



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Zornia
brasiliensis*.**

YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO

**JOÃO PESSOA
2016**

YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Zornia brasiliensis*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

**JOÃO PESSOA
2016**

N244e Nascimento, Yuri Mangueira do.

Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de *Zornia brasiliensis* / Yuri Mangueira do Nascimento. - João Pessoa, 2016.

114 f. : il.

Orientação: Josean Fechine Tavares.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.


1. Farmacoquímica. 2. *Zornia brasiliensis*. 3. Atividade antioxidante - *Zornia brasiliensis*. 4. Fenólicos. 5. Isoflavona glicosilada. 6. Flavonoides - Flavonas glicosiladas. 7. Ciclitol. 8. DPPH. I. Tavares, Josean Fechine. II. Título.

UFPB/BC

YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Zornia brasiliensis*.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Doutor em Farmacocômica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Orientador)



Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Doutor em Química Orgânica
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

Doutor em Síntese Orgânica
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Externo)

Dedico este trabalho a minha família, em especial, aos meus pais, Daísio e Zenaide que com muito amor sempre me apoiaram e me motivaram diante das minhas escolhas, além de terem me proporcionado ensinamentos como: honestidade, justiça e ética, indispensáveis para que me tornasse o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, primeiramente pela existência, e pelo Seu amor tão imenso, que pela Fé nos dá forças e ombros firmes para aguentarmos as dificuldades e delas nos desvencilharmos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, um profissional vocacionado a pesquisa e um ser humano de grande generosidade, que meu deu a oportunidade para que todo esse trabalho se concretizasse, através dos seus ensinamentos e da sua confiança no meu trabalho.

Aos professores Dr. José Maria Barbosa Filho e Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire, pelas contribuições bastante relevantes neste trabalho e por participarem desta importante etapa da minha formação.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra pela identificação botânica da espécie estudada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva pela convivência no laboratório, e conseqüentemente a todos os ensinamentos passados por ele, que contribuem de maneira significativa a minha formação.

À Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral por disponibilizar o Laboratório Oncofarm para realização dos testes antioxidantes.

Aos professores da pós-graduação por seus ensinamentos fundamentais para minha carreira profissional.

Ao Dr. Vicente Carlos Oliveira Costa não só pela pronta ajuda nas dificuldades encontradas no laboratório, mas pela amizade, pelos conselhos, pelo incentivo a encarar desafios maiores, enfim, por contribuir no meu crescimento nesta área.

Ao amigo Evandro Ferreira por sua ajuda, disponibilidade e apoio, fornecendo sempre espectros “padrão ouro”.

A Dra. Elisana Moura por todo conhecimento fornecida na Cromatografia Líquida Alta Performance (CLAE) e nos processamentos dos dados.

Ao técnico Raimundo Nonato por toda ajuda e ensinamentos necessários no laboratório de fitoquímica.

Aos técnicos Sócrates e Alexsandro por sempre estar à disposição de ajudar.

Aos alunos de mestrado da equipe do prof. Dr. Josean Fachine e do prof. Dr. Marcelo Sobral: Kaio, Márcio, Rose, Laiane e Andreza pela ajuda nos momentos de maiores dificuldades encontrados no dia a dia do laboratório, pelos momentos alegres compartilhados, pelas conversas diárias, meu muito obrigado.

A aluna de doutorado Tainá e a Rose pela contribuição nos testes de atividade antioxidante.

A minha amiga Denise Leite que sempre me incentivou para que trilhasse os caminhos da pós-graduação, e que está sempre presente em todos os momentos da minha vida, um dos presentes que ganhei da Farmácia foi sua amizade, que levarei para vida toda.

As amigas e parceiras que a pós-graduação me deu, Paula Benvindo e Carol Lima, obrigado por sempre estarem presentes, apoiando, incentivando e torcendo pelo meu êxito.

A Flávio Borges, Luís André e Madalena, pelas conversas intermináveis nas bancadas do laboratório, pela ajuda nas colunas, pelos empréstimos de solventes e pelas risadas diárias.

Aos alunos de iniciação científica, Jociano, Juliana, Ana Rita, Fiama, Hídna, André, Pedro, Mariana, Rossana e Hanna por estarem sempre à disposição para ajudar.

Aos amigos (as) dos laboratórios de fotoquímica, Anderson, Diégina, Gabi, Katherine, Yngred, Mikaele, Millen, Jéssica, Sallet, Amanda, Normando, Ana Silvia pelo companheirismo e excelente convivência.

As alunas de doutorado, Taty Kelvia, Tati Mota e Viviane do Oncofarm pelo incentivo e disponibilidade em ajudar.

Aos meus pais, Daísio e Zenaide. Por todo amor, compreensão, força, exemplo, por terem acreditado e me incentivado constantemente, afirmando que a vitória seria sempre vindoura como fruto dos nossos esforços. A minha eterna gratidão e admiração.

Aos meus irmãos Caio e Larissa, pelo carinho, compreensão, e incentivo.

Aos meus avôs, tios, primos pelo apoio sempre encontrado, a confiança sempre depositada, e sem dúvidas ao estímulo para que pudesse chegar até aqui.

Aos amigos Fidélis, Valdinar, José Antônio, Itamar Júnior, Deusdedit Filho, Domingos, Heitor, Irio, José Adriano e Pablo que sempre apoiaram, motivaram, que entenderam minhas ausências decorrentes da dedicação a este trabalho e que mesmo assim, me fizeram acreditar que tudo isto valeria a pena.

A Universidade Federal da Paraíba.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Há aves que levam a vida a dizer: «Ah, se eu quisesse!...» - e nunca levantam voo, só andam. Provavelmente, o melhor ainda será nascer sem asas e fazê-las nascer e alargar à nossa própria custa. Sonhar que voamos é sinal de crescimento”.

(José Saramago)

RESUMO

NASCIMENTO, Y. M. Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de *Zornia brasiliensis*. 2016. 114 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Zornia apresenta em torno de 80 espécies distribuídas pelo mundo, possuindo representantes na Oceania, América, África e na Ásia, e este gênero pertence à família Leguminosae. A espécie estudada, *Zornia brasiliensis*, popularmente conhecida como “urinária”, “urinana” e “carrapicho” e possui uso popular relatado como diurética e para tratamento de doenças venéreas, encontra-se distribuída em vários estados do Brasil, sendo abundante no Nordeste. Diante disto, este trabalho tem como objetivo contribuir com a ampliação do conhecimento químico do gênero *Zornia* através do estudo fitoquímico de *Zornia brasiliensis* Vogel, além de avaliar a atividade antioxidante e quantificar os fenólicos totais. Para realização do estudo, o material vegetal, seco e pulverizado, foi submetido à extração e posteriormente a procedimentos cromatográficos para isolamentos e purificação dos constituintes químicos. A elucidação das estruturas químicas das substâncias foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e bidimensionais em comparações com dados da literatura. O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila-metanol 10% resultou no isolamento do isoflavonoide glicosilado: ononina, da fração acetato de etila-metanol 50% obteve-se um ciclitol: o D-pinitol, e duas flavonas glicosiladas: a isoorientina e isovitexina. Com exceção da ononina, os compostos estão sendo isolados pela primeira vez no gênero *Zornia*. A atividade antioxidante do extrato etanólico bruto (EEB) e das frações diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol 10% e acetato de etila-metanol 50% foram verificadas através do método do sequestro do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e da quantificação de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), com comparações dos resultados obtidos com os padrões, ácido ascórbico e ácido gálico, respectivamente. O estudo da atividade antioxidante revelou uma maior atividade nas frações acetato de etila de etila, acetato de etila-metanol 10% e EEB, resultado que pode ser associado ao fato destas frações terem apresentado os maiores teores de compostos fenólicos entre as frações testadas, e a fração diclorometano apresentou a maior CE_{50} e o menor teor de fenólicos totais. Portanto, os compostos fenólicos provavelmente podem ser responsáveis pelos melhores resultados da atividade antioxidante obtidos pelo teste do sequestro do radical DPPH. Os resultados fitoquímicos relatados na literatura mostram que os fenólicos isolados na fração diclorometano não apresentam os determinantes estruturais responsáveis por esta atividade corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Palavras-chaves: *Zornia brasiliensis*. Atividade antioxidante. Fenólicos. Isoflavona glicosilada. Flavonas glicosiladas. Flavonoides. Ciclitol. DPPH.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Y. M. Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de *Zornia brasiliensis*. 2016. 114 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Zornia presents around 80 species distributed throughout the world, having representatives in Oceania, America, Africa and Asia, and this genus belongs to Leguminosae family. The species studied, *Zornia brasiliensis*, popularly known as "urinaria", "urinana" and "carrapicho" and has popular use reported as diuretic and for treatment of venereal diseases, it is distributed in various states of Brazil, is abundant in the Northeast. Thus, this study aims to contribute to the expansion of the chemical knowledge of genus *Zornia* through phytochemical study *Zornia brasiliensis* Vogel, and to evaluate the antioxidant activity and quantify the total phenolic. To perform the study, the plant material, dried and pulverized, was subjected to extraction and then to chromatographic procedures for isolation and purification of the chemical constituents. The elucidation of the chemical structures was determined by Nuclear Magnetic Resonance ^1H , ^{13}C and bidimensional comparisons with literature data. The chromatogram fractionation of the fraction ethyl acetate-methanol 10% resulted in the isolation of glycosylated isoflavonoid: ononin, the ethyl acetate-methanol 50% fraction was obtained a cyclitol: D-pinitol, and two glycosylated flavones: the isoorientin and isovitexin. Exception ononin, the compounds are isolated for the first time in *Zornia* genus. The antioxidant activity of the crude ethanolic extract (CEE) and dichloromethane fractions, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol 10%, ethyl acetate-methanol 50% were checked by the method of sequestering radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl -hidrazil) and the quantification of total phenolics (Folin-Ciocalteu), compared with the results obtained with the standards, ascorbic acid and gallic acid, respectively. The study of antioxidant activity showed greater activity fractions of ethyl acetate, ethyl acetate-methanol 10% and CEE, a result that can be associated with the fact that these fractions have shown the highest levels of phenolic compounds entres tested fractions, and the dichloromethane fraction presented higher EC_{50} and lowest concentration of phenolic compounds. Therefore, phenolic compounds can probably be responsible for the best results of antioxidant activity obtained by the test kidnapping of DPPH radical. The phytochemicals results reported in the literature show that the phenolic fraction isolated in dichloromethane not have the structural determinants responsible for this activity corroborating the results of this study.

Keywords: *Zornia brasiliensis*. Antioxidant activity. Phenolic. Glycosylated isoflavones. Glycosylated flavones. Flavonoids. Ciclitol. DPPH.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

APT	<i>Attached Proton Test</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CoA	Coenzima A
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsufóxido deuterado
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EC₅₀	Concentração Efetiva Média
EEB	Extrato Etanólico Bruto
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
<i>m</i>	Multipleteo
MHz	Mega-hertz
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
PPgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
<i>q</i>	Quarteto
R_fs	Fatores de retenção

RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
s/	Singleto largo
t	Tripleto
Tab.	Tabela
TR	Tempo de retenção
δ	Deslocamento químico em ppm

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Via do chiquimato para biogêneses dos compostos fenólicos.	40
Esquema 2 - Inter-relação entre as diferentes classes de flavonoides.....	44
Esquema 3 - Obtenção e fracionamento do EEB de <i>Z. brasiliensis</i>	53
Esquema 4 - Fracionamento da fase acetato de etila-metanol 10% de <i>Z. brasiliensis</i>	56
Esquema 5 - Fracionamento da fase acetato de etila-metanol 50% de <i>Z. brasiliensis</i>	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição geográfica da família Leguminosae no mundo, representada pelas áreas em verde.....	28
Figura 2 - <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel.	35
Figura 3 - Artículos do lemento do <i>Z. brasiliensis</i>	35
Figura 4 - Ilustração dos aspectos anatômicos de <i>Zornia brasiliensis</i>	37
Figura 5 - Estrutura e numeração padrão dos flavonoides.....	42
Figura 6 - Configurações dos esqueletos dos inositois.	45
Figura 7 - Conversão da D-glicose em <i>myo</i> -inositol.	46
Figura 8 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Zb-1	69
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-1	69
Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-1 na região de 8,4-6,9 ppm.	70
Figura 11 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-1 na região de 5,2-2,2 ppm.	70
Figura 12 - Espectro de HSQC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de Zb-1	71
Figura 13 - Expansão do espectro de HSQC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de Zb-1 na região (8,5-6,9) X (156-95) ppm.	71
Figura 14 - Expansão do espectro de HSQC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de Zb-1 na região (5,3-2,4) X (105-35) ppm.	72
Figura 15 - Espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de Zb-1	72
Figura 16 - Expansão do espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de Zb-1 na região (8,8-6,7) X (175-95) ppm.....	73

Figura 17 - Expansão do espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de Zb-1 na região (5,5-2,8) X (165-45) ppm.....	73
Figura 18 - Estrutura de um poliálcool cíclico metoxilado.....	74
Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, DMSO- d_6) de Zb-2	77
Figura 20 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, DMSO- d_6) de Zb-2 na região de 86-57 ppm.	77
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-2	78
Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-2 na região de 5-4,1 ppm.	78
Figura 23 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-2 na região de 3,7-2,3 ppm.	79
Figura 24 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os hidrogênios H-3 e H-8, em DMSO- d_6 , para as flavonas glicosiladas orientina e isoorientina (RINALDO et al., 2007).	81
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Zb-3	83
Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Zb-3 na região de 195-100 ppm.	83
Figura 27 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) de Zb-3 na região de 106-52 ppm.	84
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-3	84
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-3 na região de 7,5-6,3 ppm.	85
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Zb-3 na região de 7,5-6,3 ppm.	85

Figura 31 - Deslocamentos químicos de RMN ¹ H para os hidrogênios H-3 e H-8, em DMSO-d ₆ , para as flavonas glicosiladas orientina, Isoorientina, vitexina e isovitexina (RINALDO et al., 2007).	87
Figura 32 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de Zb-4	90
Figura 33 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de Zb-4 na região de 8,1-6,3 ppm.	90
Figura 34 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de Zb-4 na região de 8,1-6,3 ppm.	91
Figura 35 - Cromatograma da fração Zb-4(A) e dos padrões: isoorientina(B) e isovitexina(C).....	92
Figura 36 - Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico versus as absorvâncias (765 nm) para o ensaio de Folin-Ciocalteu.	93
Figura 37 - Valores das concentrações de fenólicos expressa em mg EAG / g do EEB e frações <i>Zornia brasiliensis</i>	94
Figura 38 - Curva padrão para o teste de DPPH – ácido ascórbico.	95
Figura 39 - Valores das CE ₅₀ expressa em µg/mL do ácido Ascórbico, do EEB e frações <i>Zornia brasiliensis</i>	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Substâncias isoladas de espécies de <i>Zornia</i>	33
Quadro 2 - Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fração acetato de etila-metanol 50%.....	57

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Atividades farmacológicas de espécies de <i>Zornia</i>	32
Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seus esqueletos.	41
Tabela 3 - Dados comparativos de RMN ¹³ C e ¹ H de Zb-1 em DMSO- <i>d</i> ₆ (125 e 500 MHz, respectivamente) e da ononina em DMSO- <i>d</i> ₆ (125 e 500 MHz, respectivamente) (Fedoreyev et al., 2008).	67
Tabela 4 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para Zb-1 , verificados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, respectivamente) e bidimensionais em DMSO- <i>d</i> ₆	68
Tabela 5 - Dados comparativos de RMN ¹³ C e ¹ H de Zb-2 em DMSO- <i>d</i> ₆ (50 e 500 MHz, respectivamente) e do D-pinitol em DMSO- <i>d</i> ₆ (100 e 400 MHz, respectivamente) (Yu, et al., 2005; Raporu, 2011).	76
Tabela 6 - Dados comparativos de RMN ¹³ C e ¹ H de Zb-3 em DMSO- <i>d</i> ₆ (125 e 500 MHz, respectivamente) e da isoorientina em - <i>d</i> ₆ (125 e 300 MHz, respectivamente) (Huang et al., 2015 e Çalis et al., 2006).	82
Tabela 7 - Dados comparativos de ¹ H de Zb-4 em DMSO- <i>d</i> ₆ (500 MHz) e da isoorientina e isovitexina, ambas em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 e 500 MHz, respectivamente) (Mohammed et al., 2014 e Çalis et al., 2006).	89
Tabela 8 - Concentração média ± coeficiente de variação de fenólicos totais encontradas no EEB e nas frações de <i>Zornia brasiliensis</i>	94
Tabela 9 - Determinação da CE ₅₀ a partir do teste de sequestro do DPPH.	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
3.1 Considerações sobre a família Leguminosae.....	28
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Zornia</i>	30
3.3 Considerações sobre a espécie <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel.....	34
3.4 Compostos Fenólicos.....	38
3.5 Flavonoides.....	42
3.6 Ciclitóis.....	45
3.7 Importância dos estudos da Atividade Antioxidante.....	47
3.8 Estresse oxidativo e Espécies reativas de oxigênio (EROS).....	48
3.9 Antioxidantes.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Estudo fitoquímico de <i>Zornia brasiliensis</i>	52
4.1.1 Coleta do material botânico.....	52
4.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB).....	52
4.1.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Zornia brasiliensis</i> ..	54
4.1.3.1 Processamento cromatográfico da fração acetato de etila-metanol 10% ..	54
4.1.3.2 Processamento cromatográfico da fração acetato de etila-metanol 50% ..	55
4.1.4 Caracterização do perfil cromatográfico da fração <i>Zb-4</i>	58
4.1.5 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados.....	59
4.2 Estudo da atividade antioxidante e determinação do teor de fenólicos totais de <i>Zornia brasiliensis</i>	61
4.2.1 Determinação do teor de fenólicos totais.....	61
4.2.2 Teste do sequestro do radical livre DPPH.....	62
4.2.3 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Determinação estrutural de <i>Zb-1</i>	65
5.2 Determinação estrutural de <i>Zb-2</i>	74

5.3 Determinação estrutural de <i>Zb-3</i>	80
5.4 Determinação estrutural de <i>Zb-4</i>	86
5.5 Avaliação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante do EEB e frações de <i>Zornia brasiliensis</i>	93
5.5.1 Determinação do Teor de Fenólicos Totais	93
5.5.2 Atividade Antioxidante.....	95
6 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	102

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento de diversas doenças foi documentado em todas as sociedades humanas, sendo esta utilização parte da cultura de cada povo (SIMÕES; ALMEIDA, 2015).

O uso intenso destas espécies botânicas no decorrer dos anos possibilitou que um vasto conhecimento fosse adquirido e acumulado pelas populações. A partir disto, este conhecimento por vezes é passado pelas gerações através da oralidade (SILVA; ALMEIDA, 2013).

Duzentos anos atrás, um farmacêutico de apenas 21 anos, chamado Freidrich Sertürner, isolou das sementes de papoula, *Papaver somniferum*, o primeiro composto puro farmacologicamente ativo chamado morfina. Este fato deu inicio a uma nova era, onde substâncias oriundas de produtos naturais podiam ser purificadas, estudadas e administradas em doses precisas (LI; VEDERAS, 2009).

As plantas medicinais são utilizadas por 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento no que se refere à Atenção Primária à Saúde. De forma semelhante no Brasil, cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde. Em alguns países industrializados, o uso de produtos da medicina tradicional é igualmente significativo, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70% a 90% de sua população têm usado esses recursos da medicina tradicional (BRASIL, 2012). Desta forma, mesmo com a evolução dos tratamentos alopáticos no século XX, o acesso facilitado às plantas medicinais e a própria tradição de uso, perpetuam o hábito de recorrer às feiras, quintais e mercados populares (VEIGA JUNIOR et al., 2005 apud SZABO, 2015).

Contudo, as informações técnicas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais, de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança de uso das mesmas (FIRMINO et al, 2011). Contudo os estudos desenvolvidos precisam ter uma rigorosa identificação botânica da planta pesquisada e determinar os parâmetros de qualidade necessários a sua utilização para que se possa garantir o seu uso de uma forma seguro, prevenindo intoxicações ou o aparecimentos dos efeitos colaterais relacionados a doses e utilizações inadequadas (PAULA et al., 2008).

Esses estudos podem ter sua segurança aumentada se as pesquisas fitoquímicas forem desenvolvidas conjuntamente com as investigações farmacológicas que podem através de modelos experimentais constatarem possíveis riscos toxicológicos da utilização dos produtos naturais investigados em diferentes vias, doses e apresentações (SILVA, 2013).

As plantas superiores representam uma das fontes mais relevantes para o descobrimento de novas substâncias empregadas diretamente como agentes medicinais, além disso, possibilitam o surgimento de modelos para modificações estruturais e organização de propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo de inspiração para químicos orgânicos na construção de novos arranjos moleculares naturais. (MINGUZZI, BARATA, CORDELL, 2011).

O Ministério do Meio Ambiente afirma que o Brasil, por ocupar quase a metade da América do Sul, é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, espalhadas nos seis biomas terrestres e nos três grandes ecossistemas marinhos. São mais de 43.020 espécies vegetais conhecidas no país. Suas diferentes zonas climáticas favorecem a formação de zonas biogeográficas (biomas), a exemplo da floresta amazônica, maior floresta tropical úmida do mundo; o Pantanal, maior planície inundável; o Cerrado e a Caatinga (BRASIL, 2015).

Porém no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Como grande parte das espécies nativas brasileiras não tem estudos que permitam a elaboração de pesquisas completas, a utilização empírica destas espécies demonstra que em um país como o Brasil, com uma biodiversidade incomparável, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as pesquisas aqui desenvolvidas (FOGLIO et al., 2006). De tal modo que uma pouca quantidade de espécies existentes nessa biodiversidade brasileira foi estudada (MESQUITA NETO; SOUZA; 2009; GUARIN NETO; MORAIS, 2003).

Perante esta pouca quantidade de pesquisas desenvolvidas, surgiu uma das possibilidades de estudo, que é a atividade antioxidante. Diversos produtos de origem vegetal, como frutos, folhas, sementes e óleos podem ser fontes de substâncias biologicamente ativas como os antioxidantes, por exemplo. Dentre os

principais antioxidantes naturais estão os compostos fenólicos, o ácido ascórbico, o α -tocoferol e os carotenoides (OLDONI, 2007).

Esta atividade tem recebido atenção especial por apresentar capacidade de sequestrar radicais livres. Sabe-se que estes radicais livres podem agir no corpo humano e causar diversos danos celulares, como câncer, doenças neurodegenerativas, anemias, isquemias além de oxidação do LDL (lipídio de baixa densidade), o que pode levar a problemas cardiovasculares (SALDANHA, 2005).

Diante do exposto, existe a necessidade de um envolvimento científico para melhor aplicabilidade e uso das plantas medicinais garantindo qualidade, eficácia e segurança, e conseqüentemente atestando o uso etnofarmacológico destas drogas de origens vegetais. Este trabalho se concentrou no aprofundamento do conhecimento fitoquímico e na avaliação do potencial antioxidante em uma espécie da família Leguminosae: a *Zornia brasiliensis* Vogel.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento químico do gênero *Zornia* através do estudo fitoquímico de *Zornia brasiliensis* Vogel.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar substâncias biologicamente ativas do extrato obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* pelo uso de métodos cromatográficos;
- Identificar biometabólitos de *Zornia brasiliensis* por métodos usuais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e bidimensionais (HMBC, HMQC, COSY e NOESY);
- Quantificação de fenólicos totais do extrato etanólico bruto e das frações diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol-10% e acetato de etila-metanol-50% de *Zornia brasiliensis* através método Folin–Ciocalteu;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol 10% e acetato de etila-metanol 50% de *Zornia brasiliensis* através do método do sequestro de radical DPPH.

