

## Artigo

**Perfil Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante e Citotóxica de um Espécime de *Lecythis pisonis* Cambess. (Lecythidaceae)**

Barreto, K. G.\*; Moreira, L. L. P. F.; Gomes, J. S. X.; Matos, C. R. R.; Mathias, L.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (6), 1511-1528. Data de publicação na Web: 29 de Setembro de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>**Phytochemical Profile and Antioxidant activity of a *Lecythis pisonis* Cambess. Specimen (Lecythidaceae)**

**Abstract:** The species *Lecythis pisonis* (*L. pisonis*) popularly known as “sapucaia” or “cumbuca de macaco”, is a plant belonging to the family Lecythidaceae. This family has interesting pharmacological activities that have driven researchers to explore their species. Observing the biological potential of the species *L. pisonis*, this work aimed to trace the chemical profile of its leaves and to evaluate the *in vitro* antioxidant (DPPH and ABTS<sup>•+</sup>) and cytotoxic activity against *Artemia salina* Leach larvae. Qualitative tests identified the presence of triterpenes, steroids, saponins, flavonoids, and phenolics in general. The phytochemical investigation of the leaves resulted in the identification of the mixture of triterpenes: epifriedelanol and friedelin (1+2),  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin (4+5), squalene (3) and ursolic acid (16); the mixture of steroids: stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol (6+7);  $\alpha$ -tocopherol (8); of the mixture of esters: methyl palmitate, ethyl palmitate, ethyl 9-octadecenoate, 9,12,15-methyl octadecanoate, butyl palmitate, ethyl octadecanoate and butyl octadecanoate (9-15); the mixture of isoquercitrin and astragalín flavonoids (20+21); gallic acid and methyl gallate (17+19); gallic acid (17) and ellagic acid (18). This the first report of the identification of substances 8-15, 17-21 in the leaves of the species *L. pisonis*. The evaluation of the antioxidant activity of polar extracts revealed a great antioxidant potential, which may be associated with high levels of phenols and total flavonoids. The quantification of proanthocyanidin in the extract in MeOH showed a content of 8.65 mg EC/g of crude extract. The bioassay carried out with *A. salina* MeOH and MeOH:H<sub>2</sub>O extracts showed mild toxicity.

**Keywords:** *Lecythis pisonis*; antioxidant activity; phytochemical profile.

**Resumo**

A espécie *Lecythis pisonis* (*L. pisonis*), conhecida popularmente como sapucaia ou cumbuca de macaco, é uma planta pertencente à família Lecythidaceae. Esta família possui atividades farmacológicas interessantes que têm impulsionado pesquisadores a explorar suas espécies. Observando o potencial biológico da espécie *L. pisonis*, este trabalho teve como objetivo traçar o perfil químico de suas folhas, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* (DPPH e ABTS<sup>•+</sup>) e citotóxica contra larvas de *Artemia salina* Leach. Os testes qualitativos identificaram a presença de triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides e outros compostos fenólicos. A investigação fitoquímica das folhas resultou na identificação da mistura de triterpenos: epifriedelanol e friedelina (1+2),  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (4+5), esqualeno (3) e ácido ursólico (16); da mistura dos esteroides: estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (6+7);  $\alpha$ -tocoferol (8); da mistura dos ésteres: palmitato de metila, palmitato de etila, 9-octadecenoato de etila, 9,12,15-octadecanoato de metila, palmitato de butila, octadecanoato de etila e octadecanoato de butila (9-15); da mistura dos flavonoides isoquercitrina e astragalina (20+21); do ácido gálico e galato de metila (17+19); do ácido gálico (17) e ácido elágico (18). Sendo este o primeiro relato da identificação das substâncias 8-15, 17-21 nas folhas da espécie *L. pisonis*. A avaliação da atividade antioxidante dos extratos polares revelou um grande potencial antioxidante, que pode estar associada aos altos teores de fenóis e flavonoides totais. A quantificação de proantocianidina no extrato em MeOH mostrou um teor de 8,65 mg EC/g de extrato bruto. Pelo bioensaio realizado com *A. salina* os extratos MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O mostraram leve toxicidade.

**Palavras-chave:** *Lecythis pisonis*; atividade antioxidante; perfil fitoquímico.

\* Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, Pq Califórnia, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes–RJ, Brasil.

 [kissila.barreto@hotmail.com](mailto:kissila.barreto@hotmail.com)  
DOI: [10.21577/1984-6835.20200118](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200118)

## Perfil Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antioxidante e Citotóxica de um Espécime de *Lecythis pisonis* Cambess. (Lecythidaceae)

Kíssila Gomes Barreto,<sup>a,\*</sup>  Laysa Lanes Pereira Ferreira Moreira,<sup>b</sup>  Jéssica da Silva Xarifa Gomes,<sup>a</sup>  Carlos Roberto Ribeiro Matos,<sup>a</sup>  Leda Mathias<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, Pq Califórnia, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes–RJ, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari 514, Goiabeiras, CEP 29075-910, Vitória-ES, Brasil.

\*[kissila.barreto@hotmail.com](mailto:kissila.barreto@hotmail.com)

*Recebido em 23 de Maio de 2020. Aceito para publicação em 10 de Setembro de 2020.*

### 1. Introdução

### 2. Resultados e Discussão

2.1. Triagem fitoquímica

2.2. Teor de fenólicos totais

2.3. Teor de flavonoides totais

2.4. Teor de proantocianidinas

2.5. Atividade antioxidante *in vitro*

2.6. Avaliação da atividade citotóxica frente as larvas de *Artemia salina* Leach

2.7. Determinação estrutural das substâncias

### 3. Experimental

3.1. Material vegetal

3.2. Processos de extração

3.3. Triagem fitoquímica

3.4. Determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais

3.5. Determinação do teor de proantocinidinas

3.6. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

3.7. Ensaio de citotoxicidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach

3.8. Análises cromatográficas

3.9. Espectros UV-Vis, de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C

3.10. Isolamento de compostos e misturas

3.11. Análise estatística

### 4. Conclusão

## 1. Introdução

A família da castanha-do-Brasil (Lecythidaceae A. Rich.) compreende cerca de 23 gêneros e um pouco mais de 350 espécies distribuídas pantropicamente, atingindo sua maior diversidade na região neotropical.<sup>1-6</sup> No Brasil, foi registrada a presença de aproximadamente 119 espécies, pertencentes a 10 gêneros (*Allantoma* Miers, *Asteranthos* Desf., *Bertholletia* Bonpl., *Cariniana* Casar., *Corythophora* R. Knuth, *Couratari* Aubl., *Couroupita* Aubl., *Eschweilera* Mart. ex DC., *Gustavia* L., *Lecythis* Loefl.).<sup>1,7</sup> Dentre esses, o gênero *Lecythis* Loefl. apresenta a segunda maior população de espécies presentes em território brasileiro.

O gênero *Lecythis* Loefl. é constituído por 26 espécies, sendo a *Lecythis pisonis* Cambessedes a mais conhecida.<sup>1,4</sup> A espécie é popularmente conhecida como sapucaia ou cumbuca-de-macaco, podendo ser encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, principalmente na Mata Atlântica e Floresta Amazônica.<sup>1,8-9</sup> É uma árvore de grande porte, podendo alcançar de 20 - 30 m de altura; as folhas são coriáceas, glabras e na época de floração adquirem coloração rosa avermelhada; as flores são violáceas e o fruto se assemelha a uma urna e pode possuir de 10 - 30 sementes (castanhas).<sup>10</sup>

Na medicina popular, as folhas, as cascas e o óleo extraído das sementes são empregados no tratamento de prurido (coceira), desintéria e redução da dor muscular, respectivamente.<sup>11-13</sup>

Pesquisas sobre a composição química de *L. pisonis* revelaram a presença de triterpenos, esteroides, saponinas triterpênicas, diterpenos, ácidos fenólicos, flavonoides, álcoois, aldeídos e monoterpênicos.<sup>14-19</sup>

Estudos atribuem à composição química da espécie algumas atividades biológicas, tais como: citotóxica, contra três linhagens celulares de tumor humano,<sup>15</sup> antipruriginosa,<sup>16</sup> antioxidante,<sup>17,19-21</sup> antinociceptiva<sup>22</sup> e anti-inflamatória.<sup>20</sup>

Observando o potencial biológico de *L. pisonis*, este trabalho teve como objetivo realizar a prospecção fitoquímica dos extratos brutos em hexano, MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O das folhas de um espécime de *L. pisonis*. Além disso, avaliou-se a atividade antioxidante *in vitro* frente aos radicais DPPH e ABTS, citotóxica contra larvas de *Artemia salina* Leach e determinou-se o teor de fenóis, flavonoides e proantocianidinas dos extratos polares.

