes concentrações citadas. O grupo controle em 50 ml de água mineral e levadas a incubadora BOD a 25°C por cinco dias, em seguida as raízes foram contadas e medidas com a régua. As análises foram realizadas em triplicatas.

#### 4.9.2 Teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)

As avaliações de fragilidade osmótica dos glóbulos vermelhos foram realizadas com amostras de sangue venoso de voluntários do sexo masculino, usando um método adaptado por Mayworm *et al.* (2008), em triplicata. As análises foram realizadas após aprovação do Conselho de Ética parecer nº 066/2013. Inicialmente preparou-se a solução estoque pesando-se 0,5g de cada extrato, dissolvendo-se em 10 ml de água destilada, considerando 100% do extrato liofilizado. A partir da solução estoque foram realizadas três diluições, resultando nas concentrações de extratos: 2,5%, 5% e 15%, as quais foram utilizadas no experimento da citotoxicidade.

Alíquotas de 1000 µl de sangue heparinizados foram adicionados em 1000 µl de cada concentração dos extratos da *V. sebifera* e o grupo controle com água destilada, ambos contendo solução de NaCl a 0,9% (m/v) e pré-incubada a 37° C por 60 min, em eppendorfs. Logo em seguida foi submetida à centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Retirado o sobrenadante dos eppendorfs e descartados em frascos com solução de hipoclorito de sódio a 1%. Adicionou-se 1000 µL de solução NaCl a 0,9 %, para a ressuspensão das hemácias que foram homogeneizadas delicadamente e submetidas a centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. Repetindo esse processo de ressuspensão por mais 3 vezes para a retirada do excesso de extrato da amostra sanguínea.

Por fim, alíquotas de 50 µl de cada uma das concentrações foram adicionadas aos eppendorfs contendo 0,12%, 0,24%, 0,48%, 0,60%, 0,72%, 0,9% de NaCl, respectivamente, em seguida incubadas a 37° C por 30 minutos. Após incubação foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante submetido a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, tendo como controle a solução de NaCl a 0,9 %. Posteriormente foi realizado o esfregaço sanguíneo das amostras, após o estresse hipotônico, e submetidas à secagem, fixação e coloração com corante Leishman, os esfregaços foram analisados por microscopia óptica para a análise morfológica da membrana dos eritrócitos.

#### 4.10 Atividade Antimicrobiana

Os extratos das folhas de *V. sebifera* foram testados contra as bactérias Gram-positivas (BGP): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus epidermidis* NEWP 0128;

bactérias Gram-negativas (BGN): *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi* NEWP 0028 e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Os microorganismos ATCC foram gentilmente cedidos pela INCQS/FIOCRUZ (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) e as NEWP foram adquiridas do Laboratório Newprov.

As cepas estavam armazenadas sob congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol na coleção de Cultura Carlos Augusto Rosa da Universidade Federal do Tocantins. Para reativação das cepas, estas foram repicadas em Ágar nutriente (bactérias) e Ágar batata (levedura) incubadas por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram repicadas para tubos de Ágar nutriente e Ágar batata inclinado e incubadas novamente sob as mesmas condições, findo este período os tubos foram armazenados em geladeira a temperatura de  $2-8^{\circ}\text{C}$  até o momento de preparo e padronização para os testes.

#### 4.10.1 Preparo e padronização da suspensão bacteriana e leveduriforme

Para o preparo do inóculo, as culturas armazenadas em tubo de ágar nutriente e ágar batata inclinado foram repicadas para placas de ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Então, foi feita uma suspensão direta de colônias em uma solução salina 0,85% estéril, ajustada a turbidez com a escala 0,5 de McFarland correspondendo a concentração celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL e para a levedura na concentração de  $2,0 \times 10^6$  UFC/ mL (NCCLS, 2003).

#### 4.10.2 Teste de difusão em poço

A atividade antimicrobiana foi realizada inicialmente pelo método de difusão em poços, em placas de petri contendo 50 ml de meio Ágar Muller Hinton (AMH) para bactéria e o meio Ágar Sabouraud para levedura. Os extratos das folhas de *V. sebifera* foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e ajustados para as concentrações (200, 100 e 50 mg/ml). As soluções dos inóculos foram preparadas de acordo com o item 4.10.1. Para o controle positivo foi utilizado 2 mg/ml de cloranfenicol para as bactérias e 1,5 mg/ml de albocresil para o fungo, para o controle negativo a solução de DMSO 10% (OLIVEIRA *et al.*, 2016 com adaptações).

Com auxílio de *Swab* estéril as soluções contendo os inóculos foram semeadas na superfície das placas contendo meio de cultura AMH e em seguida foram perfurados poços de 5mm de diâmetro, posteriormente esses poços foram preenchidos com 50 µL de cada extrato diluído em DMSO 10% e com os controles positivo e negativo (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Após o preenchimento dos poços as placas foram incubadas 24h de incubação a 37°C, os resultados foram analisados medindo com paquímetro digital (modelo Starret 799) os diâmetros dos halos observados foram comparados com os controles.

#### 4.10.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) -Técnica de microdiluição em caldo

Após a realização do teste de difusão em poço, os micro-organismos que apresentaram algum halo de inibição foram submetidos a técnica de microdiluição em caldo.

A Concentração Inibitória Mínima foi determinada segundo a metodologia descrita na norma M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). A montagem do teste consistiu primeiramente na distribuição de 100 µL de Caldo Miller Hinton nos poços da placa de microdiluição, em seguida, 100 µL de extrato, solução estoque a 25mg/mL foi adicionada aos poços da primeira linha, após a homogeneização foi retirada 100 µL de cada poço da primeira linha e adicionado na linha abaixo, assim sucessivamente, até os poços da última linha. Assim, foram realizadas 8 diluições de cada amostra obtendo-se concentrações finais de extrato de: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 mg/mL. Logo após, foi adicionado 5 µL de inóculo da suspensão microbiana padrão ajustada a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL em cada orifício da microplaca homogeneizando o inóculo com o meio. As microplacas foram vedadas com parafilme e incubadas a 35°C por 24 horas. Foram realizados também os seguintes controles: controle negativo (meio de cultura, solvente DMSO a 1% e inóculo), controle positivo (meio de cultura, antibiótico cloranfenicol a concentração de 2 mg/mL e inóculo), controle de crescimento (meio de cultura com inóculo e sem antibiótico ou extrato) e controle de esterilidade do caldo (CMH sem o micro-organismo). Os experimentos foram realizados com três repetições e em duplicata (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Transcorrido o período de incubação foram adicionados em cada poço da microplaca 30 µL de resazurina a 0,03% (m/v) estéril, indicador de óxido-redução. Após aplicação do corante revelador as placas foram reincubadas por 1 hora ou o tempo necessário para viragem do corante e então realizado a leitura, mostrando que a presença de cor azul representava

ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (ALVES *et al.*, 2008; PALOMINO *et al.*, 2002). Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano.

#### **4.11 Análise Estatística**

Os experimentos realizados em triplicata tiveram os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2008) e GraphPad Prism 8. Foram utilizados análise de variância (ANOVA) para comparar os valores médios obtidos nas análises. Os valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos pelo teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem Fitoquímica Preliminar

Para os testes qualitativos na triagem fitoquímica os extratos apresentaram resultados satisfatórios preliminares, indicando uma potencialidade no que tange à bioatividade da planta. A Tabela 1 mostra os resultados quanto à presença e/ou ausência de grupos de metabólitos secundários.

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica dos diferentes extratos das folhas de *Virola sebifera* obtidos pelo método de Ultrassom assistida EBU (extrato etanólico 70%) e no soxhlet EB (Extração Etanol 70%), EH (Extração Hexano), EM (Extração Metanol), EE (Extração Etanol 70%).

<b>Metabólitos Secundários</b>	<b>EBU</b>	<b>EB</b>	<b>EH</b>	<b>EM</b>	<b>EE</b>
Taninos gerais	+	+	-	+	+
Taninos catequínicos	+	+	-	+	+
Taninos gálicos	-	-	-	+	-
Flavonoides gerais	+	+	+	+	+
Flavonois	+	+	-	+	+
Saponinas	-	-	-	-	-
Fitoesteróis	-	-	-	-	-
Antraquinonas	+	+	-	+	+
Alcaloides	+	+	+	+	+

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo.

A triagem fitoquímica se faz necessária para o conhecimento dos constituintes químicos de espécies vegetais e indica os grupos de metabólitos secundários relevantes nessas espécies. Neste trabalho constatamos que o perfil de compostos bioativos das folhas de *V. sebifera* varia tanto com o método de extração, quanto o tipo de solvente utilizado. Como mostrado na Tabela 1, a prospecção fitoquímica teve reações positivas para taninos, flavonoides, antraquinonas e alcaloides e revelou maior diversidade de classes de metabólitos no extrato obtido pelo método Soxhlet utilizando metanol como solvente (EM), e menor no extrato obtido com solvente hexano (EH) por este mesmo método. Os demais extratos apresentaram um perfil de compostos semelhantes.

Tal variação no perfil fitoquímico dos extratos pode ser atribuída a vários fatores sendo os principais, a diferença nas condições de temperatura envolvidas nos dois métodos

aplicados (quente em Soxhlet e frio em Ultrassom assistida), e a polaridades dos solventes utilizados, que segundo Felhi *et al.* (2017), desempenha papel fundamental no aumento da solubilidade dos compostos fitoquímicos. Outro fator importante é o desengorduramento da amostra, um aspecto muito favorecido em extrações sequenciais, pois como demonstrado por Soares *et al.* (2017), este processo é capaz de eliminar interferências e favorecer a extração de compostos fenólicos. Em estudos com a planta *Siparuna guianensis*, estes autores também constataram melhor eficiência para o metanol em uma extração sequencial.

De modo geral, extratos obtidos a partir de solventes mais polares, como metanol e etanol, obtiveram perfil fitoquímico semelhante, com presença de taninos, flavonoides, antraquinonas e alcaloides. Em contrapartida, o extrato metanólico apresentou indicativo da presença de flavonoides e alcaloides, o que corrobora com estudo realizado por Garcia *et al.* (2019) que também encontraram um perfil fitoquímico semelhante para os extratos metanólicos da *V. sebifera*. O extrato hexânico apresentou quantidade de metabólitos inferiores aos extratos polares, apontando que os polifenóis, sobretudo flavonoides e taninos, presentes nas folhas da *V. sebifera* são majoritariamente moléculas polares.

A presença de flavonoides nesta espécie também já foi relatada em extratos brutos da casca (SCAPIN *et al.*, 2020), o que sugere ampla distribuição deste metabólito na planta. Outros metabólitos como alcaloides foram identificados em extrato etanólico e fração clorofórmica das folhas de *V. sebifera* (DENNY *et al.*, 2007). Em outra espécie do gênero *Virola* (*V. koschnyi*), a presença de taninos condensados no extrato aquoso da casca foi responsável pela inibição total do efeito hemorrágico do veneno de *Bothrops asper* (CASTRO *et al.*, 1999), o que demonstra o amplo potencial medicinal desta planta a ser explorado, sobretudo frente a processos inflamatórios, através dos efeitos antioxidantes dos flavonoides como sequestradores de radicais livres, bem como atividades antialérgica e anticancerígena, também atribuídas aos flavonoides (RIBEIRO *et al.*, 2018; SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO 2010; SHIRWAIKAR *et al.*, 2004).

Além disso, podem apresentar atividade anti-hipertensiva, bactericida e fungicida, devido à presença de taninos (FONSECA; LIBRANDI, 2008; SANTOS; MELLO, 2010) e atuar como antitumoral, antitussígeno, antiproliferativo e antiviral (DENNY *et al.*, 2007; SILVA, N. *et al.*, 2010), pela presença de alcaloides. Além de promover ação laxativa (PINHEIRO *et al.*, 2018) característica das antraquinonas. Portanto, os fitoquímicos encontrados nos extratos de *V. sebifera* podem contribuir para os efeitos medicinais relatados na medicina popular.

## 5.2 Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais

Os dados relativos à curva de calibração obtida por diferentes diluições do padrão ácido tânico, para fenóis, e do padrão rutina, para flavonoides, são demonstrados graficamente na Figura 5. A forte relação entre as concentrações e as absorvâncias é verificada pelo coeficiente de linearidade  $y = 0,0051x + 0,0072$ ,  $R^2 = 0,9807$  para o ácido tânico e  $y = 0,0022x - 0,0124$ ,  $R^2 = 0,9992$  para a rutina.

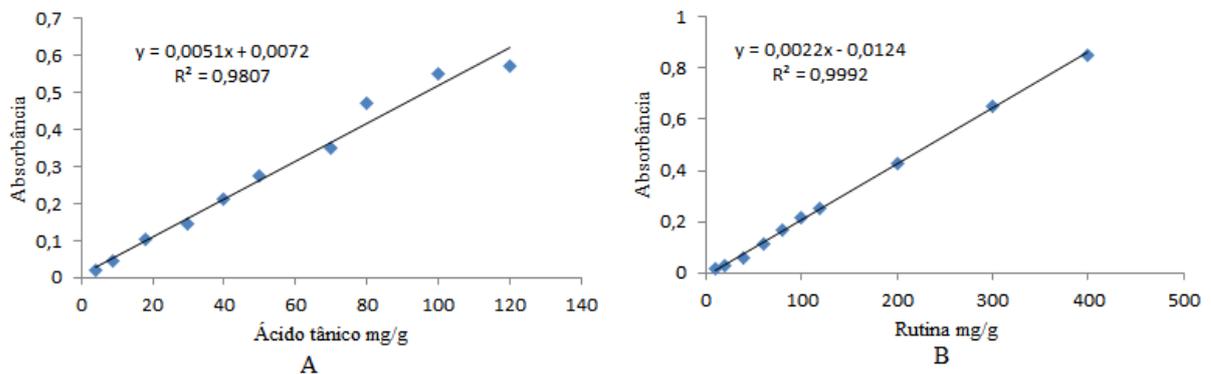


Figura 5. Curva de calibração dos padrões ácido tânico (A) e rutina (B).

Os teores de fenóis e flavonoides totais para os extratos obtidos pelo método a frio e a quente usando solventes de diferentes polaridades estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores médios e desvio padrão dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais, expresso como miligramas de equivalente de ácido tânico (mg EAT/g) e equivalente de rutina (mg ER/g) dos extratos da folha da *V. sebifera*.

<b>Extratos</b>	<b>Fenólicos Totais (mg EAT/g)</b>	<b>Flavonoides Totais (mg ER/g)</b>
EBU	98,3 ± 0,009 A	121,6 ± 0,027 A
EB	95,1 ± 0,004 B	83,8 ± 0,004 AB
EH	15,1 ± 0,005 D	61,9 ± 0,061 B
EM	90,0 ± 0,003 C	81,3 ± 0,038 AB
EE	93,8 ± 0,001 B	103,2 ± 0,002 AB

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais nos extratos das folhas da *V. sebifera* variaram significativamente ( $p < 0,05$ ) nos extratos EBU, EB, EH, EM e EE (Tabela 2).

Os teores de fenólicos totais nos extratos variaram de  $15,1 \pm 0,005$  a  $98,3 \pm 0,009$  mg EAT/g, e de flavonoides totais de  $61,9 \pm 0,061$  a  $121,6 \pm 0,027$  mg ER/g. Os resultados de flavonoides demonstram que o extrato EH  $61,9 \pm 0,061$  mg ER/g diferiu estatisticamente do extrato EBU  $121,6 \pm 0,027$  mg ER/g. Esta diferença é devido a polaridade do solvente usado em cada extração, sendo que, solventes mais polares favorecem a extração de compostos fenólicos e flavonoides. Também pode-se observar que o extrato EBU, obtido por Ultrassom assistida, foi o que apresentou maior teor de fenólicos e flavonoides. Nos extratos obtidos usando Soxhlet, o extrato EB não diferiu estatisticamente do extrato EE, observando-se que, neste caso, a extração sequencial não interferiu na extração dos constituintes em análise (Tabela 2).

Garcia *et al.* (2019) determinaram em extratos metanólicos de *V. sebifera* concentrações de fenois e flavonoides de 18580,87 mg/100g e 143,90 mg/100g, respectivamente. O estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *V. sebifera* realizado por Bicalho *et al.* (2012), levou ao isolamento e identificação dos flavonoides quercitrina, isoquercetina, rutina, afzelina, quercetina-3-metoxi-7-O- $\beta$ -D-glicosídeo, sendo o primeiro relato destas substâncias para a espécie.

Oliveira (2018) analisou o resíduo da *V. surinamensis* (torta da semente) em extrato hidrofílico, resultando entre  $49 \pm 4,6$  e  $62 \pm 1,27$  (mg ERT/100 g) para flavonoides e  $114 \pm 0,01$  e  $806,45 \pm 1,9$  (mg EAG/100 g) para polifenóis. Amostras de *V. carinata* (madeira e casca), *V. elongata* (folha, casca e madeira) e *V. peruviana* (folha, casca e madeira) coletadas no município de El Retorno na Colômbia, apresentaram alto teor de flavonoides nas folhas e de fenólicos na casca (DÍAZ, 2015). Os flavonoides ajudam na proteção contra os raios UV e ataque de microrganismos e os fenois ajudam a proteger contra o ataque de fungos.