Fundamentação
teórica

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Leguminosae

Leguminosae é uma grande família, representada por aproximadamente 750 gêneros e 19500 espécies (LEWIS et al., 2005), com exceção das regiões Ártica e Antártica, a família encontra-se distribuída em florestas tropicais e desertos quentes (Figura 1) (DUTRA; MESSIAS; GARCIA, 2005). No Brasil sua presença é muito ampla, encontrar-se distribuída em quase todas as vegetações brasileiras (LIMA, 2000). Na lista que trata das espécies presentes na flora brasileira, esta família está contemplada por 210 gêneros (15 endêmicos) e contém maior número de espécies, 2697. Entre estas espécies, 1897 são presentes apenas no território brasileiro (LIMA et al., 2010). Leguminosae é a família que possui o maior número de espécies na flora do Brasil (FORZZA et al., 2010). No entanto, as espécies que compõe esta família se diferenciam entre as áreas, não só quanto à ocorrência, mas, sobretudo, quanto à abundância (TUCKER, 2003).

Figura 1 Distribuição geográfica da família Leguminosae no mundo, representada pelas áreas em verde.



Fonte: SILVA, 2013.

Os membros desta família mostram uma grande diversidade de hábito de crescimento, desde pequenas ervas efêmera a enormes árvores de vida longa (SPRENT, 1999). Tal diversidade morfológica gera muitas controvérsias no que se

refere à taxonomia dessa família. Tradicionalmente Fabaceae foi reconhecida como uma única família, com três subfamílias (Faboideae ou Papilionoideae, Ceasalpinioideae, e Mimosoideae), porém alguns autores preferiram optar por três famílias distintas (Fabaceae, Ceasalpiniaceae e Mimosaceae) (IGNOATO, 2012).

É comum em muitas publicações observar o nome Fabaceae como nomenclatura desta família, entretanto, Leguminosae é um nome alternativo e aceito pelo Código Internacional de Nomenclaturas Botânicas, uma vez que nome Fabaceae é ambíguo, sendo usadas tanto para designar o nome da família que possui três subfamílias, como também para uma destas subfamílias, a Papilionoideae (SILVA, 2013).

Papilionoideae apresenta cerca de dois terços de todos os gêneros e espécies de Leguminosae (POLHILL, 1994), aproximadamente 478 gêneros e 13.800 espécies (LEWIS et al., 2005). Considerada o grupo mais evoluído das leguminosas, estão distribuídas no mundo inteiro. As espécies são reconhecidas, em sua grande parte, pelas suas flores papilionáceas, além das folhas geralmente alternas e compostas, mas nunca bipinadas (PEREZ, 2009).

Há muitas leguminosas úteis e diversas são cultivadas desde a antigüidade como alimentícias (lentilha, ervilha, feijão); forrageiras (alfafa, trevos, ervilhacas); oleaginosas (soja, amendoim); adubo verde (tremoços); tintóreas (índigo, pau-brasil); tânicas (acácia-negra); fornecedoras de celulose (bracatinga); melíferas (alfafa, trevos-de-cheiro); medicinais (pata-de-vaca, erva-de-touro); florestais (canafístula, angico); ornamentais (guapuruvú, corticeiras). Algumas leguminosas são tóxicas para o homem ou para o gado, pela presença de princípios nocivos (tremoços, timbó); algumas são prejudiciais por seus acúleos (maricá, unha-de-gato); outras prejudicam a lã das ovelhas por seus frutos pegajosos (pega-pegas) ou gloquidiados (trevos-de-carretilha) (MIOTTO; LÜDTKE; OLIVEIRA; 2008).

Ecologicamente esta família é importante em uma diversidade de ecossistemas, algumas de suas subfamílias estão presentes e muitas vezes dominante, em quase todo tipo de vegetação da terra, de florestas tropicais a desertos (LIRA, 2009)

A caatinga é um bioma predominante no Nordeste do Brasil, se estende do Piauí a Minas Gerais. Sua vegetação apresenta-se extremamente heterogênea incluindo pelo menos uma centena de diferentes tipos de paisagens únicas, fazendo dela um ambiente de extrema importância biológica (SILVA, T., 2013).

O cariri paraibano contém um total de 396 espécies, distribuídas em 90 famílias botânicas, sendo 85 famílias de Angiospermas. Porém a família mais diversa é a Fabaceae, com 71 espécies (BARBOSA et al., 2007).

Dados da literatura evidenciam a presença de compostos que dão características à família como ácidos graxos com cadeias de 20, 22 ou 24 carbonos, nos óleos das sementes. Já foi relatado na literatura substâncias pertencente à classe das saponinas, dos terpenoides, dos taninos, dos alcaloides quinozilidínicos além, das antraquinonas e alcaloides pirrolizidínicos; outra classe de metabólitos encontradas nessa família é a dos flavonoides, apresentando uma distribuição mais homogênea. Integrantes desta família possuem não apenas flavonas e flavonóis, que são os esqueletos de flavonoides comumente achados em espécies de outras famílias, mas biossintetizam em especial, chalconas, 2,3-diidroflavonoides e flavanonas, e outros flavonoides que são considerados raros, que ocorrem quase que especificamente nesta família: isoflavonoides e rotenoides (SILVA, 2013).

Já foram comprovados cientificamente diversos efeitos biológicos ou farmacológico para as espécies dessa família, como efeito analgésico, anti-inflamatório, antifúngico, antibacteriano e antidiabético (SILVA et al., 2008) (OLIVEIRA et al., 2009)

3.2 Considerações sobre o gênero *Zornia*

Este gênero detêm aproximadamente 80 espécies distribuídas pelo mundo, com 41 espécies na América, 16 na África, 13 na Oceania e 7 na Ásia (MOHLENBROCK, 1961, FORTUNA-PEREZ, 2015), sendo considerado o segundo gênero mais numeroso do clado Adesmia. No Brasil *Zornia* se encontra presente desde a região amazônica até os “pampas” no Rio Grande do Sul (SCIAMARELLI & TOZZI, 1996).

As principais características das plantas que compõem o gênero *Zornia* são as flores agrupadas em inflorescências espiciformes e as folhas bi ou tetrafolioladas, com os folíolos opostos muito próximos entre si (SCIAMARELLI, 1994).

O gênero *Zornia* está representado por 36 espécies no território brasileiro, dentre as quais, 15 espécies são endêmicas. Botanicamente possui flores solitárias ou dispostas em inflorescências. As espécies que possuem flores solitárias estão presentes apenas no Brasil, *Z. myriadena* e *Z. echinocarpa*. Outra característica

botânica marcante são as folhas que podem ser: tetrafolioladas ou bifolioladas. As demais espécies presentes no Brasil possuem flores em inflorescência, sendo: 12 espécies (10 existentes apenas neste território) tetrafolioladas e 22 espécies bifolioladas (PEREZ, 2009).

As espécies pertencentes à *Zornia* estão em todas as regiões geográficas do Brasil. Os estados da Bahia e Minas Gerais concentram o maior número de espécies (20 spp.), mas a Bahia é o único que possui toda a diversidade do gênero, possuindo as espécies que apresentam as flores solitárias e pelas que apresentam as flores dispostas em inflorescência, tanto as tetrafoliadas quanto as bifoliadas. Outros estados que possuem a mesma característica da Bahia, é o Rio Grande do Sul (13 spp.), seguido de São Paulo (10 spp.) e Goiás (10 spp.) (SILVA, 2013).

Algumas espécies de *Zornia* já foram estudadas quanto à sua atividade farmacológica, estas atividades e as espécies avaliadas são descritas na Tabela 1 (pág. 32).

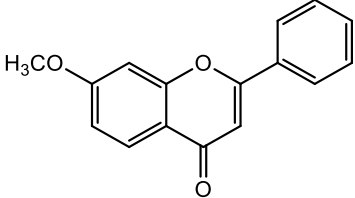
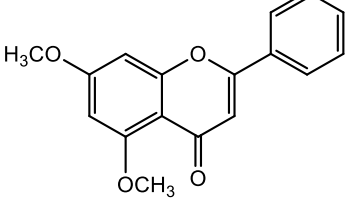
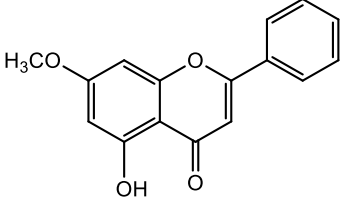
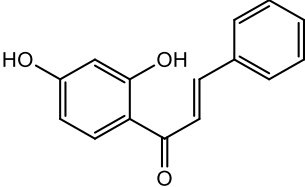
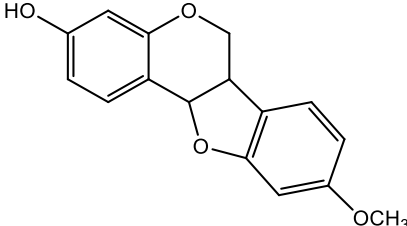
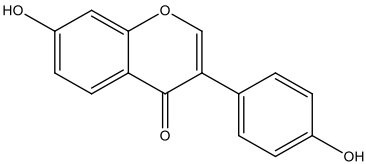
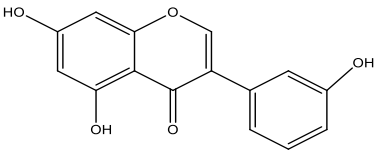
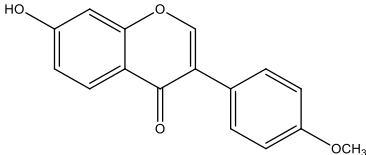
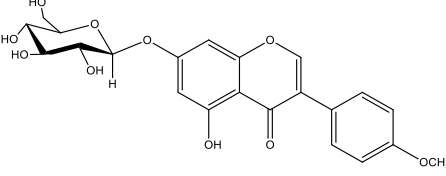
Além dos estudos farmacológicos, estudos fitoquímicos já foram relatados para espécies pertencentes ao gênero *Zornia*, contudo são estudos recentes e limitados a poucas espécies como mostrado no Quadro1 (pág. 33).

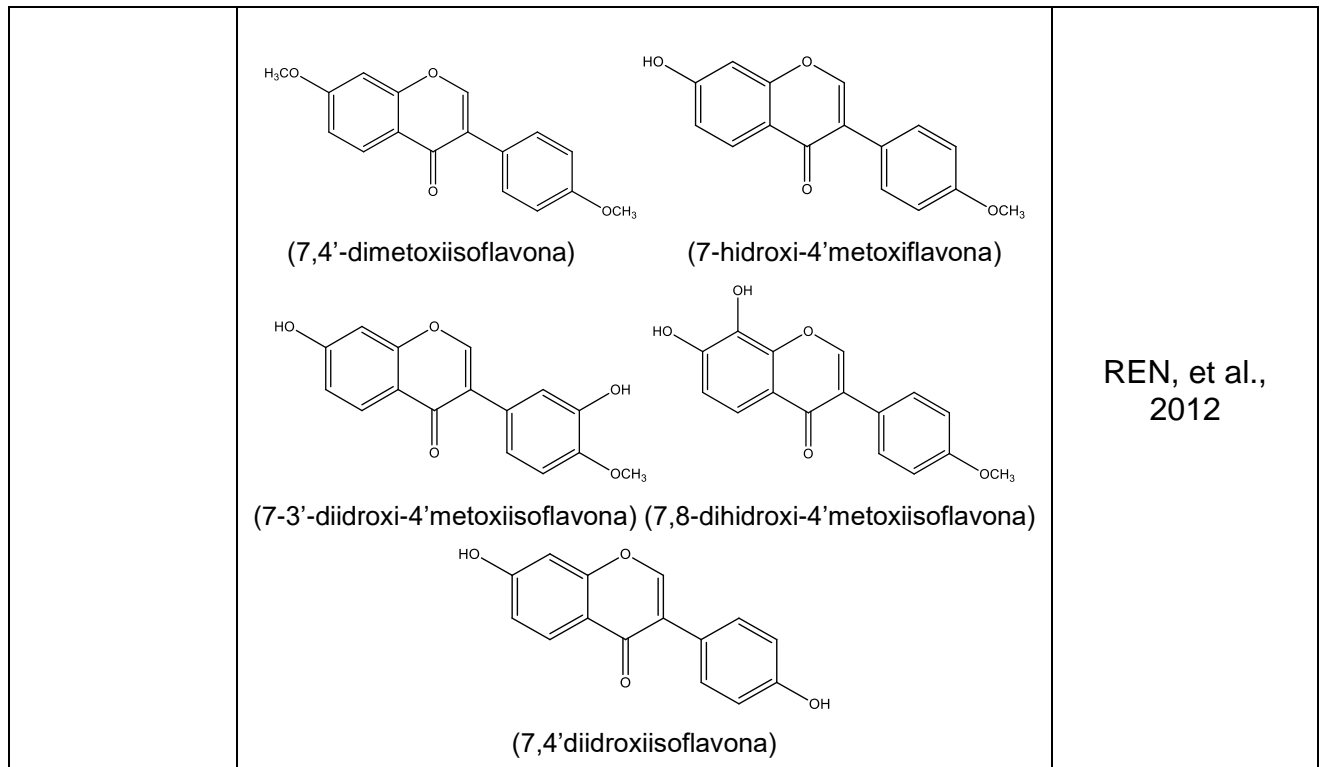
Tabela 1 - Atividades farmacológicas de espécies de *Zornia*.

Espécie	Atividade	Referência
<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	Moluscicida	DAVID, et al., 2007
	Antitumoral	COSTA, et al, 2015
	Antinociceptiva	DA SILVA, et al, 2013
	Toxicológica	BATISTA, M. T., 2013.
<i>Zornia diphylla</i> (L) Perls.	Relaxante sobre musculo liso	ROJAS, et al.,1999
	Atividade citotóxica	BELCAVELLO, et al., 2012
	Atividade anticonvulsionante	GREETHA; SHILPA; MURUGAN, 2012
	Potencial antioxidante	BRAHMACHARI, et al.,2009
	Anti-inflamatória e antibacteriana (<i>Salmonella typhi</i>)	ARUNKUMAR; RAMESHKUMARL; SUBRAMONIAM, 2014
	Antitumoral	ARUNKUMAR; AJIKUMARAN; SUBRAMONIAM, 2012
<i>Zornia elegans</i> (L) Perls.	Antibacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecium</i>) Antimicobacteriana	CHIAPPETA; DE MELLO, 1984
<i>Zornia setosa</i> Baker	Moluscicida	KLOOS, et al., 1987
<i>Zornia tenuifolia</i> Moric.	Antibacteriana (<i>S. aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>) Citotóxica	DO NASCIMENTO; DE MELLO; CHIAPPETA, 1985
<i>Zornia milneana</i> Mohlenbr.	Antibacteriana (<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> e <i>A. caviae</i>)	OBI, et al., 2007
<i>Zornia gibbosa</i> Span.	Anti-inflamatória	LAXANE, et al, 2011
	Atividade antioxidante	LAXANE, et al, 2008

Fonte: NASCIMENTO, 2016.

Quadro 1 - Substâncias isoladas de espécies de *Zornia*.

Espécie	Substância isolada	Referência	
<p><i>Zornia brasiliensis</i> Vogel</p>	 <p>(7-metoxiflavona)</p>	 <p>(5,7-dimetoxiflavona)</p>	
	 <p>(5- hidroxi-7-metoxiflavona)</p>	 <p>(2'-4'-dihidroxicalcona)</p>	
	 <p>(3-hidroxi-9- metoxipterocarpano)</p>		
	<p><i>Zornia diphylla</i> (L) Perls</p>	 <p>(7,4'-diidroxiisoflavona)</p>	 <p>(5,7,3'-tridroxiisoflavona)</p>
		 <p>(7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona)</p>	
 <p>(7-β-D-glucosil-5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona)</p>			
<p>LEUNER, et al., 2012</p>			



3.3 Considerações sobre a espécie *Zornia brasiliensis* Vogel

Conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” e “carrapicho”, a espécie *Zornia brasiliensis*, possui uso popular como diurética e para tratamento de doenças venéreas (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Está presentes em diversos estados brasileiros, sendo abundante no Nordeste. Atingindo também a Venezuela (AYMARD, 1999; MOHLENBROCK, 1961).

Suas características botânicas são: subarbusto de 60 cm altura; ramos decumbentes, glabros a tomentosos, pontuados, às vezes avermelhados; folhas 4-folioladas, digitadas; inflorescência espiciforme, geralmente axilar; lomento 4-5 articulado; artículos 2-3 mm comprimento, 1,5-2 mm largura, pubescentes, côncavos na parte superior, pontuados; acúleos 0,5-0,7 mm comprimento, não purpúreos no ápice; semente 1,5-2 mm comprimento, testa lisa, marrom. Floresce e frutifica de janeiro a agosto. (PEREZ, 2009).

Figura 2 - *Zornia brasiliensis* Vogel.



Imagem: J. F. Tavares, 2009 (Serra Branca, 2009).

Mohlenbrock (1961) ao revisar o gênero *Zornia* atribuiu como uma característica de diferenciação de *Zornia brasiliensis* entre as espécies tetrafoliadas, os artículos do lomento, que nesta espécie em estudo são dorsalmente côncavos e desprovidos de glândulas, desta forma tornando ainda mais complexa à taxonomia do gênero (Figura 3, pág. 35).

Figura 3 - Artículos do lomento do *Z. brasiliensis*.



Imagem: Fortuna-Perez et al, 2015.

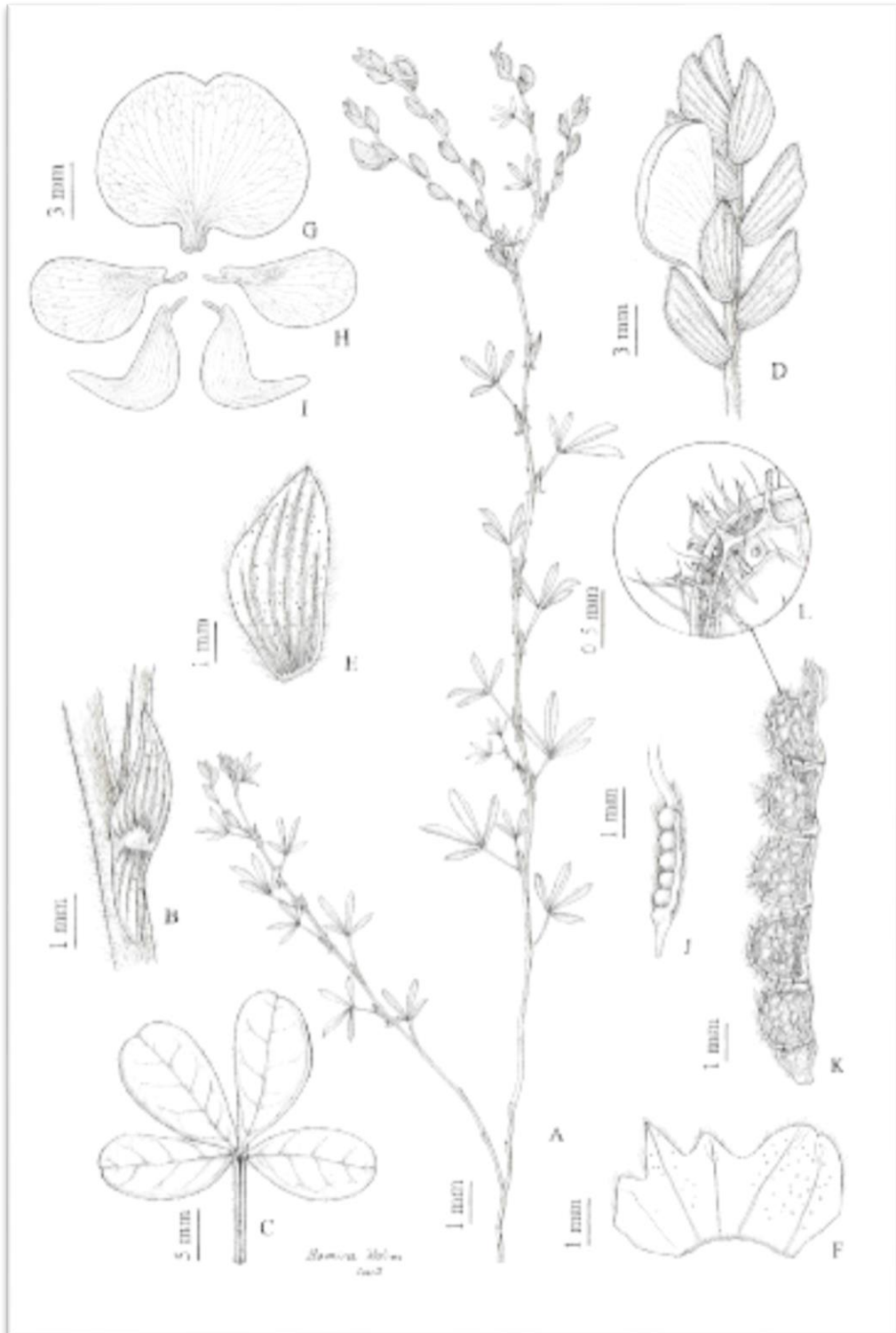
Fortuna-Perez e colaboradores (2015) atribuem à distribuição limitada ao pequeno tamanho dos artículos do lomento que apresentam pequenas cerdas. Possivelmente tem o potencial de dispersão de longas distâncias reduzido, porque

os artigos não aderem aos possíveis dispersores com tanto sucesso como nas espécies que possuem cerdas longas e plumosas.

Zornia brasiliensis é confundida recorrentemente com *Z. myriadena* pois ambas compartilham do mesmo aspecto vegetativo, forma dos folíolos, coloração dos ramos e por muitas vezes ocorrerem simpatricamente. Porém, são diferenciadas quanto as suas flores, pois *Z. brasiliensis* apresenta flores em inflorescência e *Z. myriadena* flores solitárias (Figura 4, pág. 37) (PEREZ, 2009).

Estudo químico, toxicológico e farmacológico já foi executado neste programa de pós-graduação com a espécie *Zornia brasiliensis* Vogel. As substâncias já identificadas estão no Quadro 1 (pág. 33) (SILVA, 2013). Foi ainda relatado o efeito antinociceptivo da 7-metoxiflavona, o extrato etanólico das partes áreas apresentou baixa citotoxicidade, baixa toxicidade aguda e genotoxicidade *in vivo* (Ver Tabela 1, pág.32). Este trabalho se concentrou no isolamento e caracterização de outros metabólitos secundários ainda não relatados, além da avaliação do teor de fenólicos totais bem como da atividade antioxidante do EEB e das frações oriundas deste.

Figura 4 - Ilustração dos aspectos anatômicos de *Zornia brasiliensis*.



A. Detalhe do ramo. **B.** Detalhe da estípula. **C.** Folha. **D.** Detalhe da inflorescência mostrando as flores nas bractéolas. **E.** Bractéola. **F.** Cálise **G.** Estandarte. **H.** Alas. **I.** Pétalas da quilha. **J.** Ovário. **K.** Lomento. **L.** Detalhe do articulo do lomento. Fonte: (PEREZ, 2009).

3.4 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são ubíquos no reino vegetal e são produtos secundários de plantas, isto é, produtos que não apresentam uma função direta nas atividades bioquímicas primárias, responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e reprodução (ALMEIDA, 2007).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem fenólicos, esses compostos são muito reativos quimicamente e isso não deve ser esquecido quando do seu isolamento dos vegetais. Assim, possuem, em geral, características ácidas, e podem ser isolados através da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (por exemplo, solução de carbonato de sódio). Sendo compostos fenólicos podem formar pontes de hidrogênio, e essas podem ser tanto intramoleculares como intermoleculares. Essa última é importante na ligação com proteínas, característica utilizada no teste de identificação de taninos através da precipitação de gelatina, por exemplo. Outra característica importante é a propriedade de formar complexos com metais, sendo que muitos desses quelatos metálicos são importantes em vários sistemas biológicos. Por serem compostos aromáticos, apresentam intensa absorção na região de ultravioleta (UV). Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto por enzimas vegetais específicas ou por influência de metais (como ferro ou magnésio), da luz e do calor, ou em meio alcalino, ocasionando escurecimento de suas soluções ou dos compostos isolados (SIMÕES, 2007).