## 2. Resultados e Discussão

### 2.1. Triagem fitoquímica

Na prospecção fitoquímica os resultados dos testes para identificação de metabólitos secundários foram considerados positivos mediante reação corada, formação de precipitado, espuma persistente e desenvolvimento de fluorescência. Na ausência desses parâmetros o teste foi considerado negativo, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica dos extratos brutos das folhas de *L. pisonis*

Metabólitos secundários	Reações de caracterização	Alterações observadas em resultados positivos	EH	EM	EMH
Triterpenos e/ou esteroides	Liebermann-Burchard	Coloração verde	+	-	-
Fenóis em geral	FeCl <sub>3</sub>	Coloração e precipitado azul	*	+	+
Flavonoides	Shinoda	Coloração laranja	*	+	-
	AlCl <sub>3</sub>	Fluorescência	*	+	+
	NaOH	Intensificação da cor	*	+	+
	NP/PEG	Fluorescência	*	+	+
Saponinas	Formação de espuma	Espuma persistente	*	+	+
Alcaloides	Reagente de Dragendorff	-	*	-	-
Antraquinonas	Reação de Bornträeger	-	*	-	-

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo. \* não foi possível realizar esses testes devido à baixa polaridade do extrato. EH = extrato bruto em hexano; EM = extrato bruto em MeOH; EMH = extrato bruto em MeOH:H<sub>2</sub>O; NP = difenilborato de aminoetanol; PEG = polietilenoglicol 400

A partir da triagem fitoquímica, foi possível verificar a presença de triterpenos, esteroides, fenóis, flavonoides e saponinas nos extratos das folhas de *L. pisonis*. Esses resultados estão em acordo com os dados fitoquímicos apresentados na literatura para a espécie.<sup>15-19</sup>

Somente no extrato hexânico observou-se a formação de coloração verde na reação de Liebermann-Burchard, indicativo da presença de triterpenos e/ou esteroides. De acordo com Burke e colaboradores,<sup>23</sup> a mudança na coloração é devida a formação do carbocátion 3,5-colestadieno que absorve em torno de 410 nm.

Todos os extratos de polaridade alta (MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O) em presença de solução de FeCl<sub>3</sub> apresentaram formação de coloração azul e precipitado. A reação com FeCl<sub>3</sub> é genericamente utilizada para identificação de substâncias fenólicas.<sup>24</sup> Devido ao resultado positivo obtido para os extratos polares, procedeu-se a verificação da presença de flavonoides nos mesmos.

Apenas o extrato em MeOH apresentou coloração laranja na reação de Shinoda, que baseia-se na reação do flavonoide em presença de magnésio/HCl. Essa reação é frequentemente utilizada para a identificação de flavonoides como, flavanonas e flavonas. O desenvolvimento da coloração alaranjada é indicativo da presença de flavonas.<sup>24</sup>

Os extratos polares apresentaram resultados positivos em presença de AlCl<sub>3</sub> (fluorescência sob luz UV), de NaOH (intensificação da cor) e de NP/PEG (fluorescência sob luz UV). A reação com AlCl<sub>3</sub>, consiste na formação de uma reação de coordenação estável entre os grupos hidroxilas livres do flavonoide com o íon Al<sup>3+</sup>. A formação da ligação provoca uma intensificação da absorção e um desvio batocrômico, quando analisado por espectrofotometria de UV/Vis, devido à extensão do sistema conjugado.<sup>24-26</sup> A reação do flavonoide com NaOH resulta na ionização das hidroxilas fenólicas, promovendo um desvio batocrômico e efeito hiperacrômico.<sup>24</sup> O reagente difenilborato de aminoetanol (NP)/ polietilenoglicol 400 (PEG) é bastante utilizado para revelação e/ou identificação de flavonoides em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA). A presença de saponinas espumílicas foi verificada em ambos os extratos polares.<sup>24,27</sup>

## 2.2. Teor de fenólicos totais

Existem vários testes descritos na literatura para a quantificação do teor de fenóis totais, no

entanto o método mais empregado é o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. Esse reagente apresenta coloração amarela que na presença de substâncias fenólicas forma um complexo de coloração azul.<sup>28-29</sup>

O teor de fenólicos totais verificado com o reagente de Folin-Ciocalteu para os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O foi de 120,33 ± 0,58 e 154,30 ± 2,64 mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g, respectivamente. No presente trabalho o teor de substâncias fenólicas pode ser classificado como alto para ambos os extratos, visto que o resultado foi superior a 50 mg EAG/g.<sup>30</sup> Os valores obtidos nesse trabalho foram superiores aqueles encontrados por Ferreira e colaboradores, que verificaram um teor de 56,78 ± 0,13 mg EAG/g para o extrato em EtOH das folhas de *L. pisonis*.<sup>17</sup>

A discrepância no valor descrito na literatura com o obtido nesse trabalho, pode estar relacionada com o solvente/polaridade empregado na extração, bem como as condições ambientais e época de coleta da planta.<sup>31</sup>

Resultados similares aos obtidos nesse estudo foram encontrados em outras espécies da família Lecythidaceae. O extrato etanólico (70%) das folhas de *Careya sphaerica* e o extrato aquoso das folhas de *Barringtonia racemosa* apresentaram valores de 121,27 ± 0,05 e 159 ± 0,95 mg EAG/g, respectivamente.<sup>32,33</sup>

## 2.3. Teor de flavonoides totais

A prospecção fitoquímica dos extratos polares de *L. pisonis* (Tabela 1) indicou, entre outros, a presença de flavonoides. Desse modo procedeu-se a quantificação desse metabólito através do método da reação com AlCl<sub>3</sub>. Nesse trabalho, encontrou-se um teor de flavonoides totais de 15,19 ± 0,18 e 15,23 ± 0,01 mg equivalente de quercetina (EQ)/g de material vegetal seco para os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O, respectivamente. Obafemi e colaboradores, relataram resultado similar, 13,10 mg EQ/g, para o extrato em MeOH das folhas da espécie *Napoleona vogelli* (Lecythidaceae).<sup>34</sup> Enquanto Rondón e colaboradores, descrevem um valor de 0,79 ± 2,40 mg EQ/g para o extrato em EtOH das folhas de *Gustavia pubescens* Ruiz & Pav. ex Berg.<sup>35</sup>

Ferreira e colaboradores encontraram um teor de 30,04 ± 0,02 mg equivalente de rutina/g de material vegetal seco (ER/g) para o extrato em

EtOH de folhas *L. pisonis*, enquanto que Janovick e colaboradores, descreveram um teor de  $28,65 \pm 0,09$  mg ER/g de extrato etanólico das folhas de *Cariniana domestica* (Lecythidaceae).<sup>17,36</sup>

A discrepância no resultado obtido no presente trabalho com os relatados por Ferreira e colaboradores e Janovick e colaboradores pode estar relacionada com a diferença do padrão de flavonoide utilizado na dosagem.

#### 2.4. Teor de proantocianidinas

Na determinação do teor de proantocianidinas foi empregado o método da vanilina sulfúrica. Este é amplamente utilizado para quantificar essa classe de substâncias em material vegetal.<sup>37-38</sup> O método baseia-se na reação, em meio ácido, da vanilina com o anel do flavanol *meta* substituído, resultando em uma coloração avermelhada.<sup>37,39</sup>

No presente trabalho, o extrato em MeOH mostrou um teor de proantocianidina de  $8,65 \pm 0,00$  mg equivalente de catequina/ g de extrato (ECAT/g). Os estudos sobre essa classe de metabólitos em *L. pisonis* são escassos. Em um trabalho realizado com o extrato MeOH de quatro diferentes amostras das cascas das nozes de *L. pisonis* foram observados teores de proantocianidinas de  $91,99 \pm 1,59$  -  $123,81 \pm 1,74$  mg ECAT/g.<sup>19</sup> Até o momento, não há relatos sobre a quantificação de proantocianidinas nas folhas de *L. pisonis*, dessa forma os resultados obtidos neste trabalho podem servir de referência para futuros estudos com as folhas da planta em questão.

#### 2.5. Atividade antioxidante *in vitro*

A análise da atividade antioxidante *in vitro* pode ser influenciada pela presença de interferentes, como por exemplo, ceras, gorduras e clorofilas, que podem apresentar características pró-oxidantes ou antioxidantes, dependendo das condições experimentais empregadas.<sup>40-41</sup> Para minimizar a presença de interferentes, foi feita, *a priori*, a extração com hexano e em seguida com MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O.

A capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O foi avaliada através dos métodos do 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e do 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS<sup>+</sup>). O método do DPPH é aplicável a sistemas hidrofóbicos, enquanto o método do

ABTS<sup>+</sup> permite avaliar o potencial antioxidante de substâncias de natureza hidrofílica e lipofílica.<sup>42-43</sup>

##### 2.5.1. Método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)

O método do radical DPPH baseia-se no princípio de que o radical (violeta em solução) na presença de um doador de hidrogênio ou elétron é reduzido, com isso a intensidade de absorção diminui (efeito hipsocrômico) e a solução de DPPH perde a coloração inicial, tornando-se amarela.<sup>43-44</sup>

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH foi expressa em concentração de amostra necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE<sub>50</sub>) e em porcentagem de atividade antioxidante (% AA) (Figura 1a).

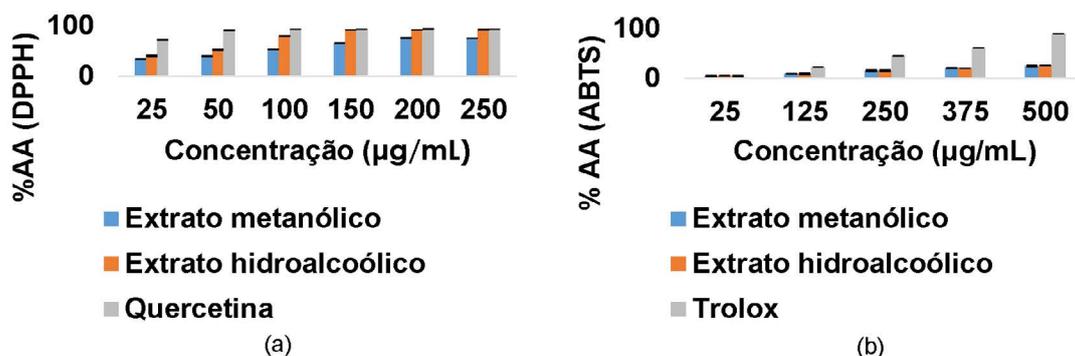
No método do radical DPPH o extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O apresentou uma capacidade antioxidante (CE<sub>50</sub> =  $25,17 \pm 0,85$  µg/mL) superior a do extrato em MeOH (CE<sub>50</sub> =  $61,57 \pm 0,34$  µg/mL) e similar à do padrão utilizado, quercetina (CE<sub>50</sub> =  $23,24 \pm 1,44$  µg/mL). Segundo a literatura, os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O apresentaram moderada e elevada atividade antioxidante, respectivamente.<sup>45</sup> Um estudo científico com as folhas de *L. pisonis* mostrou para o extrato em EtOH uma CE<sub>50</sub> =  $49,04 \pm 1,65$  µg/mL.<sup>17</sup>

Quanto a porcentagem de atividade antioxidante, o extrato em MeOH e o MeOH:H<sub>2</sub>O apresentaram uma % AA máxima de  $75,77 \pm 0,22\%$  e  $92,11 \pm 0,33\%$  respectivamente, enquanto o padrão quercetina de  $93,02 \pm 0,17\%$  (Figura 1a). Ambos os extratos analisados apresentaram capacidade de inibir ou sequestrar radicais livres, podendo configurar como possíveis fontes de substâncias antioxidantes.