Os flavonoides são amplamente distribuídos no reino vegetal, representando um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (SIMÕES *et al.*, 2017) e constituem uma alternativa potencial como agentes terapêuticos frente aos processos inflamatórios (COUTINHO *et al.*, 2009). Além disso, vários estudos mostram que a presença de compostos fenólicos pode contribuir para a atividade antioxidante (TOIU *et al.*, 2018).

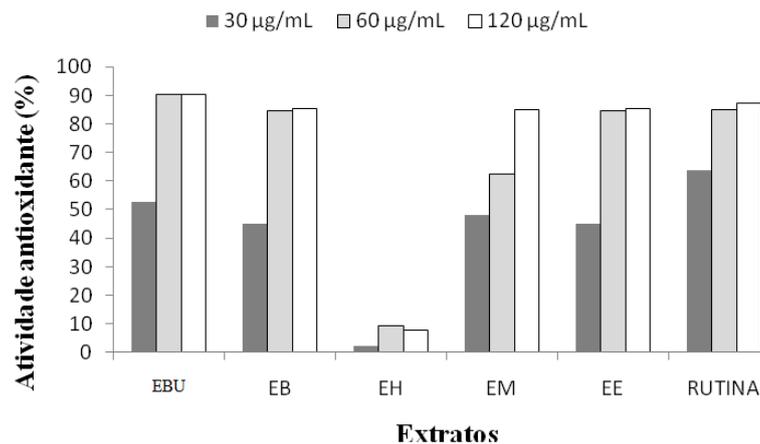
### 5.3 Avaliação da atividade Antioxidante

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante (AA%) e valores de IC<sub>50</sub> dos extratos obtidos pelo método a frio extrato EBU e a quente extratos EB, EH, EM e EE e o controle positivo (rutina), nas concentrações 30, 60 e 120 µg/mL, determinado pelo ensaio do radical DPPH, estão apresentados na Tabela 3 e Figura 6.

**Tabela 3.** Valores médios e desvio padrão da concentração eficiente necessária para reduzir a absorvância do DPPH em 50 % nos extratos da folha de *V. sebifera*. Resultados expressos em µg/mL.

Extratos	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)
EBU	30,41 ± 0,98 C
EB	31,86 ± 0,31 C
EM	38,32 ± 1,59 D
EE	26,46 ± 0,58 B
Rutina	22,21 ± 0,24 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6.** Atividade antioxidante dos extratos medidas no ensaio DPPH, em três concentrações diferentes (30, 60 e 120 µg/ml). Os valores representam a porcentagem da eliminação de radicais. EBU: extrato bruto, etanol 70%, Ultrasson; EB: extrato bruto, Etanol 70%, Soxhlet; EH: extrato hexânico, Soxhlet, EM: extrato metanólico, Soxhlet e EE: hidroetanólico, Soxhlet.

Todos os extratos das folhas de *V. sebifera* apresentaram atividade sequestradora do radical DPPH, com exceção do extrato EH (Tabela 3). O EH mostrou valores de atividade antioxidante inferiores a 50%, inviabilizando a determinação do IC<sub>50</sub>. A fraca atividade antioxidante do EH pode ser justificada pelo baixo teor de fenois totais (Tabela 2).

Os extratos EBU e EB não diferiram estatisticamente, demonstrando atividade antioxidante equivalente. Já os extratos EBU, EB, EM e EE, na concentração 120 µg/mL

apresentaram atividade antioxidante superior a 85%, atingindo um máximo de 87% (Figura 1 e Tabela 3).

Analisando os dados da Tabela 3, todos os extratos apresentaram resultados satisfatórios para a atividade antioxidante. Os IC<sub>50</sub> dos extratos ficaram próximos ao da rutina, utilizada como padrão. Dentre os extratos destaca-se o EE com a maior atividade antioxidante, fato que demonstra que a extração sequencial, com solventes de polaridade crescente, otimizou o processo de extração dos metabólitos secundários responsáveis pela atividade antioxidante nesta espécie. Isto corrobora a necessidade de um desengorduramento para evitar interferências na obtenção de compostos bioativos.

Já quando comparamos os extratos brutos EBU e o EB, os valores de IC<sub>50</sub> obtidos são estatisticamente iguais, demonstrando que o fator predominante na extração de compostos com atividade antioxidante das folhas de *V. sebifera* é a polaridade do solvente e não o método utilizado.

A atividade antioxidante *V. Sebifera* também foi determinada por Garcia *et al.* (2019), que encontraram atividade antioxidante de 81,08% com IC<sub>50</sub> de 1,5 mg/ml no extrato metanólico. Em outro estudo, a atividade antioxidante das lignanas ariltetralonas isoladas de sementes de *V. Sebifera*, bem como os derivados de catecol, obtidos pela desmetilação de lignanas foram mais eficazes como antioxidantes que o padrão ( $\alpha$ -tocoferol) (REZENDE *et al.*, 2005). Ainda na semente, três policetídeos identificados como 1'-(2,6-diidroxifenil)-13'-fenil-tridecan-1'-ona, 1'-(2,6-hidroxifenil)-11'-fenil-undecan-1'-ona e 1'-(2,6-diidroxipentadeca-4',8',12'-trien-1'-ona foram os responsáveis pela atividade antioxidante (BARROSO *et al.*, 2003).

Em outros estudos com espécies do gênero *Virola* também confirmaram seu poder antioxidante. Coutinho *et al.* (2017) demonstraram que a resina da *V. oleifera* diminuiu a deposição lipídica atenuando a progressão da aterosclerose (AT) em parte justificada pela atividade antioxidante, já que o estresse oxidativo é decisivo tanto para a iniciação quanto para a progressão da AT. Ainda com a resina de *V.oleifera*, Bôa *et al.* (2015) demonstraram efeitos renoprotetores acompanhados por atividade antioxidante (AA%  $8,96 \pm 0,14$ ) e antiapoptótica.

Estes resultados apontam para um perfil promissor de moléculas antioxidantes, que podem futuramente ser utilizadas para obtenção de novos produtos, uma vez que substâncias fenólicas de plantas têm efeitos na diminuição do câncer e uma relação inversa entre doenças cardiovasculares e a ingestão de alimentos fonte de compostos fenólicos, provavelmente por suas propriedades antioxidantes (BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010). Segundo

Drisko, Chapman e Hunter (2003), os antioxidantes podem ser uma alternativa junto ao tratamento quimioterápico, pois podem contribuir com a redução do tumor.

#### 5.4 Análise por CLAE

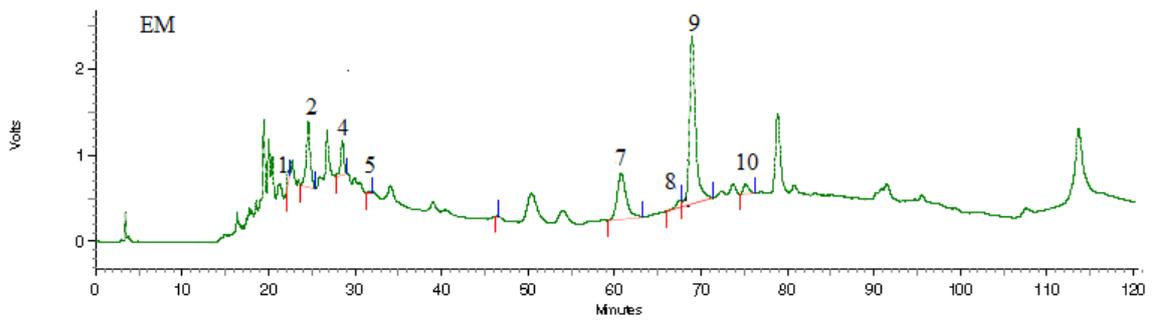
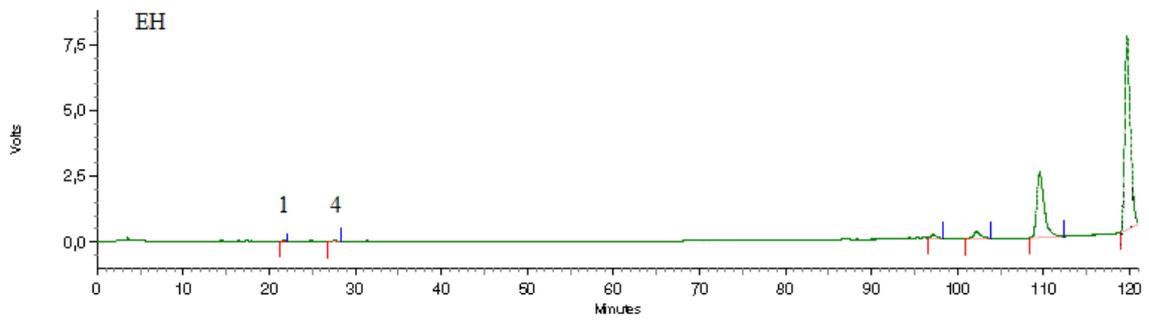
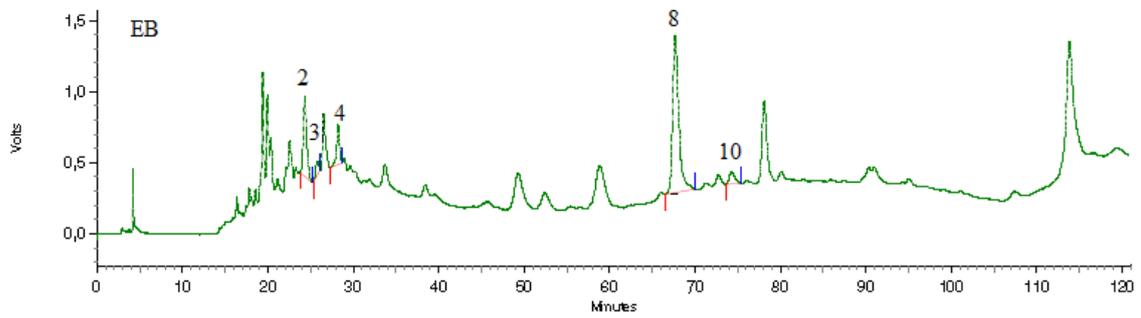
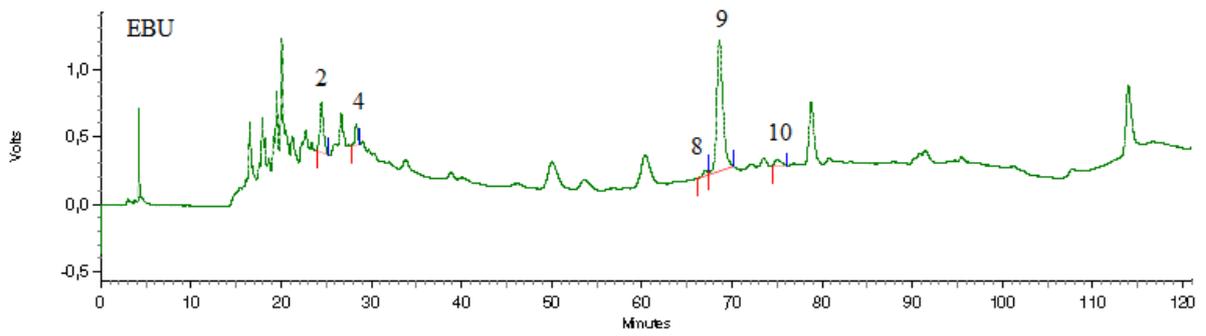
Os metabólitos detectados nos extratos da folha de *V. sebifera* são apresentados na Tabela 4 e os perfis cromatográficos obtidos por CLAE são mostradas na Figura 7. O tempo de retenção e os padrões autênticos permitiram a identificação de vários compostos fenólicos, no método a frio (Ultrassom) e no método a quente (Soxhlet).

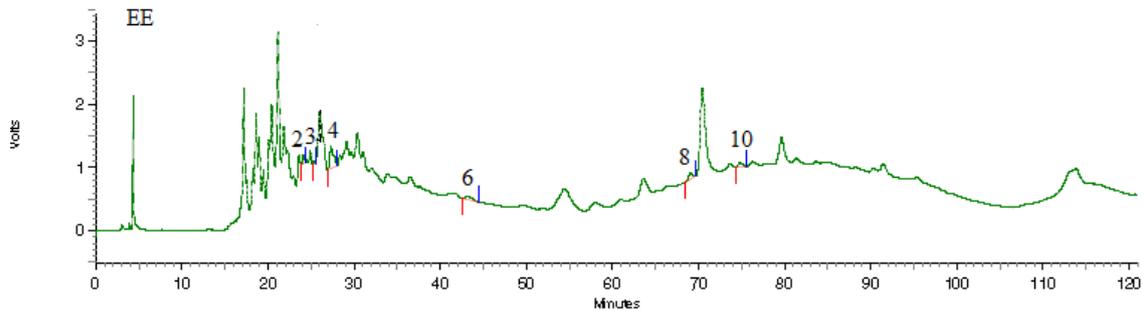
No método a frio o extrato hidroalcoólico EBU identificou o ácido siríngico (TR: 24,460), ácido *p*-cumárico (TR: 28,320), morina (TR: 67,050), ácido rosmarínico (TR: 68,600) e quercetina (TR: 75,010). No método a quente o extrato hidroalcoólico EB apresentou: ácido clorogênico (TR: 25,730), ácido siríngico (TR: 24,310), ácido *p*-cumárico (TR: 28,220), morina (TR: 67,670) e quercetina (TR: 74,230); o extrato hexânico EH: catequina (TR: 21,710) e ácido *p*-cumárico (TR: 27,550); o extrato metanólico EM: catequina (TR: 22,250), ácido siríngico (TR: 24,560), ácido *p*-cumárico (TR: 28,510), naringina (TR: 31,580), hesperidina (TR: 60,770) morina (TR: 67,500), ácido rosmarínico (TR: 68,960), quercetina (TR: 75,140) e o extrato hidroalcoólico EE: ácido siríngico (TR: 24,080), ácido clorogênico (TR: 25,340), ácido *p*-cumárico (TR: 27,300), rutina (TR: 43,180), morina (TR: 69,070) e quercetina (TR: 74,800).

**Tabela 4.** Compostos fenólicos identificados por CLAE nos extratos da folha de *V. sebifera*.

Compostos fenólicos	Área dos extratos (%)				
	EBU	EB	EH	EM	EE
Catequina	-	-	0,159	1,09	-
Ácido siríngico	16,144	17,906	-	13,221	10,193
Ácido clorogênico	-	2,877	-	-	2,53
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,34	8,231	0,296	5,593	48,246
Naringina	-	-	-	0,199	-
Rutina	-	-	-	-	14,093
Hesperidina	-	-	-	21,8	-
Morina	2,276	66,331	-	1,996	14,357
Ácido rosmarínico	72,646	-	-	53,23	-
Quercetina	3,595	4,655	-	2,851	10,581

(-) não detectado.





**Figura 7.** Perfil cromatográfico via CLAE dos extratos da folha de *V. sebifera*, detectados a 280 nm. EBU extrato obtido pelo método a frio (Ultrassom); EB, EH, EM e EE extratos obtidos pelo método a quente (Soxhlet). Pico 1: catequina, Pico 2: ácido siríngico, Pico 3: ácido clorogênico, Pico 4: ácido *p*-cumárico, Pico 5: naringina, Pico 6: rutina, Pico 7: hesperidina, Pico 8: morina, Pico 9: ácido rosmarínico e Pico 10: quercetina.

As análises por CLAE indicaram consistência dos dados obtidos na prospecção fitoquímica preliminar, pois alguns compostos das classes indicadas foram identificados e foi constatada diversidade semelhante para os diferentes extratos. O mesmo aspecto é observado para a atividade antioxidante, onde a maioria dos compostos identificados são relatados na literatura para este papel biológico.

Os cromatogramas dos extratos demonstraram que a espécie *V. sebifera* possui uma matriz de compostos fenólicos bastante diversos (Tabela 4), dentre eles, ácidos fenólicos (ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico e ácido clorogênico) e flavonoides (morina, quercetina, catequina, hesperidina, naringina e rutina).

Em estudo realizado com extrato metanólico das folhas de *V. sebifera* foram identificados quercitrina, isoquercetina, rutina, afzelina, quercetina-3-metoxi-7-O- $\beta$ -D-glicosídeo (BICALHO *et al.*, 2012). Além disso, perfil fitoquímico semelhante foi identificado nos extratos brutos da casca da *V. sebifera*, onde foram detectados o ácido gálico e ácido elágico e os flavonoides naringina, morina, quercetina, rutina, miricetina, naringenina e kaempferol (SCAPIN *et al.* 2020).

Os cromatogramas dos extratos brutos EBU e EB e os extratos sequenciais em ordem crescente de polaridade EM e EE apresentaram em comum o ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, morina e quercetina. O ácido rosmarínico foi identificado no extrato obtido pelo método a frio EBU e a quente EM. Já o ácido clorogênico foi identificado apenas pelo método a quente, no extrato bruto EB e no extrato sequencial EE (Figura 7). A extração utilizando solventes em gradiente crescente de polaridade, identificou catequina, hesperidina e naringina apenas no extrato metanólico EM e a rutina no extrato etanólico EE. Demonstrando que o

desengorduramento favorece a extração de compostos bioativos. O extrato EH foi o que apresentou menor quantidade de compostos fenólicos identificados por CLAE (somente catequina e ácido *p*-cumárico), o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente para a quantificação dos teores totais de fenois e flavonoides (Tabela 2).