O interesse nestes compostos prende-se com a sua atividade antioxidante, que representa também um possível mecanismo explicativo para muitos outros efeitos destes constituintes (anti-aterosclerótico, anti-inflamatório e antitumoral) (APROTOSOAIE et al., 2013). A propriedade mais recentemente identificada nos polifenóis é o seu efeito nas complicações em longo prazo da diabetes, incluindo retinopatia, nefropatia e neuropatia (BAHADORAN et al., 2013).

A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos

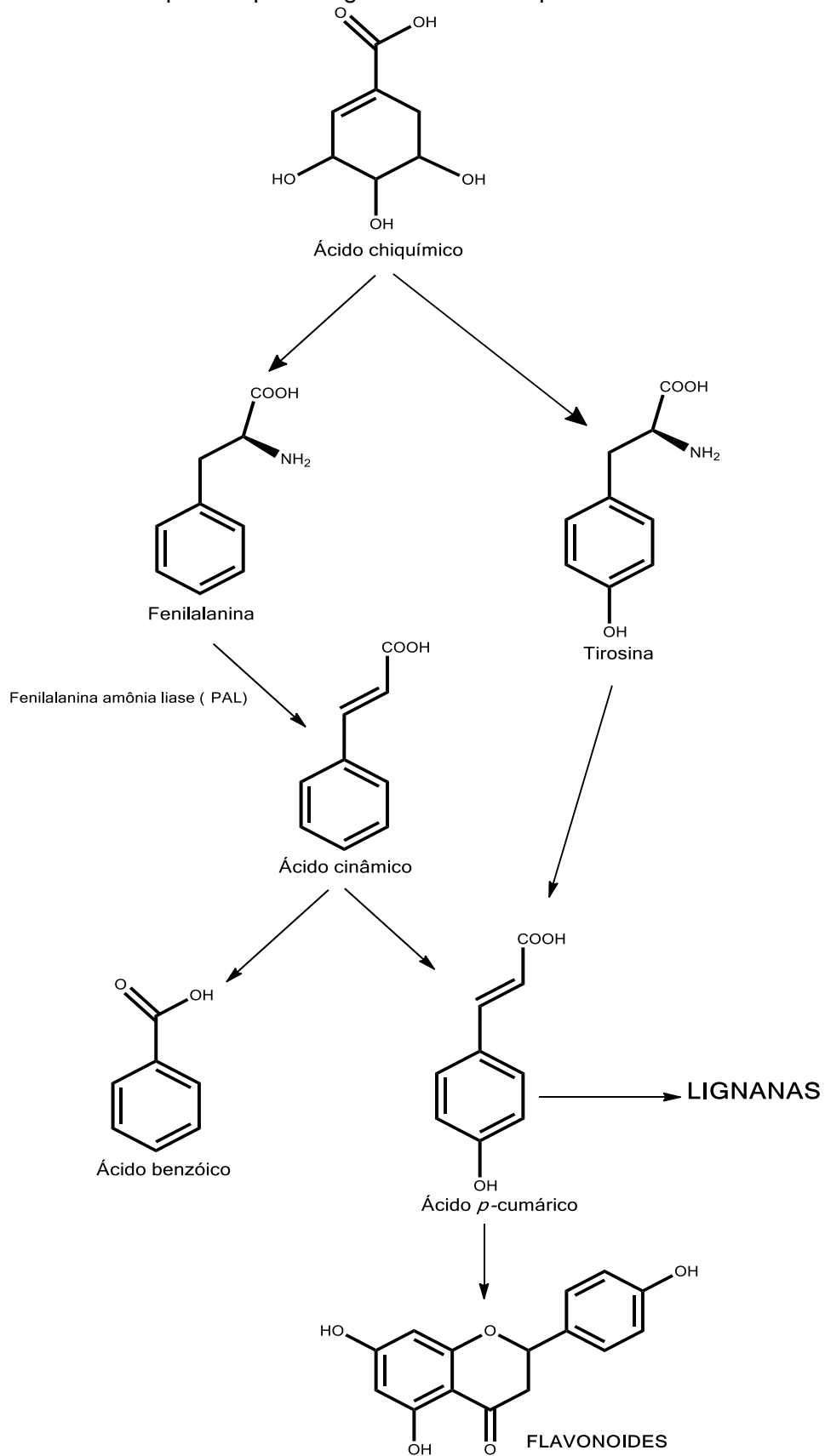
fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis (PIMENTEL, FRANCKI, 2005).

Em torno de 40% dos compostos fenólicos provêm da via do acetato-polimalato, sendo os 60% restantes originados da rota do ácido chiquímico, a partir de carboidratos. Metabólitos derivados do acetato são originados do processo de condensação da unidade iniciadora, o acetil-CoA com a unidade propagadora, o malonil-CoA sendo a sua função fornecer unidade C₂ para a síntese de ácidos graxos, prostaglandinas e polifenóis, entre outros componentes (BRUNETON, 1991). A sua biossíntese é mais pronunciada durante o crescimento vegetal ou na fase de diferenciação celular (SIQUEIRA et al., 1991).

A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em *meta*. É importante ressaltar que uma característica da biogênese de derivados fenólicos é a capacidade que os vegetais têm de produzir um mesmo composto a partir de diferentes intermediários, isto é, os vegetais apresentam rotas biogenéticas alternativas (SIMÕES, 2007) (Ver Esquema 1, pág. 40).

Outra característica importante é a possibilidade de ocorrerem acoplamentos oxidativos que originam ligações C-C ou C-O intramoleculares com formação de anéis, e intermoleculares com formação de polímeros (OLDONI, 2007).

Esquema 1- Via do chiquímato para biogêneses dos compostos fenólicos.



Fonte: Dewick (2009) (Adaptação).

Destacam-se como mais importantes os derivados de ácido benzóico, ácido cafeico e outros fenilpropanoides simples, cumarinas, ligninas, taninos e flavonoides. Os derivados do ácido benzóico, ácido cafeico, fenilpropanoides simples e cumarinas estão relacionados à atividade fitotóxica. Os taninos, hidrolisáveis ou condensados, podem ser alelopático e comumente inseticidas e repelentes, pois costumam formar complexos proteicos difíceis de serem digeridos por herbívoros (NOVAES 2011).

A classificação dos compostos fenólicos pode ser realizada de acordo com esqueleto principal, na Tabela 2 (pág. 41) abaixo o C₆ corresponde ao anel do benzênico e o C_x os substituintes com X átomos de carbono.

Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seus esqueletos.

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C ₆	fenóis simples, benzoquinonas
C ₆ -C ₁	ácidos fenólicos
C ₆ -C ₂	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₃	fenilpropanoides: ácido cinâmico e análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C ₆ -C ₄	naftoquinonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	estilbenos e antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoides e isoflavonoides
(C ₆ -C ₃) ₂	lignanas
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	biflavonoides
(C ₆) _n	melaninas vegetais
(C ₆ -C ₃) _n	lignanas
(C ₆ -C ₁) _n	taninos hidrolisáveis
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Fonte: Simões (2007)

3.5 Flavonoides

Os flavonoides são a maior classe de compostos fenólicos existentes. São compostos aromáticos de baixo peso molecular caracterizado por um núcleo flavânico e um esqueleto carbonado com esqueleto C₆-C₃-C₆. A estrutura básica dos flavonoides consiste em dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel pirano que contém oxigênio (anel C). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato-polimalato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. A numeração individual do esqueleto flavonoide está representada na Figura 5 (pág. 42) (MARTENS; MITHÖFER, 2005) (MERKEN; BEECHER, 2000).

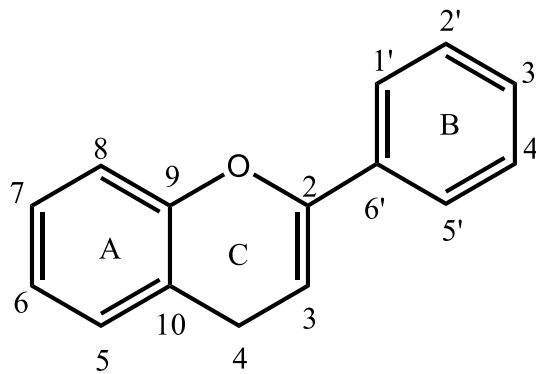


Figura 5 - Estrutura e numeração padrão dos flavonoides.

As variações nas configurações de substituição do anel C resultam nas diversas subclasses dos flavonoides: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis (ou catequinas) e antocianidinas. (ANTÃO, 2015).

Os flavonoides podem ocorrer na sua forma livres (agliconas), ligados a açúcares (glicosídeos/heterosídeos) (SANDHAR et al., 2011).

A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural de flavonoides se dá pelas modificações que tais compostos podem sofrer, como hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (LOPES et al, 2000). Os flavonoides são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxilas são frequentemente metilados, acetilados ou sulfatados. As prenilações geralmente ocorrem diretamente num átomo de carbono no anel aromático, mas O-prenilações já foram relatadas (OLDONI, 2007).

Nas plantas, estão muitas vezes presentes como O-glicosídeos ou C-glicosídeos. Os O-glicosídeos possuem o substituinte açúcar ligado a um grupo hidroxilo (-OH) da aglicona, geralmente na posição C3 ou C7, enquanto os C-glicosídeos possuem os grupos de açúcar diretamente ligados a um carbono da aglicona, geralmente C6 ou C8 (SANDHAR et al., 2011).

Os flavonoides são utilizados por botânicos para classificação taxonômica. Eles regulam o crescimento da planta pela inibição da exocitose da auxina (ácido indol acético), assim como pela indução da expressão gênica e influenciam outras células em numerosas vias (HAVSTEEN, 2002). As flavonas e flavonóis, geralmente, absorvem luz em comprimentos de UV, podendo funcionar como atrativos aos polinizadores e protetores de tecidos contra excesso de radiação (FERREIRA; OLIVEIRA; SANTOS, 2008). As flavonas e os flavonóis são descritos ainda como alelopáticos mediadores da interação planta-bactérias simbiotes e do desenvolvimento de vegetais competidores (EINHELLIG, 2004). As isoflavonas são descritas como inseticidas (ALMEIDA, 2010) e como repositores de estrogênio humano (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

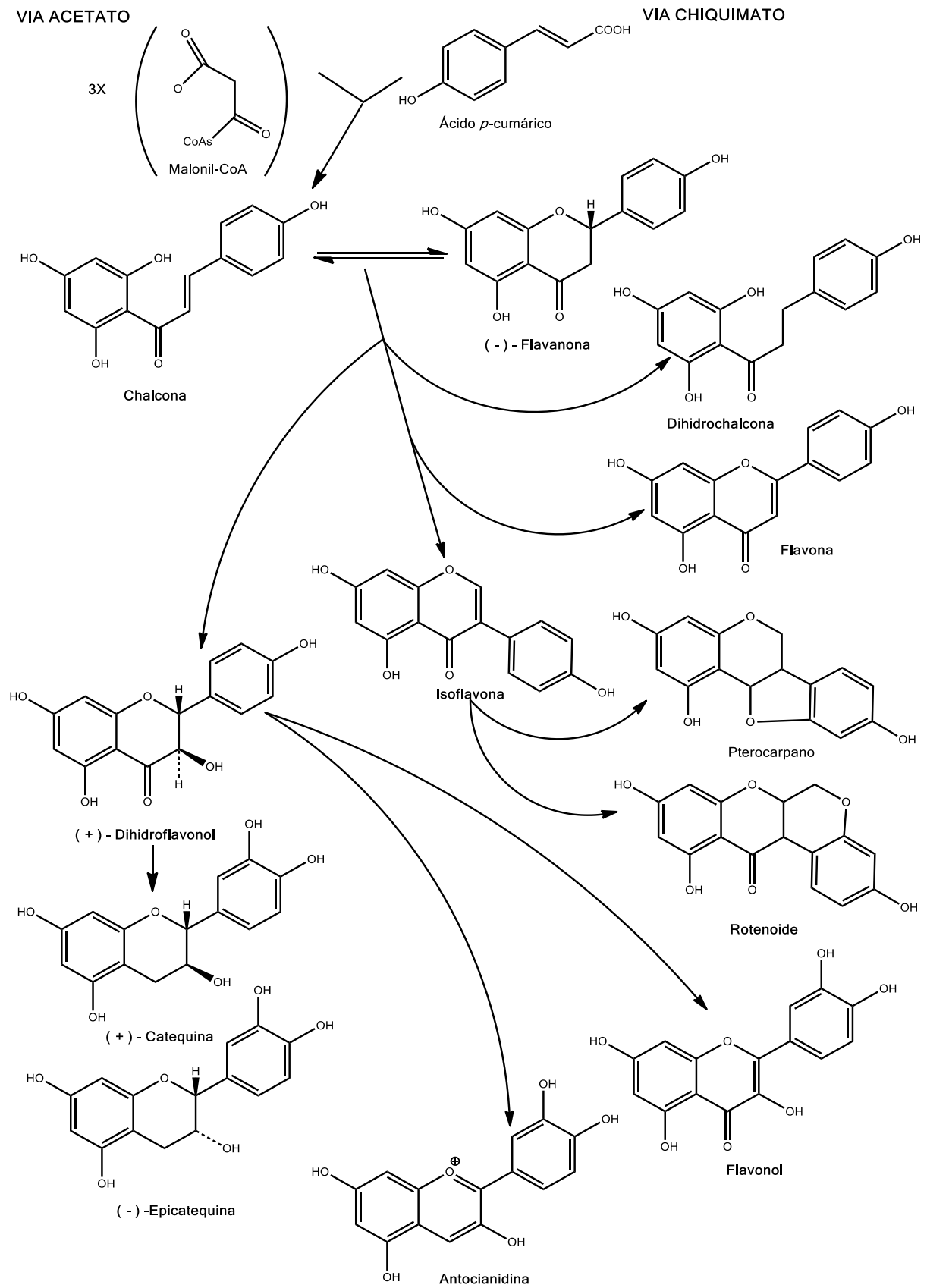
Flavonoides inibem o crescimento ou matam muitas cepas bacterianas, inibem importantes enzimas virais como transcriptase reversa e proteases, bem como destroem alguns protozoários patogênicos. Todas essas atividades são exercidas com baixa toxicidade em células animais (HAVSTEEN, 2002).

Relatos apontam que os flavonoides possuem atividade anti-inflamatória, citotóxica antitumoral, efeitos no tratamento de doenças neurodegenerativas e ação vasodilatadora. São ainda conhecidos por inibir em a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária e a atividade enzimática das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (ASIF; KHODADADI, 2013).

Além da atividade periférica, os flavonoides apresentam atividade sobre o SNC, uma vez que podem também agir como agonistas dos receptores adenosinérgicos e de receptores GABA_A sensíveis aos benzodiazepínicos (MEDINA et al., 1997; PALADINI et al., 1999; BLARDIR et al., 1999).

Os flavonoides atuam como antioxidantes primários reagindo com os radicais livres, e também como quelantes de metais. Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonoides encontradas universalmente na natureza. Os mais comuns flavonóis antioxidantes são canferol, quercetina e miricetina (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Esquema 2 - Inter-relação entre as diferentes classes de flavonoides.

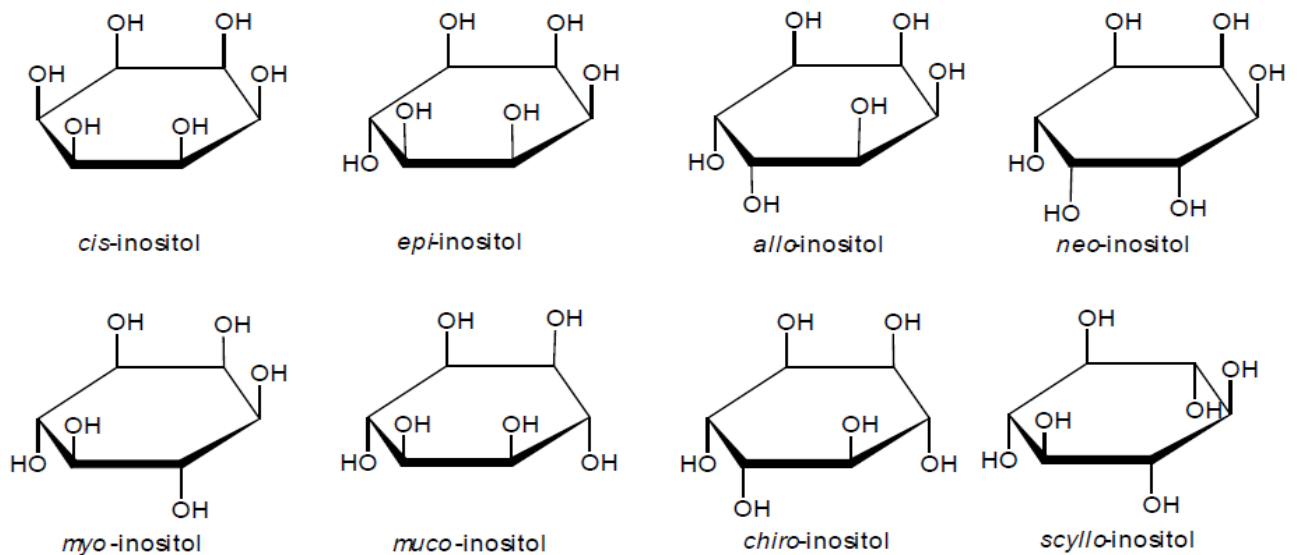


Fonte: Dewick (2009)/ Oldoni (2007) (Adaptação).

3.6 Ciclitóis

Os ciclitóis são derivados cicloexânicos que contêm pelo menos três hidroxilas no anel. Quando a estrutura básica for derivada do 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaidroxiciclohexano, são genericamente denominada de inositol (IUPAC, 2006). Assim como os monossacarídeos, os inositóis podem apresentar diversas configurações em seus carbonos, todos assimétricos, relacionados à orientação axial/equatorial das suas hidroxilas, resultando em diferentes tipos de inositóis (SILVA, T., 2013) (Ver Figura 6, pág. 45).

Figura 6 - Configurações dos esqueletos dos inositóis.

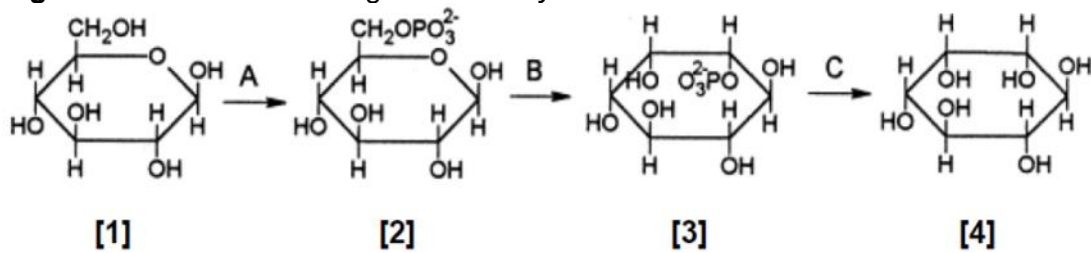


Fonte: SILVA, T. (2013).

A maioria dos ciclitóis é sintetizada a partir do *myo*-inositol, sendo um dos mais comuns o pinitol (1-D-3-O-methyl *chiro*-inositol). Altas concentrações de pinitol e de ononitol são encontradas em várias espécies de plantas osmotolerantes (VERNON et al., 1993).

Os ciclitóis ou inositóis tem como precursor a D-glicose (1). Esta é convertida em *myo*-inositol livre através de quatro reações enzimáticas (Figura 7, pág. 46). Inicialmente a glicose é convertida em D-glicose-6-P (2) pela hexoquinase (A), sendo posteriormente ciclizada para 1L-*myo*-inositol-1-P (3) pela sintase 1L-*myo*-inositol-1-P (B). No terceiro passo, a perda do fosfato através da monofosfatase de *myo*-inositol (C), deixando assim o *myo*-inositol livre (SILVA, T., 2013).

Figura 7 - Conversão da D-glicose em *myo*-inositol.



Fonte: Loewusa e Murthy (2000).

Atualmente, os ciclitóis têm sido estudados principalmente em sementes, por estarem relacionados à tolerância à dessecação e à longevidade das mesmas, promovendo, quando em solução, a formação de um estado vítreo que protege as estruturas macromoleculares durante a dessecação (SILVA, 2007).

Destaca-se que os inositóis, quando fosforilados, são importantes agentes de comunicação intercelular em todos os organismos vivos, os quais participam da transdução de sinais (segundos mensageiros), atuam como mediadores na liberação de cálcio e são constituintes das membranas fosfolipídicas (OLIVEIRA; EINICKER-LAMAS, 2000; ALMEIDA et al., 2003).

Diversas funções podem ser atribuídas ao *myo*-inositol e derivados. Além da reserva de fosfato os *myo*-inositol fosfatos estão envolvidos em muitos processos de rotas celulares como, transdução e regulação de sinal, regulação da síntese de ATP (adenosina trifosfato) (SAFRANY et al., 1999), transporte e estocagem de auxina, biossíntese de parede celular, endocitose e tráfico de vesículas (SAIARDI et al., 2002) e produção de moléculas relacionadas ao estresse (LOEWUS; MURTHY, 2000). Participam ainda, do remodelamento da cromatina, reparo e recombinação de DNA (YORK et al., 1999), expressão de genes e exportação de mRNA (SHEN et al., 2003).

O *myo*-inositol tem sido utilizado na terapia de varias patologias como síndrome do ovário policístico, atuando na recuperação da ovulação e regulação das alterações hormonais secundárias a essa patologia. Essas moléculas também atuam na terapêutica da menopausa, atuando na diminuição da pressão arterial e das lipoproteínas de alta densidade. Ainda atuam como protetor osmótico e na homeostase das sinapses neuronais. Seu papel principal no equilíbrio celular é devido sua ação regulatória nas mudanças de osmolaridade celular, promovendo

adaptação ao volume e conseqüentemente protegendo as funções celulares (CARVALHO, 2013).

3.7 Importância dos estudos da Atividade Antioxidante

Os seres vivos estão a todo tempo sujeitos a sofrerem a ação de radicais livres. A ação destes radicais livres geram reações de oxidação, e diversos estudos mostraram que essas reações estão ligadas a doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças cardiovasculares e doenças do envelhecimento (DEGÁSPARI et.al., 2004).

Nos sistemas biológicos, os ácidos graxos polinsaturados das membranas são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres, também são afetadas as proteínas, e os ácidos nucleicos que podem gerar alterações nas moléculas de DNA que resultam em aberrações cromossômicas, entre outros problemas genéticos (SOARES, 2002).

Nesse contexto, os antioxidantes são substâncias que impedem a formação de radicais livres ou impedem a etapa de propagação dessas reações doando hidrogênio de forma que a molécula alvo fique estável e assim agem no retardo ou na prevenção da oxidação (SOARES, 2002; BROINIZI et. al., 2007).

Os vegetais são uma grande fonte de metabólitos que apresentam significativa atividade antioxidante. Dentre esses metabólitos estão os compostos fenólicos que podem ser classificados entre flavonoides e não flavonoides. Os compostos fenólicos apresentam grupos benzênicos que possuem pelo menos um de seus hidrogênios substituídos por um grupamento hidroxila (SOARES et al., 2008).

Os chás estão presentes em abundância na dieta da população mundial, estes chás feitos a partir do método de infusão, que é o despejo de água fervente sobre a erva, auxiliam na extração dos compostos fenólicos (ACHKAR, et al., 2013). Diversos estudos evidenciam o efeito protetor contra as espécies reativas de oxigênio e aos danos causados pelas mesmas, devido ao consumo destes chás, e estes efeitos tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes, que são produtos secundários do metabolismo vegetal (GONÇALVES, et al., 2015)..