##### 2.5.2. Método do 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS<sup>+</sup>)

Ao contrário do DPPH que é um radical livre estável a temperatura ambiente, o radical ABTS<sup>+</sup> é formado através da reação do sal ABTS com persulfato de potássio. O radical em solução apresenta coloração azul-esverdeado e  $\lambda_{\max}$  em 734 nm. Na presença de um potencial antioxidante o ABTS<sup>+</sup> é reduzido tornando a solução incolor.<sup>42-43</sup>

A capacidade antioxidante, utilizando o método do radical ABTS, foi expressa como micromolar equivalente de Trolox por grama de extrato seco (µM ET/g) e em % AA (Figura 1b).



**Figura 1.** Atividade antioxidante dos extratos MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O das folhas de *L. pisonis* pelo método do (a) DPPH e (b) ABTS

No método do ABTS<sup>+</sup> o extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O apresentou um potencial antioxidante (300,15 ± 2,97 µM ET/g) superior ao do extrato em MeOH (296,51 ± 3,89 µM ET/g), comportamento este similar aquele observado no método do DPPH.

Demoliner e colaboradores, trabalhando com amostras do extrato aquoso das castanhas e do extrato hidroalcoólico (8:2) das cascas das castanhas de *L. pisonis*, observaram valores de 34,15 ± 0,18 - 48,13 ± 0,27 µM ET/g e 193,45 ± 0,89 - 197,70 ± 0,17 µM ET/g, respectivamente.<sup>19</sup> Outro trabalho utilizando o óleo das castanhas obtido por dois processos, extração a quente com hexano em Soxhlet e o método de extração Bligh e Dyer, mostrou valores de 5,58 ± 0,38 µM ET/g de óleo e 8,71 ± 0,29 µM ET/g de óleo, respectivamente.<sup>21</sup>

No método do ABTS<sup>+</sup>, ambos os extratos apresentaram uma baixa % AA, quando comparados com o padrão Trolox (Figura 1b). Os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O apresentaram uma % AA máxima de 25,07 ± 0,90% e 25,78 ± 0,11%, respectivamente, enquanto o padrão de Trolox mostrou um valor de 89,57 ± 0,01%.

Comparando a % AA obtida por ambos os métodos utilizados verificou-se que o resultado alcançado com o DPPH foi superior ao observado com o ABTS<sup>+</sup>. De acordo com Yu e colaboradores, o fato pode estar associado aos diferentes mecanismos envolvidos nas reações entre radical e antioxidante, bem como a estereoseletividade dos radicais e a solubilidade do extrato nos solventes empregados.<sup>46</sup>

Comparando-se os resultados obtidos para fenóis totais, flavonoides totais e proantocianidinas, observa-se que o aumento das concentrações destes nos extratos foi acompanhado, como era de se esperar, pelo aumento da capacidade antioxidante (Tabela 2).

## 2.6. Avaliação da atividade citotóxica frente as larvas de *Artemia salina* Leach

O ensaio da citotoxicidade frente a larva de *A. salina*, por sua simplicidade, é utilizado preliminarmente a testes biológicos mais específicos.<sup>47</sup> Os extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O apresentaram toxicidade com uma DL<sub>50</sub> igual a

**Tabela 2.** Conteúdo de atividade antioxidante, flavonoides totais e fenólicos totais dos extratos MeOH e MeOH/H<sub>2</sub>O

Teste	EM	EMH	Quercetina
Fenóis totais (FT)	120,33 ± 0,58	154,30 ± 2,64	-
Flavonoides totais (FLT)	15,19 ± 0,18	15,23 ± 0,01	-
Proantocianidinas	8,65 ± 0,00	-	-
DPPH (CE <sub>50</sub> )	61,57 ± 0,34	25,17 ± 0,85	23,24 ± 1,44
ABTS	296,51 ± 3,89	300,15 ± 2,97	-

FT (mg de EAG/g de extrato seco), FLT (mg de EQ/g de extrato seco), Proantocianidina (mg de ECAT/g de extrato seco), CE<sub>50</sub> (µg/mL), ABTS (µM equivalente de Trolox/g de extrato seco). EM = extrato bruto em MeOH; EMH = extrato bruto em MeOH:H<sub>2</sub>O.

665,7  $\mu\text{g/mL}$  e 889,0  $\text{mg/mL}$  respectivamente, pois segundo Meyer e colaboradores extratos brutos com  $\text{DL}_{50} \leq 10^3 \mu\text{g/mL}$  são considerados tóxicos.<sup>48</sup> Ambos os extratos podem ser considerados levemente tóxicos, uma vez que apresentaram valores de  $\text{DL}_{50}$  entre 500  $\mu\text{g/mL}$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>49</sup> De fato, algumas substâncias presentes nesses extratos foram relatadas previamente como agentes citotóxicos, como por exemplo, a mistura dos triterpenos ácido ursólico e oleanóico.<sup>15</sup>

## 2.7. Determinação estrutural das substâncias

A investigação fitoquímica dos extratos de baixa polaridade das folhas secas de *L. pisonis*, resultou na identificação da mistura dos triterpenos: epifriedelanol e friedelina (1+2),  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina (4+5) e esqualeno (3), da mistura dos esteroides: estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (6+7);  $\alpha$ -tocoferol (8); e da mistura dos seguintes ésteres de cadeia longa: palmitato de metila, palmitato de etila, 9-octadecenoato de etila, 9,12,15-octadecanoato de metila, palmitato de butila, octadecanoato de etila e octadecanoato de butila (9-15). O fracionamento dos extratos de alta polaridade possibilitou a identificação do ácido ursólico (16), quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (20), kaempferol-3-

O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (21), ácido gálico (17) e do galato de metila (19). Do hidrolato resultante da extração das folhas frescas em destilador tipo Clevenger, foram identificados o ácido gálico (17) e o ácido elágico (18). Segundo a busca na literatura, este é o primeiro relato da identificação das substâncias 8 - 15, 17 - 21 nas folhas da espécie *L. pisonis*.

A identificação estrutural das substâncias 1 - 2 e 4 - 7 foi realizada através de análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), comparação dos tempos de retenção e razão massa/carga ( $m/z$ ) dos fragmentos com os dados da biblioteca NIST do equipamento de CG/EM (Tabela 3), informações obtidas nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e dados da literatura.<sup>17,50</sup> A identificação do triterpeno 16 foi realizada por meio das técnicas de EM (inserção direta) e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados da literatura.<sup>51</sup> A mistura de 3, 8 e 9 - 15 foi identificada pela análise dos espectros de massas, comparação com dados da biblioteca NIST do equipamento de CG/EM e/ou dados da literatura.<sup>52-53</sup> Para as substâncias 17 - 21 além dos dados obtidos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram utilizadas informações obtidas na análise dos dados de UV, LC/MS, EM e/ou comparação com dados da literatura.<sup>54-56</sup>

**Tabela 3.** Constituintes químicos 1- 16 identificados nas folhas de *L. pisonis*

Substância	Nome da substância	Método de identificação	$\text{M}^+$	$m/z$	I.S. (%)
1	Epifriedelanol	CG/EM e RMN	428	413, 275, 231	96,7
2	Friedelina	CG/EM e RMN	426	411, 302, 274, 273	97,8
3	Esqualeno	CG/EM	410	81, 69	99,2
4	$\beta$ -amirina	CG/EM e RMN	426	218, 208, 203, 189	99,0
5	$\alpha$ -amirina	CG/EM e RMN	426	218, 208, 203, 189	98,4
6	Estigmasterol	CG/EM e RMN	412	394, 351, 273, 255, 231, 213	96,7
7	$\beta$ -Sitosterol	CG/EM e RMN	414	399, 381, 329, 273, 255, 231, 213	96,5
8	$\alpha$ -Tocoferol	CG/EM	430	205, 165	99,3
9	Palmitato de metila	CG/EM	270	227, 143, 129, 87, 74	99,4
10	Palmitato de etila	CG/EM	284	239, 149, 101, 88	98,9
11	9-Octadecenoato de etila	CG/EM	310	264, 222, 180, 123	97,0
12	Octadecanoato de metila	CG/EM	298	269, 255, 199, 143, 87, 74	89,1
13	Palmitato de butila	CG/EM	312	257, 239, 129	98,0
14	Octadecanoato de etila	CG/EM	312	269, 157	97,8
15	Octadecanoato de butila	CG/EM	340	285, 267, 129	92,7
16	Ácido ursólico	EM e RMN	456	438, 411, 248, 203, 133	89,0

I.S. = Índice de similaridade com a biblioteca NIST

A substância **17** (54,30 mg) foi obtida como um sólido cristalino e solúvel em MeOH. O espectro de massas, obtido via inserção direta e ionização por impacto de elétron a 70 eV apresentou pico do íon molecular a  $M^+ = 170$  Daltons, compatível com a fórmula molecular  $C_7H_6O_5$ . Os fragmentos de massa, foram:  $m/z = 153$  ( $M^+ - 17$ ) relativo a perda de  $HO^{\cdot}$  e a  $m/z = 125$  ( $M^+ - 17 - 28$ ) relativo a perda concomitante de  $HO^{\cdot}$  e de um fragmento neutro de CO.