A identificação de compostos antioxidantes é etapa preliminar para estudos que testam atividades preventivas e de tratamento de problemas de saúde. As moléculas encontradas já foram estudadas previamente e várias atividades biológicas foram relatadas.

De modo geral, os flavonoides, em especial a quercetina têm demonstrado atividade na prevenção de doenças crônicas (KNEKT *et al.*, 2002) e lesão oxidativa em membranas de eritrócitos (PROCHAZKOVA *et al.*, 2011), possui ação analgésica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) além de atuar na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e insuficiência renal e hepática (AVILA *et al.*, 1994; BEHLING *et al.*, 2004). Apesar da quercetina ser considerada como um dos flavonoides com maior potencial antioxidante, em seu isômero morina, foi verificada maior eficácia em alguns processos oxidativos. A forma hidratada da morina é mais ativa, exibe níveis de toxicidade muito baixos e a sua administração crônica é bem tolerada. (JAPIASSU, 2018; WILSON; ORTEGA; QUINTANA, 2011).

A presença de morina nos extratos pode indicar atividade antioxidante, antidiabética, inibidora da proliferação de células, indutora de apoptose, inibidora da tirosinase, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antibacteriana e neuroprotetora, cardiotônica e também na doença de Parkinson (JUNG *et al.*, 2010; LEE; BAEK; NAM, 2015; MIYAZAKI *et al.*, 2018; VANITHA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2010).

Ésteres procedidos do ácido *p*-cumárico possuem relatos de atividades despigmentante, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antiadipogênica e antimicrobiana (HELENO *et al.*, 2014a; PEREIRA *et al.*, 2017; RICE-EVANS *et al.*, 1996). O ácido *p*-cumárico demonstrou atividade antitumoral (HELENO *et al.*, 2014b) e atividade antimicrobiana (LOU *et al.*, 2012), enquanto o ácido clorogênico pode ser utilizado como ansiolítico e antidepressivo (DALCOL *et al.*, 2007; LORENZI, 2002) e o ácido siríngico possui atividade antidepressiva (GARCIA *et al.*, 2017).

O ácido rosmarínico apresenta atividade antioxidante, antinociceptiva, antiapoptótica, antiapoptose, antiamnésica, bactericida, antiviral, protetora cardiovasculares, neuroprotetora, fotoprotetora, anti-inflamatória (BULGAKOV; INYUSHKINA; FEDOREYEV, 2012; JIANG *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2010; QIAO *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-CAMPILLO *et al.*, 2009; SOARES, 2002). A naringina é considerada um potente agente

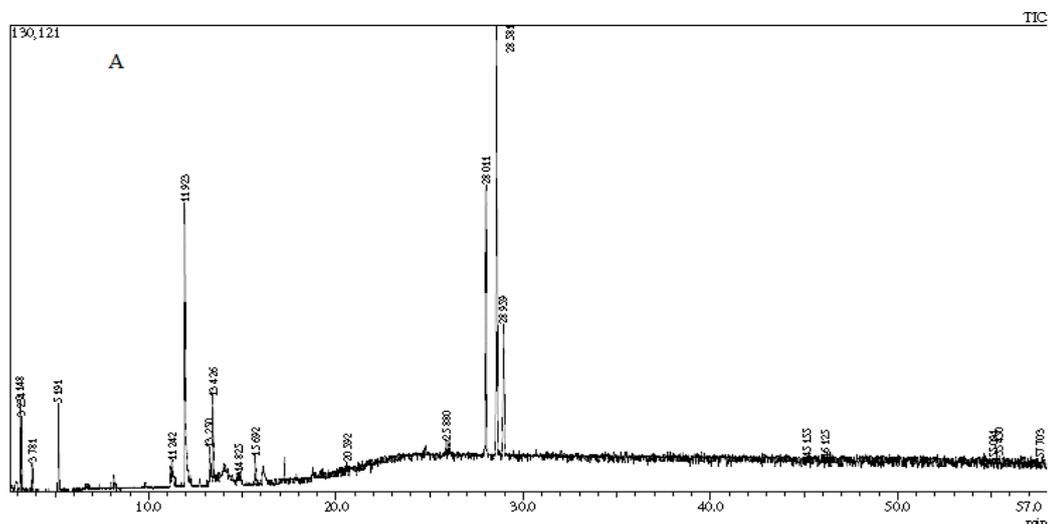
antioxidante, antimutagênico, antibacteriano e antifúngico (ALAM *et al.*, 2014; ITURRIAGA *et al.*, 2014).

Em outras espécies do gênero *Virola*, os flavonoides catequina, quercetina e quercitrina foram previamente identificadas na *V. venosa* (FERNANDES *et al.*, 2019), *V. carinata* (ORDUZ *et al.*, 2013), *V. surinamensis* (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009) e *V. oleifera* (BÔA *et al.*, 2015).

No estudo de Almeida *et al.* (2018) o extrato hidroetanólico da casca e do caule da *V. elongata* revelou a presença de ácido gálico, catequina e rutina exibindo efeitos gastroprotetores. Pereira *et al.* (2017) na resina da *V. oleifera* também constatou efeitos gastroprotetores podendo estar relacionada a taninos, ácidos fenólicos e flavonoides. No extrato etanólico da *V. surinamensis* a epicatequina foi responsável pela atividade gastroprotetora (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009). Portanto, pesquisas que identifiquem compostos são importantes para guiar estudos futuros de isolamento molecular.

## 5.5 Análise por CG/EM

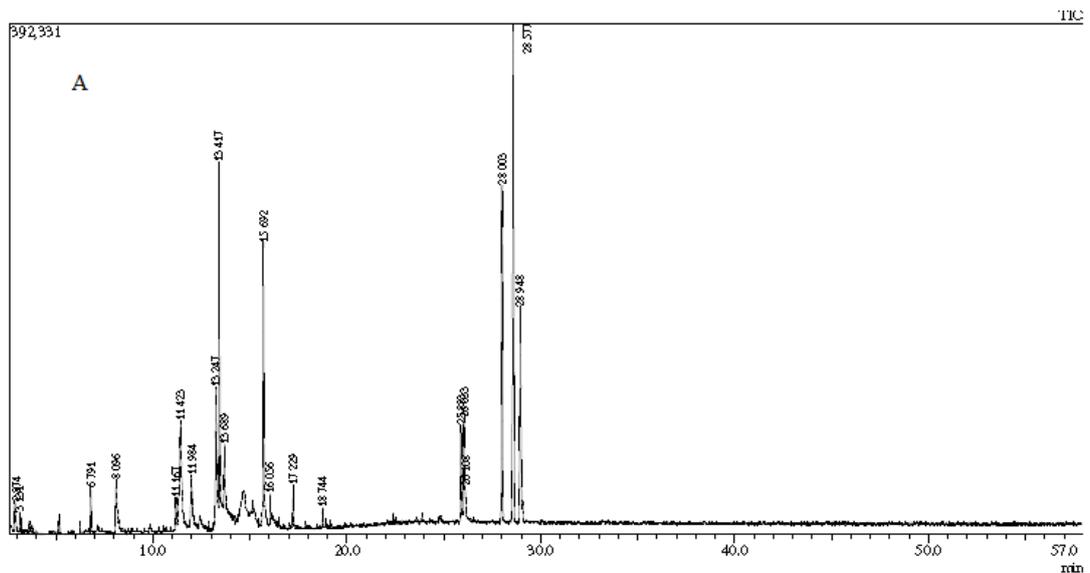
Através da análise por CG/EM foi determinada a composição qualitativa e quantitativa dos extratos da folha da *V. sebifera* usando o método de extração a frio, em Ultrassom extrato EBU (Figura 8, Tabela 5) e o método de extração a quente, em Soxhlet dos extratos EB (Figura 9 e Tabela 6), EH (Figura 10 e Tabela 7), EM (Figura 11 e Tabela 8) e EE (Figura 12 e Tabela 9). Foram identificados os 20 compostos majoritários.



**Figura 8.** CG/EM do extrato bruto etanólico EBU das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a frio em Ultrassom.

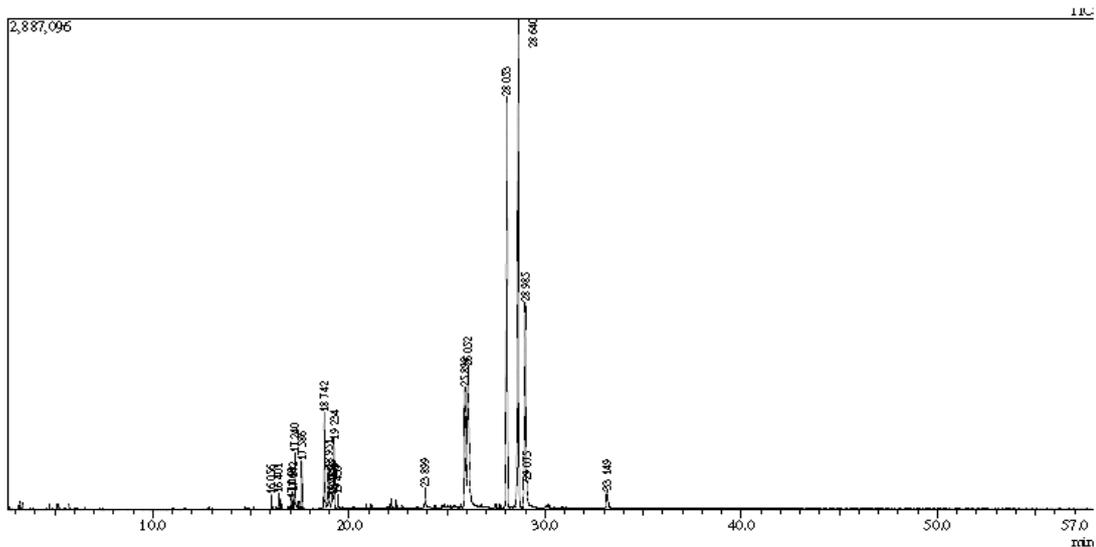
**Tabela 5.** Composição química do extrato bruto etanólico EBU das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a frio, em Ultrassom.

Pico	Compostos	R.T	Área
1	3,3-Dimethoxy-2-butanone	3.148	3,09
2	Di-sec-Butyl ether	3.234	2,21
3	Oxalic acid, butyl propyl ester	3.781	1,14
4	Butane, 2,2-dimethyl-	5.191	2,57
5	Propanoic acid, 2-propenyl ester	11.242	1,69
6	beta-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	11.923	18,73
7	1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine	13.250	2,88
8	1,3-Benzenediol, 4-propyl-	13.426	4,25
9	Propane, 2-methoxy-2-methyl-	14.825	1,23
10	1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethane-1,2-diamine	15.692	1,18
11	Isobutane	20.592	1,02
12	(E)-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)tetradec-3-en-5-one	25.880	0,93
13	2(3H)-Furanone, 3,4-bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)dihydro-, (3R-trans)-	28.011	16,76
14	(3R,4R)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)dihydrofuran-2(3H)-one	28.581	27,06
15	Benzene, 1,2-dimethoxy-4-[[4-methylphenyl)sulfonyl)methyl]-	28.959	8,97
16	Ethylenimine	45.155	1,49
17	Cyclobutylamine	46.125	1,31
18	Cyclobutylamine	55.091	1,27
19	1,2,4-Benzenetricarboxylic acid, 1,2-dimethyl ester	55.450	1,16
20	1,4-Dioxane-2,6-dione	57.703	1,03

**Figura 9.** CG/EM do extrato bruto etanólico EB das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.

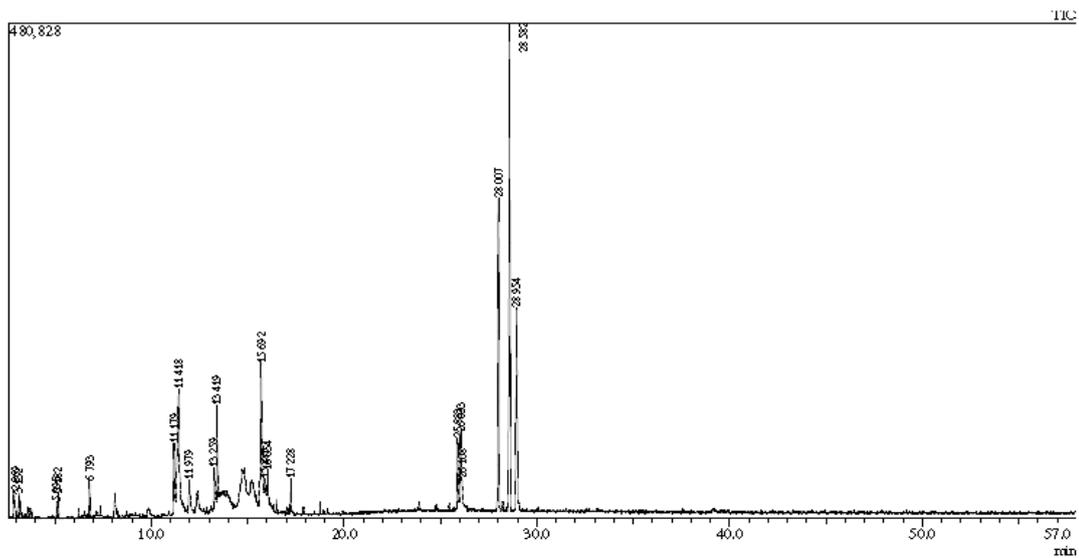
**Tabela 6.** Composição química do extrato bruto etanólico EB das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.

Pico	Compostos	R.T.	Área
1	Glyceraldehyde	2.874	0,75
2	3,3-Dimethoxy-2-butanone	3.131	0,4
3	Pentanoic acid, 4-methyl-	6.791	0,84
4	Catechol	8.096	2,49
5	Propanal, 2,3-dihydroxy-, (S)-	11.167	1,48
6	Adenosine, N6-phenylacetic acid	11.423	9,02
7	beta-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	11.984	2,37
8	1,3,5-Benzenetriol	13.247	7,27
9	Benzeneacetic acid, 3,4-dihydroxy-	13.417	9,55
10	beta-D-Ribopyranoside, methyl	13.689	3,14
11	2-Hydroxy-5-methylisophthalaldehyde	15.692	7,18
12	3-Dodecen-1-ol, (Z)-	16.056	0,49
13	n-Decanoic acid	17.229	1,06
14	Tetrahydrofurfuryl acrylate	18.744	0,55
15	4-Hexanoylresorcinol	25.883	3,37
16	4-Hexanoylresorcinol	26.033	3,85
17	Ethanone, 1-(2,4-dihydroxyphenyl)-	26.108	0,84
18	2(3H)-Furanone, 3,4-bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)dihydro-, (3R-trans)-	28.003	14,04
19	(3R,4R)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)dihydrofuran-2(3H)-one	28.577	22,47
20	Carissanol dimethyl ether	28.948	8,82

**Figura 10.** CG/EM do extrato hexânico EH das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.

**Tabela 7.** Composição química do extrato hexânico EH das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.

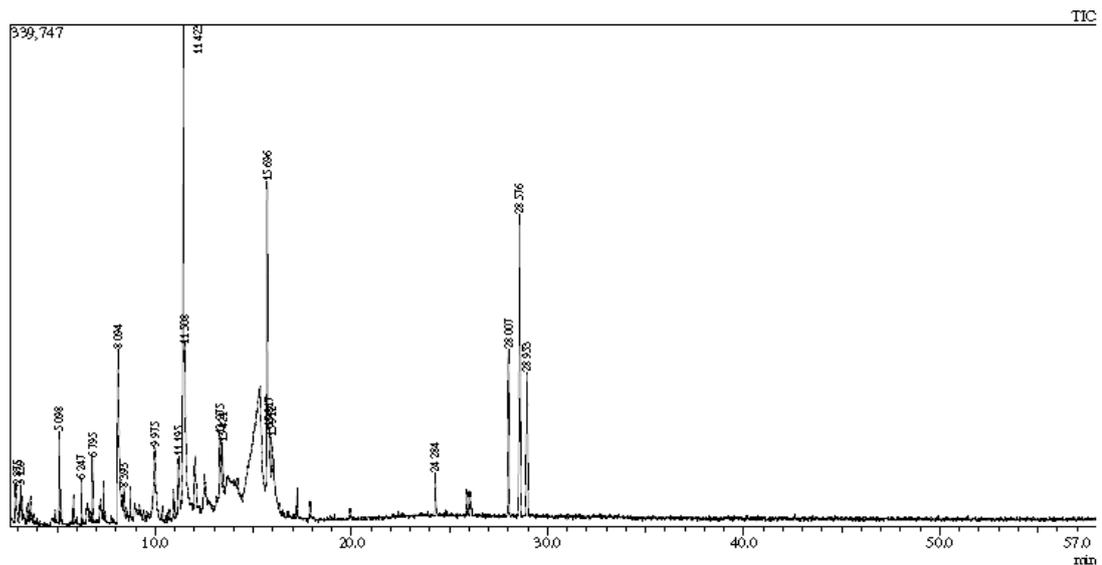
Pico	Compostos	R.T	Área
1	Neophytadiene	16.056	0.35
2	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	16.401	0.37
3	Erucic acid	17.060	0.29
4	Erucic acid	17.142	0.49
5	n-Hexadecanoic acid	17.240	1.70
6	Hexadecanoic acid, ethyl ester	17.586	1.15
7	Phytol	18.742	3.00
8	7-Tetradecenal, (Z)-	18.951	1.92
9	Eicosanoic acid	19.129	0.50
10	1,8,11-Heptadecatriene, (Z,Z)-	19.175	0.40
11	9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester, (Z,Z,Z)-	19.234	2.43
12	Octadecanoic acid, ethyl ester	19.439	0.30
13	Phen-1,3-diol, 2-tetradecanoyl-	23.899	0.47
14	Phen-1,3-diol, 2-dodecanoyl-	25.898	7.68
15	4-Hexanoylresorcinol	26.052	11.57
16	2(3H)-Furanone, 3,4-bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)dihydro-, (3R-trans)-	28.053	22.14
17	(3R,4R)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)dihydrofuran-2(3H)-one	28.640	30.84
18	Benzenamine, N-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-2-nitro-	28.985	12.20
19	Vitamin E	29.075	0.93
20	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5-Ethyl-6-methylheptan-2-yl)-3-methoxy-10,13-dimethyl	33.149	12.7