Neste sentido, há crescente interesse em identificar alimentos que contenham compostos antioxidantes, e que possam ser comumente consumidos pelos indivíduos, como parte habitual de suas dietas (GONÇALVES, et al., 2015).

3.8 Estresse oxidativo e Espécies reativas de oxigênio (EROS)

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais existe uma produção constante de EROS acompanhada pela sua contínua inativação, através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. A extensão e os tipos de dano causados pelas EROS dependem tanto da quantidade como da qualidade ou natureza dos mesmos a que as células estão expostas, bem como das suas defesas antioxidantes (DAVIES, 1991). O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e das defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (CROFT, 1998).

Os radicais livres apresentam diferentes mecanismos de ação, podem reagir com moléculas circundantes pela doação de elétrons, redução de radicais, recepção de elétrons e oxidação de radicais, através das seguintes reações: a) abstração de hidrogênio; b) reação de adição; c) reação de auto aniquilação e; d) através da dismutação (SLATER, 1984).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) incluem os radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxil (OH^{\cdot}), o óxido nítrico e outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot}$). São formadas durante o metabolismo celular e das atividades funcionais, tem importante papel na sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte iônico. No entanto, quantidades excessivas de EROS podem ter efeitos deletérios em muitas moléculas, incluindo proteínas, lipídios, RNA e DNA, considerando que são excessivamente pequenas e altamente reativas. As ROS podem atacar bases em ácidos nucleicos, cadeias de aminoácidos de proteínas e as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, nos quais o radical OH é um potente oxidante (CAMMERER, 2012).

Espécies reativas de nitrogênio são derivadas do óxido nítrico através da reação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot}$). As espécies reativas de enxofre (RSS) são facilmente formadas a partir de tiols em reação com EROS (RAHMAN, 2007).

Diversos autores citam o envolvimento das EROS em um grande número de doenças, como causa secundária a doenças crônico-degenerativas, ao

aparecimento de alguns tipos de câncer e ao processo de envelhecimento humano. Neste sentido, à medida que as pessoas envelhecem, ocorre uma diminuição na eficácia do sistema das enzimas antioxidantes, enquanto que a formação de EROS se mantém ou é aumentada (GONÇALVES, 2008).

3.9 Antioxidantes

Com o objetivo de prevenir ou reduzir o dano oxidativo causado pelas ROS, o organismo humano e outros seres vivos, desenvolveram um sistema de defesa antioxidante que inclui a atividade enzimática, a quelação de minerais e a ação sequestradora “*scavenger*” dos radicais livres, para neutralizar esses radicais depois de serem formados. Além disso, a ingestão de antioxidantes dietéticos pode auxiliar na manutenção de um adequado status antioxidante no organismo (CAROCHO; FERREIRA, 2012).

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização o das EROS. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil (BOVERIS; CADENAS, 1997).

Considerando os antioxidantes não enzimáticos, podemos citar as vitaminas, cofatores enzimáticos, compostos de nitrogênio e peptídeo (PALLACE et al. 1999; JEE et al., 2006). Além dos inúmeros metabólitos secundários de origem vegetal com ação antioxidante, como os compostos fenólicos, que podem ser classificados em várias classes: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados hidrolisáveis e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004; SOUSA et al., 2007; NUNES, et al., 2008).

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de

oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ANGELO;e JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

A manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de espécies reativas de oxigênio é de extrema importância para sobrevivência dos organismos. Assim os antioxidantes artificiais como os naturais têm um papel importante por atuarem na inibição dos radicais livres formados. A busca por antioxidantes naturais nos produtos vegetais tem sido intensificada nos últimos anos, por constituírem fontes naturais destas substâncias, além dos compostos fenólicos produzem como a vitamina C, E e β -caroteno. Vários óleos essenciais e componentes não voláteis presentes em diferentes espécies vegetais foram identificados como importantes agentes antioxidantes (LOLIGER, 1991; WENG & WANG, 2000).

*Material e
métodos*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo fitoquímico de *Zornia brasiliensis*

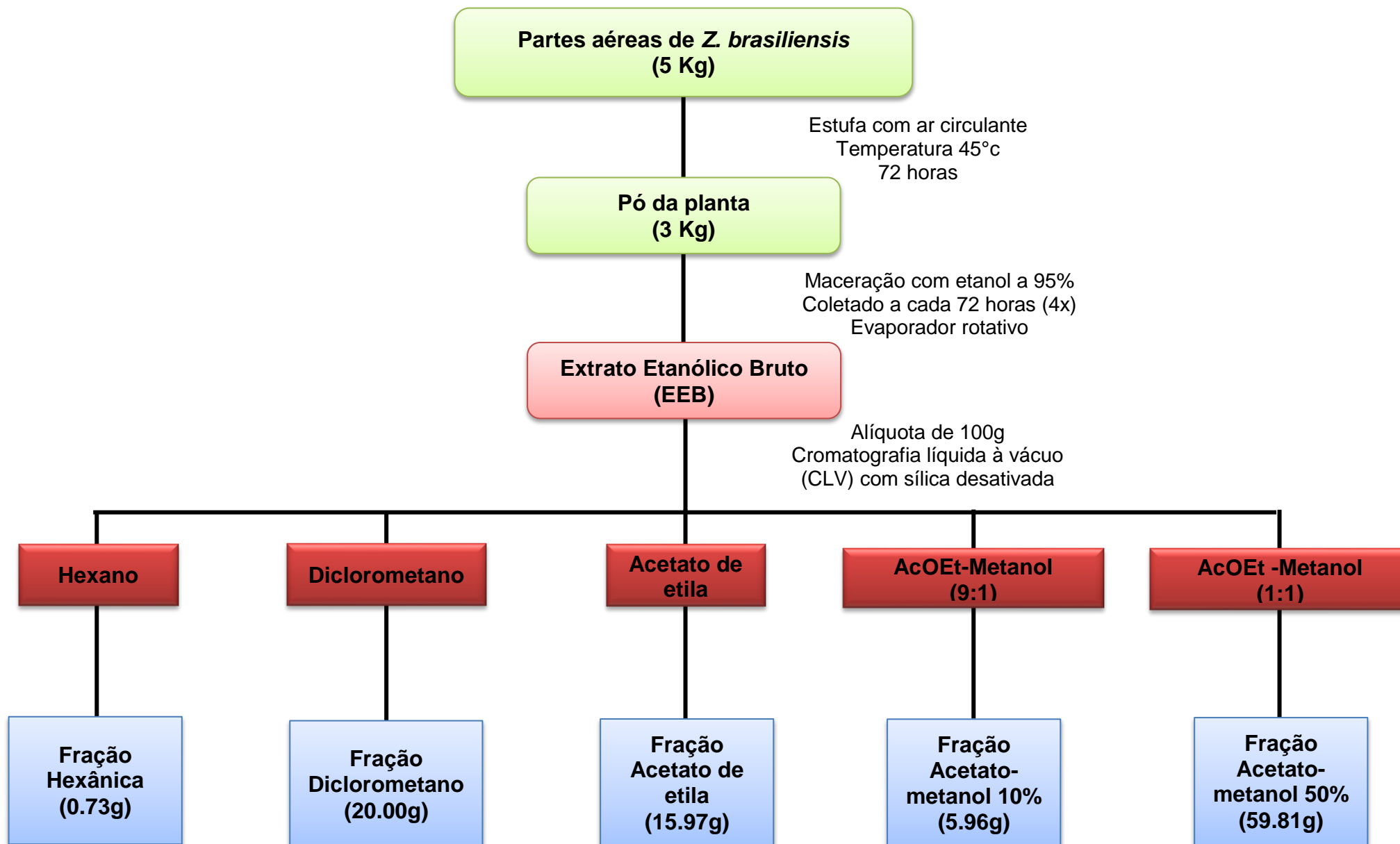
4.1.1 Coleta do material botânico

Partes aéreas de *Zornia brasiliensis* foram coletadas em setembro de 2009, a coleta foi realizada no município de Serra Branca, estado da Paraíba. A identificação botânica foi realizada pela Prof^a. Dra. Maria de Fátima Agra do Setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata foi depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier da UFPB, sob o número AGRA-6833.

4.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB)

As partes aéreas de *Z. brasiliensis* (5 Kg) foram secas em uma estufa de ar circulante, à uma temperatura de 45°C por 72 horas. O material seco (3 Kg) foi então triturado com o auxílio de um moinho mecânico. O pó seco foi submetido à extração com etanol (EtOH) 95%, via maceração. O tempo de extração foi 72 horas, sendo esse processo repetido por quatro vezes. A solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C, desta forma obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 3, pág. 53) (SILVA, 2013).

Uma parte do EEB (100,0g) foi então submetido a uma cromatografia líquida à vácuo (CLV) com 300 g de sílica desativada(10% de água destilada, v/v, e uma hora em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 45° C) como fase móvel foi usado hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. As soluções extrativas foram concentradas de forma semelhante ao descrito anteriormente resultado na obtenção de 0,73 g da fração hexânica; 20,0 g da fração diclorometano; 15,97g da fração acetato de etila (AcOEt); 5,96 g da fração acetato de etila-metanol 10% (AcOEt-MeOH10%); e 59,81g da fração acetato de etila-metanol 50% (AcOEt-MeOH 50%) como exposto no Esquema 3 (pág. 53) (SILVA, 2013).

Esquema 3 - Obtenção e fracionamento do EEB de *Z. brasiliensis*.

4.1.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Zornia brasiliensis*

O isolamento e a purificação dos constituintes químicos de *Z. brasiliensis* foram realizados através de técnicas cromatográficas clássicas, como a cromatografia em coluna (CC) de adsorção e por exclusão molecular. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel (ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,060 – 0,200 mm e 70 - 230 mesh), e Sephadex® LH-20 (AMERSHAM BIOSCIENCES), colunas cilíndricas de vidro com comprimentos e diâmetros variáveis de acordo com a quantidade de amostra submetida à cromatografia.

A realização da análise do processo de isolamento e purificação das frações obtidas foi realizada em cromatografia de camada delgada analíticas (CCDA), utilizando cromatofolha de alumínio – sílica gel 60 F254 da MERCK.

As substâncias em análise foram reveladas através da exposição das cromatoplasas à radiação ultravioleta (UV) sob os comprimentos de onda de 254 e 366 nm, em aparelho BOITTON (modelo BOIT-LUB01), como também, por impregnação das placas com o reagente específico para flavonoides: NP (2-aminoetoxi-difenilborano 98%, numa concentração 10mg/mL).

Após análise da CCDA, as frações foram reunidas de acordo com os semelhantes fatores de retenção (Rfs).

Como fases móveis foram utilizadas solventes orgânicos comerciais (Hexano, Acetato de etila e Metanol) para eluição de placas e colunas, puros ou em misturas binárias obedecendo a uma ordem crescente de polaridade.

4.1.3.1 Processamento cromatográfico da fração acetato de etila-metanol 10%

Uma alíquota da fração acetato de etila-metanol 10% (3 g) foi submetida à CC utilizando-se como fase estacionária Sephadex® LH-20 e como fase móvel metanol (MeOH) puro.

Foram coletadas 29 frações que foram analisadas em CCDA utilizando diversos sistemas de eluição. Após revelação no UV, às frações 9 a 16 foram reunidas uma vez que apresentaram Rfs semelhantes.

A Fr 9-16 foi submetida a uma nova CC utilizando Sephadex® LH-20 como fase estacionária e o MeOH como fase móvel. Desta forma foram obtidas 9 frações, que foram monitoradas por CCDA utilizando diversos sistemas de eluição, esta placa foi revelada na luz UV e após análises dos Rfs, as frações 9-16.2 a 9-16.7 foram reunidas.

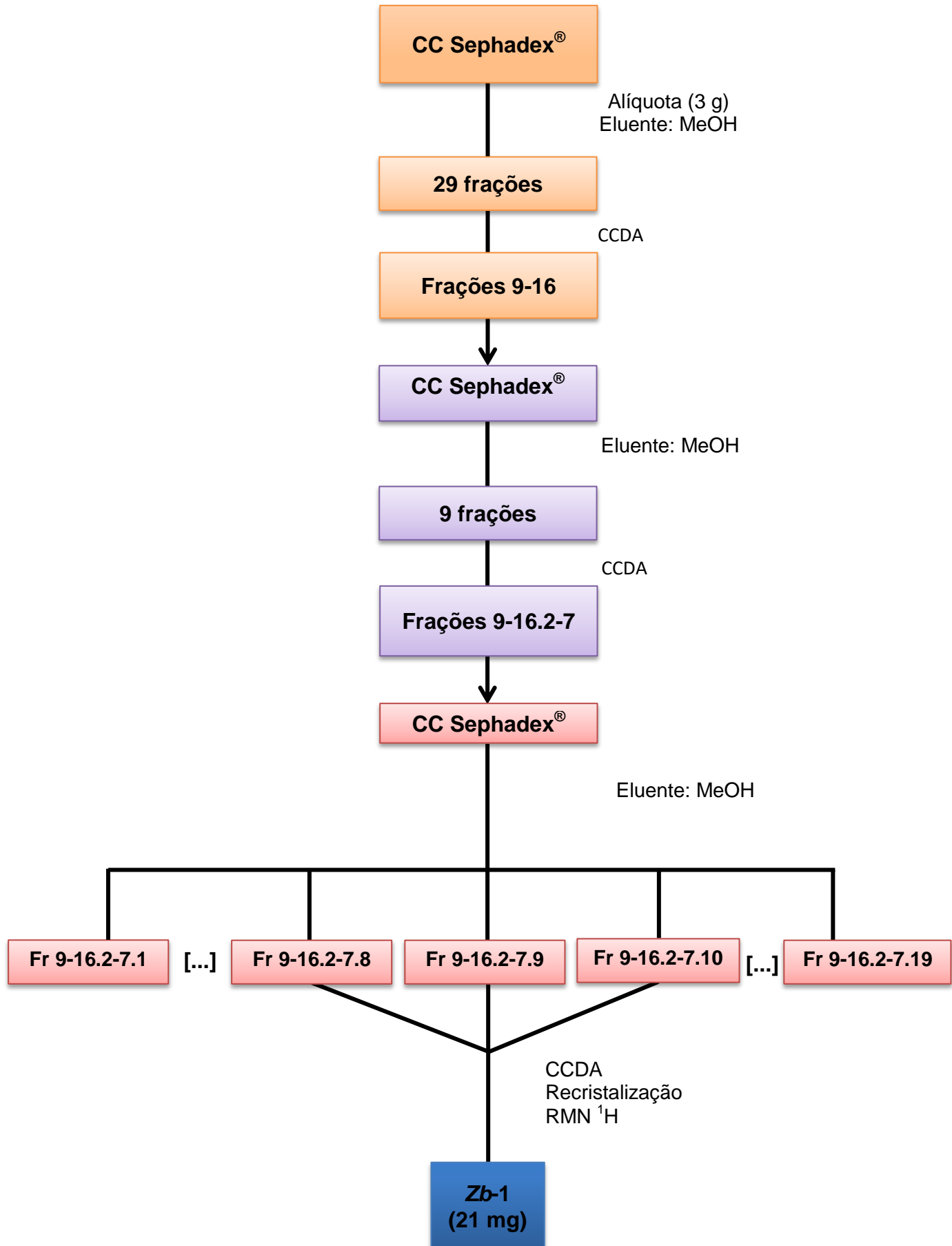
Uma terceira CC em Sephadex® LH-20 e utilizando o MeOH como eluente, foi realizada com a Fr 9-16.2-7, desta coluna foram obtidas 19 frações. As frações 9-16.2-7.8, 9-16.2-7.9 e 9-16.2-7.10 apresentaram um precipitado branco, que foram recristalizados em acetona separadamente. Os precipitados das três frações foram analisadas por CCDA e quando expostas a irradiação ultravioleta apresentaram-se como manchas únicas. A análise dos fatores de retenção mostrou valores semelhantes nas três frações analisadas o que as levou a serem reunidas (Fr 9-16.2-7.8-10) e codificadas como **Zb-1** (21 mg) e foi encaminhadas para o RMN ¹H. (Ver Esquema 4, pág. 56)

4.1.3.2 Processamento cromatográfico da fração acetato de etila-metanol 50%

Uma alíquota da fração acetato de etila-metanol 50% (10 g) foi submetida à CC utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (300 g) e como fase móvel hexano (Hex) acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

Foram obtidas 21 frações de 250 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo à temperatura média de 40 °C. Em seguida, foram analisadas através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição e reveladas na luz UV (Quadro 2, pág. 57; Esquema 5, pág. 60)

A Fr 13 foi submetida a uma CC em Sephadex® LH-20 com MeOH como eluente. Foram obtidas 18 frações que foram monitoradas por CCDA utilizando diversos sistemas de eluição, esta placa foi revelada na luz UV e após análises dos Rfs, as frações 13.14 e 13.15 foram reunidas.

Esquema 4 - Fracionamento da fase acetato-metanol 10% de *Z. brasiliensis*.

Quadro 2 - Sistemas de eluições utilizados no fracionamento da fração acetato de etila-metanol 50%.

Frações	Solventes	Proporção (%)
1	Hex-AcOEt	40:60
2	Hex-AcOEt	30:70
3	Hex-AcOEt	20:80
4-5	Hex-AcOEt	10:90
6	AcOEt	100
7	AcOEt-MeOH	99:1
8	AcOEt-MeOH	95:5
9-10	AcOEt-MeOH	90:10
11	AcOEt-MeOH	80:20
12	AcOEt-MeOH	60:40
13	AcOEt-MeOH	50:50
14-15	AcOEt-MeOH	30:70
16	AcOEt-MeOH	20:80
17	AcOEt-MeOH	10:90:
18-21	MeOH	100

Esta fração 13.14-15 foi submetida a uma nova CC tendo como fase estacionária Sephadex® LH-20 e como fase móvel MeOH. Foram obtidas 8 frações desta coluna que foram devidamente monitoradas por CCDA em diversos sistemas de eluição. Após revelação em luz UV, às frações 13.14-15.5 e 13.14-15.6 foram encaminhadas para realização de RMN ^1H , então foram reunidas e codificadas como A-1.

A fração 14 foi submetida a uma CC em Sephadex® LH-20 tendo como eluente o MeOH. Foram obtidas 20 frações. A Fr.14.12 apresentou-se como cristais transparentes na forma de agulhas, esta fração foi codificada como **Zb-2** e foi encaminhada para RMN ^1H e ^{13}C . As demais frações foram monitoradas com CCDA em diferentes sistemas de eluição e reveladas em luz UV. Pode-se constatar que a Fr 14.20 apresentava-se como uma mancha única após ser revelada, então foi encaminhada para análises em RMN ^1H , observou-se que esta fração possuía o espectro de hidrogênio semelhante à fração A-1, estas foram então reunidas e codificadas como **Zb-3** e encaminhadas para RMN ^1H e ^{13}C .

Foi ainda observado após a revelação em luz UV que o intervalo entre as Fr 14.16 e 14.19 possuíam Rfs semelhantes, desta forma foram reunidas. Esta Fr 14.16-19 foi submetida a uma CC com Sephadex® LH-20 e tendo como eluente o

MeOH. Foram obtidas 5 frações, que foram monitoradas por CCDA. A Fr 14.16-19.4 e Fr 14.16-19.5 foram reunidas e codificadas como sendo **Zb-4**, esta foi encaminhada para realização de análises em RMN ^1H . O espectro de hidrogênio revelou a existência de uma mistura de substâncias. Então **Zb-4** foi submetida a uma análise em Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE) acoplada a um detector de arranjo de diodo (DAD), a fim de se obter o perfil cromatográfico desta fração.

4.1.4 Caracterização do perfil cromatográfico da fração **Zb-4**

Para a caracterização do perfil cromatográfico da **Zb-4** foram utilizados os padrões químicos isoorientin e isovitexin, obtidos da Sigma Aldrich, com teor de pureza > 98%. Os solventes utilizados foram metanol grau HPLC obtido no comércio local (Tédia[®], Brasil) e água ultra-pura obtida por sistema de purificação Milli-Q Millipore[®].

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta performance (CLAE) da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A₅, detector SPD-M20A diode array. A coluna utilizada foi Phenomenex Gemini[®] C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 μm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini[®] C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 μm) adquirido da Maxcrom Instrumentos Científicos Ltda (São Paulo, SP, BR). A fase móvel consistiu de uma mistura de metanol e água acidificada com 1,0% de ácido acético, na proporção inicial de (5:95) MeOH/H₂O. A fase móvel foi eluída com em modo gradiente de 5 a 52% em 16 min, permanecendo isocrático até 20 min, finalizando com gradiente a 95% de metanol no tempo de 25 min. O volume de injeção foi de 20 μL , com fluxo de fase móvel constante de 1,0 mL min⁻¹ e a detecção foi realizado utilizando detector de arranjo fotodiodo (DAD). O software LC Solution[®] (Shimadzu, Japão) foi utilizado para o controle do equipamento, aquisição e análise dos dados.

A amostra da **Zb-4** e os padrões químicos foram diluídos em metanol até a concentração final de 1 mg/mL e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

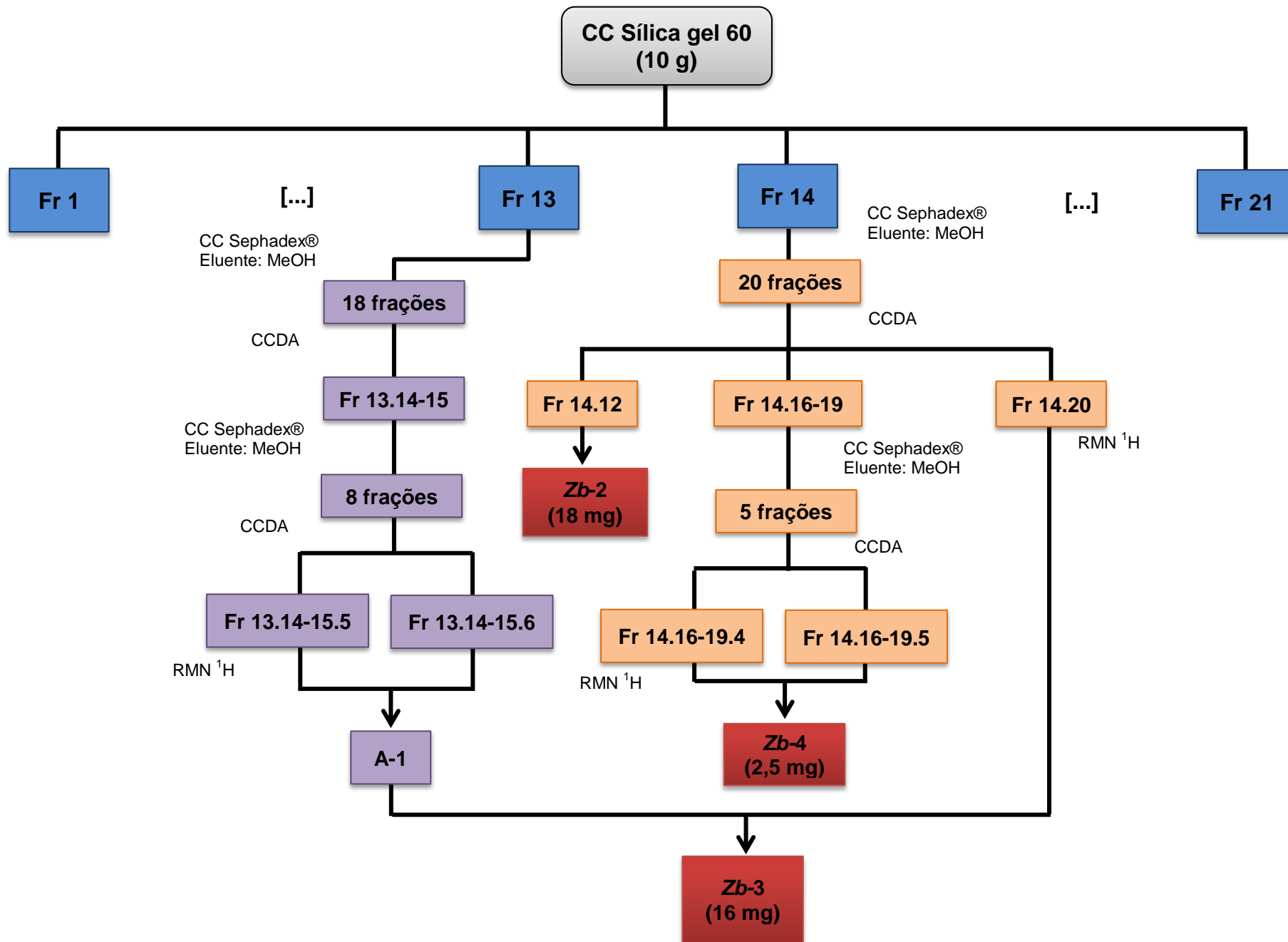
4.1.5 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

Os constituintes químicos foram estruturalmente determinados através do método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD).