O espectro de RMN de  $^1H$  de **17** apresentou um sinal simples a  $d_H$  7,07 (s, H-2/ H-6). O espectro de RMN  $^{13}C$  apresentou quatro sinais entre  $d_C$  110,46 – 146,46 e um sinal a  $d_C$  170,57 (C-7) relativo a um substituinte carbonila. Os dados observados no espectro de correlação heteronuclear (HMQC), relativos a correlação existente entre os sinais  $d_H$  7,07 e  $d_C$  110,46 (C-2/ C-6) e também a maior intensidade dos sinais a  $d_C$  110,46 e 146,46 (C-3/ C-5), sugerem uma molécula simétrica. Essas observações puderam ser confirmadas a partir da análise do espectro de correlação heteronuclear a longa distância (HMBC), no qual se verifica a existência de correlação entre os cinco carbonos da molécula com o sinal  $d_H$  7,07. O conjunto de dados espectrais obtidos para a substância **17**, associados aqueles observados na literatura possibilitaram a identificação da substância como sendo o ácido gálico.<sup>54</sup>

A substância **18** (4,40 mg) apresentou-se como um sólido amarelo solúvel em DMSO. O espectro de massas, obtido via inserção direta e ionização por impacto de elétron a 70 eV apresentou o pico do íon molecular a  $m/z$  302 ( $M^+$ ), compatível com a fórmula molecular  $C_{14}H_6O_8$ . O espectro de RMN de  $^1H$  apresentou um sinal simples a  $d_H$  7,40 (H-5/ H-5'). Enquanto o espectro de RMN de  $^{13}C$  apresentou seis sinais entre  $d_C$  106,85 – 148,30 e um sinal a  $d_C$  159,32 atribuído a carbonila da lactona. O espectro de HMQC, mostrou correlação entre  $d_H$  7,40 (H-5/ H-5') e  $d_C$  109,86 (C-5/ C-5'). O espectro de HMBC mostrou a existência de correlação de  $d_H$  7,40 com todos os carbonos da molécula, sugerindo uma molécula simétrica com dois carbonos metínicos equivalentes (C-5/ C-5') e seis pares de carbonos não hidrogenados equivalentes (C1/ C1'; C-2/ C-2'; C-3/ C-3'; C-4/ C-4'; C-6/ C-6' e C-7/ C-7'). O conjunto desses dados associados com aqueles comparados com os dados da literatura permitiu identificar a substância **18** como sendo o ácido elágico.<sup>55</sup>

O fracionamento cromatográfico da fração etérea do extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O resultou no isolamento da mistura de **17+19**. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (LC/EM-ESI) da mistura revelou a presença de dois picos majoritários. A análise forneceu, informações sobre o íon molecular e fragmentos característicos das substâncias. A substância **17** exibiu íon quasimolecular em  $[M+H]^+ = 171,03$ , compatível com a fórmula molecular  $C_7H_7O_5$ , típica do ácido gálico, identificado anteriormente. O espectro de massas de **19**, substância majoritária, mostrou  $[M+H]^+ = 185,04$  ( $C_8O_5H_9$ ) e fragmentos a  $m/z = 153$  [ $M - 31 - H$ ]<sup>+</sup> (perda da metoxila),  $m/z = 126$  [ $M - 59 - H$ ]<sup>+</sup> (perda de  $COOCH_3$ ) e  $m/z = 107$  [ $M - 46 - H$ ]<sup>+</sup> (perda de  $H_2CO_2$ ).

O espectro de RMN de  $^1H$  da mistura revelou sinais simples em  $d_H$  7,05 (s, H-2/ H-6) atribuídos a substância **17** e  $d_H$  7,03 (s, H-2/ H-6) e  $d_H$  3,81(s), característico de grupo metoxila, para a **19**. O espectro de RMN de  $^{13}C$  exibiu onze sinais de carbono, sendo um sinal de carbono metílico ( $d_C$  52,42;  $-OCH_3$ ), dois sinais de carbonos metínicos ( $d_C$  110,46 e  $d_C$  110,18) e seis sinais de carbonos não hidrogenados entre  $d_C$  170,53 - 121,58. O espectro de HMQC mostrou que os sinais  $d_C$  52,42 ( $-OCH_3$ ) e  $d_C$  110,18 (C-2 e C-6) apresentam correlação direta com os sinais em  $d_H$  3,81 (s) e  $d_H$  7,03 (s), respectivamente; e o sinal  $d_H$  7,05 (s) com  $d_C$  110,46 (C-2 e C-6) sugerindo uma mistura de substâncias com estrutura molecular aromática simétrica com anel tetrasubstituído.<sup>54</sup> A análise do espectro de HMBC mostrou a correlação entre  $d_H$  3,81 (s) e  $d_C$  169,18 (C-7) indicando a presença de função éster em uma das substâncias da mistura.<sup>54</sup> Com base nas informações obtidas com os espectros de LC/EM-ESI, RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , aliada à comparação com dados espectrométricos descritos na literatura, foi possível identificar as substâncias como o ácido gálico (**17**) e galato de metila (**19**) na proporção 1:2.<sup>54</sup>

A mistura de flavonoides (**20 + 21**) se apresentou como um pó amorfo amarelado, solúvel em MeOH, que ao ser analisado por CCDA apresentou-se como duas manchas com Rf distintos de coloração amarelada e verde escuro quando revelada com vanilina sulfúrica e  $FeCl_3$ , respectivamente. Não foi possível purificar a amostra devido a pouca massa obtida da mesma (3,4 mg).

O espectro de UV da mistura apresentou duas bandas em  $\lambda_{\text{máx}}$  264 e 353 nm, característicos da banda II (anel A - benzoíla) e da banda I (anel B - cinamoíla), respectivamente.<sup>57</sup> A adição de  $\text{AlCl}_3$  a solução de **20** + **21** provocou um deslocamento batocrômico nas bandas I e II. Por outro lado, a adição de  $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$  (15%) na mistura de flavonoides/ $\text{MeOH}/\text{AlCl}_3$  resultou em deslocamento hipsocrômico da banda I. A banda II não sofreu alteração. Essas observações sugerem a presença de uma mistura de flavonóis com grupos hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B (Figura 2).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura **20** + **21** revelou sinais na região de hidrogênios aromáticos,  $d_{\text{H}}$  6,40 (*d*,  $J = 1,95$  Hz, H-8) e 6,20 (*d*,  $J = 1,80$  Hz, H-6), característicos do anel **A** dos flavonoides. Para o anel **B** foram observados sinais em  $d_{\text{H}}$  7,58 (*m*, H-2'/H-6') e  $d_{\text{H}}$  6,85 (*dl*,  $J = 8,85$  Hz, H-5') atribuídos a isoquercitrina e sinais em  $d_{\text{H}}$  8,03 (*m*, H-2'/H6') e 6,85 (*dl*,  $J = 8,85$  Hz, H-3'/H-5') atribuídos a astragalina. Também foram observados sinais na região característica de resíduo de açúcar ( $d_{\text{H}}$  3,22 – 5,45) e os sinais em  $d_{\text{H}}$  5,45 (*d*,  $J = 7,65$  Hz) e  $d_{\text{H}}$  5,33 (*d*,  $J = 7,15$  Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos da isoquercetina e astragalina, respectivamente.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  desacoplado de hidrogênio e APT exibiram 22 sinais, sendo dez sinais relativos a carbonos quaternários, 11 sinais referentes a carbonos metínicos e

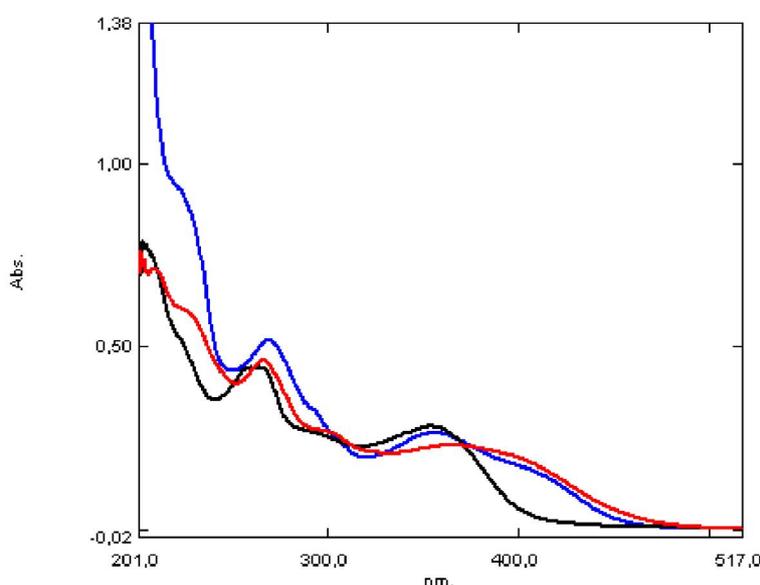
um sinal de carbono metilênico. A localização dos resíduos de açúcar foi determinada pela diferença de deslocamento químico, observado em C-2 e C-3, em relação aos valores verificados na literatura para os flavonoides quercetina e kaempferol. A presença do resíduo de açúcar na posição C-3 provoca um efeito de desproteção no C-2, promovendo um deslocamento químico para maiores frequências.<sup>58</sup> A quercetina e kaempferol apresentam valores de deslocamento químico para os carbonos C-2 e C-3 em torno de  $d_{\text{C}}$  148,0 e 127,2, respectivamente, enquanto os seus derivados glicosilados (isoquercitrina e astragalina) apresentam deslocamentos químicos para os carbonos C-2 e C-3 em  $d_{\text{C}}$  156,26 e 133,22, respectivamente.