**Figura 11.** CG/EM do extrato metanólico EM das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.

**Tabela 8.** Composição química do extrato metanólico EM das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.

Pico	Compostos	R.T	Área
1	Glyceraldehyde	2.869	0.72
2	3,3-Dimethoxy-2-butanone	3.132	0.76
3	2H-Pyran-2,6(3H)-dione	5.095	0.49
4	Oxalic acid, isobutyl pentyl ester	5.182	0.70
5	Pentanoic acid, 4-methyl-	6.793	0.87
6	Propanal, 2,3-dihydroxy-, (S)-	11.179	4.54
7	1,3-Propanediol, 2-(hydroxymethyl)-2-nitro-	11.418	12.43
8	beta-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	11.979	1.89
9	1,3,5-Benzenetriol	13.259	2.52
10	1,3-Benzenediol, 4-propyl-	13.419	3.02
11	2-Hydroxy-5-methylisophthalaldehyde	15.692	8.28
12	Ethylamine, 2-((p-bromo-.alpha.-methyl-.alpha.-phenylbenzyl)oxy)-N,N-dimethyl-	15.883	1.63
13	R(-)-3,7-Dimethyl-1,6-octadiene	16.054	0.66
14	n-Decanoic acid	17.228	0.85
15	4-Hexanoylresorcinol	25.883	3.47
16	4-Hexanoylresorcinol	26.033	4.03
17	4-Hexanoylresorcinol	26.108	0.87
18	2(3H)-Furanone, 3,4-bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)dihydro-, (3R-trans)-	28.007	15.69
19	(3R,4R)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)dihydrofuran-2(3H)-one	28.582	26.22
20	Carissanol dimethyl ether	28.954	10.36



**Figura 12.** CG/EM do extrato etanólico EE das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet.

**Tabela 9.** Composição química do extrato etanólico EE das folhas de *V. sebifera* obtido pelo método de extração a quente usando Soxhlet

Pico	Compostos	R.T	Área
1	Glyceraldehyde	2.875	2.12
2	2-Propanamine, N-nitro-	3.139	0.85
3	2H-Pyran-2,6(3H)-dione	5.098	2.22
4	3-Amino-2-oxazolidinone	6.247	0.95
5	1-Deoxy-d-arabitol	6.795	1.57
6	Catechol	8.094	10.71
7	Benzofuran, 2,3-dihydro-	8.393	1.60
8	Acetamide, N-(2-methylpropyl)-	9.975	3.21
9	Propanal, 2,3-dihydroxy-, (S)-	11.195	3.11
10	Benzaldehyde, 2-hydroxy-6-methyl-	11.423	14.52
11	1,3-Propanediol, 2-(hydroxymethyl)-2-nitro-	11.508	7.98
12	1,3,5-Benzenetriol	13.275	3.65
13	1,3-Benzenediol, 4-propyl-	13.421	1.53
14	2-Hydroxy-5-methylisophthalaldehyde	15.696	9.20
15	6-Desoxy-l-gulitol	15.817	4.83
16	Benzenemethanol, .alpha.-[1-(methylamino)ethyl]-	15.912	3.76
17	3-Hexanol	24.284	1.17
18	2(3H)-Furanone, 3,4-bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)dihydro-, (3R-trans)-	28.007	6.68
19	(3R,4R)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)dihydrofuran-2(3H)-one	28.576	13.64
20	Carissanol dimethyl ether	28.953	6.72

Nos cromatogramas obtidos por CG/EM em todos os extratos foram identificados 20 compostos majoritários. Serão discutidos os compostos que apresentaram maiores áreas de pico de cada extrato.

Os compostos encontrados em quantidades significativas, presentes em todos os extratos, foram as lignanas 3,4-bis(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)dihidro-(3R-trans)-2(3H)-Furanona EBU (16,76 %), EB (14,04%), EH (22.14 %), EM (15.69%) e EE (6.68%) e a (3R,4R)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-(3,4-dimetoxibenzil)dihidrofuran-2(3H)-ona EBU (27,06 %), EB (22,47%), EH (30.84 %), EM (26.22%) e EE (13.64%) com fórmula molecular  $C_{20}H_{18}O_6$  e  $C_{21}H_{22}O_6$ , respectivamente. Estes compostos são descritos como pesticidas, nematicida, larvicida e fungicida (BALASUBRAMANI *et al.*, 2015; BICALHO *et al.*, 2012), possuem atividade antimicrobiana, citotóxica, antimicobacteriana e anti-inflamatória (MARCOTULLIO; PELOSI; CURINI, 2014; BAQUERO *et al.*, 2015).

O extrato obtido pelo Ultrassom apresentou o composto 1,6-anidro-beta-D-Glucopiranosose EBU (18,73%), uma anidro-hexose ( $C_6H_{10}O_5$ ), é um produto da degradação térmica da celulose e glicose (FABBRI *et al.*, 2002) e outro composto que mais aparece no

EBU (8,97%) é o 1,2-dimetoxi-4-[[[4-metilfenil]sulfonil]metil]-Benzeno, uma sulfona com fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_4$ .

No extrato EB aparece o ácido N6-fenilacético-Adenosina (9,02%), um aminoácido ( $C_{18}H_{19}N_5O_6$ ), seguido do ácido 3,4-dihidroxi-Benzoacético (9,55%), que é um ácido fenólico ( $C_8H_8O_4$ ) e do Carissanol dimetil éter (8,82%) que é uma lignana ( $C_{22}H_{28}O_7$ ).

O extrato EM possui o Carissanol dimetil éter (10,36%) é uma lignana ( $C_{22}H_{28}O_7$ ), o 2-(hidroximetil)-2-nitro-1,3-Propanodiol (12,43%) é um nitrocomposto ( $C_4H_9NO_5$ ) e o 2-Hidroxi-5-metilsoftalaldeído (8,28%) é um composto fenólico ( $C_9H_8O_3$ ).

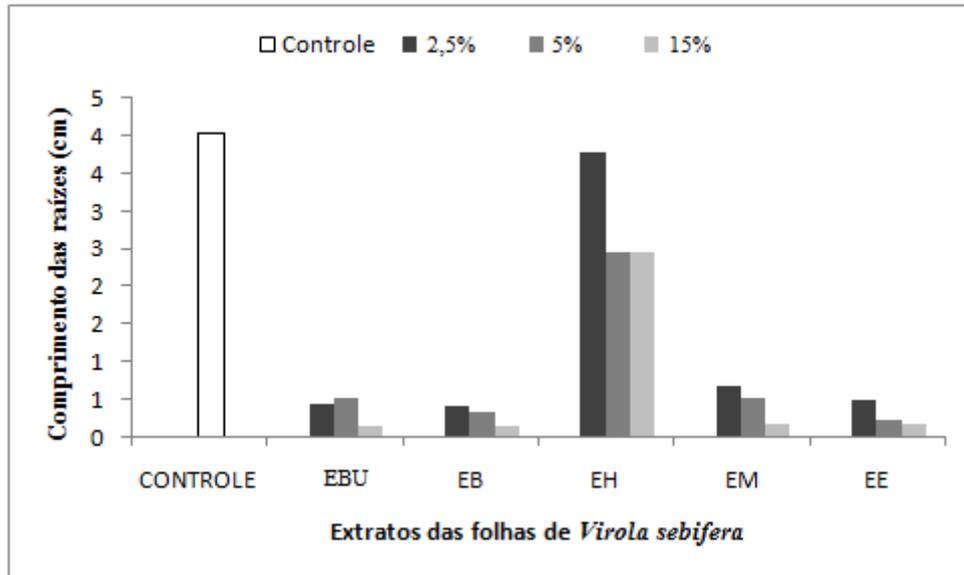
O catecol ( $C_6H_6O_2$ ), o 2-hidroxi-6-metil-Benzaldeído ( $C_8H_8O_2$ ) e o 2-Hidroxi-5-metilsoftalaldeído ( $C_9H_8O_3$ ) são compostos fenólicos, todos presentes no extrato EE (10,71%, 14,52% e 9,20%) respectivamente.

Garcia *et al.* (2019) apresentaram as moléculas de interesse encontradas nas frações metanólicas de *V. sebifera* foram o ácido fólico, 3,5-diterbutio-4-hidroxianisol (fenólico), cariofileno (sesquiterpeno bicíclico) e espatulenol (sesquiterpeno alcoólico), compostos reconhecidos como antioxidantes. Já Tonelli *et al.* (2014), em seu estudo com a mesma planta encontrou a quercetina-3- *O* - $\alpha$ -ramnopiranosídeo como constituinte principal.

Pereira *et al.* (2018) apresentaram que nos óleos essenciais obtidos das folhas, casca/polpa e semente da *V. sebifera*, coletada no Campus de Pesquisa do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG) Belém, Pará, foram identificados 28 constituintes químicos, sendo os majoritários (E,E)- $\alpha$ -farneseno, biciclogermacreno, (E)- $\beta$ -ocimeno, 6-metil-5-hepten-2-ona,  $\alpha$ -pineno, E-cariofileno.

## 5.6 Teste em Raiz *Allium Cepa*

A avaliação *in vitro* da toxicidade dos extratos EBU (método a frio) e EB, EH, EM e EE (método a quente), das folhas de *V. sebifera* frente à raiz da *Allium cepa*, nas concentrações 5%, 10% e 15% e o grupo controle com água mineral, estão apresentadas na Figura 13.



**Figura 13.** Testes de toxicidade dos extratos EBU no Ultrassom e dos extratos EB, EH, EM e EE no soxhlet da *V. sebifera* frente à raiz da *Allium cepa*.

Houve uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) nos resultados dos testes de toxicidade comparando os extratos e o grupo controle, sendo que os extratos induziram inibição no desenvolvimento radicular.

Os extratos EBU e os extratos EB, EM e EE não apresentaram diferenças estatísticas entre si, ou seja, se comportaram de maneira similar na inibição do crescimento das raízes. O extrato EH divergiu estatisticamente em relação aos outros extratos, sendo que nas concentrações de 10% e 15% houve inibição em relação ao controle (Figura 13).

É possível considerar que a presença de compostos como os taninos nos extratos sejam um dos responsáveis pelo efeito inibidor no desenvolvimento radicular. Fachineto *et al.* (2007) e Teixeira *et al.* (2003) também atribuíram aos taninos a inibição da divisão celular de *Allium cepa* quando tratadas com extratos vegetais. Segundo Monteiro *et al.* (2005) os taninos possuem a facilidade de se ligar às proteínas e a outras macromoléculas com isso apresentando atividade tóxica.

Tonelli *et al.* (2014), testaram o efeito dos extratos da folha de *V. Sebifera* na germinação de *A. cepa*, onde a radícula e o hipocótilo tiveram uma inibição de cerca de 73%. A toxicidade foi atribuída as lignanas sesamina, kobusina e a quercetina-3-O-ramopiranósido.

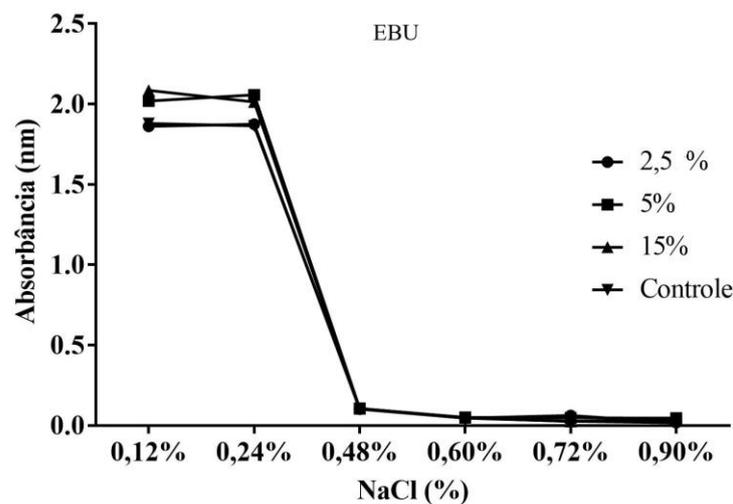
Outro composto, detectado nos extratos, que pode estar associado aos resultados tóxicos são os flavonoides. Para Silva *et al.* (2015) o efeito medicinal dos flavonoides vai depender da dose e do tempo de exposição ao qual fica exposto o organismo.

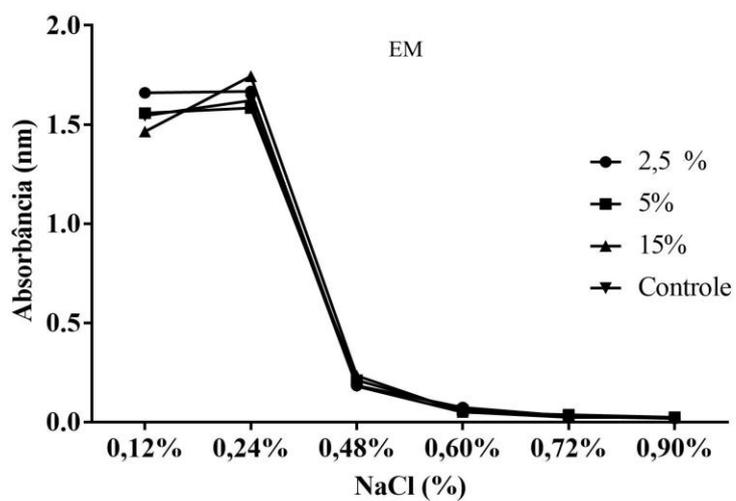
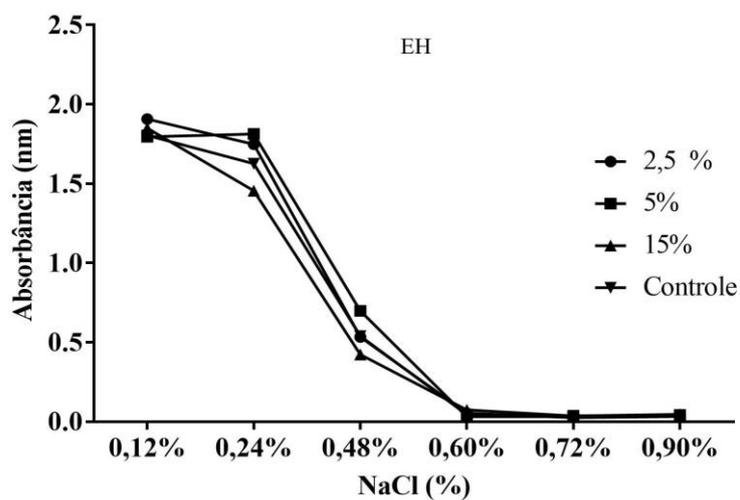
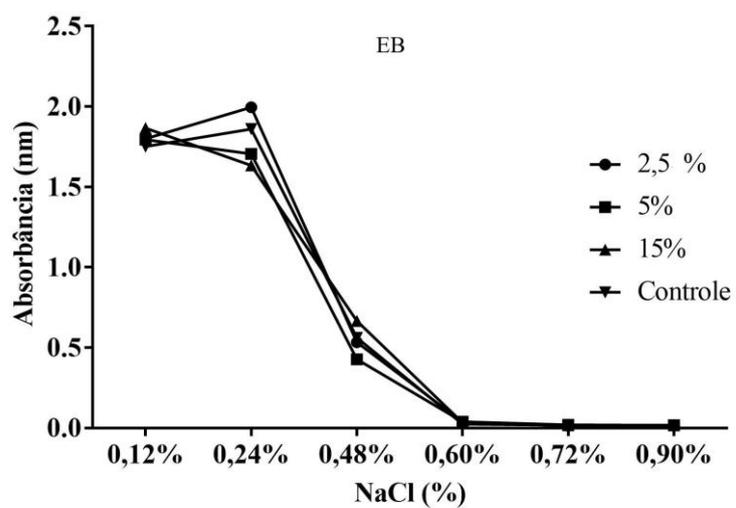
Em seus estudos Verma *et al.* (2013) demonstraram que elevadas concentrações de flavonoides causaram a necrose celular e até a morte de camundongos. Giuliani *et al.* (2014) evidenciaram que doses excessivas e prolongadas de quercetina inibiram a função da tireoide.