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz, operando a 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C . E VARIAN-MERCURY-NMR-SYSTEM 200 MHz, operando a 200 MHz para RMN ^1H e 50 MHz para RMN ^{13}C . Ambos no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB. As amostras foram preparadas utilizando solventes deuterados como: dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$) e piridina ($\text{py-}d_5$) ambos da Cambridge Isotope Laboratories.

Os picos característicos de ^1H e ^{13}C dos solventes utilizados nas análises serviram como padrão interno durante a obtenção dos espectros. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz, e as multiplicidades de RMN de ^1H indicadas segundo a convenção: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *dl* (dubleto largo), *dd* (duplo dubleto), *t* (tripleto), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

Esquema 5 - Fracionamento da fase acetato-metanol 50% de *Z. brasiliensis*.



4.2 Estudo da atividade antioxidante e determinação do teor de fenólicos totais de *Zornia brasiliensis*

Os ensaios de determinação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante foram realizados nas frações diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol 10%, acetato de etila metanol 50% e no EEB de *Zornia brasiliensis*.

4.2.1 Determinação do teor de fenólicos totais

Para realização deste ensaio de quantificação de fenólicos totais nas amostras de *Zornia brasiliensis*, foi utilizado o método fotocolorimétrico Folin-Ciocalteu, com adaptações (CABRAL et al. 2009).

Foi então construída uma curva de calibração utilizando o padrão ácido gálico (SIGMA-ALDRICH) em soluções hidrometanólicas (1:1 v/v) com concentrações entre 7,5 e 150 µg/mL.

Um eppendorf de 2 mL foi utilizado para que fossem misturados 120 µL de cada solução padrão com 500 µL de solução a 10% de Folin-Ciocalteu (SIGMA-ALDRICH). Após 8 minutos, foram adicionados 400 µL de solução de Na₂CO₃ (SIGMA-ALDRICH) a 7,5%. Para o branco foi utilizado 100 µL da solução padrão com 100 µL da solução hidrometanólicas (1:1 v/v). Após 2h foi medida a absorbância a 765 nm em espectrofotômetro (Biotek Multidetecção Synergy HTX). Obtendo-se uma curva de calibração com coeficiente de regressão linear > 0,99.

As amostras analisadas foram preparadas, do EEB e das frações diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol 10%, acetato de etila metanol 50%, soluções diluídas em MeOH:H₂O (1:1 v/v), com concentrações variando entre 75 e 150 µg/mL, e em seguida submetidas ao mesmo procedimento descrito para as soluções padrão de ácido gálico. Estes procedimentos foram realizados em triplicata.

O teor de fenólicos totais no EEB e das frações diclorometano, acetato de etila, acetato de etila-metanol 10%, acetato de etila metanol 50% foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra (mg EAG/ g amostra).

4.2.2 Teste do sequestro do radical livre DPPH

Para realização deste ensaio de determinação do sequestro do radical livre DPPH foi empregado o teste de redução do radical DPPH pelo método de microdiluição, adaptado de Garcez et al., 2009.

Foi preparada a solução de 0,03 mM de DPPH (SIGMA ALDRICH) (11,82 mg de DPPH em 100 mL de MeOH). A solução do padrão ácido ascórbico (SIGMA ALDRICH) foi preparada em 5 concentrações diferentes entre 3 e 18 µg/mL e das amostras-teste (variando de 200 a 800 µg/mL, de acordo com a amostra testada) todas em MeOH.

Uma alíquota de 100 µL de cada concentração, tanto da substância padrão (controle positivo) quanto da amostra-teste, foi distribuída em placa de 96 poços, adicionando-se em seguida 100 µL da solução de DPPH. Desta forma, em cada poço a concentração das amostras foi diluída 1:1, bem como a concentração do DPPH. O controle negativo foi realizado com adição de 100 µL de MeOH em 100 µL de DPPH. E o branco com adição de 100 µL de MeOH em 100 µL das amostras analisadas. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Após 30 min de incubação da reação à temperatura ambiente, protegida de luz, foi realizada a leitura da absorbância a 518 nm, em espectrofotômetro (Biotek Multidetecção Synergy HTX). Desta forma avaliando o decréscimo da concentração do radical DPPH.

A capacidade de sequestro do radical DPPH, ou seja, a % da atividade antioxidante foi calculada através da equação:

$$\%AA = \{ [ABS_{\text{controle negativo}} - (ABS_{\text{amostra}} - ABS_{\text{branco}})] \times 100 \} / ABS_{\text{controle negativo}}$$

Onde:

$Abs_{\text{controle negativo}}$ = absorbância do controle negativo (DPPH incubado apenas com metanol);

Abs_{amostra} = absorbância da substância-teste (amostra incubada com DPPH).

Os resultados obtidos foram expressos através da concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres (CE_{50}) que foi determinada de acordo com o método de regressão linear.

4.2.3 Análise estatística

Para análises dos dados foi utilizado o método da Análise de Variância (ANOVA) para avaliar os resultados obtidos, sendo considerados estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre as médias. Estas análises foram realizadas usando o programa Minitab Statistical Software 17.

*Resultados e
discussão*

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação estrutural de **Zb-1**.

A substância codificada como **Zb-1** foi isolada na forma de um cristal branco com massa de 21 mg (0,0007% da massa do material vegetal seco).

No espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) (Figura 8, pág. 69) foram observados 20 sinais referentes a 22 carbonos. Dos 20 sinais observados sete foram referentes a carbonos não hidrogenados, um referente a carbono metilênico (CH_2), onze para carbonos metínicos (CH) e um para carbono metoxílico (OCH_3). A presença de 13 sinais atribuídos a 15 carbonos sp^2 dentre eles os deslocamentos químicos em δ_{C} 153,7(CH), δ_{C} 123,4(C) e δ_{C} 174,8(C) sugeriram um esqueleto carbônico de uma isoflavona para **Zb-1** e esses sinais foram atribuídos a C-2, C-3 e C-4, respectivamente (YU et al., 2005). Observou-se ainda sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_{C} 127,0 (C-5), 115,7 (C-6) e 103,5 (C-8) além do sinal para carbono não hidrogenado em 161,5 (C-7) que permitiram sugerir a presença de um anel A com oxigenação na posição 7. Foram observados ainda, sinais intensos em δ_{C} 113,7 (C-2'/C-5') e em δ_{C} 130,1 (C-2'/C-6') além do sinal em δ_{C} 159,1 (C-4'), desta forma revelando outra oxigenação na molécula, no C-4' corroborando para um sistema AA'BB' no anel B (YU et al., 2005). Foram observados sinais compatíveis com a proposta da presença da unidade osídica na substância, como um sinal em δ_{C} 100,0 atribuído ao carbono anomérico C-1". Além das absorções na região entre δ_{C} 69,6 e 77,2 condizentes com carbonos carbinólicos. Um sinal em δ_{C} 60,7 atribuído ao carbono metilênico oxigenado confirmou a presença da unidade osídica, a glicose (YU et al., 2005).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (Figura 9, pág. 69) e suas expansões de **Zb-1** (Figura 10-11, pág. 70) apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C (Figura 8, pág. 69). Apresentou um singleto em δ_{H} 8,41 com integral para um hidrogênio atribuído a posição H-2, assim propondo a existência de um esqueleto flavonoidico do tipo isoflavona. O padrão de substituição para este esqueleto de isoflavona é confirmado com os deslocamentos: um duplo dubleto em δ_{H} 7,15 ($J = 2,0$ e $9,0$ Hz) acoplado *orto* com δ_{H} 8,05 ($J = 9,0$ Hz) e *meta* δ_{H} 7,23 ($J = 2$ Hz) que são condizentes com os

hidrogênios H-6, H-5 e H-8, respectivamente, revelando um padrão de hidrogenação do tipo ABX ou que o anel A é tri-substituído e as absorções na forma de um dubleto em δ_H 6,99 ($J = 8,5$ Hz) acoplado *orto* com o dubleto em δ_H 7,52 ($J = 8,5$ Hz) ambos com integrais para dois hidrogênios, atribuídos respectivamente aos H-3'/5' e H-2'/6', corroborando com a existência de um sistema AA'BB' ou uma para-substituição no anel B. Neste mesmo espectro foi possível observar um conjunto de absorções na região de hidrogênios alifáticos entre δ_H 3,18 e 3,71. Que associados à presença de um dubleto em δ_H 5,09 ($J = 7,0$ Hz) característico com um hidrogênio anomérico, permitiu confirmar que a unidade osídica se ligada ao esqueleto da isoflavona é a β -glicose. A presença de um singlete em δ_H 3,77 com integral para três hidrogênios forneceu a informação da presença de uma metoxila na molécula (FEDOREYEV et al., 2008).

No espectro bidimensional $^1H \times ^{13}C$ – HSQC (DMSO- d_6 , 500/125 MHz) (Figura 12, pág. 71) foram observadas mapas de contornos dos sinais δ_H 8,41/ δ_C 153,7; δ_H 8,05/ δ_C 127,0; δ_H 7,15/ δ_C 115,7; δ_H 7,23/ δ_C 103,7; δ_H 7,52/ δ_C 130,1 e δ_H 6,99/ δ_C 130,1 (Figura 13, pág. 71) confirmando os carbonos sp^2 hidrogenados δ_C 153,7 (C-2); 127,0 (C-5); 115,7 (C-6); 103,5 (C-8); 113,7 (C-2'/6'); 130,1 (C-3'/5'). Outro mapa de contorno importante foi δ_H 5,09 (H-1") com o carbono δ_C 100,0 (C-1") corroborando com a presença do carbono anomérico da unidade osídica. Ainda foi possível detectar também um mapa de contorno entre o sinal em δ_H 3,77 e o carbono em 55,2 ppm atribuído a metoxila (Figura 14, pág. 72).

No espectro de HMBC (Figura 15, pág. 72) foi possível observar mapas de contornos entre o hidrogênio anomérico foi δ_H 5,09 (H-1") com o sinal de carbono em δ_C 161,5 (C-7) confirmando a inserção da unidade osídica em C-7 e um outro mapa de contorno entre o sinal em δ_H 3,77 (OCH₃) e o sinal de carbono em δ_C 159,1 confirmando a inserção da metoxila na posição C-4' (Figura 17, pág. 73). Foi observada os mapas de contornos entre o hidrogênio δ_H 8,41 (H-2) com os sinais de carbono em δ_C 174,8, δ_C 157,1 e δ_C 123,4 sendo possível atribuir estes sinais para as posições C-4, C-9 e C-3 (Figura 16, pág. 73). Os demais dados de RMN estão compilados na Tabela 4 (pág. 68). Após análises desses foi possível identificar **Zb-1** como sendo a ononina isolada pela primeira vez em *Zornia brasiliensis*.

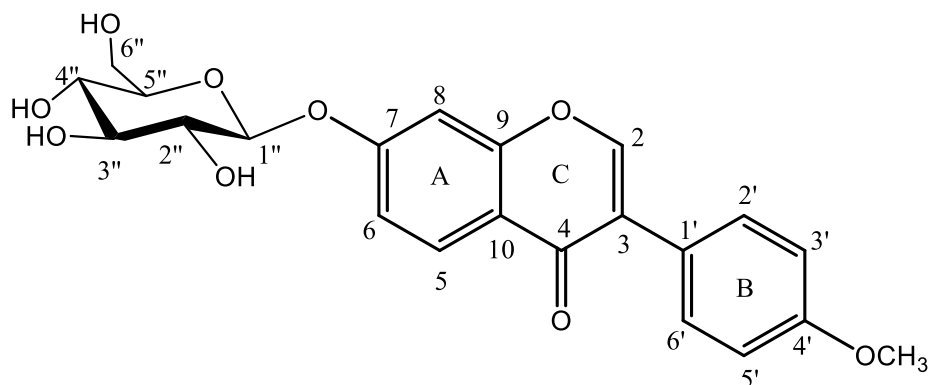


Tabela 3 - Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **Zb-1** em $\text{DMSO-}d_6$ (125 e 500 MHz, respectivamente) e da ononina em $\text{DMSO-}d_6$ (125 e 500 MHz, respectivamente) (Fedoreyev et al., 2008).

N ^o	Zb-1		Fedoreyev et al., 2008	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	153,7	8,41 (s)	153,7	8,43 (s)
3	123,4	-	123,4	-
4	174,8	-	174,7	-
5	127,0	8,05 (d, $J = 8,5$ Hz)	126,9	8,06 (d, $J = 8,8$ Hz)
6	115,7	7,15 (dd, $J = 2,0$ e $9,0$ Hz)	115,7	7,15 (dd, $J = 2,2$ e $8,8$ Hz)
7	161,5	-	161,5	-
8	103,5	7,23 (d, $J = 2,0$ Hz)	103,5	7,24 (d, $J = 2,2$ Hz)
9	157,1	-	157,1	-
10	118,5	-	118,5	-
1'	124,0	-	124,1	-
2'	130,1	7,52 (d, $J = 8,5$ Hz)	131,1	7,53 (d, $J = 9,0$ Hz)
3'	113,7	6,99 (d, $J = 8,5$ Hz)	113,7	7,00 (d, $J = 9,0$ Hz)
4'	159,1	-	159,1	-
5'	113,7	6,99 (d, $J = 8,5$ Hz)	113,7	7,00 (d, $J = 9,0$ Hz)
6'	130,1	7,52 (d, $J = 8,5$ Hz)	131,1	7,53 (d, $J = 9,0$ Hz)
1''	100,0	5,09 (d, $J = 7,0$ Hz)	100,1	5,11 (d, $J = 7,2$ Hz)
2''	73,2	3,31 (m)	73,8	3,31 (m)
3''	76,4	3,33 (m)	76,2	3,32 (m)
4''	69,6	3,18 (m)	69,7	3,19 (m)
5''	77,2	3,46 (m)	77,3	3,46 (m)
6''	60,7	3,71 (m)	60,7	3,72 (m)
		3,47 (m)		3,47 (m)
OCH_3	55,2	3,77 (s)	55,2	3,79 (s)

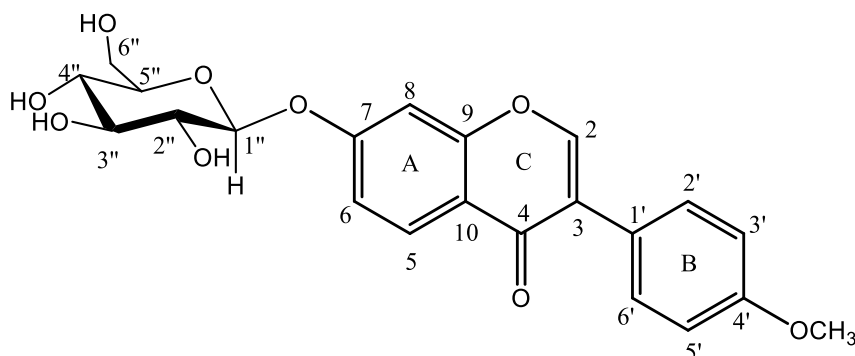


Tabela 4 - Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para **Zb-1**, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) e bidimensionais em DMSO- d_6 .

Nº	HSQC		HMBC	
	^1H	^{13}C	$^2 J_{\text{CH}}$	$^3 J_{\text{CH}}$
2	8,41 (s)	153,7	C-3	C-4/C-9
3	-	123,4	-	-
4	-	174,8	-	-
5	8,05 (d, $J = 8,5$ Hz)	127,0	-	C-4/C-7/C-9
6	7,15 (dd, $J = 2,0$ e $9,0$ Hz)	115,7	C-7	C-8/C-10
7	-	161,5	-	-
8	7,23 (d, $J = 2,0$ Hz)	103,5	C-7/C-9	C-6/C10
9	-	157,1	-	-
10	-	118,5	-	-
1'	-	124,0	-	-
2'	7,52 (d, $J = 8,5$ Hz)	130,1	C-1'/C3'	C-3/C-4'/C-6'
3'	6,99 (d, $J = 8,5$ Hz)	113,7	C-4'	C-1'/C-5'
4'	-	159,1	-	-
5'	6,99 (d, $J = 8,5$ Hz)	113,7	C-4'	C-1'/C-3'
6'	7,52 (d, $J = 8,5$ Hz)	130,1	C-1'/C-5'	C-3/C-4'/C-2'
1''	5,09 (d, $J = 7,0$ Hz)	100,0	C-7/C-5''	-
2''	3,31 (m)	73,2	-	-
3''	3,33 (m)	76,4	C-2''/C-4''	C-1''/C-5''
4''	3,18 (m)	69,6	C-5''	C-6''
5''	3,46 (m)	77,2	-	-
6''	3,71 (m)	60,7	C-4''/C-5''	C-1''
OCH ₃	3,77 (s)	55,2	-	C-4'

Figura 8 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-1**.

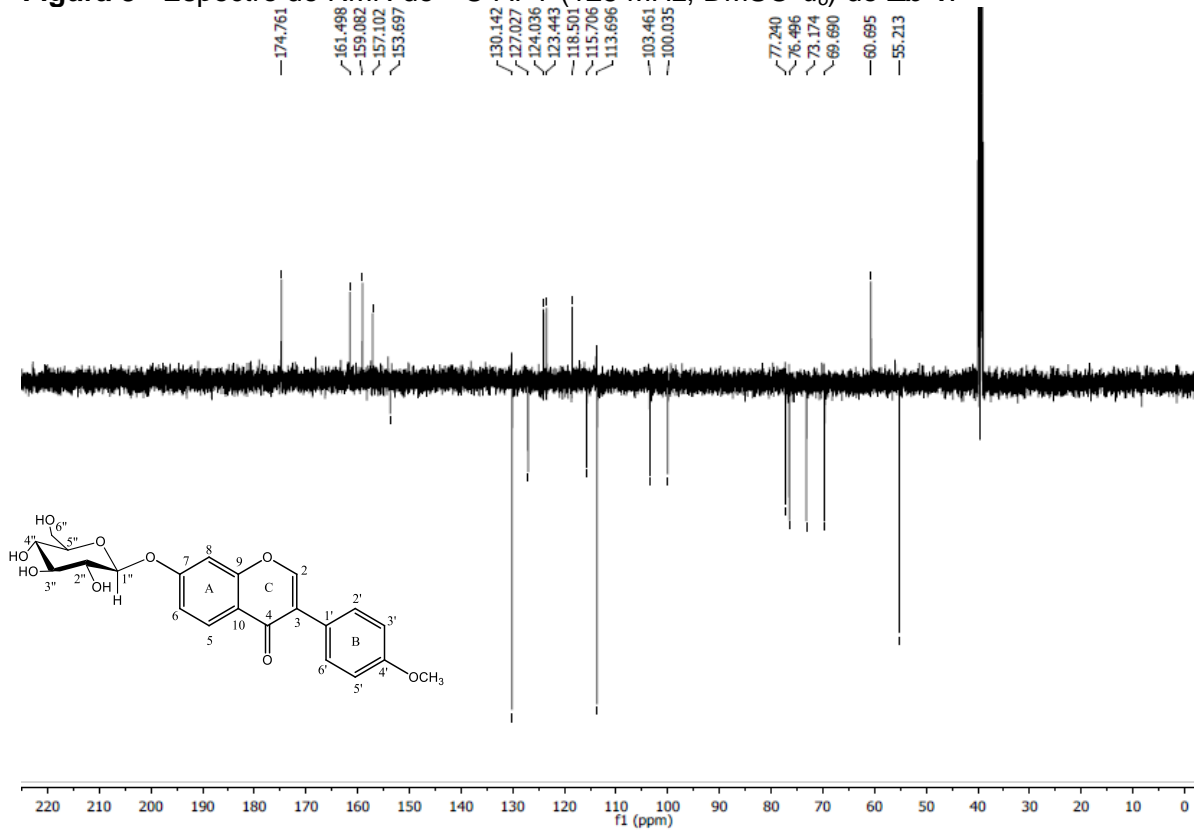


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-1**.

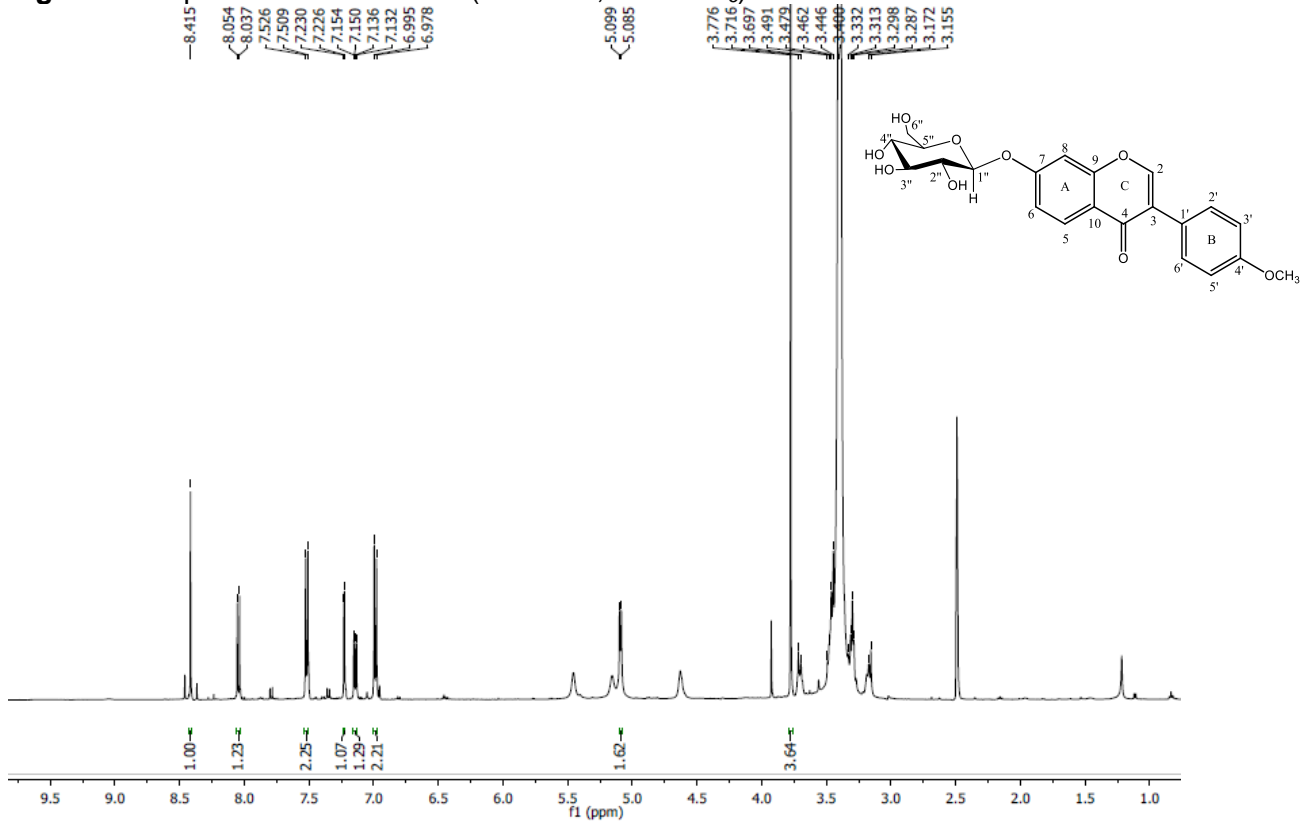


Figura 10 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-1** na região de 8,4-6,9 ppm.