A associação dos dados fornecidos pelos espectros de UV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e a comparação com a literatura, possibilitou a identificação da mistura de substâncias como quercetina-3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (isoquercetina - **20**) e kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (astragalina - **21**).<sup>54,56</sup>

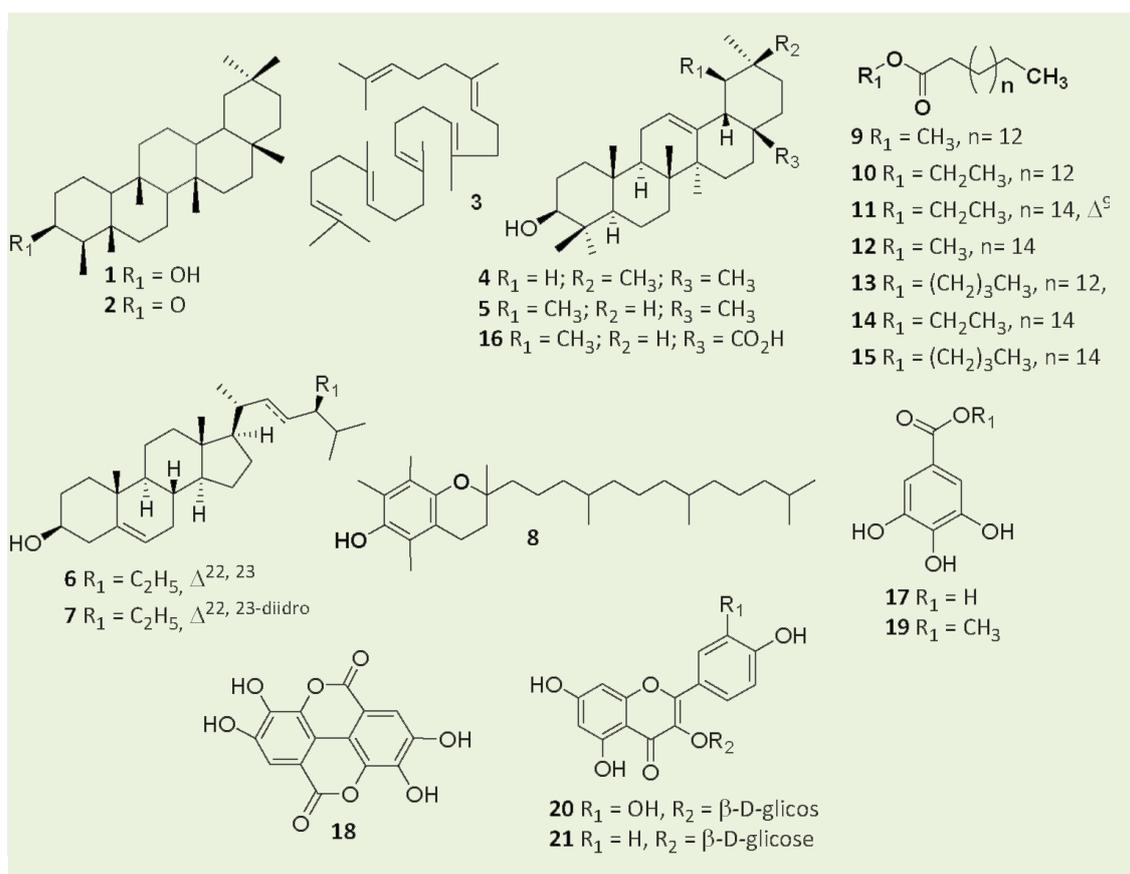
### 3. Experimental

#### 3.1. Material vegetal

As folhas de um espécime de *L. pisonis* foram coletadas em maio e junho de 2015 no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy



**Figura 2.** Espectros de absorção no UV da mistura das substâncias **20** + **21**: Preto (MeOH); Vermelho ( $\text{MeOH} + \text{AlCl}_3$ ); Azul ( $\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ )



**Figura 3.** Estruturas das substâncias identificadas nas folhas de *L. pisonis*

Ribeiro (UENF) (21° 45' 41.7" Sul 41° 17' 38.3" Oeste), no município de Campos dos Goytacazes, RJ. O material foi identificado pela bióloga Tatiane Pereira de Souza e a exsicata (HUENF 5707) está depositada no herbário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), localizado no Centro de Biociências e Biotecnologia.

### 3.2. Processos de extração

Foram utilizados dois métodos para preparação dos extratos brutos: extração exaustiva à temperatura ambiente (folhas secas à temperatura ambiente) e hidrodestilação pela extração com aparelho tipo Clevenger (folhas frescas).

#### 3.2.1. Extração exaustiva à temperatura ambiente

As folhas secas e trituradas (1381,0 g) foram submetidas à sucessivas extrações com os solventes hexano, MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1). Após remoção do solvente sob pressão reduzida foram obtidos 128,86 g de extrato bruto em hexano (EH), 365,57 g de extrato em MeOH (EM) e 140,81 g de extrato em MeOH:H<sub>2</sub>O (EMH).

#### 3.2.2. Hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger

Na tentativa de obtenção de óleo essencial, as folhas frescas de *L. pisonis* (47,20 g) foram trituradas e adicionadas a um balão de fundo redondo com 500 mL de água destilada. Ao balão foi acoplado um hidrodestilador tipo Clevenger, refrigerado com banho ultratermostático (10°C) por 2 h. Esse procedimento não produziu óleo essencial. Por outro lado, o resíduo aquoso foi submetido à extração com AcOEt, e a fração orgânica após um período de repouso resultou na formação de um precipitado amarelo pálido (**18**, 4,40 mg). O sobrenadante da fração em AcOEt foi submetida a precipitação forçada por adição de hexano. O precipitado (separado do sobrenadante por centrifugação) resultou na substância **17** (54,30 mg).

### 3.3. Triagem fitoquímica

Após a obtenção dos extratos brutos, os mesmos foram submetidos a testes químicos qualitativos para identificação de metabólitos secundários: triterpenos e esteroides, flavonoides

e fenólicos em geral, alcaloides, saponinas espumídicas e antraquinonas.<sup>24, 27</sup>

### 3.4. Determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais

#### 3.4.1. Teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, adaptando a metodologia descrita por Sousa e colaboradores.<sup>59</sup> Uma alíquota (100 mL) da solução em MeOH dos extratos (150 µg/mL) foi misturada e agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min. Posteriormente, acrescentou-se solução de carbonato de sódio (2 mL, 15% m/v) e agitou-se a mistura por 30 segundos. O volume da solução foi acertado para 10 mL, com água destilada. Após 2 horas de incubação, em ambiente escuro, as leituras das absorbâncias foram feitas a 750 nm, utilizando como branco metanol e todos os reagentes, com exceção dos extratos. A curva de calibração foi preparada com cinco pontos utilizando soluções padrão de ácido gálico, em MeOH, nas concentrações de 100 a 700 µg/mL ( $y = 0,001x - 0,0703$ ,  $R^2 = 0,998$ ). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG/g) e todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.4.2. Teor de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada pelo método do  $AlCl_3$  com base na metodologia descrita por Rio (adaptado).<sup>60</sup> Em um balão volumétrico (50 mL), uma alíquota de 15 mL da solução hidroalcoólica (MeOH/H<sub>2</sub>O 70%) dos extratos (1 mg/mL) foi misturada com 1,0 mL de solução metanólica de  $AlCl_3$  (5% m/v) e acertou-se o volume com MeOH/H<sub>2</sub>O 70%. Após repouso de 30 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 425 nm. A curva de calibração foi construída com treze pontos utilizando-se soluções padrão de quercetina nas concentrações de 3,0 a 15 µg/mL ( $y = 0,0637x + 0,0487$ ,  $R^2 = 0,995$ ). Como branco foi utilizada a solução de MeOH/H<sub>2</sub>O 70%. Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de quercetina por grama de extrato seco (mg EQ/g) e as análises realizadas em triplicata.

### 3.5. Determinação do teor de proantocinidinas

O teor de proantocinidinas foi determinado pelo método da vanilina sulfúrica, adaptando a metodologia descrita por Queiroz e colaboradores.<sup>61</sup> Uma alíquota de 1,0 mL da solução aquosa do extrato (2 mg/mL) foi misturada com 2,0 mL da solução de vanilina a 2% em ácido sulfúrico (70% v/v). Após incubação por 15 minutos, em banho-maria a 50°C, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 500 nm. O branco foi preparado substituindo a solução de vanilina na mistura de reação por água destilada. A curva de calibração foi construída com sete pontos utilizando soluções padrão de catequina nas concentrações de 10,20 a 25,50 µg/mL ( $y = 0,0297x + 0,201$ ,  $R^2 = 0,996$ ). O resultado foi expresso em miligrama de equivalente de catequina por grama de extrato seco (mg ECAT/g) e as análises realizadas em triplicata.

### 3.6. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

#### 3.6.1. Método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)

A avaliação da capacidade sequestradora do radical DPPH foi realizada com base na metodologia descrita por Sousa e colaboradores.<sup>59</sup> Construiu-se uma curva de calibração com nove pontos utilizando soluções padrão do radical DPPH nas concentrações de 1 a 40 µg/mL, em MeOH ( $y = 0,0227x + 0,0124$ ,  $R^2 = 0,999$ ). Utilizou-se o MeOH como branco. As leituras das absorbâncias foram realizadas, em triplicata, no comprimento de onda de 515 nm.