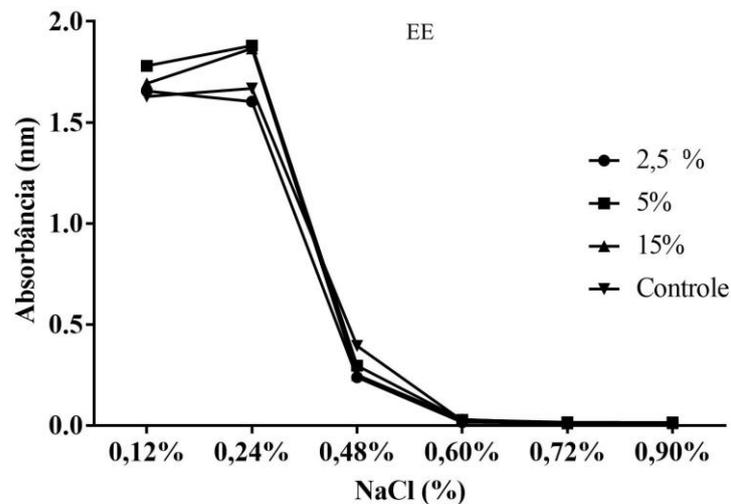
Vários estudos relatam o uso da *A. cepa* para testar a toxicidade de extratos vegetais (ANCIA; ROMÃO, 2016; ANJOS *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2016; KNOLL *et al.*, 2006). No entanto, na literatura são poucos os estudos de toxicidade com *A. cepa* em espécies do gênero *Virola*.

### 5.7 Teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária (FOE)

A Figura 14 apresenta a curva de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) para os extratos das folhas de *V. sebifera* pelo método a frio EBU e a quente EB, EH, EM e EE nas concentrações de 2,5%, 5% e 15% em diferentes concentrações de NaCl (0,12%, 0,24%, 0,48%, 0,60%, 0,72% e 0,9%).







**Figura 14.** Teste de fragilidade osmótica em amostras de sangue tratadas e não tratadas com extratos da folha de *V. sebifera* obtidos pela extração a frio EBU e extração a quente EB, EH, EM e EE nas concentrações 2,5%, 5% e 15% em diferentes concentrações (0,12%, 0,24%, 0,48%, 0,60%, 0,72% e 0,9%) de NaCl.

A FOE expressa a integridade estrutural das membranas quando exposta a um estresse osmótico (ALDRICH; SAUNDERS, 2001). Segundo Mousinho *et al.* (2008) fitocompostos podem alterar a integridade da membrana celular. Nesse sentido o ensaio hemolítico foi feito para analisar o potencial dos extratos da folha da *V. sebifera* em ocasionar lesão na membrana plasmática das células.

De acordo com os resultados para o teste de FOE (Figura 14) não houve diferença significativa ( $p > 0,05\%$ ) entre as concentrações dos extratos (2,5%; 5% e 15%) quando comparadas com o grupo controle ou comparadas entre as concentrações de NaCl para o extrato obtido pelo método a frio (Ultrassom) EBU e para os extratos obtidos pelo método a quente (soxhlet) EB, EH, EM e EE.

Houve uma maior absorbância nas concentrações 0,12% e 0,24% de NaCl, em função do maior grau de hemólise na hemácia, esse efeito é provocado pelo estresse hipotônico na hemácia que ao ser rompida libera hemoglobina que pode ser quantificada por leitura espectrofotométrica da absorbância (MOECKEL *et al.*, 2002). E dentre as concentrações de 0,48% a 0,9% houve uma queda acentuada da hemólise, demonstrando que não houve diferença significativa entre elas e que as hemácias estavam em harmonia com o meio, evidenciando, com isso, que a hemólise, nas duas primeiras concentrações salinas foi em função da baixa concentração de NaCl. Segundo Maiworm *et al.* (2008) concentrações de NaCl baixas podem causar rupturas das hemácias em função da sua sensibilidade a meios

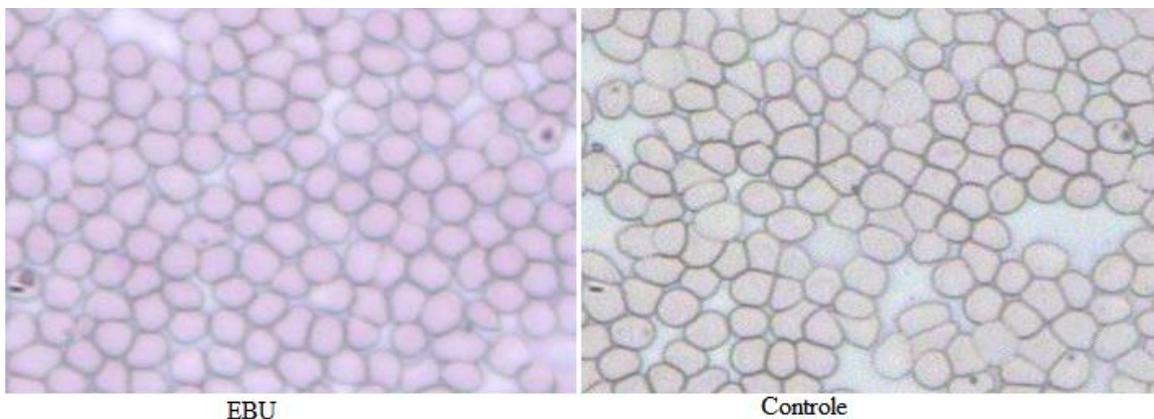
hipotônicos. Com isso pode-se inferir que as diferentes concentrações desses extratos não ocasionaram alteração fisiológica nas hemácias (Figura 15).

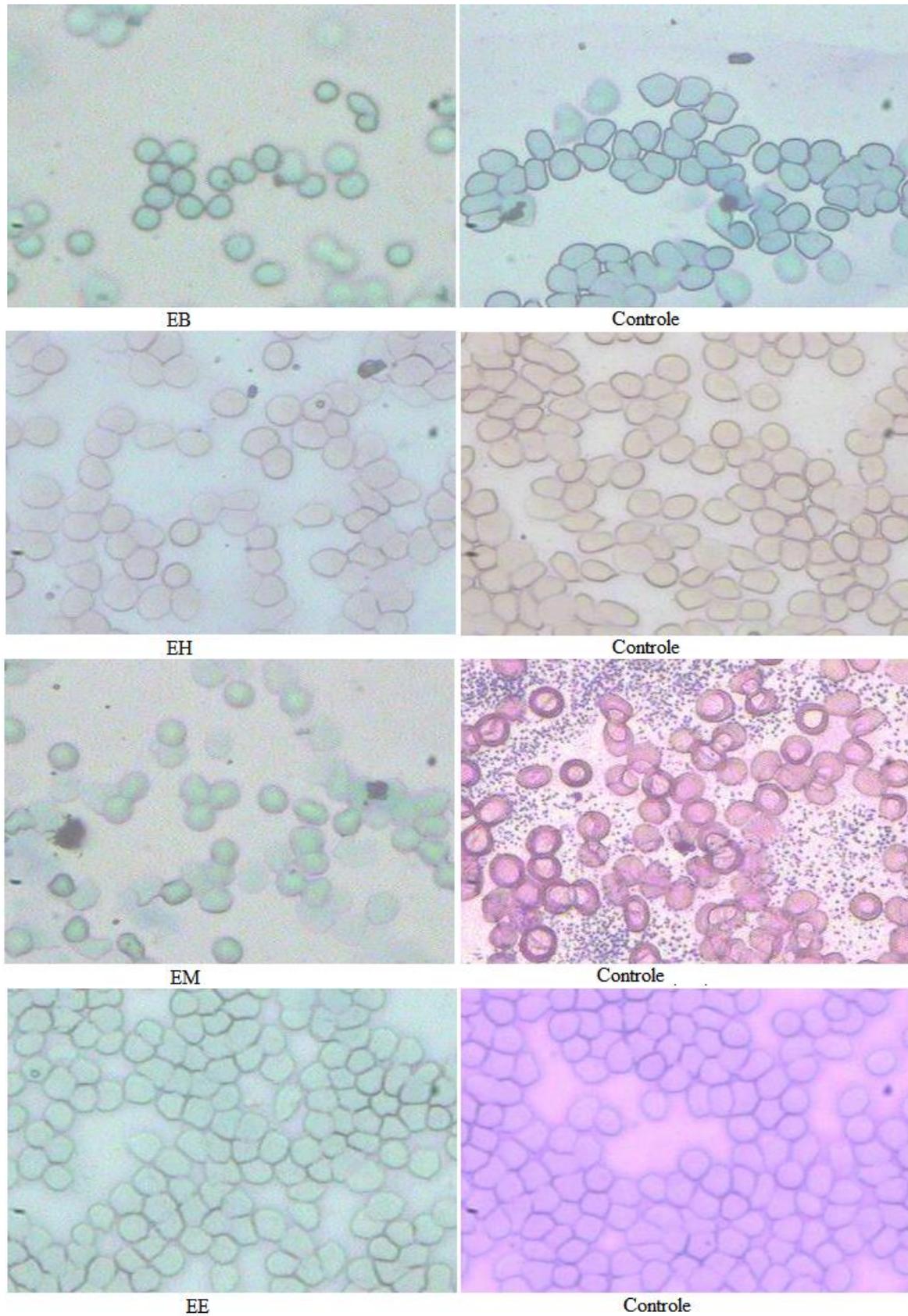
Nos estudos de Duarte *et al.* (2016) com extratos das folhas de *Raphiodon echinus* demonstraram que não houve diferença significativa no grau de hemólise entre as diferentes concentrações dos extratos em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), ou seja, não afetou a integridade da membrana dos eritrócitos.

Da mesma forma, Dias *et al.* (2018) também observaram efeitos similares em seus estudos com extratos liofilizados e *in natura* de *Aloe vera*, ou seja, não foi encontrada taxa de hemólise significativa que sugira efeito tóxico quando comparadas ao controle. Cunha *et al.* (2016) em suas pesquisas com a espécie *Eugenia uniflora* evidenciaram que o extrato etanólico das folhas não causou nenhuma anormalidade nas membranas das células sanguíneas.

Há inúmeros estudos na literatura com extratos vegetais analisando seus efeitos hemolíticos sobre células de eritrócitos (CLEMENTE; PEREIRA; NASCIMENTO, 2019; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2003; KEMPAIAH; SRINIVASAN, 2002; MARTINS, 2017; PASQUINI-NETTO *et al.*, 2012; SENGUPTA; GHOSH, 2011), no entanto testes hemolíticos com espécies do gênero *Virola* não foram encontrados na literatura.

Na análise morfológica dos eritrócitos não apresentaram destruição ou deformidade após o contato com os extratos obtidos no Ultrassom EBU e soxhlet EB, EH, EM e EE quando comparados ao controle, sugerindo que não houve efeito tóxico sobre as hemácias conforme Figuras 15.





**Figura 15.** Imagem microscópica do esfregaço sanguíneo, coradas com o Leishman, demonstrando a morfologia da membrana celular, após contato com os extratos pelo método a frio EBU e a quente EB, EH, EM e EE das folhas de *V. sebifera*.

## 5.8 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos da folha de *V. sebifera* foi realizada contra quatro cepas bacterianas, duas Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e duas Gram-negativas, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, e uma cepa fúngica, *Candida albicans*. Usando como controle positivo o cloranfenicol, para as bactérias, e o albocresil, para o fungo (Tabela 10).

**Tabela 10.** Atividade antimicrobiana dos extratos da folha de *V. sebifera* pelo método a frio EBU e a quente EB, EH, EM e EE frente aos micro-organismos *S. aureus*, *Salmonella*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans* pela técnica difusão em poço.

	Concentração (mg)	Micro-organismos				
		<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
<b>Extrato EBU</b>	50	15,84	-	2,60	-	-
	100	17,08	-	11,91	-	-
	200	18,69	-	11,75	-	-
<b>Controle</b>	positivo	25,19	31,00	27,52	30,07	21,00
<b>Extrato EB</b>	50	17,15	-	11,55	-	-
	100	19,09	11,8	13,61	-	-
	200	20,41	13,1	15,41	-	-
<b>Controle</b>	positivo	22,98	29,52	28,22	27,64	20,44
<b>Extrato EH</b>	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
	200	-	-	-	-	-
<b>Controle</b>	positivo	25,92	29,79	25,7	29,84	24,27
<b>Extrato EM</b>	50	16,61	-	-	-	-
	100	17,76	10,23	13,92	-	-
	200	19,50	12,63	15,06	-	-
<b>Controle</b>	positivo	21,91	28,74	29,78	27,39	21,04
<b>Extrato EE</b>	50	17,10	-	-	-	-
	100	17,74	-	17,00	-	-
	200	18,77	-	17,01	-	-
<b>Controle</b>	positivo	25,03	22,3	27,32	27,25	17,79

(-) não houve inibição nas concentrações testadas.

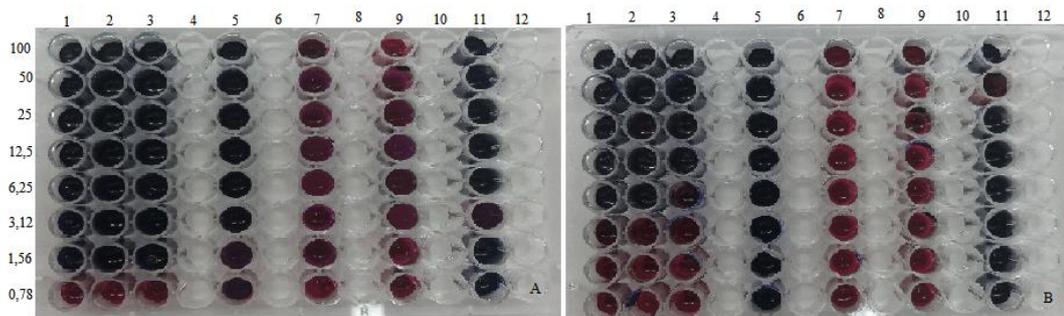
Para os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana identificada no teste de difusão em poço foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) com o intuito de confirmar a atividade antimicrobiana (Tabela 11 e Figura 16 a 19).

**Tabela 11.** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os extratos das folhas de *V. sebifera*, pelo método a frio EBU e a quente EB, EH, EM e EE.

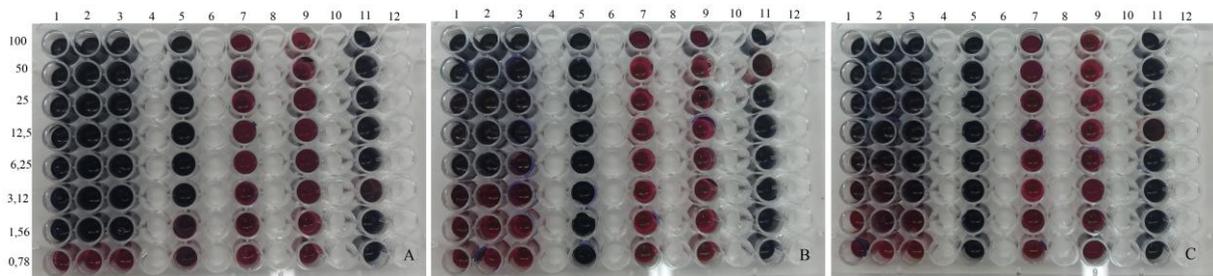
MICRO-ORGANISMOS	CIM (mg/ml)			
	EBU	EB	EM	EE
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,56	1,56	1,56	1,56
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,25	6,25	6,25	3,12
<i>Salmonella typhimurium</i>	*	6,25	12,5	*

\* Não apresentou atividade antimicrobiana no teste do poço.

As Figuras 16 a 19 apresentam os testes em microplacas de 96 poços dos extratos EBU, EB, EM e EE. Os valores de CIM foram obtidos por diluições sucessivas obtendo concentração final de extrato de 100 a 0,78 mg/ml e determinados por leitura visual.



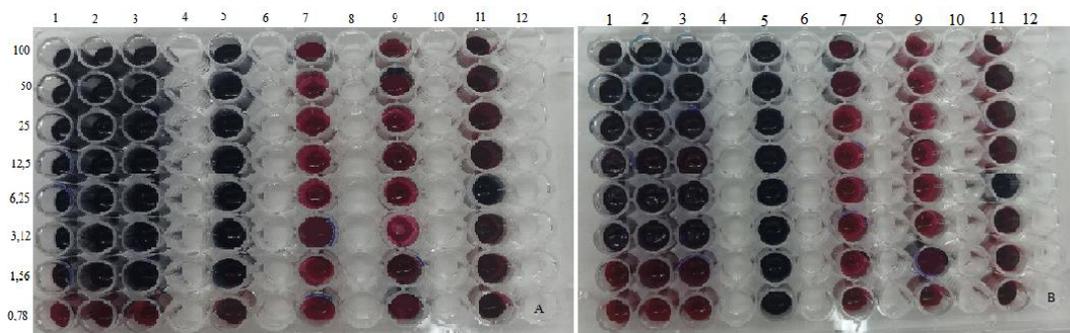
**Figura 16.** Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* do extrato etanólico bruto EBU obtido pelo método a frio da *V. sebifera*, microrganismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.