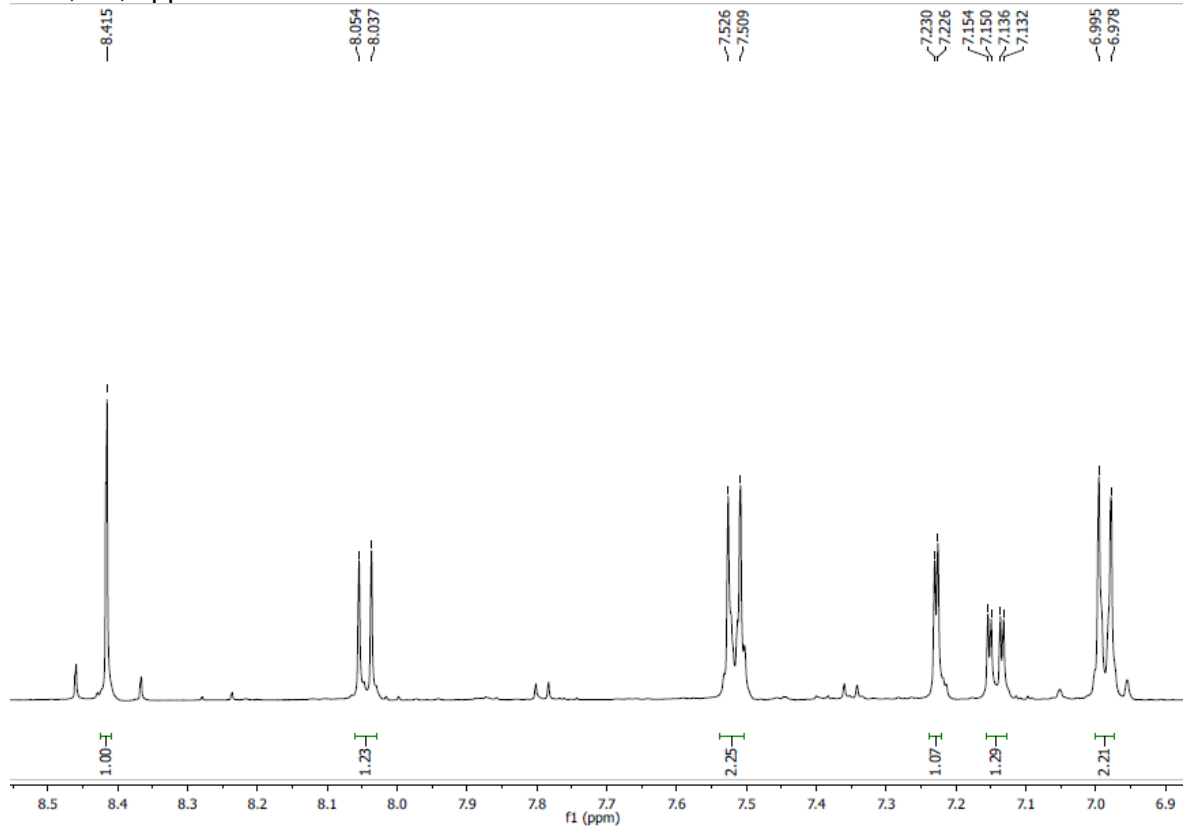


Figura 11 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-1** na região de 5,2-2,2 ppm.

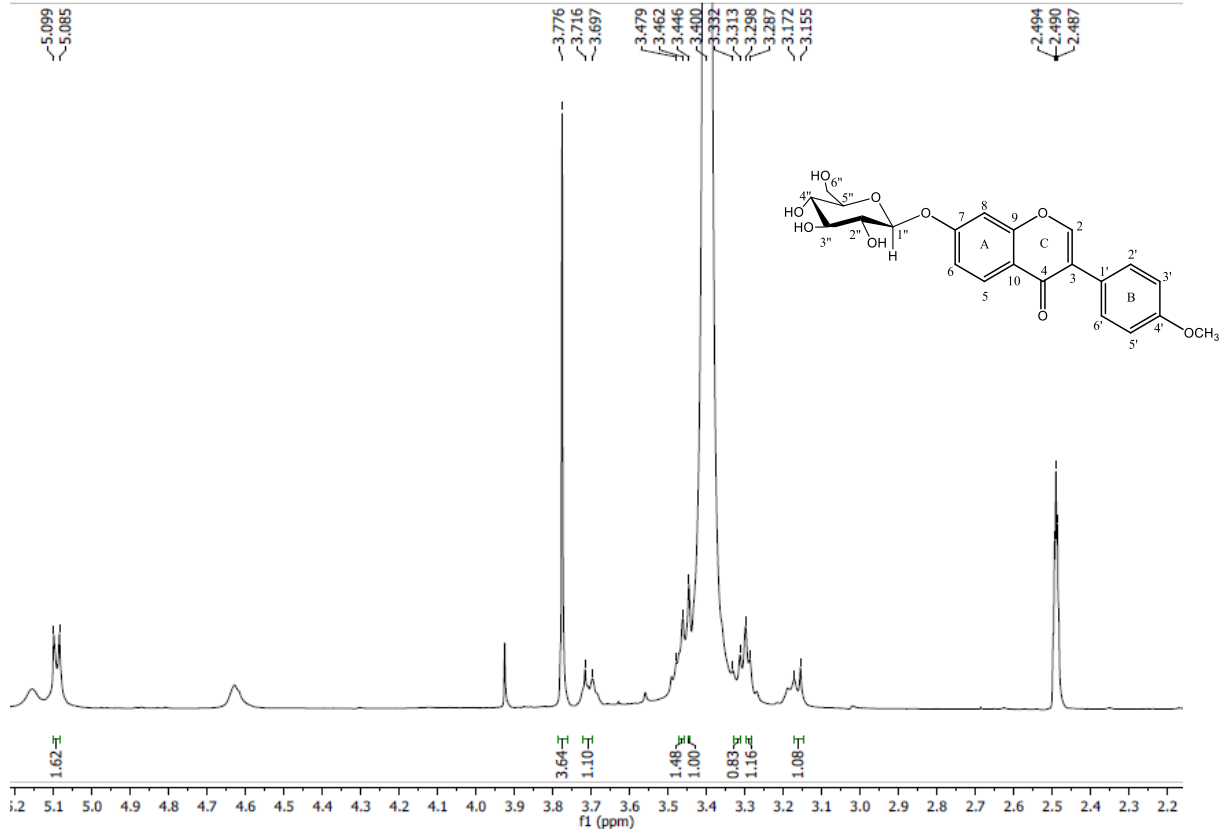


Figura 12 - Espectro de HSQC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de **Zb-1**.

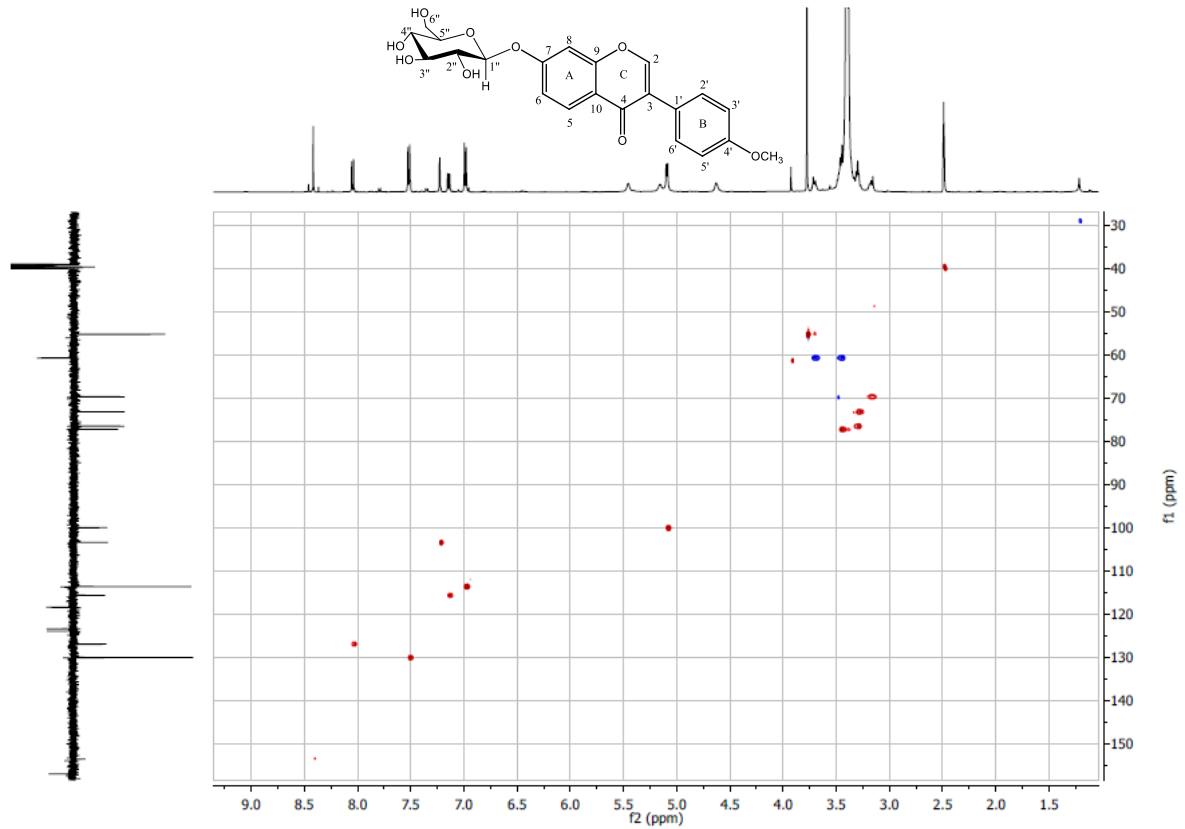


Figura 13 - Expansão do espectro de HSQC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de **Zb-1** na região (8,5-6,9) X (156-95) ppm.

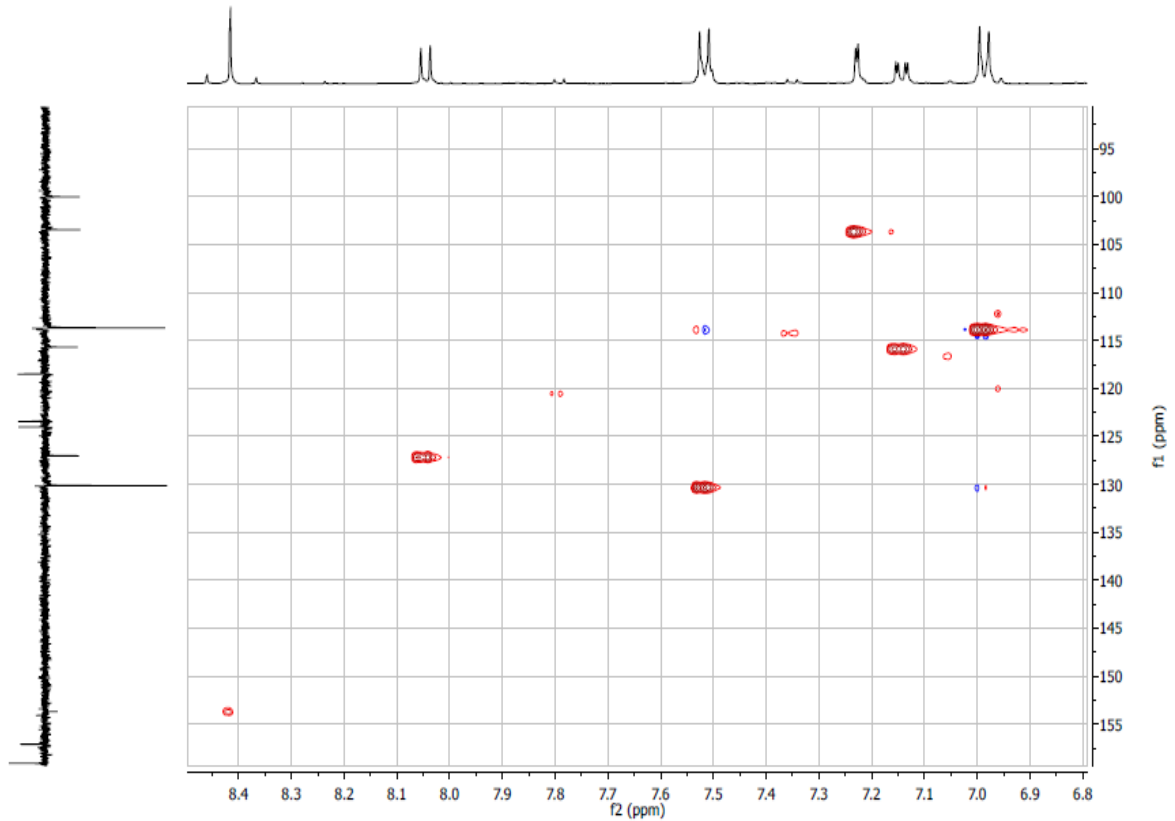


Figura 14 - Expansão do espectro de HSQC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de **Zb-1** na região (5,3-2,4) X (105-35) ppm.

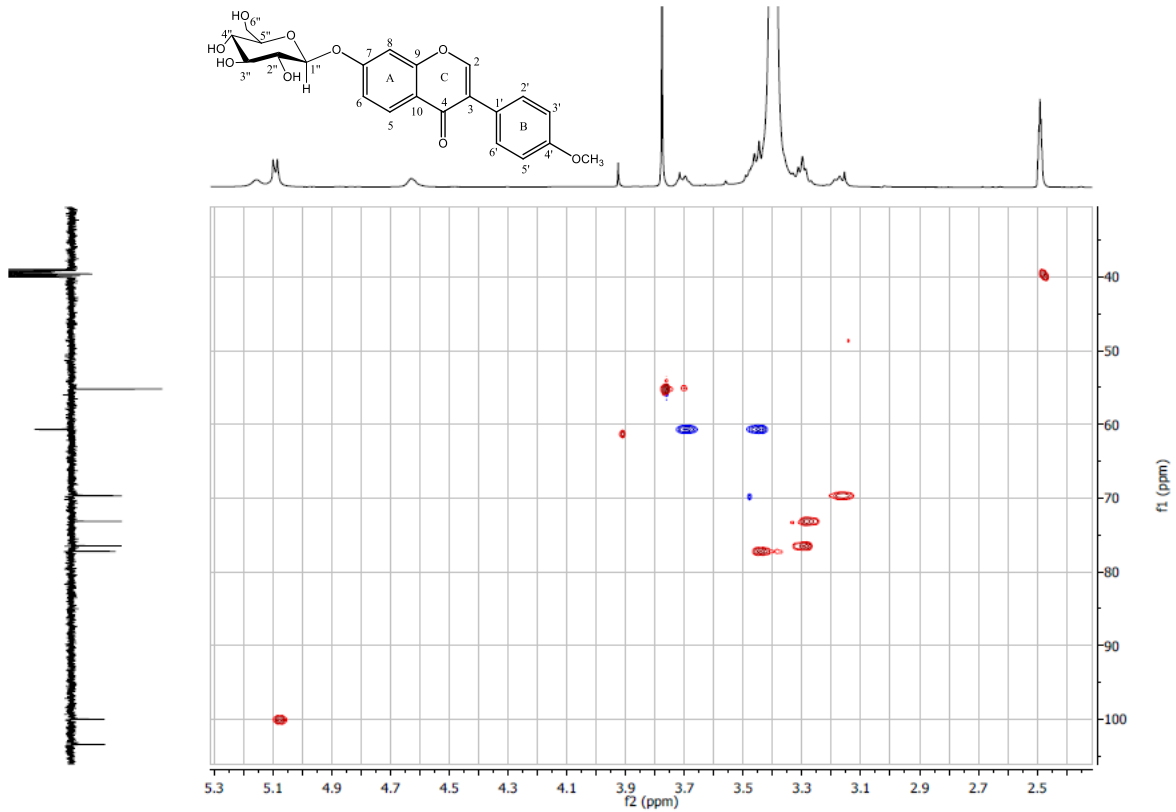


Figura 15 - Espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de **Zb-1**.

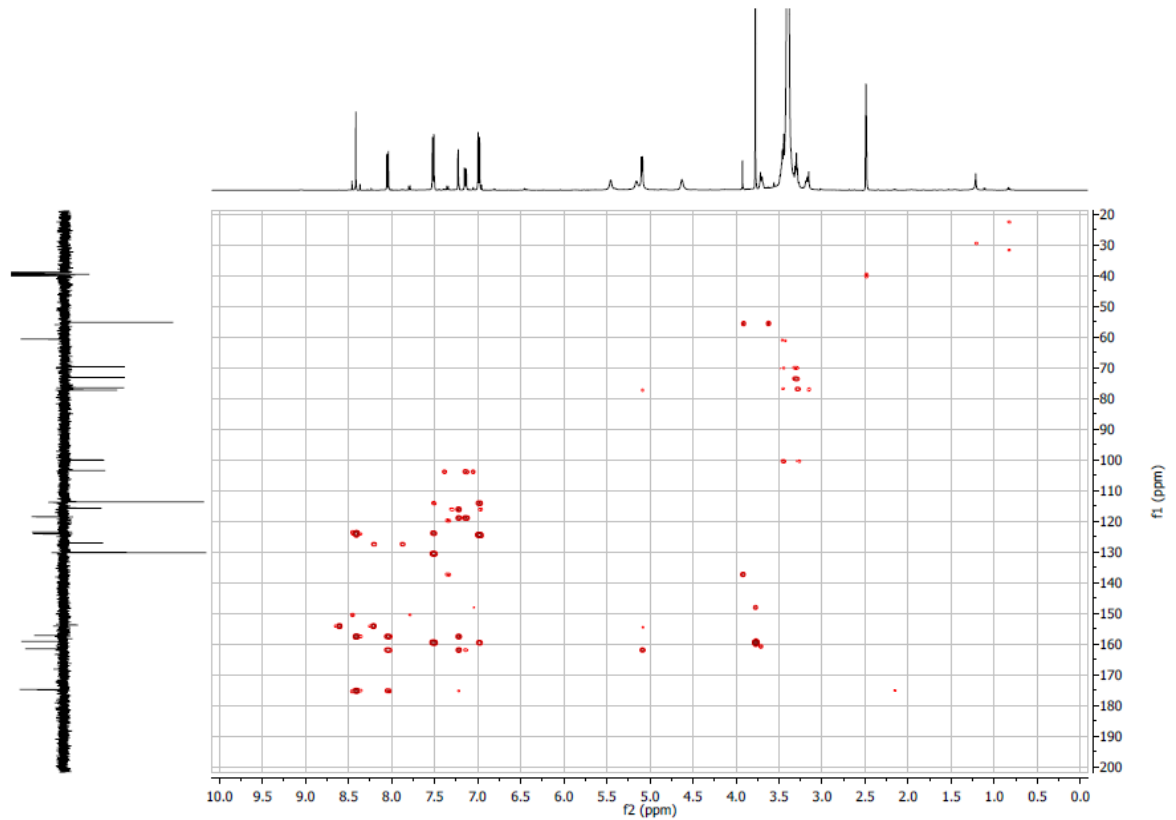


Figura 16 - Expansão do espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de **Zb-1** na região (8,8-6,7) X (175-95) ppm.

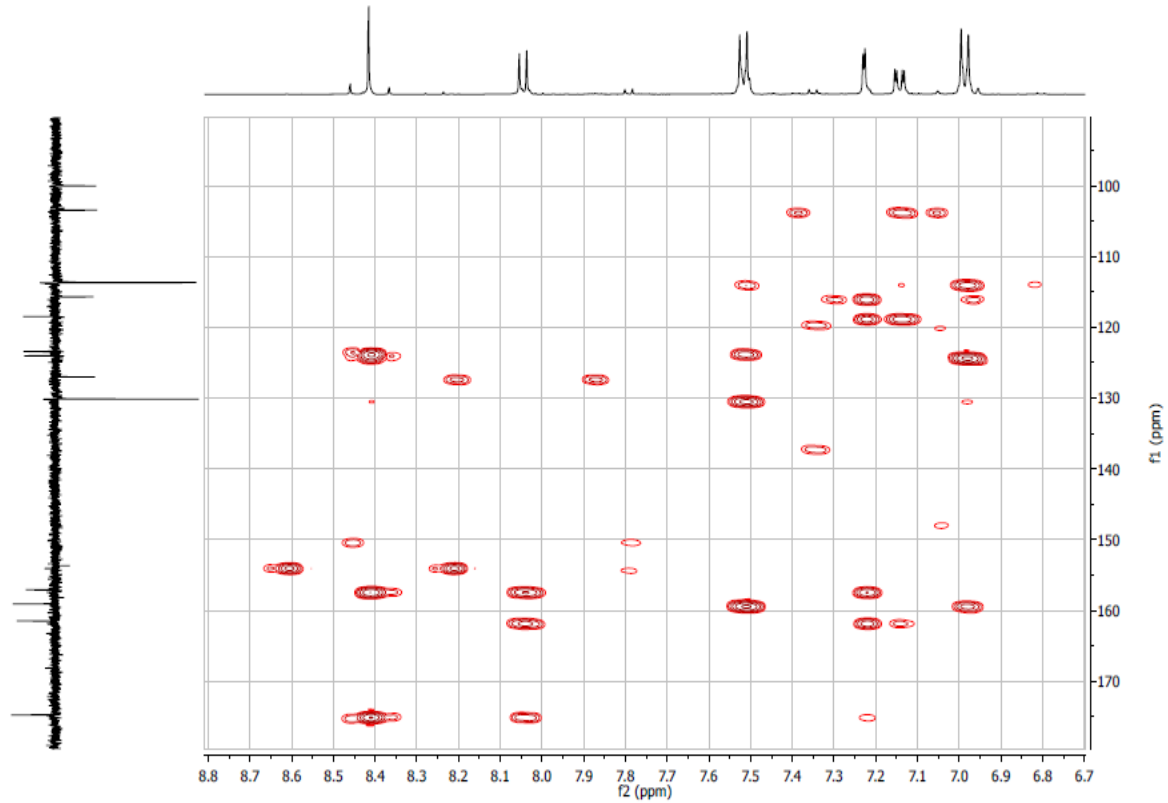
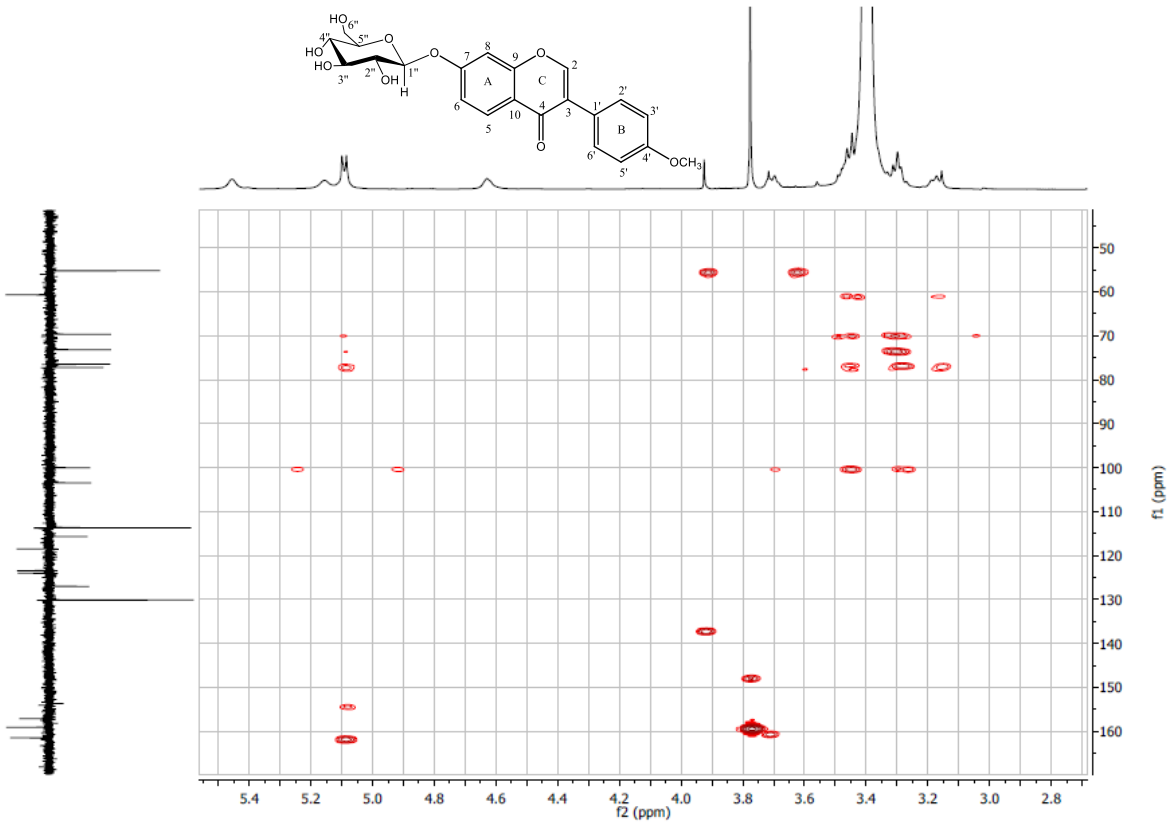


Figura 17 - Expansão do espectro de HMBC (500 MHz e 125 MHz, em DMSO- d_6) de **Zb-1** na região (5,5-2,8) X (165-45) ppm.