#### 3.6.2. Leitura das absorbâncias dos extratos e padrão quercetina

Foram preparadas seis soluções dos extratos e quercetina nas concentrações de 25 a 250 µg/mL em MeOH. Uma alíquota (0,3 mL) dessas soluções foi misturada com 2,7 mL da solução de DPPH a 40 µg/mL. Após 30 minutos de incubação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 515 nm. Como branco foi utilizado a mistura de MeOH (2,7 mL) e solução do extrato (0,3 mL). Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade antioxidante (% AA), determinada pela equação 1,

e  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), que corresponde a concentração necessária da amostra para decrescer a absorbância inicial da solução do radical DPPH em 50%. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\% \text{ AA} = \{[A_{\text{controle}} - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})] \times 100\} / A_{\text{controle}} \quad (1)$$

Onde:  $A_{\text{controle}}$  é a absorbância da solução do radical DPPH a  $40 \mu\text{g/mL}$ ,  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância da mistura da solução do radical DPPH com a amostra e  $A_{\text{branco}}$  é a absorbância da mistura da solução do extrato com solvente MeOH.

### 3.6.3. Método do 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS<sup>+</sup>)

O ensaio foi desenvolvido seguindo a metodologia descrita por Rufino e colaboradores.<sup>62</sup> Inicialmente, uma alíquota (5,0 mL) da solução aquosa de ABTS<sup>+</sup> (7,0 mM) foi misturada com 88  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de persulfato de potássio (2,45 mM) e armazenadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, o produto da reação (radical ABTS<sup>+</sup>) foi diluído em etanol até atingir uma absorbância de 0,70 no comprimento de onda de 734 nm.

Foram preparadas cinco soluções dos extratos nas concentrações de 25 a 500  $\mu\text{g/mL}$ , em etanol. Uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  dos extratos foi misturado com 3,0 mL da solução do radical ABTS<sup>+</sup>. Após 6 minutos de incubação ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, as leituras das absorbâncias foram realizadas a 734 nm, utilizando como branco o solvente EtOH. A curva de calibração foi construída com cinco pontos utilizando soluções padrão de Trolox nas concentrações de 100 a 2.000  $\mu\text{M}$ , em etanol ( $y = -0,0003x + 0,7042$ ,  $R^2 = 0,993$ ). Os resultados foram expressos como equivalente micromolar de Trolox por grama de extrato seco ( $\mu\text{M ET/g}$ ) e por % AA (equação 1). As análises foram realizadas em triplicata.

### 3.7. Ensaio de citotoxicidade frente a larvas de *Artemia salina* Leach

A análise de citotoxicidade frente a larvas de *Artemia salina* L. (*A. salina*) foi realizada conforme metodologia proposta por Meyer e colaboradores.<sup>48</sup> Foram preparadas cinco soluções dos extratos e controle positivo (dicromato de potássio) nas concentrações de 100 a 1000  $\mu\text{g/}$

mL. As amostras foram solubilizadas no sistema água marinha/DMSO 1% na proporção 3:2 (v/v). Foram colocadas, aproximadamente, 15 larvas de *A. salina* em contato com cada solução pelo período de 24 horas, sob iluminação artificial e à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos. Os resultados foram expressos em  $DL_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), que corresponde à dose necessária da amostra para matar 50% dos indivíduos em teste. Os dados foram tratados estatisticamente pelo método log-Probit e a análise realizada em triplicata.

### 3.8. Análises cromatográficas

A cromatografia em coluna foi realizada utilizando sílica gel 60 (Merck®, 70-230 e 230-400 mesh); Sephadex LH-20 da marca Pharmacia e resina XAD-2 da marca Amberlite. Para as análises por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram usadas cromatoplasas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> da Merck®.

As análises cromatográficas a gás e os espectros de massa de baixa resolução foram realizadas em um espectrômetro de massas Agilent 5975C acoplado ao cromatógrafo a gás 7890A. Foi utilizado uma coluna HP-5ms (30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ). O volume injetado foi de 1  $\mu\text{L}$  em modo de divisão (*split*) 1: 10 em um injetor a 280°C. O forno foi programado para uma temperatura inicial de 80°C com taxa de aquecimento de 10°C/min até 280°C (20 min.). O gás de arraste hélio (5.0 analítico) manteve o fluxo constante de 1,0 mL/min. O detector de massa operou nas seguintes condições: temperatura da interface, da fonte de ionização e do analisador quadrupolo foram de 280, 230 e 150 °C respectivamente; modo de ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software MSD Chemstation acoplado com a biblioteca de espectros de massa NIST/EPA/NIH, versão 2.0 g de 19 de maio de 2011.

O espectro de massa de baixa resolução da substância **16** foi realizado em um espectrômetro QP 5050 Shimadzu com um dispositivo para inserção direta com uma rampa de aquecimento com uma temperatura inicial de 100°C (5 min.) até 280°C (20 min).

A identificação das substâncias foi realizada por comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca NIST e dados disponíveis na literatura.

A análise de cromatografia líquida e os espectros de alta resolução foram obtidos no equipamento LCMS-IT-TOF, equipado com fonte de ionização por *electrospray*, Shimadzu. A separação foi realizada em uma coluna Shimadzu XR-ODS C18 (75 mm x 2,0 mm x 2,2 µm). As fases móveis foram água deionizada (solvente A) e MeOH (solvente B), ambos acidificados com ácido fórmico (0,1%), utilizando o seguinte gradiente de eluição: 0 – 3 min, 5% B; 3 – 18 min, 50% B; 18 – 20 min, 50% B; 20 – 25 min, 5% B. A temperatura do forno foi de 40°C, a taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min e o volume de injeção da amostra de 50 µL.

A cromatografia líquida de média pressão (MPLC) foi realizada em um cromatógrafo de média pressão Büchi equipado com uma unidade controlada (C-620), 2 bombas (C-605), coletor de frações (C-660), monitor UV (C - 630), injetor e um *loop* de 5 mL.

### 3.9. Espectros UV-Vis, de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C

As medidas de absorção foram feitas usando espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics, modelo 1105. Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos por varredura no intervalo de 1 200 - 500 nm em um espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu, com faixa espectral entre 200 e 1000 nm.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker Avance III 500 MHz (500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C), utilizando CDCl<sub>3</sub>, MeOD ou DMSO como solventes e TMS como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram fornecidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

### 3.10. Isolamento de compostos e misturas

O extrato bruto em hexano (EH, 32 g) foi submetido à filtração utilizando como material filtrante uma mistura de sílica gel 60 (70-230 mesh), celite e carvão ativo. Como eluente foram empregados os solventes hexano, diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (AcOEt) e MeOH. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) e reunidas de acordo com a semelhança do fator de retenção (Rf), resultando em oito grupos distintos (EH1 – EH8). Os grupos EH3 (4,87 g) e EH4 (3,45 g) apresentaram a formação de

um material cristalino (EHMC) que foi separado por meio de filtração simples em papel de filtro e lavado com hexano. Os solventes utilizados na extração, fracionamento cromatográfico e nas análises qualitativas e quantitativas foram da Synth® e Vetec. Os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich e Synth®.

A partir da análise em CG/EM, o EHMC (660,60 mg), resultante da filtração, foi reunido e forneceu a mistura dos triterpenos **1** – **2**. O filtrado do grupo EH3 (4,52 g) indicou uma mistura dos triterpenos **2**, **4** - **5** e do tocoferol **8**.

Uma alíquota do filtrado do grupo EH4 (1,50 g) foi submetido a cromatografia em coluna (CC) empacotada com sílica gel (230-400 mesh) e eluída com o sistema de solventes orgânicos hexano:AcOEt (85:15), seguido por AcOEt e, posteriormente MeOH. Esse procedimento deu origem a 123 frações, que foram reunidas, após análise em CCDA, em 12 subfrações (EH4.1 – EH4.12). A subfração EH4.3 (369,30 mg) forneceu a mistura dos triterpenos **4** - **5** e a EH4.6 (51,70 mg) a mistura dos esteroides **6** - **7**.

A análise por CG-EM do grupo EH1 (15,70 g) revelou a presença do triterpeno **3**, como componente majoritário. No grupo EH2 (3,01 g) foi identificada uma mistura de **3**, **8** e dos ésteres de cadeia longa **9** - **15**.

Uma alíquota do extrato bruto em MeOH (EM, 40,30 g) foi particionada com AcOEt. Após remoção do solvente, sob pressão reduzida, foram obtidos 12,30 g da fase em AcOEt (EMFAE). Uma porção da EMFAE (4,00 g) foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna empacotada com resina XAD-2, eluída com água destilada acidificada com ácido clorídrico (pH = 2), seguido de água destilada e por fim MeOH:H<sub>2</sub>O (5:95 a 100:0). As frações coletadas foram analisadas em CCDA e reunidas em dez subfrações (CX1 – CX10). A subfração CX2 (320,50 mg) foi submetida a sucessivas cromatografias de exclusão em Sephadex LH-20, eluídas com MeOH, e forneceu a mistura (3,40 mg) dos flavonoides **20** - **21**.

A subfração CX7 (3,21 g) foi submetida a precipitação forçada por adição de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O sobrenadante (1,40 g), separado por meio de filtração, foi submetido a cromatografia líquida de média pressão (MPLC) sobre sílica gel (230-400 mesh) em coluna de vidro Büchi (15 mm x 230 mm), eluída com o sistema hexano:AcOEt (9:0,5), seguido por AcOEt e MeOH. Foram

recolhidas 141 frações de 10 mL, que, após análise em CCDA, foram reunidas em 23 subfrações (CX700 – CX723). A subfração CX713 (56,50 mg) foi submetida a precipitação forçada por adição de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, resultando em um precipitado branco (3,20 mg, 16).