**Figura 17.** Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* (C) *Salmonella* do extrato etanólico bruto EB obtido pelo método a quente das folhas da *V. sebifera*, microrganismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.



**Figura 18.** Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* (C) *Salmonella* do extrato metanólico EM obtido pelo método a quente das folhas *V. sebifera*, microrganismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.



**Figura 19.** Concentração inibitória mínima do crescimento dos micro-organismos: (A) *S. aureus*; (B) *S. Epidermidis* do extrato etanólico EE obtido pelo método a quente das folhas da *V. sebifera*, microrganismo + extrato (1 a 3), controle positivo (5), controle negativo (7), cultura microbiana (9), esterilidade do meio de cultura (11). Vazias (4, 6, 8, 10, 12). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Somente o extrato EH não apresentou nenhum halo de inibição frente aos micro-organismos testados (Tabela 11), portanto não foi considerado na análise estatística.

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais está relacionada com alguns requisitos como o microrganismo avaliado, o método extrativo e o tipo de solvente, pois a polaridade do solvente tem uma grande influência na extração dos metabólitos da planta (GIRONDI *et al.*, 2017). Isso corrobora com o resultado visto, que o extrato hexânico, por ser apolar, não extraiu substâncias com ação antimicrobiana, ou pelo menos em quantidade suficiente. De acordo com Akhtar *et al.* (2018) a ausência de atividade antimicrobiana, pode ser devido a menor quantidade de compostos ou suas ações foram antagonizadas pela presença de outros compostos.

Dentre os micro-organismos avaliados o *S. aureus* foi inibido pelos extratos obtidos pelo método a quente EB, EM e EE e pelo método a frio EBU em todas as concentrações testadas, apresentando maior sensibilidade aos extratos com CIM > 1,56 mg/ml, demonstrando o potencial antimicrobiano da *V. sebifera* contra esse patógeno. Observa-se que flavonoides,

taninos e alcaloides foram detectados em todos estes extratos (Tabela 1) e com isso deduz-se que esses metabólitos são os responsáveis pela atividade antibacteriana.

Comparando as concentrações 50, 100 e 200 mg/ml de cada extrato com o controle tem-se que em todas as concentrações a inibição foi inferior ao controle. Quando comparados os microrganismos dentro de cada concentração 50, 100 e 200 mg/ml para todos os extratos, o EM não difereu estatisticamente do extrato EB na concentração 50 mg/ml, do extrato EBU nas concentrações 50 e 100 mg/ml, e nem do EE nas concentrações 50, 100 e 200 mg/ml. O extrato EE também não diferiu do EB na concentração 50 mg/ml e do extrato EBU nas concentrações 100 e 200 mg/ml para o *S. aureus*.

O *S. epidemidis* também foi inibido pelos extratos EBU, EB, EM e EE, apresentando valor de CIM de 6,25 mg/ml com exceção do EE, que obteve uma taxa de inibição um pouco maior (CIM de 3,12 mg/ml). Para o *S. epidermidis* o extrato EM não diferiu estatisticamente do EE na concentração 50 mg/ml e do EB nas concentrações 100 e 200 mg/ml. Segundo Vieira *et al.* (2018), produtos naturais tem melhor ação sobre bactérias gram-positivas. De acordo com Araújo *et al.* (2015), dentre os compostos fenólicos, os flavonoides e taninos são capazes de inibir micro-organismos e fatores de virulência.

O extrato EBU (método a frio) e os extratos EB, EM e EE (método a quente) não apresentaram halo de inibição para *C. albicans* e *E. coli* em nenhuma das concentrações, demonstrando que não houve diferença entre os métodos de extração (quente em Soxhlet e frio em Ultrassom assistida). Já nos estudos do Cordeiro *et al.* (2019) com sementes de *V. surinamensis*, comparando dois métodos de extração (a supercrítica de fluidos – SFE e o Soxhlet), demonstraram que a *S. aureus* foi sensível aos extratos obtidos por SFE, enquanto nos extratos obtidos pelo soxhlet, não foi observada nenhuma zona de inibição.

Apenas os extratos obtidos pelo método a quente EB e EM foram os que apresentaram sensibilidade a *Salmonella* com CIM de 6,25 mg/ml e 12,5 mg/ml, respectivamente. Isso indica que o desengorduramento favoreceu a extração de compostos polares. O EB não difereu estatisticamente do EM na concentração 200 mg/ml. Segundo Menezes *et al.* (2007) os microrganismos gram-negativos, devido a sua complexidade, são menos suscetíveis aos antimicrobianos.

A classe dos flavonoides possui atividade antibiótica em função da capacidade de complexar com as proteínas e a membrana de células bacterianas (COWAN, 1999; DESOTI *et al.*, 2011). Costa-Lotufo *et al.* (2003) relatam a atividade citotóxica dos flavonoides contra diferentes linhagens tumorais. Taninos são outros compostos com atividade antimicrobiana

(MONTEIRO *et al.*, 2005) e os alcaloides, de acordo com Wink e Schimmer (1999), inibem o crescimento de micro-organismos patogênicos.

Velasco *et al.* (2005) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos da espécie *V. sebifera* (Aubl.) contra o *S. aureus* e 28 cepas de MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) de pacientes infectados. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso apresentou maior atividade antibacteriana, com sensibilidade de 89,29% das cepas MRSA avaliadas, seguido do extrato etanólico (67,16%) e acetônico (39,29%), inferindo que as substâncias ativas presentes na *V. sebifera* são de natureza polar.

Em suas pesquisas, Barreto *et al.* (2011) relataram que os extratos preparados com acetato de etila e clorofórmio da seiva da *V. sebifera* apresentaram ótima atividade antimicrobiana contra as espécies de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já o óleo extraído das folhas de *V. sebifera*, segundo Costa *et al.* (2013), apresentou uma inibição significativa frente ao fungo *Corynespora cassicola*.

O extrato diclorometânico das folhas de *V. sebifera* nos estudos de Denny *et al.* (2007) apresentaram atividade antiproliferativa para a linhagem de pulmão (NCI-460), com IC<sub>50</sub> de 46 µg/mL, atividade esta, atribuída aos alcaloides ou compostos nitrogenados.

Bicalho *et al.* (2012) relataram que o extrato metanólico das folhas de *V. sebifera* e suas frações hexânica, diclorometânica e aceto de etila apresentaram atividade inseticida frente às operárias de formigas cortadeiras e potencial fungicida de lignanas, principalmente, a lignana (-)-kusunokinina (100%) frente ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

Nos estudos com extratos de *V. sebifera*, Baquero *et al.* (2015) isolaram o composto metilpluviatilol que foi ativo com porcentagem de inibição da proliferação maior que 90% da *Mycobacterium tuberculosis* a 128 µg / mL.

Cordeiro *et al.* (2019), encontraram resultados semelhantes a esta pesquisa ao estudarem o efeito antimicrobiano dos extratos do óleo de sementes da *V. surinamensis* onde não foi observado ação inibitória contra *C. albicans* e *E. coli*, enquanto se mostrou sensível para o *S. aureus*. As bactérias gram-positivas (*S. aureus*) são mais sensíveis aos antibióticos, enquanto as bactérias gram-negativas (*E. coli*) são mais resistentes, em função das diferenças estruturais em suas paredes celulares.

Resultados similares, também, foram encontrados por Costa *et al.* (2008), onde a *V. surinamensis* não apresentou halo de inibição para *E. coli* e se mostrou sensível a *S. aureus* sob o argumento que os micro-organismos gram-positivos são mais suscetíveis aos extratos que os gram-negativos. O extrato aquoso de *V. theiodora* também não apresentou ação contra a *E. coli*. (SUFFREDINI *et al.*, 2006).

O estudo de Oliveira (2018) apontou que o resíduo da *V. surinamensis* (torta da semente) do extrato hidrofílico foi sensível na concentração de 625 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e para a *Escherichia coli* na concentração de 1250 µg/mL. Já o extrato lipofílico mostrou-se inativo frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Isto pode ter relação com o método extrativo empregado ou o solvente utilizado por ser apolar acaba não extraindo compostos com ação antimicrobiana.

Outros estudos confirmam os resultados encontrados neste trabalho sobre maior sensibilidade do *S. aureus* aos extratos vegetais (ARAÚJO *et al.*, 2015; BONA *et al.*, 2014; PALMEIRA *et al.*, 2010; ROJAS *et al.*, 2016; SILVA, C., 2007).

De acordo com Auricchio e Bacchi (2003) é difícil comparar atividade antimicrobiana de extratos de plantas pois são muitas as variáveis que irão influenciar no resultado como aspectos climáticos que exercem influência na composição química do vegetal, parte da planta estudada, forma de preparar o extrato e, especialmente, os protocolos seguidos nos experimentos.

Contudo a descoberta de novas substâncias antimicrobianas é de considerável interesse devido à ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos atualmente utilizados no tratamento de infecções (BRAQUEHAIS, 2016).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização química das folhas da espécie *V. Sebifera* identificou a presença de compostos fenólicos na triagem fitoquímica que puderam ser identificados por CLAE como catequina, ácido siríngico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, naringina, rutina, hesperidina, morina, ácido rosmarínico e quercitina. Compostos fenólicos, estes, evidenciados na análise cromatográfica gasosa (CG/EM), que, também, demonstrou uma matriz diversificada de compostos (lignana, cetona, éter, aminoácido, amina). Os resultados apontam a espécie como uma boa fonte de antioxidantes naturais. A fração etanólica EE demonstrou atividade antioxidante estatisticamente superior em relação aos demais extratos testados, o que demonstra que a extração sequenciada pode ser uma metodologia promissora para a extração de compostos antioxidantes. Também foi possível observar que a extração sequencial em ordem crescente de polaridade usando Soxhlet, otimizou a extração dos compostos o que está de acordo com os resultados obtidos pelo CLAE e CG/MS.

Os extratos demonstraram propriedades tóxicas frente aos bioensaios com *Allium cepa*, entretanto suas substâncias bioativas podem ser usadas contra infecções causadas por micro-organismos. A investigação da capacidade citotóxica nos experimentos de fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos demonstrou que não foi encontrado efeito tóxico significativo, preservando a morfologia das membranas que não apresentaram destruição ou deformidade.

De cinco espécies de micro-organismos testados, três (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Salmonella typhimurium*) apresentaram atividade antimicrobiana pelo teste preliminar de difusão por poço para os extratos, podendo, assim, inferir que os compostos fenólicos encontrados nos extratos possam ser os responsáveis por esta atividade. Os resultados deste estudo sugerem que a *V. sebifera* possua atividade anti-proliferativa e citotóxica na inibição do ciclo celular, podendo representar novas opções de substâncias antimicrobianas. No entanto, experimentos aprofundados, como o isolamento e identificação dos compostos responsáveis pelos efeitos observados e seus mecanismos de ação, são imprescindíveis.

Ainda são poucos os trabalhos que demonstrem o potencial biológico da *V. sebifera*, espécie típica do cerrado, principalmente no cerrado tocantinense. Portanto as informações direcionam para estudos futuros sobre o potencial farmacológico dessa espécie de forma a justificar a adequação ou não do uso medicinal popular, visto que, geralmente, a forma de preparo mais usada é o chá, sendo as folhas as mais utilizada para fins terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. *et al.* Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. **Food Science and Technology**. 30: 254-259, 2010.
- ADRIANZÉN, M. U. Aporte de biomasa aérea de las especies arbóreas de la familia Myristicaceae en los bosques Amazónicos del Perú. **Revista de Biología Tropical**. 63: 263-273, 2015.
- AGATI, G. *et al.* Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**. 196, 67-76, 2012.
- AKHTAR, N. *et al.* Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. **Arabian Journal of Chemistry**. 11: 1223–1235, 2018.
- ALAM, M. A. *et al.* Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. **American Society for Nutrition**. Adv. Nutr. 5: 404–417, 2014.
- ALI, S. S. *et al.* Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**. 41: 1–15, 2008.
- ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. Comparison of erythrocyte os-comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**. 26: 179 –182, 2001.
- ALMEIDA, G. V. B. d. *et al.* Chemical characterization and evaluation of gastric antiulcer properties of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Virola elongata* (Benth.) Warb. **Journal of Ethnopharmacology** 231, 113–124, 2018.
- ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**. 31: 1224-1229, 2008.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**. 5: 450-513, 2013.
- AMORIM, E. L. C. *et al.* A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities** 2: 88-94, 2008.
- AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Laverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. 16: 189-203, 2002.
- ANCIA, J. P.; ROMÃO, N. F. Análise da atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *Allium cepa*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**. 3: 16–26, 2016.

- ANDRADE, C. A. *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 17: 231-235, 2007.
- ANDREI, C. C.; BRAZ FILHO, R. Isolamento de antraquinonas de *Hemorocallis fulva*. Liliaceae. **Semina**. 10: 260-261, 1989.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 66: 1-9, 2007.
- ANJOS, A. P. S. *et al.* Fitoquímicos e atividade antioxidante das espécies *Lafoensia pacari* e *Calycophyllum spruceanum*. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer**. 15: 1227, 2018.
- AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, M. C. Reserva Legal no Bioma Cerrado: uso e preservação. Planaltina – DF: **Embrapa Cerrados**, 2006.
- ARAÚJO, E. R. D. *et al.* Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente às bactérias gram-negativa e gram-positiva. **Biota Amazônia**. 5: 66-71, 2015.
- ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. de F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**. 60: 161-165, 2013.
- ARTEAGA, L. L. Dispersión y remoción de semillas de *Virola sebifera* (Myristicaceae) en un bosque montano de Bolívia. **Ecología en Bolívia**. 43: 111-118, 2008.
- ARRAIS, F. C. L. *et al.* Levantamento etnobotânico nas margens do córrego machado - Palmas, Tocantins, Brasil. **Flovet**. v.1, n.9, 2017.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G. Panagiotis kefalas tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**. 89: 27- 36, 2005.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 62: 55-6, 2003.
- AVANCINI, G. *et al.* Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**. 63: 171–175, 2003.
- AVILA, M. A. *et al.* Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. **Icancer Research**. 54: 2424-2428, 1994.
- BADKE, M. R. *et al.* Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**. 21: 363-70, 2012.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17: 444-447, 2007.

- BALASUBRAMANI, G. *et al.* GC–MS analysis of bioactive components and synthesis of gold nanoparticle using Chloroxylon swietenia DC leaf extract and its larvicidal activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 148: 1-8, 2015.
- BAQUERO, E. *et al.* Furan type lignans with antimycobacterial activity. **Boletín latino americano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas**. 14: 171 – 178, 2015.
- BARATA, L. E. S. *et al.* Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry** 55: 589-595, 2000.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**. 32: 679-688, 2009.
- BARRETO, H. P. *et al.* Análise comparativa da atividade antimicrobiana da seiva, óleo e frações da espécie *Virola sebifera*. In: **63ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da ciência (SBPC)** Cerrado: água alimento e energia, UFG- Goiânia-GO, 2011.
- BARROS, A. P. *et al.* Uso medicinal de plantas na comunidade de Santa Helena, Axixá–Tocantins. In: **XVI Encontro regional de Agroecologia do Nordeste**. CECA/UFAL Rio Largo-AL, 2017.
- BARROSO, H. S. *et al.* Policetídeos com atividade antioxidante de *Virola Sebifera*. 26a Reunião Anual da **Sociedade Brasileira de Química - SBQ** - 26 a 29 de maio de 2003.
- BASTOS, E. G. P. *et al.* Antimicrobial evaluation of endophytic fungi extracts isolated from *Casearia sylvestris*. **Journal of medicinal plant research**. 11: 683-689, 2017.
- BEGUM, A. N., TERAQ, J. Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocyte deformability. **The Journal of nutritional biochemistry**. 13: 265-272, 2002.
- BEHLING, E. B. *et al.* Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição** 15: 285-292, 2004.
- BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 545p., 2008.
- BERNAL, F. A.; SUÁREZ, L. E. C. Estudio fitoquímico de las hojas de *Virola sp.* (Myristicaceae). **Scientia et Technica**. 1: 33, 2007.
- BERNARDES, N. R.; PESSANHA, F. F.; OLIVEIRA, D. B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. **Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB**. 6: 11-19, 2010.
- BESSA, N. G. F. *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais** 15: 692-707, 2013.

BEZERRA, C. M. *et al.* Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de malva-santa *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Electronic Journal of Pharmacy**. 3: 220-228, 2016.

BICALHO, K. U. Estudo fitoquímico de *Virola sebifera* associado ao controle de formigas cortadeiras. **Dissertação (Mestrado em Química)**. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) São Carlos, 2011.

BICALHO, K. U. *et al.* Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. **Psyche: A Journal of Entomology**. doi:10.1155/2012/785424, 2012.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. 90: 157–177, 2001.

BÔA, I. S. F. *et al.* Resin from *Virola oleifera* protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. **PLOS ONE** | doi:10.1371/journal.pone.0144329 December, 2015.