5.2 Determinação estrutural de **Zb-2**.

A substância codificada como **Zb-2** foi isolada na forma de um cristal branco com massa de 18 mg (0,0006% do peso de material vegetal seco).

O espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (Figura 19, pág. 77) e suas expansões (Figura 20, pág. 77) revelaram a presença de 7 sinais com absorções na região característica de carbonos alifáticos oxigenados. Um destes com deslocamento químico em δ_{C} 59,7 sugerindo a presença de metoxila (OCH_3). Estas informações foram compatíveis com o esperado para um metil-hexosídeo, no entanto, os deslocamentos de RMN de ^{13}C não indicaram a presença de carbono anomérico. Este composto também poderia ser confundido com um açúcar redutor, com grupo metílico em outra posição. Contudo, para isso seriam esperados dois sinais de carbonos anoméricos (α e β) entre δ_{C} 90-100 (KIATKOSKI, 2011). Desta forma **Zb-2** poderia se tratar de uma substância semelhante a um monossacarídeo (hexose) metilado, compatível com os polialcoóis cíclicos, como os inosítois (ciclitol). De acordo com Poongothai e Sripath (2013) a substância D-pinitol, um derivado metilado do inositol apresenta deslocamentos de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_{C} 83,75 (C-3), 72,54 (C-4), 72,36 (C-6), 71,92 (C-1), 70,84 (C-5), 70,02 (C-2), 59,63 (OMe) (YU et al., 2005), compatíveis com os dados encontrados para **Zb-2**. (Ver Tabela 5, pág. 76)

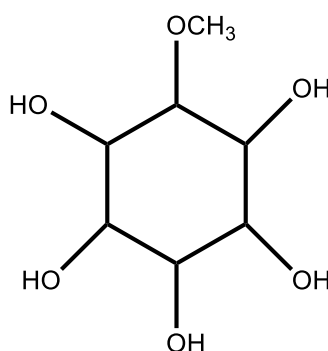
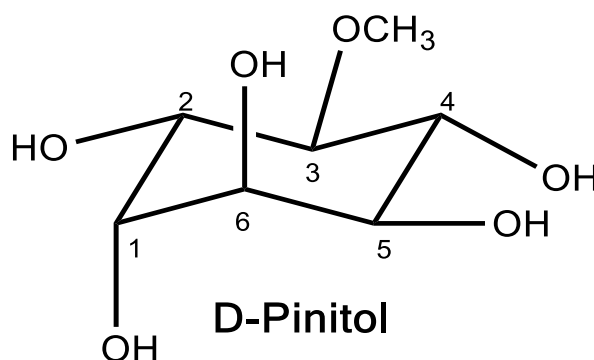


Figura 18 - Estrutura de um polialcool cíclico metoxilado.

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (Figura 21, pág. 78) e suas expansões de **Zb-2** (Figura 22-23, pág. 78-79) apresentaram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN de ^{13}C (Fig., pág.). Foram observados absorções entre δ_{H} 2,90 a 3,70 ppm característicos de hidrogênios alifáticos ligados a carbono carbinólicos, os cinco sinais observados

nesta região correspondem a 9 hidrogênios. Outro fato relevante foi a ausência do sinal referente ao hidrogênio anomérico, os sinais existentes na sua região característica de absorção observados neste espectro foram todos atribuídos a hidroxilas (-OH), corroborando com a proposta de **Zb-2** ser um poliálcool ciclohexânico (POONGOTHAJ; SRIPATH, 2013). Na expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-2** (Figura 23, pág. 79) o tripleto em δ_{H} 3,010-2,973 foi atribuído ao H-3, os multipletos em δ_{H} 3,352-3,306 referente ao H-2 e δ_{H} 3,510-3,473 ao H-4, os singletos largos em δ_{H} 3,619 e δ_{H} 3,427 foram atribuídos ao H-5/H-6 e a H-1/metoxila (OCH_3), respectivamente. Os dubletos presentes na região de δ_{H} 4,709-4,312 foram atribuídos às cinco hidroxilas (-OH) existentes na estrutura proposta (Figura 22, pág. 78). Diante destes dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e em comparação com os dados da literatura, foi possível identificar **Zb-2** como sendo o D-Pinitol (3-O-metil-D-*chiro*-inositol), isolado pela primeira vez no gênero *Zornia*.



O D-pinitol é um ciclitol abundante em algumas plantas sendo um componente importante das famílias Pinaceae, Leguminosae e Caryophyllaceae. Sua rota biosintética tem sido elucidada nas gimnospermas e em plantas leguminosas, incluindo o myo-inositol como seu precursor (KIATKOSKI, 2011).

Seu papel fisiológico parece estar relacionado à adaptação das plantas a condições osmóticas drásticas, sendo um soluto orgânico osmoticamente ativo: o D-pinitol é um dos mais importantes constituintes de numerosas espécies de mangaue, e grandes quantidades têm sido relatadas em folhas do arbusto de jojoba (*Simmondsia chinensis*) no deserto (NGUYEN; LAMANT, 1988; CARVALHO et al, 2006).

O D-pinitol apresenta propriedades farmacológicas como: agente anti-diabético exercendo um efeito semelhante à insulina, resultando em níveis mais

baixos de açúcar no sangue e aumento da disponibilidade de glicose para o metabolismo celular (e aumenta a retenção de creatinina pelas células musculares (GREENWOOD et al., 2001; OSTLUND; SHERMAN, 1996; BATES, JONES, BAILEY, 2000). O D-pinitol, portanto, parece desempenhar um papel na regulação da energia celular, resultando em níveis de energia maiores e redução da fadiga (VAN WYK; ALBRECHT, 2008). Outras atividades estudadas deste composto são descritas na literatura, como: anti-inflamatório (SINGH et al, 2000) e larvicida (CHAUBAL et al, 2005).

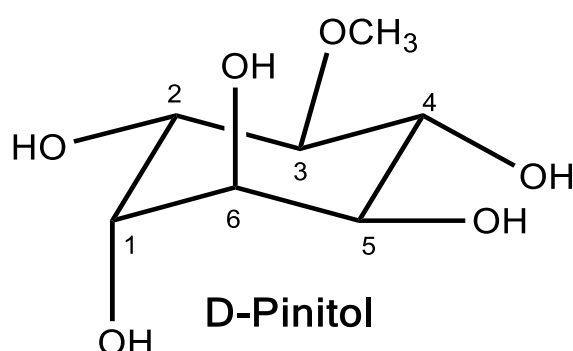


Tabela 5 - Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **Zb-2** em $\text{DMSO-}d_6$ (50 e 500 MHz, respectivamente) e do D-pinitol em $\text{DMSO-}d_6$ (100 e 400 MHz, respectivamente) (Yu, et al., 2005; Raporu, 2011).

Nº	^{13}C	Zb-2		Yu, et al., 2005/ Raporu, 2011	
		^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	72,03		3,42 (<i>sl</i> , 4H)	71,92	3,44 (<i>m</i>)
2	70,13		3,35 (<i>m</i> , 1H)	70,02	3,35
3	83,85		3,01 (<i>t</i> , $J=8,5$, 1H)	83,75	3,01(<i>t</i> , $J=9,0$ Hz)
4	72,65		3,51 (<i>m</i>)	72,54	3,50 (<i>m</i>)
5	70,95		3,61 (<i>sl</i> , 2-H)	70,84	3,63 (<i>m</i>)
6	72,47		3,61 (<i>sl</i> , 2-H)	72,36	3,62 (<i>m</i>)
OCH ₃	59,74		3,42 (<i>sl</i> , 4-H)	59,63	3,43 (<i>s</i>)

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-2**.

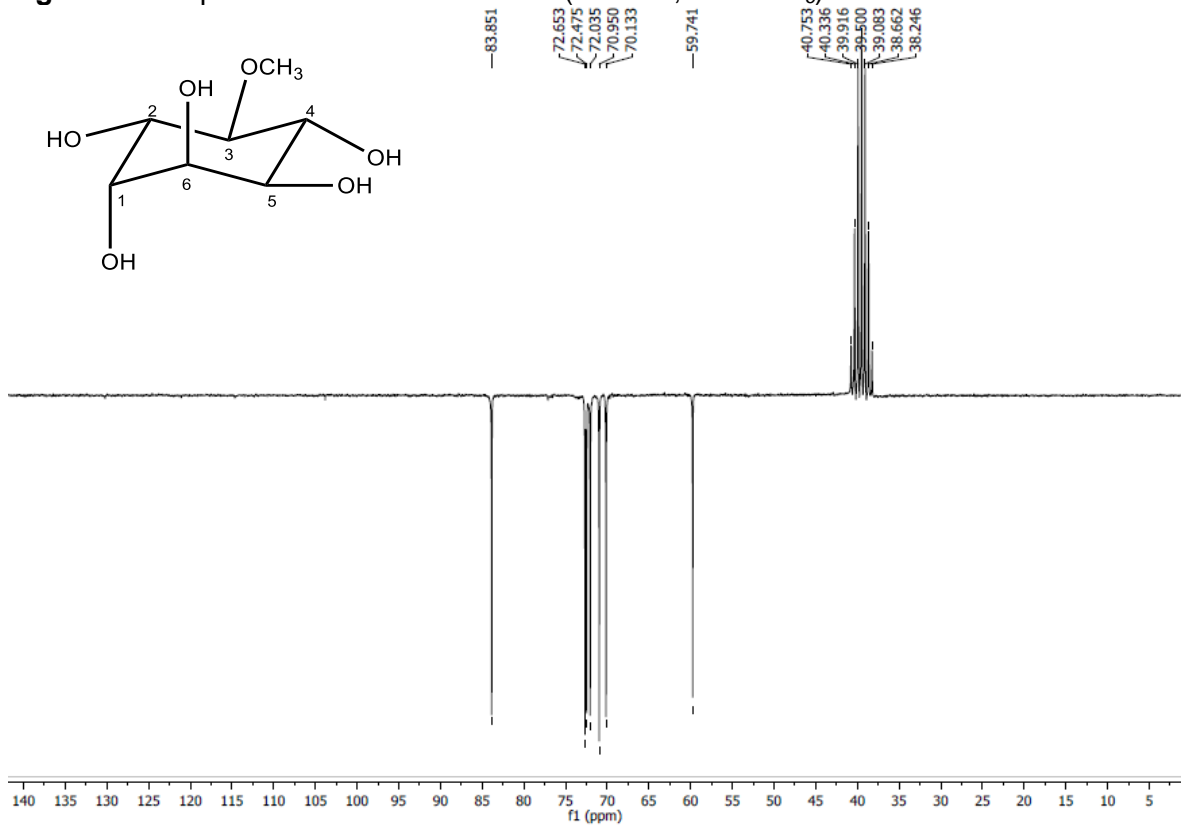


Figura 20 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-2** na região de 86-57 ppm.

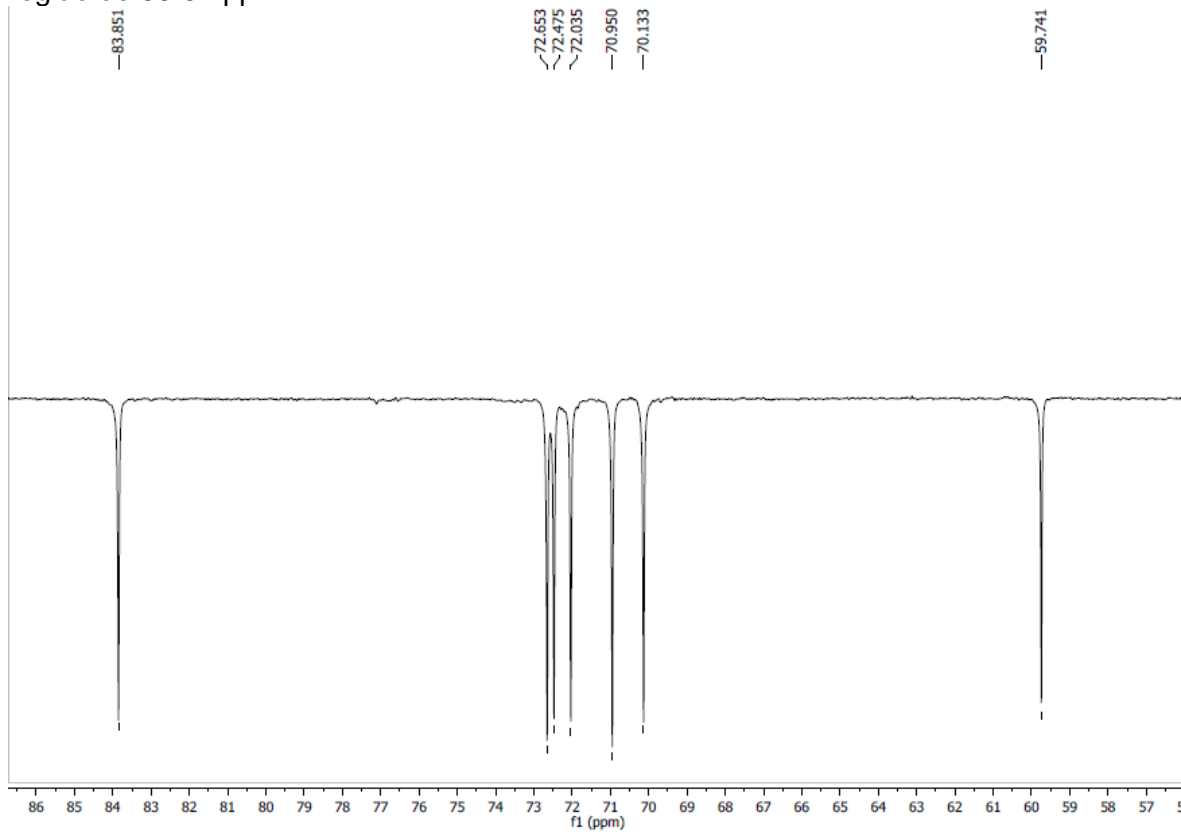


Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-2**.

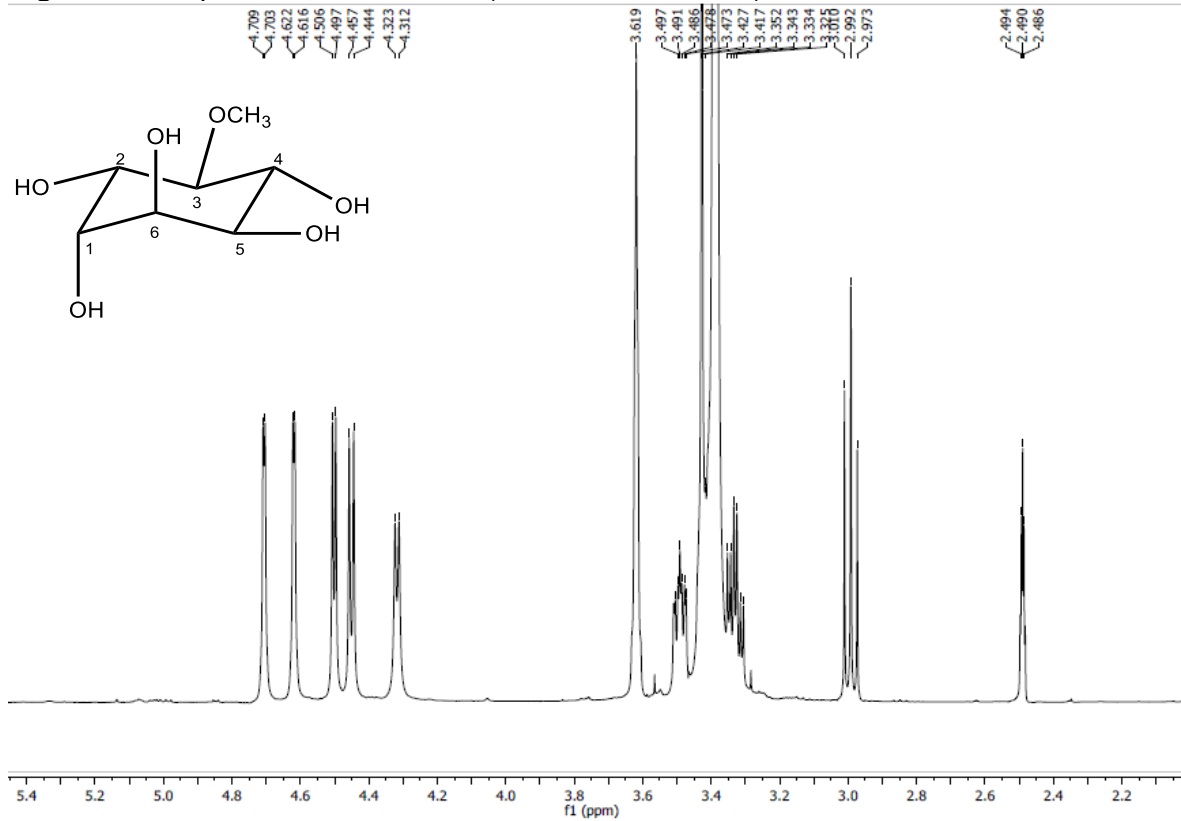


Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-2** na região de 5-4,1 ppm.

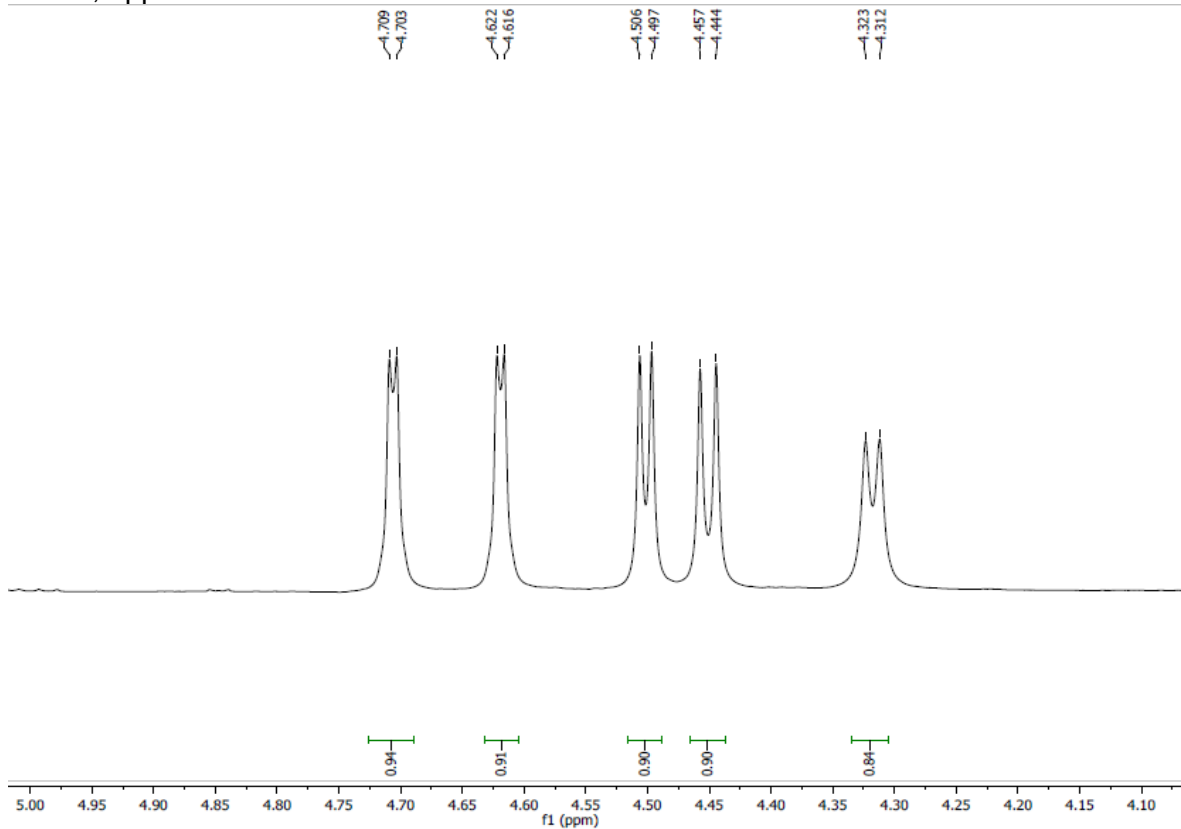
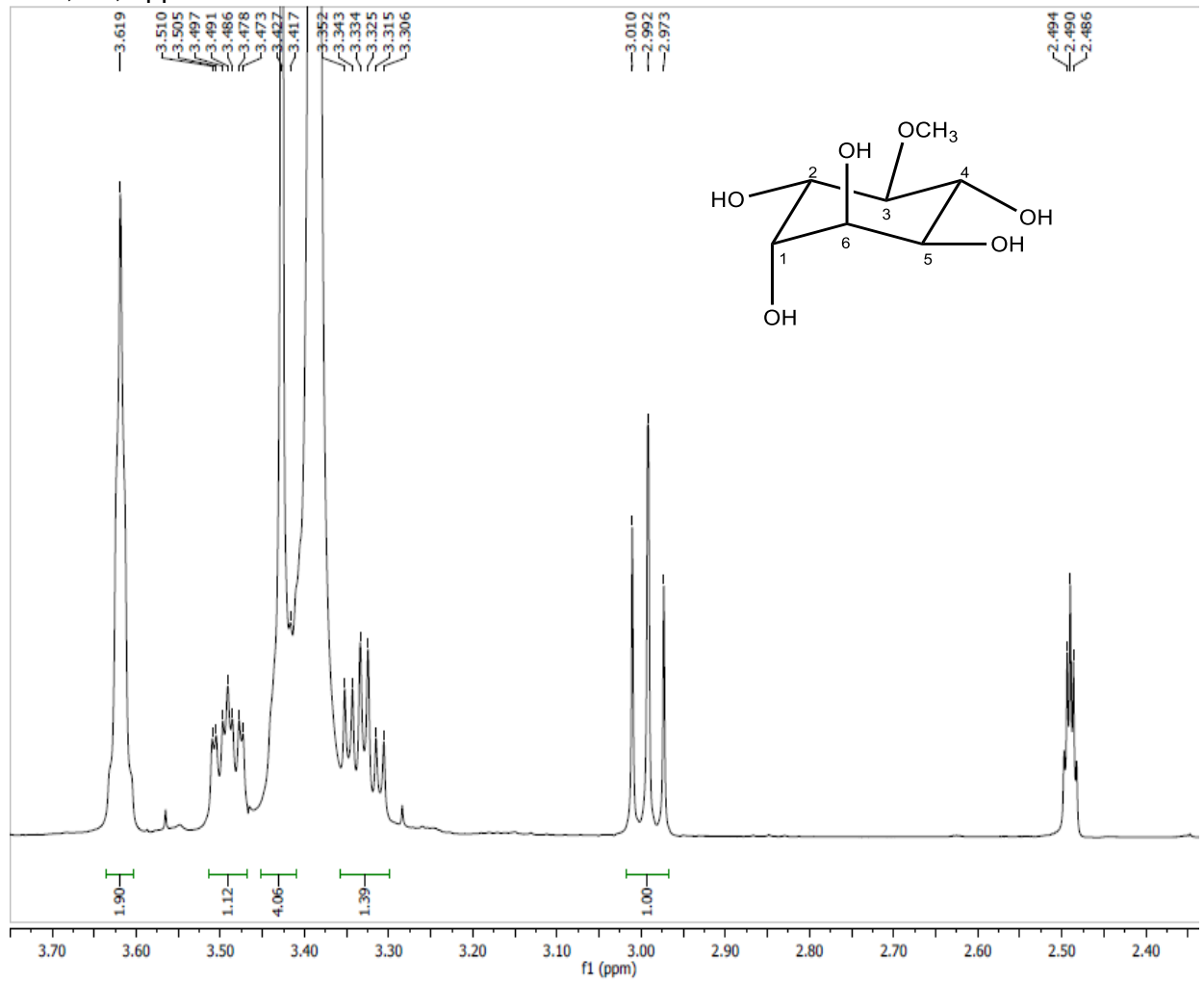


Figura 23 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-2** na região de 3,7-2,3 ppm.