Uma porção do extrato EMH (8,80 g) foi submetida a partição entre água e o solvente orgânico éter etílico. A fase orgânica foi separada e evaporada para obter a fração em éter etílico (EMHFET, 143,40 mg). A fração EMHFET foi submetida a cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20, eluída com MeOH. Foram recolhidas 42 frações, que foram reunidas em 7 subfrações (D1 - D7), com base no comportamento em CCDA. A subfração D3 (13,70 mg) forneceu uma mistura de 17 - 19.

O fluxograma do processo de obtenção das substâncias identificadas nas folhas de *L. pisonis* pode ser visualizado na Figura 4.

### 3.11. Análise estatística

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados como a média de três repetições (n=3) ± desvio padrão da média.

## 4. Conclusão

A prospecção fitoquímica dos extratos em hexano, MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O, obtidos das folhas de *L. pisonis*, mostrou resultado positivo para a presença de triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides e fenóis em geral. Essas classes de metabólitos secundários podem estar associadas às propriedades farmacológicas relacionadas para a espécie.

Esses resultados foram respaldados pelo fracionamento dos extratos, no qual foram identificados seis triterpenos: epifriedelanol (1), friedelina (2), esqualeno (3), β-amirina (4), α-amirina (5) e ácido ursólico (16); dois esteroides: estigmasterol (6) e β-sitosterol (7); um tocoferol, α-tocoferol (8); sete ésteres: palmitato de metila (9), palmitato de etila (10), 9-octadecenoato de etila (11), 9,12,15-octadecanoato de metila (12), palmitato de butila (13), octadecanoato de etila (14) e octadecanoato de butila (15); dois flavonoides: quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (20) e kaempferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo (21); um ácido fenólico: ácido gálico (17) e dois derivados de ácido fenólico: galato de metila

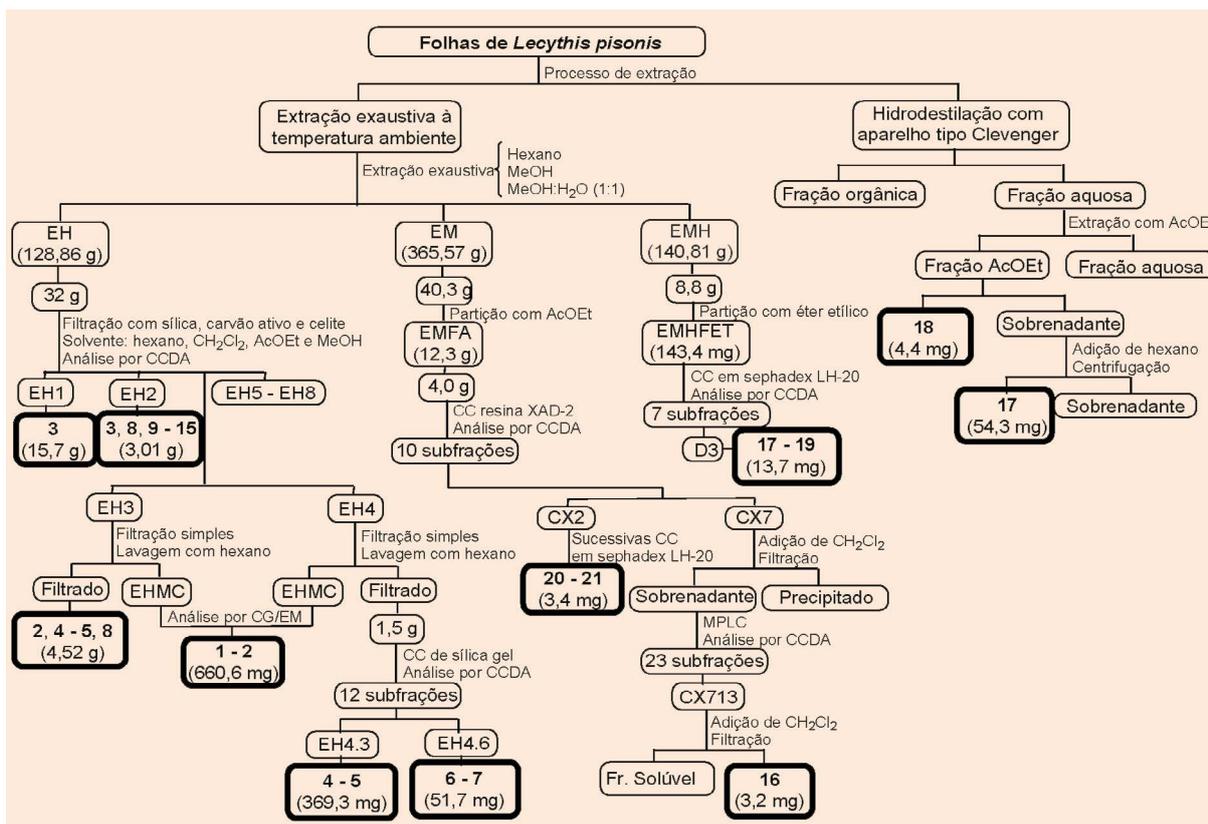


Figura 4. Fluxograma do processo de obtenção das substâncias identificadas nas folhas de *L. pisonis*

(19) e ácido elágico (18). Pelo melhor do nosso conhecimento as substâncias 8 - 15, 17 - 21 estão sendo reportadas pela primeira vez nas folhas da espécie.

Destaca-se ainda que o presente estudo verificou um expressivo potencial antioxidante dos extratos em MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O das folhas. Com base nos resultados obtidos, verifica-se que dentre esses extratos, o hidroalcoólico apresentou a melhor atividade antioxidante frente o radical DPPH e ABTS, que pode estar associada aos maiores teores de fenóis e flavonoides totais observados para este extrato. Na investigação fitoquímica foram identificadas substâncias que corroboram a atividade antioxidante verificada nos extratos.

O bioensaio realizado com *A. salina* revelou que ambos os extratos testados, MeOH e MeOH:H<sub>2</sub>O, são levemente tóxicos. Por fim, pode-se concluir que os resultados obtidos neste trabalho são promissores e podem servir de base para investigações futuras que busquem novas fontes naturais de substâncias com propriedades bioativas.

## Agradecimentos

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001”. Os autores agradecem a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Mori, S. Diversificação e conservação das Lecythidaceae neotropicais. *Acta Botanica Brasílica* **1990**, *4*, 45. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Mori, S. A.; Kiernan, E. A.; Smith, N. P.; Kelley, L. M.; Huang, Y-Y.; Prance, G. T.; Thiers, B. Observations on the phytogeography of the Lecythidaceae clade (Brazil nut family). *Phytoneuron* **2017**, *30*, 1. [Link]
- <sup>3</sup> Catenacci, F. S.; Simon, M. F. A checklist of Lecythidaceae in the upper Madeira River, Rondônia, Brazil with comments on diversity and conservation. *Brittonia* **2017**, *69*, 447. [CrossRef]
- <sup>4</sup> Mori, S.; Tsou, C. H.; Wu, C. C.; Cronholm, B.; Anderberg, A. A. Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: information from combined *ndhF* and *trnL-F* sequence data. *American journal of botany* **2007**, *94*, 289. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>5</sup> Vargas, O. M.; Dick, C. W. *Em Neotropical Diversification: Patterns and Processes*; Rull, V.; Carnaval, A. C., eds.; Springer: Cham, 2020, cap. 29. [CrossRef]
- <sup>6</sup> Mori, S. A.; Smith, N. P.; Cornejo, X.; Prance, G. T. Lecythidaceae – the Brazil nut family Page. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/science/projects/lp/>>. Acesso em: 18 agosto 2020.
- <sup>7</sup> Smith, N. P.; Mori, S.; Prance, G. T. Lecythidaceae A. Rich. in Lista de Espécies da Flora do Brasil Page. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB145>>. Acesso em: 21 maio 2020.
- <sup>8</sup> Huang, Y. Y.; Mori, S.; Kelly, L. M. A morphological cladistic analysis of Lecythidoideae with emphasis on *Bertholletia*, *Corythophora*, *Eschweilera*, and *Lecythis*. *Brittonia* **2011**, *63*, 396. [CrossRef]
- <sup>9</sup> Rosa, T. L. M.; Araujo, C. P.; Alexandre, R. S.; Schmildt, E. R.; Lopes, J. C. Biometry and genetic diversity of paradise nut genotypes (Lecythidaceae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2019**, *54*, 1. [CrossRef]
- <sup>10</sup> Souza, A. S. de; Margalho, L.; Prance, G. T.; Gurgel, E. S. C.; Gomes, J. I.; Carvalho, L. T. de; Martins-da-Silva, R. C. V. Conhecendo Espécies de Plantas da Amazônia: Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess. – Lecythidaceae). *Embrapa Amazônia Oriental - Comunicado Técnico on-line n° 250* **2014**, *1*. [Link]
- <sup>11</sup> Franco, E. A. P.; Barros, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2006**, *8*, 78. [Link]
- <sup>12</sup> Agra, M. F.; Freitas, P. F.; Barbosa-filho, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, *17*, 114. [CrossRef]
- <sup>13</sup> Matos, L. S.; Serra, A. B. As florestas no meio de vida das famílias do Mosaico de unidades de conservação do Lago de Tucuruí, Pará. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* **2020**, *15*, 48. [CrossRef]
- <sup>14</sup> Andrade, E. H. A.; Zoghbi, M. G. B.; Maia, J. G. S. The Volatiles from Flowers of *Couroupita guianensis* Aubl., *Lecythis usitata* Miers. var. *paraensis* (Ducke) R. Kunth. and *Eschweilera coriacea* (A. P. DC.) Mori (Lecythidaceae). *Journal of Essential Oil Research* **2000**, *12*, 163. [CrossRef]