BOLZANI, V. S. *et al.* **Biodiversidade brasileira: uma fonte potencial de agentes terapêuticos ainda inexplorada**. In: FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 5ª edição. Ed. Itajaí, SC: Univali, 2016.

BONA, E. A. M. de *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**. 81: 218-225, 2014.

BRANDÃO, M. G. L.; GOMES, C. G.; NASCIMENTO, A. M. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. **Revista Fitos**. 2: 24-29, 2006.

BRAND-WILLIMS, E. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activity. **Food Science and Technology**. 28: 25-30, 1995.

BRAQUEHAIS, I. D. *et al.* Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 18: 582-587, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Tratamento das principais infecções comunitárias e relacionadas a assistência a saúde e a profilaxia antimicrobiana em cirurgia. ANVISA Publicações Eletrônicas. 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo3/Introdução.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/Introdução.htm). Acesso em 04/12/2019.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. 33: 229-239, 2010.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos. 2010.

BREITBACH, U. B. *et al.* Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. Von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**. 147: 180–189, 2013.

BULGAKOV, V. P.; INYUSHKINA, Y. V.; FEDOREYEV, S. A. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. 32: 203-217, 2012.

CAIRES, A. C.; GILENO, M. C. Padronização e aplicação da curva de fragilidade osmótica no auxílio diagnóstico de anemias. **Revista ReBraM**. 15: 49-58, 2012.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33: 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica**. Bahia, 78: 98-106, 2008.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. 55: 37-39, 2003.

CAMPOS, S. C. *et al.* Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 18: 373-382, 2016.

CAPASSO, R. *et al.* Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. 71: 58-65, 2000.

CARDOSO, F. D. P. Bioprospecção para compostos antimicobacterianos. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente). Universidade Federal do Tocantins (UFT) Palmas - TO, 2017.

CARLOS, A. A. *et al.* *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae) leaf chemical composition and implications on leaf-cutter ant foraging choice. **Arthropod-Plant Interactions** 12:361–368, 2017.

CARNEIRO, H. O saber fitoterápico indígena e os naturalistas europeus. **Fronteiras**. 13: 13-32, 2011.

CARTEA, M. E. *et al.* Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. **Molecules**. 16: 25- 280, 2011.

CARVALHO, A. A. V. *et al.* Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytother**. 24: 113–118, 2010.

CARVALHO, E. B. *et al.* Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Revista Brasileira Hematol Hemoter**. 29: 149-52, 2007.

CASTRO, O. *et al.* Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista biología Tropical** 47: 605-616, 1999.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. 21: 99-105, 1998.

CEZARI, E. J. Plantas medicinais: atividade antitumoral do extrato bruto de sete plantas do cerrado e o uso por povos tradicionais. Dissertação (**Mestrado em Ciências do Ambiente**). Universidade Federal do Tocantins (UFT) Palmas - TO, 2010.

CHAVES, T. P. Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro. Dissertação (**Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental**). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2012.

CHÁVEZ, R.; PLAZA, A.; UGAZ, O. L. de. Antioxidantes de origen vegetal. **Revista de Química**. PUC-Lima. 10: 71-101, 1996.

CITOGLU, G. S.; ALTANLAR, N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. **Journal Herb Pharmacotherapy**. 32: 159-163, 2003.

CLAVIN, M. *et al.* Antiinflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. **Journal of Ethnopharmacology**. 112: 585-589, 2007.

CLEMENTE, R. C.; PEREIRA, R. J.; NASCIMENTO, G. N. L. do. Avaliação do potencial toxicológico de Bacabas-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) por ensaios de fragilidade osmótica eritrocitária, *Artemia salina* e em raiz de *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Development**. 5: 19170-19183, 2019.

CORDEIRO, R. M. *et al.* Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of ucuúba (*Virola surinamensis*) seed oil: global yield, kinetic data, fatty acid profile, and antimicrobial activities. **Chemical Engineering Communications**. 206: 86–97, 2019.

COSTA, E. S. *et al.* Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytotherapy research**. 22: 705-707, 2008.

COUTINHO, M. A. S. *et al.* Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química** 1: 241-256, 2009.

COUTINHO, P. N. *et al.* Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 206: 65-72, 2017.

COSTA, A. V. *et al.* Composição química e avaliação fungicida do óleo essencial da *Virola sebifera* sobre o crescimento micelial da *Corynespora cassicola*. In: **VII SBOE – Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais**. Universidade Federal do Oeste do Pará – Santarém, PA. 15 a 18 de outubro, 2013.

COSTA-LOTUFO, L.V. *et al.* Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* AC Smith. **Zeitschrift für Naturforschung**. 58: 675-680, 2003.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. 12: 564-582, 1999.

CRAGG, G. M. *et al.* New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**. 77: 703-723, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. the wall and wani contribution to cancer chemotherapy. **Journal of Natural Products**. 67: 232-244, 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos**. In: FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 5ª edição. Ed. Itajaí, SC: Univali, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1830: 3670-3695, 2013.

CUNHA, F. A. B. *et al.* Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 84: 614-621, 2016.

DALCOL, I. I. *et al.* Inhibitory effects of three species of *Hypericum* on POP and DPP IV activities. **Anales Del VI Internacional Symposium on natural products and its applications**. Chillan. 2007.

DANELUTTE, A. P.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J. Lignoids in seedlings of *Viola sebifera*. **Phytochemical Analysis**. 11: 383-386, 2000.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**. 55: 396-398, 1997.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. 5: 33-40, 2004.

DENNY, C. *et al.* Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Viola sebifera* leaves. **Phytotherapy Research**. 22, 127-130, 2008.

DENNY, C. *et al.* Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Viola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Brazilian Journal of Pharmacognosy) 17: 598-603, 2007.

DESOTI, V. C. *et al.* Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde**. 15: 3-13, 2011.

DEVASAGAYAM, T. P. A. *et al.* Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **The Journal of the Association of Physicians of India (JAPI)**. 52: 4, 2004.

DIAS, J. L. *et al.* Propriedade antimicrobiana e potencial citotóxico in vitro do gel de *Aloe vera*: uma discussão sobre o uso em queimaduras. **Scientia Plena**. 14: 2-14, 2018.

DÍAZ, L. L. O. Perfilado metabólico de plantas del género *Virola spp* (Myristicaceae) provenientes de la Amazonía y Orinoquía Colombiana y evaluación de la actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*. Dissertação (**Magister en Ciências Química**). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 2015.

DIAZ, M. N. *et al.* Antioxidants and atherosclerotic heart disease. **New England Journal of Medicine**. 337: 408-416, 1997.

DRISKO, J. A.; CHAPMAN, J.; HUNTER, V. J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. **Gynecologic Oncology**. 88: 434-439, 2003.

DUARTE, A. E. *et al.* Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. **Molecules**. 21: 1-2, 2016.

DUARTE, M. C. T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 14: 06-08, 2004.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. 112: 4-29, 2016.

ELISABETSKY, E.; SUZA, G. C. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C. M. O. et al., Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto alegre: editora da UFRGS; Florianópolis, 2010.

ENDERS, D. *et al.* First asymmetric synthesis and determination of the absolute configuration of a lignan isolated from *Virola sebifera*. **European Journal of Organic Chemistry**. p.1984–1990, 2005.

ESQUINCA, A.; MORENO, M. C. Papel ecológico de los metabolitos secundários. **Lacandonia**. 2: 123-130, 2017.

FABBRI, D. *et al.* Cromatografia gasosa/caracterização espectrométrica de massa de produtos de pirólise/sililação de glicose e celulose. **Rapid Commun Espectro de massa**. 16: 2349-2355, 2002.

FACHINETTO, J. M. *et al.* Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17: 49-54, 2007.

FELHI, S. *et al.* Solvent extraction effects on phytochemical constituents profiles, antioxidant and antimicrobial activities and functional group analysis of *Ecballium elaterium* seeds and peels fruits. **Food Science and Technology** 37: 483-492, 2017.

FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. 42: 369-394, 2006.

- FERNANDES, K. R. P. *et al.* Phenolic compounds from *Virola venosa* (Myristicaceae) and evaluation of their antioxidant and enzyme inhibition potential. **Acta Amazônica** 49: 48-53, 2019.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium** 6: 36-41, 2008.
- FERREIRA, E. A. 2-Acil-cicloexano-1, 3-diona de *Peperomia trineura* (miq.). Dissertação (**Mestrado em Química Orgânica**). Programa de Pós-Graduação em Química-Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, 2009.
- FERRO, D. **Fitorerapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 502 p., 2006.
- FIGUEIREDO, S. M. *et al.* Cerebral macroabscess caused by *Candida albicans* in an immunocompetent patient: A diagnostic challenge. **Medical Mycology Case Reports**. 3: 17-19, 2014.
- FIRMINO, F. C. BINSFELD, P. C. **A biodiversidade brasileira como fonte de medicamentos para o SUS**, 2013. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br>> Acesso em: 05/11/2019.
- FIRMO, W. C. A. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**. 18: n. especial, 2011.
- FONSECA, P.; LIBRANDI, A. P. L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 44: 271-277, 2008.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 607 p., 2013.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. 182 p., 2005.
- FRANCO, F. *et al.* Etnobotânica: aspectos históricos e aplicativos desta ciência. **Caderno de Cultura e Ciência**. Ano VI, v.10, n.2, 2011.
- FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48: 3597–3604, 2000.
- FUNASAKI, M. *et al.* Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. **Química Nova**. 39: 194-209, 2016.
- FURQUIM, L. C. *et al.* Relação entre plantas nativas do cerrado e água. **Científica Multidisciplinary Journal**. 5: 146-156, 2018.
- GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P-U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**. Serie Fisiología Vegetal. 2: 119-145, 2009.

- GARCIA, C. S. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana in vitro de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 70: 589-98, 2011.
- GARCIA, D. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of 31 amazonian vegetable species of tamshiyacu Loreto-Peru. **Journal of Natural Sciences**, v. 7, n. 1, 2019.
- GARCÍA, D. E. Los metabolitos secundários de las espécies vegetales. **Pastos y Forrajes**. v. 27, n. 1, 2004.
- GARCIA, S. A. M. *et al.* Ácido siríngico exerce efeito tipo-antidepressivo e antioxidante em camundongos submetidos ao teste repetido de suspensão pela cauda. **Anais I Simpósio Internacional em Investigações Químico-Farmacêuticas**. Itajaí. Santa Catarina. 2017.
- GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 4. ed. Barueri, SP: Manole, 2011.
- GHADEMZADEH, A.; GHADEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5: 6697-6703, 2011.
- GIRONDI, C. M. *et al.* Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. **Future Microbiology**. 12: 671–681, 2017.
- GIULIANI C. *et al.* The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function. **Food and Chemical Toxicology**. 66: 23-9, 2014.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**. 30: 374-381, 2007.
- GOTTLIEB, O. R. Chemical studies on medicinal myristicaceae from amazonia. **Journal of Ethnopharmacology**. 1: 309 - 323, 1979.
- GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Transações Filosóficas da Royal Society A: Ciências Matemáticas, Físicas e de Engenharia**. 355: 1499- 1510, 2000.
- HAMILL, F. A. *et al.* Traditional herbal drugs of Southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays. **Journal of Ethnopharmacology**. 84: 57–78, 2003.
- HARROWEN, D. C. *et al.* On the identity of a neo-lignan from the fruits of *Virola sebifera*. **Tetrahedron Letters**. 39: 6757-6760, 1998.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**. 59: 205-215, 1996.
- HEIL, M. *et al.* Extraction and quantification of condensed tannins as a measure of plant anti-herbivore defense Revisiting an old problem. **Natur wissens chaften**. 89: 519-524, 2002.

HELENO, S. A. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds. **Food Chemistry**. 173: 501-513, 2014a.

HELENO, S. A. *et al.* Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. **Food Research International**, 55, 170–175, 2014b.

HENRIQUES, A. T. *et al.* Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. (org.). *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.765-791, 2010.

HERRERO-MARTÍNEZ, J. A; *et al.* Infecciones por hongos en sujetos no inmunocomprometidos. **Medicine**. 58: 3426-34, 2014.

HIRUMA-LIMA, C. A. *et al.* Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 122: 406-409, 2009.

ITURRIAGA, L. *et al.* Active naringin-chitosan films: Impact of UV irradiation. **Carbohydrate Polymers**. 110: 374–381, 2014.

JAPIASSU, K. B., Biossíntese catalisada por *Beauveria bassiana* ATCC 7159 de um novo flavonóide metilglicosilado potencialmente antioxidante e antifúngico. (**Dissertação de Mestrado**). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 117p, 2018.

JIANG, W. L. *et al.* Rosmarinic acid protects against experimental sepsis by inhibiting pro inflammatory factor release and ameliorating hemodynamics. **Shock**. 32: 608-613, 2009.

JIANG, P. *et al.* Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. **Journal of Translational Medicine**. 12:13, 2014.

JUNG, H. J. *et al.* Evaluation of the Antiangiogenic, antiinflammatory, and antinociceptive activities of morin. **Planta Médica**. 76: 273–275, 2010.

KALA, K. H. *et al.* Ten years of research on phenolics (2005-2015): A status report. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**. 18: 2-5, 2016.

KATO, M. J. *et al.* Acylresorcinols from *Virola sebifera* and *Virola elongata*. **Phytochemistry**. 24: 533-536, 1985.

KAWANISHI, K.; HASHIMOTO, Y. Long chain esters of *Virola* species. **Phytochemistry**. 26: 749-752, 1987.

KAWANISHI, K. *et al.* Alkaloids from the hallucinogenic plant *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 24: 1373-1375, 1985.

KEMPAIAH, R. K.; SRINIVASAN, K. Integrity of erythrocytes of hypercholesterolemic rats during spices treatment. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 236: 155–161, 2002.

- KITTAKOOP, P.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S. Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 2, 2014.
- KLINK, C. A. MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**. 1: 146-155, 2005.
- KNEKT, P. *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**. 76: 560-568, 2002.
- KNOLL, M. F. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**. 29: 539-542, 2006.
- LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 88: 21-25, 2007.
- LEE, H. J. *et al.* Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Toxicology**. 250: 109-115, 2008.
- LEE, Y. S.; BAEK, N.; NAM, T. Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. 16: 1-13, 2015.
- LEITE, A. M. C.; LLERAS, E. Áreas prioritárias na Amazônia para a conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fase preliminar. **Acta Botânica Brasileira**. 7: 61-94, 1993.
- LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu. 550 p., 2009.
- LENZA, E.; OLIVEIRA, P. E. Biologia reprodutiva e fenologia de *Virola sebifera* (Aubl.) (Myristicaceae) em mata mesofítica de Uberlândia, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. 29: 443-451, 2006.
- LESSA, L. R. *et al.* Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* L. como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. **Revinter**. 10: 39-48, 2017.
- LIMA, A. E. Bioprospecção de óleos e de fungos endofíticos com potencial antifúngico. Dissertação (**Mestrado em Biotecnologia**) Universidade Federal do Tocantins (UFT) Palmas - TO, 2014.
- LIN, Y. Microbial transformation of phytosterol in corn flour and soybean flour to 4-androstene-3,17-dione by *Fusarium moniliforme* Sheld. **Bioresource Technology** 100: 1864-1867, 2009.
- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. 1, 11-diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 21: 751-755, 1982.
- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 22: 1516-1518, 1983.

- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Aryltetralone and arylindanone neolignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 23: 2021-2024, 1984a.
- LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Further lignoids from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 23: 2647-2652, 1984b.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3ª Ed., Instituto Plantarum. Nova Odessa-SP, 2000.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. Ed. Editora UFV. São Paulo, 2002.
- LORENZI, H; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. Ed., Instituto Plantarum. Nova Odessa-SP, 2008.
- LOU, Z. *et al.* *p*- Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food control**. 25, 550-554, 2012.
- LOUREIRO, A. A. *et al.* Estudo anatômico de 24 espécies do gênero *Virola* (myristicaceae) da amazônia. **Acta Amazônica**. 19: 415-465, 1989.
- MACEDO, F. M. *et al.* Determinação de Compostos Fenólicos Totais em Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**. 5: 1164-1165, 2007.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. 25: 429-438, 2002.
- MAIWORM, A. I. *et al.* Osmotic and morphological effects on red blood cell membrane: action of an aqueous extract of *Lantana camara*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 18: 42-46, 2008.
- MALHEIROS, R. A influência da sazonalidade na dinâmica da vida no bioma cerrado. **Revista Brasileira de Climatologia**. 19: 113-128, 2016.
- MALIK, E. M.; MULLER, C. E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal Research Reviews**. 36: 705-748, 2016.
- MARCOTULLIO, M. C.; PELOSI, A.; CURINI, M. Hinokinin, an emerging bioactive lignan. **Molecules**. 19: 14862-14878, 2014.
- MARTÍNEZ V, J. C. *et al.* Lignano furofuránicos en corteza de *Virola sebifera* (Aublet). **Revista Colombiana de Química**. 14: 1-2, 1985.
- MARTINEZ, V, J. C. Distribution of flavonoids in the Myristicaceae. **Phytochemistry**. 55: 505-511, 2000.
- MARTINEZ, V, J. C. *et al.* Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves. **Phytochemistry**. 50: 883-886, 1999.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MAZID, M. *et al.* Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**. 3: 232-249, 2011.

MENEGUETI, D. U. O. *et al.* Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do jamari, rondônia, amazônia ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**. 10: 181-187, 2011.

MENEZES, F. G. *et al.* Evolução da Farmaco-terapia de Antibióticos em Pacientes com Infecção hospitalar. **Saúde Coletiva**, v. 4, n. 15, p. 84-88, São Paulo, 2007.

MEYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. 403: 853-858, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS. Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos 2006. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-mediciniais-e-fitoterapicos>. Acesso em: 28/10/19.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS. RENISUS – **Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS DAF/SCTIE/MS – RENISUS** - fev/2009. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 28/10/19.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 2011.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Mapas de cobertura vegetal dos Biomas brasileiros**. 2007. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/cerrado.html>. Acesso em: 28/08/19.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. Plano de ação para prevenção e controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado- **PPCERRADO**. Brasília, DF, 2009.

MIYAZAKI, Y, *et al.* The natural flavonoid myrricetin inhibits gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. **European Journal of Pharmacology**. 820: 2017-221, 2018.

MOECKEL, G. W. *et al.* Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences**. 71: 2413-24, 2002.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**. 28: 892-896, 2005.

MORAIS, S. K. R. *et al.* Biological Activities of Lignoids from Amazon Myristicaceae Species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 20: 1110-1118, 2009.

MOUCO, G. *et al.* Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 31: 68-73, 2003.

MOUSINHO, K. C. *et al.* Effect of the extract of *Ricinus communis L.* on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with Technetium-99m and morphology of the cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 51: 1139-1146, 2008.

NARENDRA, M. *et al.* Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**. 67: 1065-1071, 2007.

NEWMAN D. J. *et al.* Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. 66: 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J, CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. 75: 311-335, 2012.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. v.32 n.3, 2009.

OLIVEIRA, A. I. T. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Palm Leaf Extracts from Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macaúba (*Acrocomia aculeata*). **The Scientific World Journal**. p. 1-5, 2016.

OLIVEIRA, A. I. T. *et al.* In vitro antimicrobial activity and fatty acid composition through gaschromatography-massspectrometry (GC-MS) of ethanol extracts of *Mauritia flexuosa* (Buriti) fruits. **Journal of Medicinal Plant Research**. 11: 635-641, 2017.

OLIVEIRA, B. H. **Obtenção de novos fármacos através da biotransformação de produtos naturais**. In: YUNES, R. S.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). *Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 5 ed., rev. e ampl., Itajaí, SC.: Univali, 2016.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Antibacterial mode of action of the ethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. involves bacterial membrane perturbations. **Journal of Ethnopharmacology**. 172: 356–363, 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 17: 2015.

OLIVEIRA, K. B. Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese. (Dissertação de mestrado) **Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal do Paraná, 2010.

OLIVEIRA, K. M. Obtenção de extratos padronizados em antioxidantes naturais: aproveitamento dos resíduos da ucuúba (*Virola surinamensis*). (Dissertação de mestrado) **Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, 2018.

ORDUZ, L. L. *et al.* A novel flavone, LC-MS-Based profiling, phenol and flavonoid content, and antioxidant activity of *Virola carinata*. **Planta Medica**. v. 79, n. 10, 2013.

OTERO M. J.; HIDALGO L. G. Taninos condensados em espécies forrajeras de clima templado: efectos sobre La productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). **Livestock Research for Rural Development**. 16: 1-9, 2004.

OSZMIANSKI, J. *et al.* Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. **Food Chemistry**. 100: 579-83, 2007.

OKSI, J. *et al.* *Candida dubliniensis* spondylodiscitis in an immunocompetent patient. Case report and review of the literature. **Medical Mycology Case Reports**. 3: 4-7, 2014.

PAIVA, A.O; REZENDE, A.V.; PEREIRA, R. S. Estoque de carbono em cerrado *sensu stricto* do Distrito Federal. **Revista Árvore**. 35: 527-538. 2011.

PALMEIRA, J. D. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análise Clínica**. 42: 33-37, 2010.

PALOMINO, J. C. *et al.* Resazurin Microtiter assay plate: simple and inexpensive method for 51 detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46: 2720-2722, 2002.

PAPON, N. *et al.* Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS Pathogens**. 9: 1-4, 2013.

PASQUINI-NETTO, H. *et al.* Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 14: 666-672, 2012.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B. *et al.* The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. **Biochemical Pharmacology**. 66: 605–612, 2003.

PFALLER, M. A. *et al.* Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 82: 303-13, 2015.

PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. D. S. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidioscolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 5: 2310-2316., 2011.

PEREIRA, A.C.H. *et al.* Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. **Pharmaceutical Biology**. 55: 472–480, 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. 3: 146-152, 2012.

PEREIRA, S. F. M. *et al.* Avaliação do rendimento e composição química do óleo essência das folhas, frutos de *Virola sebifera* Aubl. (myrsiticaceae). **58º Congresso Brasileiro de Química**, 2018.

PEREIRA, D. R. *et al.* Fragilidade osmótica do extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa* sobre eritrócitos de ratos. **Resumo expandido**, 2007. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1492-1.pdf>. Acesso em: 18/10/2019.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, p.1-26. 2004. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGrad/Bio/MetSec.pdf>. Acesso em: 25/10/ 2019.

PINHEIRO, A. K. *et al.* Constipação intestinal: tratamento com fitoterápicos. **Revista Científica (FAEMA)**. 9: 559-564, 2018.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. 25: 45-61, 2002.

PROCHAZKOVA, D. *et al.* Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia** 82: 513-523, 2011.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracro druonurun* deuva). **Revista Árvore**. 26: 485-492, 2002.

QIAO, S. *et al.* Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. **Free Radicals Research**. 39: 995-1003, 2005.

QUINTANILHA, L. G.; LOBÃO, A. Q. Flora do Rio de Janeiro: Myristicaceae. **Rodriguésia**. 68: 085-089. 2017

RESTIVO, A. *et al.* Development and optimisation of an HPLC-DAD-ESI-Q- To F method for the determination of phenol acids and derivatives. **PLOS ONE**, 9: e88762, 2014.

REZENDE, K. R. *et al.* Antioxidant activity of aryltetralone lignans and derivatives from *Virola sebifera* (Aubl.). **Natural Product Research**, 19: 662- 666, 2005.

REZENDE, K. R.; KATO, M. J. Dibenzylbutane and aryltetralone lignans from seeds of *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. 61: 427-432, 2002.

REZENDE, F. M. de *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. Laboratório de Ensino de Botânica, p. 93, 2016.

- RIBEIRO, S. O. *et al.* Avaliação antioxidante de flavonoides de *Citrus sp.* **ANAIS SIMPAC.** v. 2, n. 1, 2010.
- RIBEIRO, V. P. *et al.* Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology.** 56: 253–268, 2018.
- RICE-EVANS, C. A. *et al.* Antioxidant activityrelationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine,** 20: 933-956, 1996.
- RIGONATO, V. D.; ALMEIDA, M. G. A singularidade do Cerrado: a interrelação das populações tradicionais com as fitofisionomias. VIII EREGEO – **Encontro Regional de Geografia.** A geografia no mundo da diversidade. Cidade de Goiás. outubro de 2003.
- RODON NETO, R. M. *et al.* Potencialidades de uso de espécies arbustivas e arbóreas em diferentes fisionomias de cerrado, em Lucas do Rio Verde/MT. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** 10: 113-126, 2010.
- RODRIGUES, F. A. *et al.* Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer.** 13: 870-887, 2016.
- RODRIGUES, W. A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazônica.** 10: 3-127, 1980.
- RODRIGUES, K. A. F. *et al.* Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Caderno de Pesquisa.** 17: 69-76, 2010.
- ROCHA-COELHO, F. B. O uso das plantas no cotidiano da comunidade quilombola Kalunga do Mimoso – Tocantins: um estudo etnobotânico. **Dissertação** (Mestrado em Ciências do Ambiente) Universidade Federal do Tocantins (UFT) Palmas – TO, 2009.
- ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia Alimentos.** 27: 53-60, 2007.
- ROJAS, J. *et al.* Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres, Estado Bolívar. **Revista Farmácia Odontologia.** 58: 2-10, 2016.
- ROSÁRIO, A. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica da espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra). **Estação Científica (UNIFAP).** 6: 35-41, 2016.
- SADHU, I. S.; WARE, K.; GRISHAN, M. B. Peroxyl radical-mediated hemolysis: role of lipid, protein and sulphhydryl oxidation. **Free Rad. Res. Comm.** 16: 111-122, 1992.
- SANO, E. E. *et al.* Mapeamento de cobertura vegetal do bioma Cerrado: estratégias e resultados. **Embrapa Cerrados - documentos** (Infoteca), 2007.
- SALAZAR, E. B. *et al.* Actividad antimicobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana. **Scientia et Technica.** 13: 133-136, 2007.

SÁNCHEZ-CAMPILLO, M. *et al.* Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food and chemical toxicology**. 47: 386-392, 2009.

SANTOS, A. C. *et al.* Alterações cerebrais reversíveis na síndrome hemolítico-urêmica. **Arq. Neuropsiquiatr**. 53: 284-7, 1995.

SANTOS, C. F.; NOVAK, E. Plantas nativas do cerrado e possibilidades em fitorremediação. **Revista de Ciências ambientais**. 7: 67-68, 2013.

SANTOS, M. G. CURSINO, J. P. Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do Cerrado-TO. In: **Seminário de Iniciação Científica-UFT- Campus de Palmas**, 11 a 14 de dezembro de 2012.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / editora da UFSC, p. 403- 434, 2010.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. (org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 615-645, 2010.

SARAIVA, M. E. V. Atividade antimicrobiana e antipromastigota de extratos e frações de *virola surinamensis* (Rol. ex Rottb) Warb (Myristicaceae). Dissertação (**Mestrado em Ciências Farmacêuticas**). Universidade Federal do Pará (UFPA)- Instituto de ciências da saúde. Belém-PA, 2012.

SARAIVA, S. A. *et al.* Amazonian vegetable oils and fats: fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57: 10, 2009.

SCHENKEL, E.P. *et al.* **Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos**. In: SIMÕES, C. M. O. (org.). Farmacognosia: da Planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.371-400, 2010.

SENGUPTA, A.; GHOSH, M. Integrity of erythrocytes of hypercholesterolemic and normocholesterolemic rats during ingestion of different structured lipids. **European Journal of Nutrition**. 50: 411–419, 2011.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G., PORTA-DUCOING, H., y ROCHA-SOSA, M. La participación de los metabolitos secundarios em la defensa de las plantas. **Revista Mexicana de Fitopatología**. 21:355-363, 2003.

SCAPIN, E. *et al.* Análise fitoquímica e caracterização química via CLAE da *Vellozia Flavicans* Mart., *Brosimum Gaudichaudii* Trécul. e *Virola Sebifera* Aubl., espécies típicas do Cerrado tocantinense. In: **Biodiversidade e Biotecnologia no Cerrado Tocantinense** – v. 1, Curitiba, Ed. CRV, capítulo IV, p. 73-90.

- SHIRWAIKAR, A. *et al.* Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin---nicotinamide type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 91, 171, 2004.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. **Oreades**. 8: 15-30, 1981.
- SILVA, A. O. *et al.* Antioxidant power of carotenoids, flavonoids and vitamin e in preventing arteriosclerosis. **ReonFacema**. 2: 320-324, 2016.
- SILVA, C. A. M. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) *Baehni* (Sapotaceae). Dissertação (**Mestrado em Ciências da Saúde**) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- SILVA, C. J. *et al.* Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae plantadas no Brasil. **Química Nova**. 33: 1, 2010.
- SILVA, L. A. G. C. **Biomias presentes no Estado do Tocantins**. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, p. 10, 2007.
- SILVA, L. R. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**. 23: 36-43, 2015.
- SILVA, N. C. C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. 2010. 75 f. Dissertação (**Mestrado em Biologia Geral e Aplicada**) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, 2010.
- SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**. 6: 25-40, 2010.
- SILVA, R. C.; RORIZ, B. C.; SANTOS, C. S. Identificação das plantas medicinais utilizadas pela população de Araguaína, TO. In: **Seminário de Iniciação Científica**- UFT- Campus de Palmas, 11 a 14 de dezembro de 2012.
- SILVA, F. J. C. S.; ARMELIN, M. A. J. A.; SILVA, A. G. Determinação da composição mineral de subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação animal pela técnica da ativação neutronica. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. 34: 235-241, 1999.
- SILVA, S. M. F.Q. *et al.* Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência Saúde Coletiva**. 6: 1649-1656, 2012.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre, Artmed, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Organizadores). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

- SOARES, I. M. *et al.* Application of a degreasing process and sequential ultrasound-assisted extraction to obtain phenolic compounds and elucidate of the potential antioxidant of *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Medicinal Plants Research** 11: 357-366, 2017.
- SOARES, I. M. *et al.* Conteúdo fenólico e atividade antioxidante de diferentes cultivares de ipomoea batatas (L.) lam. obtidas por melhoramento genético para produção industrial de etanol. **Revista de Ciência Farmaceutica Básica Aplicada**. 35: 479-488, 2014.
- SOARES, M. *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 30: 59-64, 2008.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**. 15: 71-81, 2002.
- SOUSA, J. R. *et al.* Avaliação da casca de *Passiflora edulis* como fonte de flavonoides. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. 1: 556-563, 2015.
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. 20: 135-142, 2006.
- SUFFREDINI, I. B. *et al.* Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 10: 400-402, 2006.
- TAN, W. *et al.* Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system. **International Journal of Nanomedicine**. 6, 2011.
- TEIXEIRA, R. O. *et al.* Assessment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**. 26: 551-555, 2003.
- TONDO, E. C.; BARTZ, S. Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos. Porto Alegre: Sulina, 2011.
- TONELLI, F. M. P. *et al.* Bioautography as a search tool to identify the allelopathic compounds in *Viola sebifera*. **Allelopathy Journal** 33: 277-288, 2014.
- TONIAL, F. Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira). Dissertação (**Mestrado em Microbiologia**) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 138 f, 2010.
- TORRAS-CLAVERIA, *et al.* Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. **Plant Science**. 182: 71-78. 2012.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- TUROLLA, M. S. R, NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 42: 289-306, 2006.

- VALE, S. C. *et al.* Análise fitoquímica das folhas de *eugenia dysenterica dc.* (cagaita) no Município de Palmas, Tocantins-Brasil. In: II – Simpósio Brasileiro de Saúde e Nutrição. **Anais do II Simpósio Brasileiro de Saúde e Nutrição**, Campus UFT de Palmas, 25 a 27 de março de 2015. – Palmas: Universidade Federal do Tocantins, 2015.
- VANITHA, P. *et al.* Modulatory effects of morin on hyperglycemia by attenuating the hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism and  $\beta$ -cell function in streptozotocin-induced diabetic rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 37: 326-335, 2014.
- VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. 28: 519-528, 2005.
- VERMA, M. *et al.* Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. 51: 65-72, 2013.
- VELASCO, J. *et al.* Efecto antibacteriano de *Virola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Ciencia**. 13: 411 - 415, 2005.
- VIEIRA, D. S. *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana Hayne* frente às *Staphylococcus spp.* e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. vol.38 no.3, 2018.
- VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. 29: 326-337, 2006.
- VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L.; QUEVEDO, A. E. P. **Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais**. In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5ª edição. Ed. Itajaí, SC: Univali, 2016.
- VINSON, J. A. *et al.* Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 5315-5321, 2001.
- VIZZOTO, M. *et al.* Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**-Documentos, 316., 2010.
- VON ROTZ, R. R., Diarilpropanos y derivado indolico en madera de *Virola sebifera* y *Virola calophylloidea*. **Revista colombiana de química**. v. 19 n. 1, 1990.
- WANG, Y. *et al.* Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**. 218: 152–158, 2017
- WAGNER, H. **Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças**. In: YUNES, R. S.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5 ed., rev. e ampl., Itajaí, SC.: Univali, 2016.
- WEISBURGER, J. H. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food Chemistry Toxicologic**. 37: 943-948, 1999.

WILLIAMS, R. J.; HEYAMNN. Containment of antibiotic resistance. **Science**. 279:1153-1154, 1998.

WILSON, A. M. M.; ORTEGA, H. S.; QUINTANA, R. R. B. Relationship between structure, properties, and the radical scavenging activity of morin. **Journal of Molecular Structure**. 995: 134–141, 2011.

WINK, M.; MOHAMMED, G. I. A. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. **Biochemical Systematics and Ecology**. 31: 897-917, 2003.

WINK, M.; SCHIMMER, O. Modes of action of defensive secondary metabolites. **Annual Plant Reviews**. 3: 18–137, 1999.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to nonalbicans *Candida* species. **Cytokine**. 76: 42-52, 2015.

YANG, C. S. *et al.* Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu. Revista de Nutrição**. 21: 331-406, 2001.

YUNES, R. S.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5 ed., rev. e ampl., Itajaí, SC.: Univali, 2016.

ZHANG, Z. T. *et al.* Morin exerts neuroprotective actions in Parkinson disease models in vitro and in vivo. **Acta Pharmacology**. Sin. N. 31: 900–906, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S. **Flavonóides**. In: SIMÔES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.489-640, 2000.