- <sup>15</sup> Oliveira, J. P. C.; Ferreira, E. L. F.; Chaves, M. H.; Militão, G. C. G.; Júnior G. M. V.; Costa, A. M.; Pessoa, C. Ó.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V. Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, *22*, 1140. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Silva, L. L.; Gomes, B. S.; Sousa-Neto, B. P.; Oliveira, J. P.; Ferreira, E. L.; Chaves, M. H.; Oliveira, F. A. Effects of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in a mouse model of pruritus. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, *139*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Ferreira, E. L. F.; Mascarenhas, T. S.; Oliveira, J. P. C.; Chaves, M. H.; Araújo, B. Q.; Cavalheiro, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. *Journal of Medicinal Plants Research* **2014**, *8*, 353. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Duarte, R. C.; Matos, C. R. R.; Braz-filho, R.; Mathias L. Chemical Constituents of *Lecythis pisonis* (Lecythidaceae) – A New Saponin and Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shift Assignments. *Natural Product Communications* **2015**, *10*, 871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Demoliner, F.; de Britto Policarpi, P.; Vasconcelos, L. F. L.; Vitali, L.; Micke, G. A.; Block, J. M. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. *Food Research International* **2018**, *112*, 434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>20</sup> Vidal Martins, M.; Montezano de Carvalho, I. M.; Magalhães Caetano, M. M.; Lopes Toledo, R. C.; Avelar Xavier, A.; De Queiroz, J. H. Neuroprotective effect of Sapucaia nuts (*Lecythis pisonis*) on rats fed with high-fat diet. *Nutricion Hospitalaria* **2016**, *33*, 1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>21</sup> Teixeira, G. L.; Ávila, S.; Silveira, J. L. M.; Ribani, M.; Ribani, R. H. Chemical, thermal and rheological properties and stability of sapucaia (*Lecythis pisonis*) nut oils. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2018**, *131*, 2105. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Brandão, M. S.; Pereira, S. S.; Lima, D. F.; Oliveira, J. P. C.; Ferreira, E. L. F.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C. Antinociceptive effect of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in models of acute pain in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *146*, 180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> Burke, R. W.; Diamondstone, B. I.; Velapoldi, R. A.; Menis, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clinical Chemistry* **1974**, *20*, 794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>24</sup> Mouco, G.; Bernardino, M. J.; Cornélio, M. L. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2003**, *31*, 68. [[Link](#)]
- <sup>25</sup> Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E. M.; Santos, J. M. T.; Rosa, M. R.; Quináia, S. P.; Torres, Y. R.; Santa, H. S. D.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Ferreira, P. M. P.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova* **2009**, *32*, 296. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Marques, G. S.; Monteiro, R. P. M.; Leão, W. F.; Lyra, M. A. M.; Peixoto, M. S.; Rolim-Neto, P. J.; Xavier, H. S.; Soares, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. *Química Nova* **2012**, *35*, 517. [[CrossRef](#)]
- <sup>27</sup> Barbosa, W. L. R.; Quignard, E.; Tavares, I. C. C.; Pinto, L. N.; Oliveira, F. Q.; Oliveira, R. M. *Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais (Edição Revisada)*, 4ª ed., UFPA: Belém, 2004.
- <sup>28</sup> Agbor, G. A.; Vinson, J. A.; Donnelly, P. E. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* **2014**, *3*, 147. [[CrossRef](#)]
- <sup>29</sup> Everette, J. D.; Bryant, Q. M.; Green, A. M.; Abbey, Y. A.; Wangila, G. W.; Walker, R. B. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 8139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>30</sup> Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 996B. [[CrossRef](#)]
- <sup>31</sup> Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* **2007**, *30*, 374. [[CrossRef](#)]
- <sup>32</sup> Daduang, J.; Vichitphan, S.; Daduang, S.; Hongsprabhas, P.; Boonsiri, P. High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *5*, 608. [[CrossRef](#)]
- <sup>33</sup> Kong, K. W.; Mat-Junit, S.; Aminudin, N.; Ismail, A.; Azlina Abdul-Aziz, A. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chemistry* **2012**, *134*, 324. [[CrossRef](#)]

- <sup>34</sup> Obafemi, O. T.; Amos, O.; Ba, A.; Falode, J. A. High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprinting and in vitro antioxidant activity of methanol leaf extract of *Napoleona vogelii* (Lecythidaceae). *Pharmacologyonline* **2016**, *1*, 109. [Link]
- <sup>35</sup> Rondón, M.; García, I.; Cornejo, X.; Rojas, J.; Terán, W. Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. *Pharmacologyonline* **2015**, *3*, 19. [Link]
- <sup>36</sup> Janovick, V.; Boligon, A. A.; Bandeira, R. V.; Athayde, M. L. HPLC/DAD Analysis, determination of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity from leaves of *Cariniana domestica* (Mart) Miers. *Research Journal of Phytochemistry* **2011**, *5*, 209. [CrossRef]
- <sup>37</sup> Naczki, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1054*, 95. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>38</sup> Mitsunaga, T.; Doi, T.; Kondo, Y.; Abe, I. Color development of proanthocyanidins in vanillin-hydrochloric acid reaction. *Journal of Wood Science* **1998**, *44*, 125. [CrossRef]
- <sup>39</sup> Hagerman, A. E. The Tannin Handbook Page. 2002. Disponível em: <<https://www.users.miamioh.edu/hagermae/>>. Acesso em: 21 maio 2020.
- <sup>40</sup> Wanasundara, U. N.; Shahidi, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry* **1998**, *63*, 335. [CrossRef]
- <sup>41</sup> Alvarez-Parrilla, E.; Rosa, L. A.; Amarowicz, R.; Shahidi, F. Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. *Food Chemistry* **2012**, *133*, 827. [CrossRef]
- <sup>42</sup> Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*, 1231. [CrossRef]
- <sup>43</sup> Floegel, A.; Kim, D. O.; Chung, S. J.; Koo, S. I.; Chun, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 1043. [CrossRef]
- <sup>44</sup> Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995**, *28*, 25. [CrossRef]
- <sup>45</sup> Reynertson, K. A.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. *Ethnobotany Research and Applications* **2005**, *3*, 25. [CrossRef]
- <sup>46</sup> Yu, L.; Haley, S.; Perret, J.; Harris, M.; Wilson, J.; Qian, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 1619. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>47</sup> Maposa, S.; Afolayan, A. J.; Otunola, G. A. Toxicity Assessment of *Vachellia karro* (Hayne) Banfi and Galasso Pods using Brine Shrimp Assay. *Pharmacognosy Journal* **2020**, *12*, 1. [CrossRef]
- <sup>48</sup> Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **1982**, *45*, 31. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>49</sup> Nguta, J. M.; Mbaria, J. M.; Gakuya, D. W.; Gathumbi, P. K.; Kabasa, J. D.; Kiama, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacologyonline* **2011**, *2*, 458. [Link]
- <sup>50</sup> Almeida, M. F. O.; Melo, A. C. R.; Pinheiro, M. L. B.; Silva, J. R. A.; Souza, A. D. L.; Barison, A.; Campos, F. R.; Amaral, A. C. F.; Machado, G. M. C.; Leon, L. L. P. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova* **2011**, *34*, 1182. [CrossRef]
- <sup>51</sup> Lemes, G. F.; Ferri, P. H.; Lopes, M. N. Constituintes químicos de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). *Química Nova* **2011**, *34*, 39. [CrossRef]
- <sup>52</sup> Negri, G.; Barreto, L. M. R. C.; Sper, F. L.; Carvalho, C.; Campos, M. G. R. Phytochemical analysis and botanical origin of *Apis mellifera* bee pollen from the municipality of Canavieiras, Bahia State, Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology* **2018**, *21*, 1. [CrossRef]
- <sup>53</sup> Siqueira, D. S.; Pereira, A. S.; Aquino Neto, F. R.; Cabral, J. A.; Ferreira, C. A. C.; Simoneit, B. R. T.; Elias, V. O. Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da Amazônia. *Química Nova* **2003**, *26*, 633. [CrossRef]
- <sup>54</sup> Moura, A. C. S.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. *Química Nova* **2011**, *34*, 1136. [CrossRef]
- <sup>55</sup> Silva, S. L.; Calgarotto, A. K.; Chaar, J. S.; Marangoni, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. *Toxicon* **2008**, *52*, 655. [CrossRef] [PubMed]

- <sup>56</sup> Costa, D. A.; Silva, D. A.; Cavalcanti, A. C.; Medeiros, M. A. A.; Lima, J. T.; Cavalcante, J. M. S.; Silva, B. A.; Agra, M. F.; Souza, M. F. V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O- $\beta$ -D-(6''-E-p-Coumaroyl) glucopyranoside on Guinea-Pig Ileum. *Química Nova* **2007**, *30*, 901. [[CrossRef](#)]
- <sup>57</sup> Pinheiro, P. F.; Justino, G. C. Em *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*; Rao, V., ed.; Intech: Rijeka, 2012, cap. 2.
- <sup>58</sup> Wenkert, E.; Gottlieb, H. E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1811. [[CrossRef](#)]
- <sup>59</sup> Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-júnior, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* **2007**, *30*, 351. [[CrossRef](#)]
- <sup>60</sup> Rio, R. G. W.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 1996. [[CrossRef](#)]
- <sup>61</sup> Queiroz, C. R. A. A.; Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A. Caracterização dos taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore* **2002**, *26*, 485. [[CrossRef](#)]
- <sup>62</sup> Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>. *Embrapa Amazônia Oriental - Comunicado Técnico on-line n° 128* **2007**, *1*. [[Link](#)]