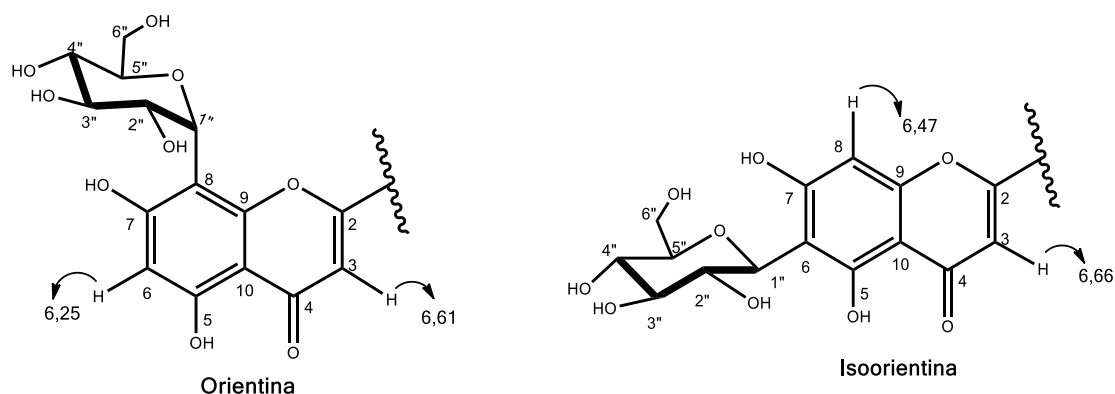
5.3 Determinação estrutural de **Zb-3**.

A substância codificada como **Zb-3** foi isolada na forma de um sólido amorfo amarelado com massa de 16 mg (0,000533 % do peso de material vegetal seco).

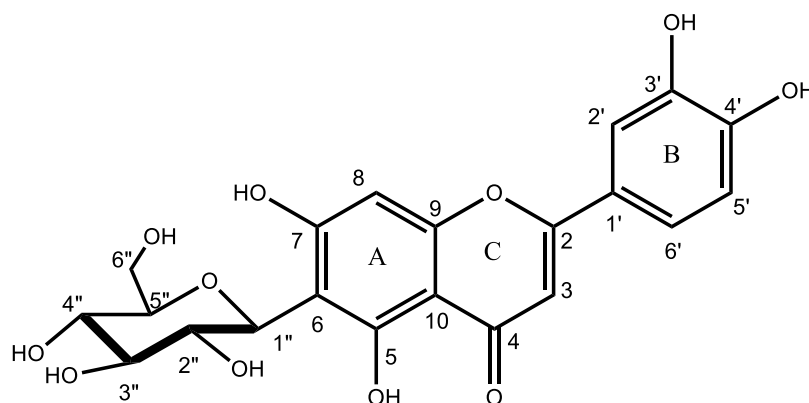
No espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, DMSO- d_6) (Figura 25, pág. 83) foram observados 20 sinais referentes a 21 carbonos. Dos 20 sinais observados dez foram referentes a carbonos não hidrogenados, um referente a carbono metilênico (CH_2) e dez para carbonos metínicos (CH). A presença de 14 sinais para carbonos sp^2 dentre eles os deslocamentos químicos em δ_{C} 163,7(C), δ_{C} 102,8(CH) e δ_{C} 181,8(C) diferem dos valores observados para **Zb-1** (isoflavona), e esses sinais foram atribuídos a C-2, C-3 e C-4, respectivamente, sugerindo um esqueleto carbônico de uma flavona para **Zb-3** (HUANG et al., 2015). Observou-se ainda um sinal para carbono metínico sp^2 em δ_{C} 93,6 (C-8), e sinais para carbono não hidrogenado em 108,9 (C-6), 160,7 (C-5) e 163,7(C-7) que permitiram sugerir a presença de um anel A com oxigenação nas posições 5 e 7. Foram observados ainda, sinais para carbonos metínicos sp^2 em δ_{C} 113,2 (C-2'), δ_{C} 116,1 (C-5') e δ_{C} 119,0 (C-6'), além dos sinais em δ_{C} 145,8 (C-3') e δ_{C} 149,8 (C-4') (Figura 26, pág. 83), desta forma revelando outras duas oxigenações na molécula. De tal modo que, o anel B é tri-substituído (sistema ABX) e o anel A é penta-substituído. Neste espectro ainda foram observados sinais compatíveis com a proposta da presença da unidade osídica na substância, como um sinal em δ_{C} 73,1 atribuído ao carbono anomérico C-1", este deslocamento é sugestivo de ligação do tipo carbono-carbono (C-C) ao esqueleto flavonoidico. Além das absorções na região entre δ_{C} 70,2 e 81,6 condizentes com carbonos carbinólicos. Um sinal em δ_{C} 61,5 atribuído ao carbono metilênico oxigenado confirmou a presença da unidade osídica, a glicose (Figura 27, pág. 84) (HUANG et al., 2015).

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (Figura 28, pág. 84) e suas expansões de **Zb-3** (Figura 29-30, pág. 85) demonstraram deslocamentos químicos que corroboraram com a proposta do espectro de RMN ^{13}C (Fig. 25, pág. 85). Apresentaram dois singletos em δ_{H} 6,64 e δ_{H} 6,46, ambos com integral para um hidrogênio cada, atribuídos as posições H-3 e H-8, assim reforçando a existência de um esqueleto flavonoidico do tipo flavona, bem como, corroborando com a inserção da unidade osídica na posição 6 (ver Figura 24, pág. 81).

Figura 24 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os hidrogênios H-3 e H-8, em $\text{DMSO-}d_6$, para as flavonas glicosiladas orientina e isoorientina (RINALDO et al., 2007).



O padrão de substituição para este esqueleto de flavona é confirmado com os deslocamentos: um duplo dubleto em δ_{H} 7,41 ($J = 2,0$ e 8,0 Hz) acoplado *orto* com δ_{H} 6,88 (d , $J = 8,5$ Hz) e *meta* δ_{H} 7,37 (d , $J = 2$ Hz) que são condizentes com os hidrogênios H-6', H-5' e H-2' respectivamente, confirmando a tri-substituição existente no anel B proposta pelos dados de RMN ^{13}C já que este é um padrão de hidrogenação do tipo ABX. Outro sinal em δ_{H} 13,53 (s) é atribuído a hidroxila na posição 5 quelada com a carbonila em 4, confirmando que o anel A encontra-se penta-substituído. Neste mesmo espectro foi possível observar um conjunto de absorções na região de hidrogênios alifáticos entre δ_{H} 3,11 e 3,67. Que associados à presença de um dubleto em δ_{H} 4,57 ($J = 9,5$ Hz) característico com um hidrogênio anomérico, permitiu confirmar que a unidade osídica se ligada ao esqueleto da flavona por uma ligação do tipo C-C e que esta é a β -glicose. (ÇALIS et al., 2006). Os demais dados de RMN estão compilados na Tabela 6 (pág. 82). Após análises desses foi possível identificar **Zb-3** como sendo a isoorientina (Luteolina-6-C- β -glicopiranosídeo) isolada pela primeira vez no gênero *Zornia*.



Isoorientina

Tabela 6 - Dados comparativos de RMN ^{13}C e ^1H de **Zb-3** em $\text{DMSO-}d_6$ (125 e 500 MHz, respectivamente) e da isoorientina em $\text{DMSO-}d_6$ (125 e 300 MHz, respectivamente) (Huang et al., 2015 e Çalis et al., 2006).

Nº	Zb-3		Huang et al., 2015/ Çalis et al., 2006	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	163,7	-	163,4	-
3	102,8	6,64 (s)	102,3	6,66 (s)
4	181,1	-	181,4	-
5	160,7	-	160,5	-
6	108,9	-	108,8	-
7	163,7	-	163,4	-
8	93,6	6,46 (s)	93,7	6,48 (s)
9	156,2	-	156,2	-
10	103,7	-	102,7	-
1'	121,4	-	121,5	-
2'	113,2	7,37 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	112,9	7,39 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
3'	145,8	-	145,9	-
4'	149,8	-	150,4	-
5'	116,1	6,88 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	116,0	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,3$ Hz)
6'	119,0	7,40 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)	118,8	7,41 (<i>dd</i> , $J = 8,3$ e $2,2$ Hz)
1''	73,1	4,57 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz)	73,1	4,58 (<i>d</i> , $J = 9,8$ Hz)
2''	70,6	4,04 (<i>t</i> , $J = 9,8$ e $9,3$ Hz)	70,5	4,03 (<i>dd</i> , $J = 9,8$ e $9,3$ Hz)
3''	79,1	3,20-3,11 (<i>m</i>)	78,9	3,22-3,11 (<i>m</i>)
4''	70,2	3,20-3,11 (<i>m</i>)	70,1	3,22-3,11 (<i>m</i>)
5''	81,6	3,20-3,11 (<i>m</i>)	81,3	3,22-3,11 (<i>m</i>)
6''	61,5	3,68 (<i>d</i> , $J = 10,5$ Hz)	61,3	3,68 (<i>dd</i> , $J = 11,8$ e $1,5$ Hz) 3,40 (<i>dd</i> , $J = 11,8$ e $6,0$ Hz)
5-OH	-	13,53 (s)	-	13,57 (s)

Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-3**.

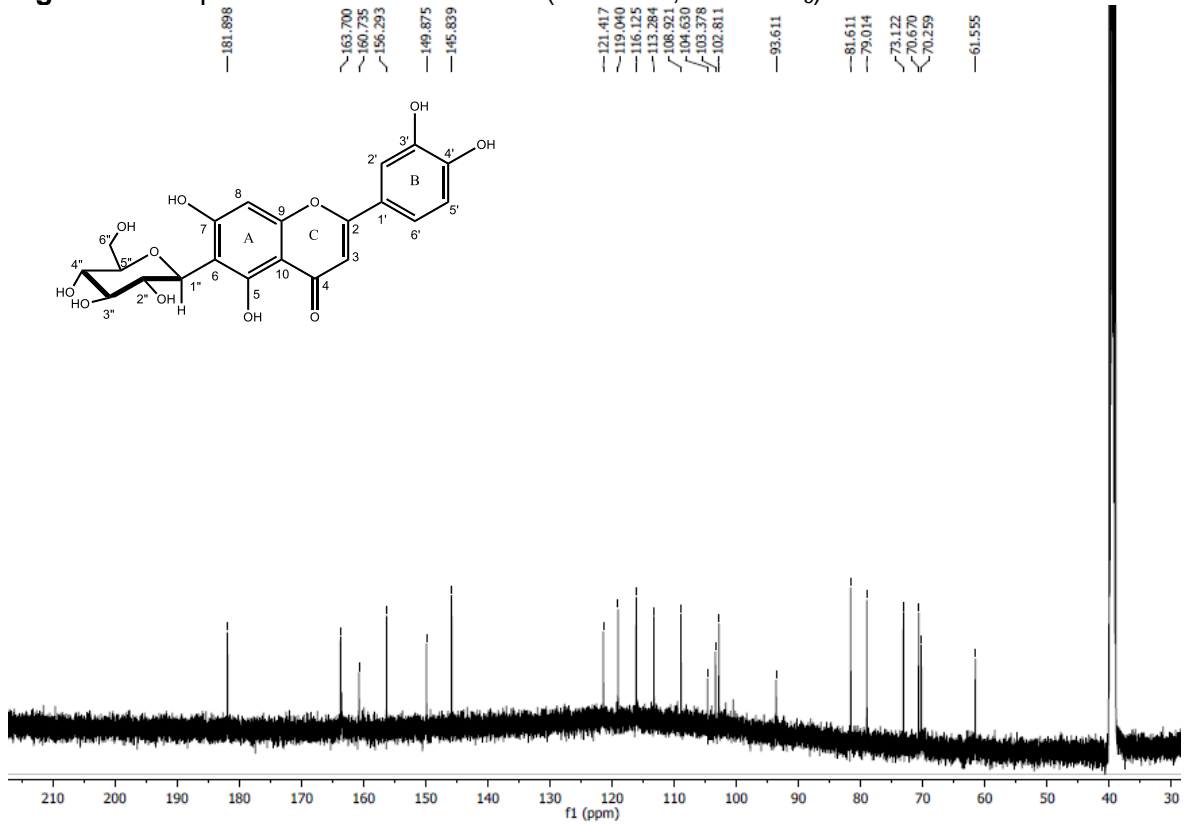


Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-3** na região de 195-100 ppm.

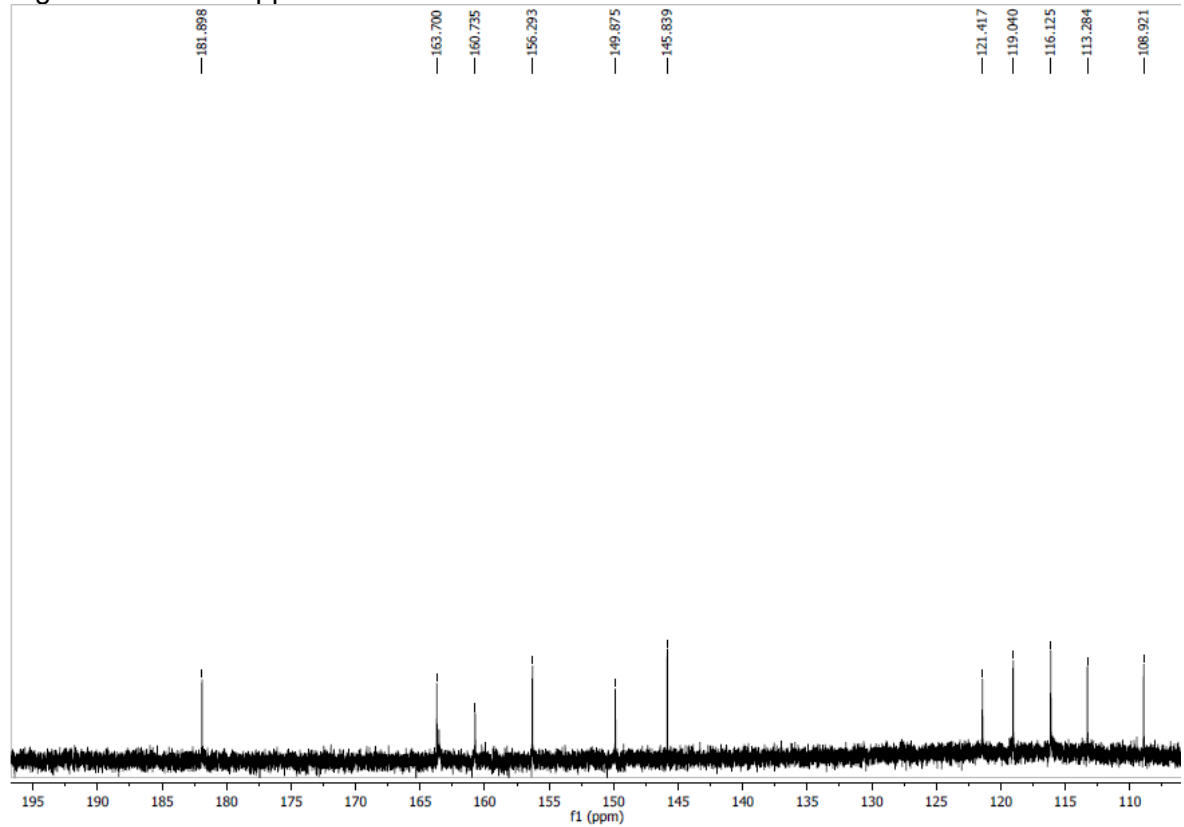


Figura 27 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -BB (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-3** na região de 106-52 ppm.

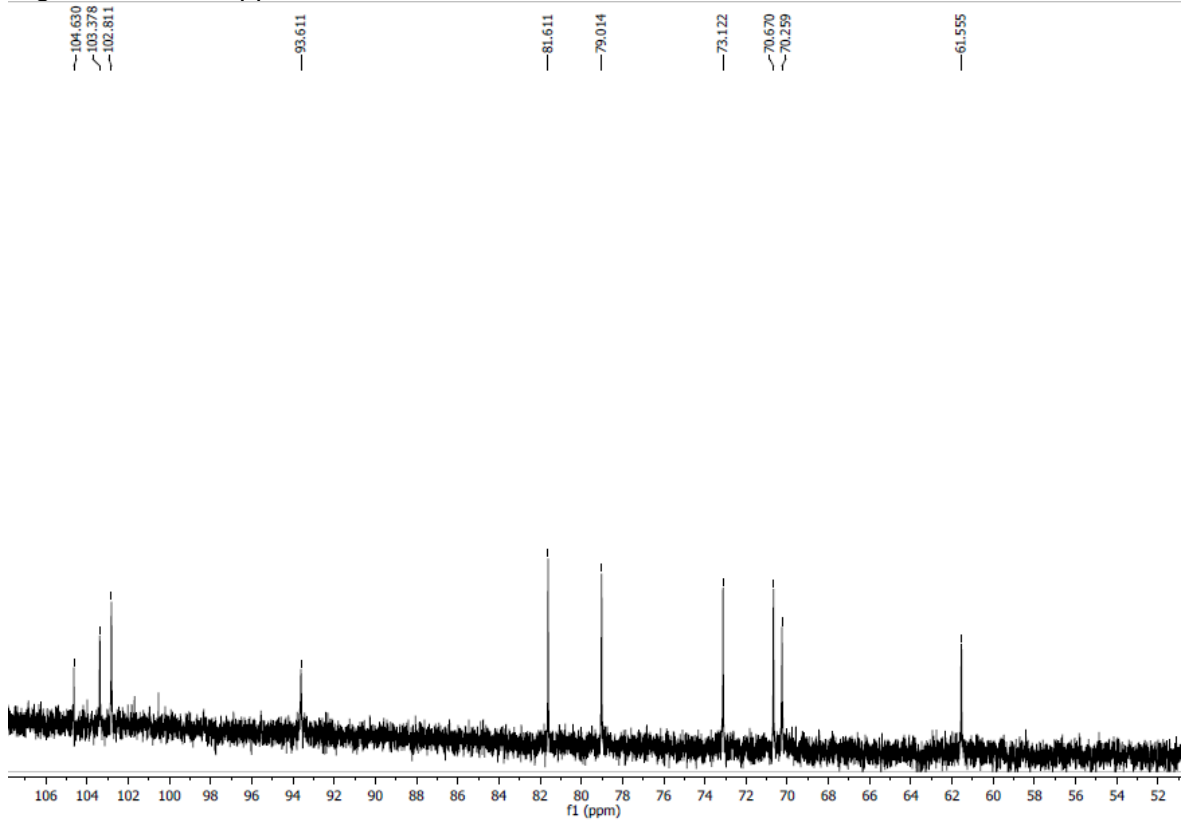


Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-3**.

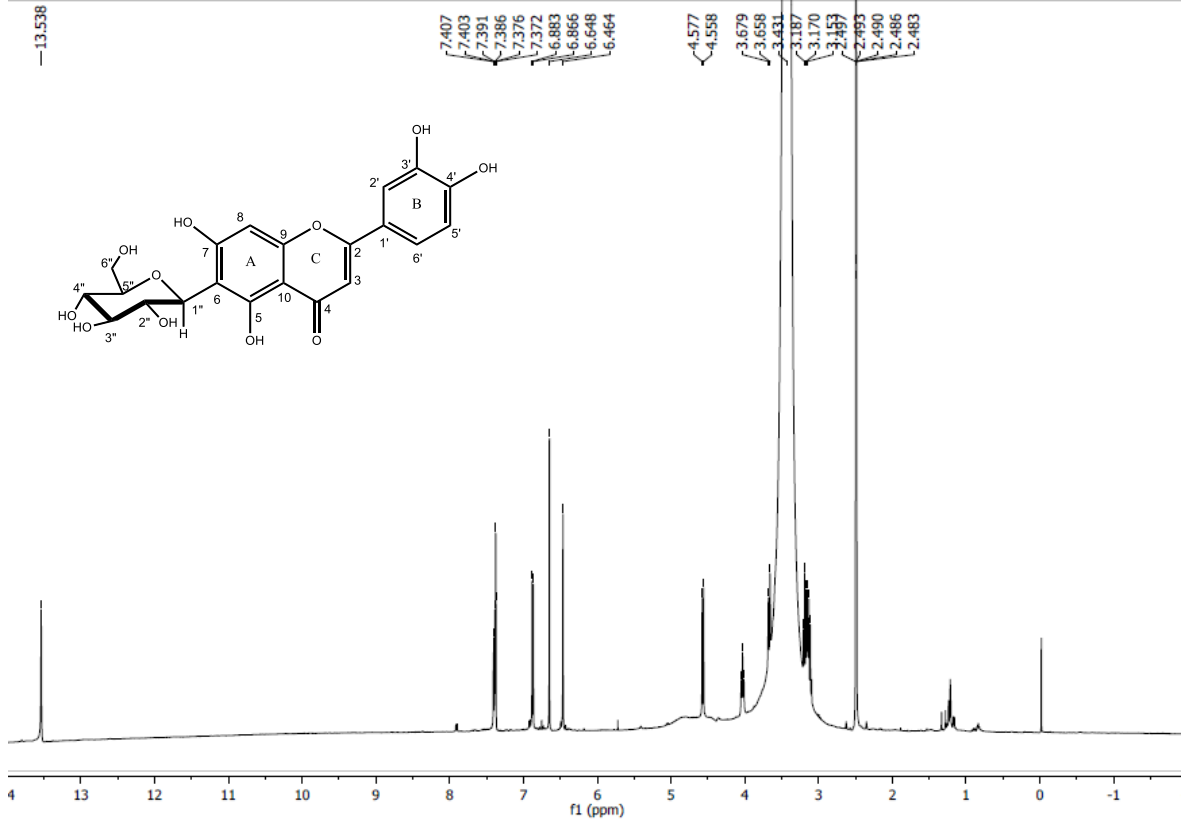


Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-3** na região de 7,5-6,3 ppm.

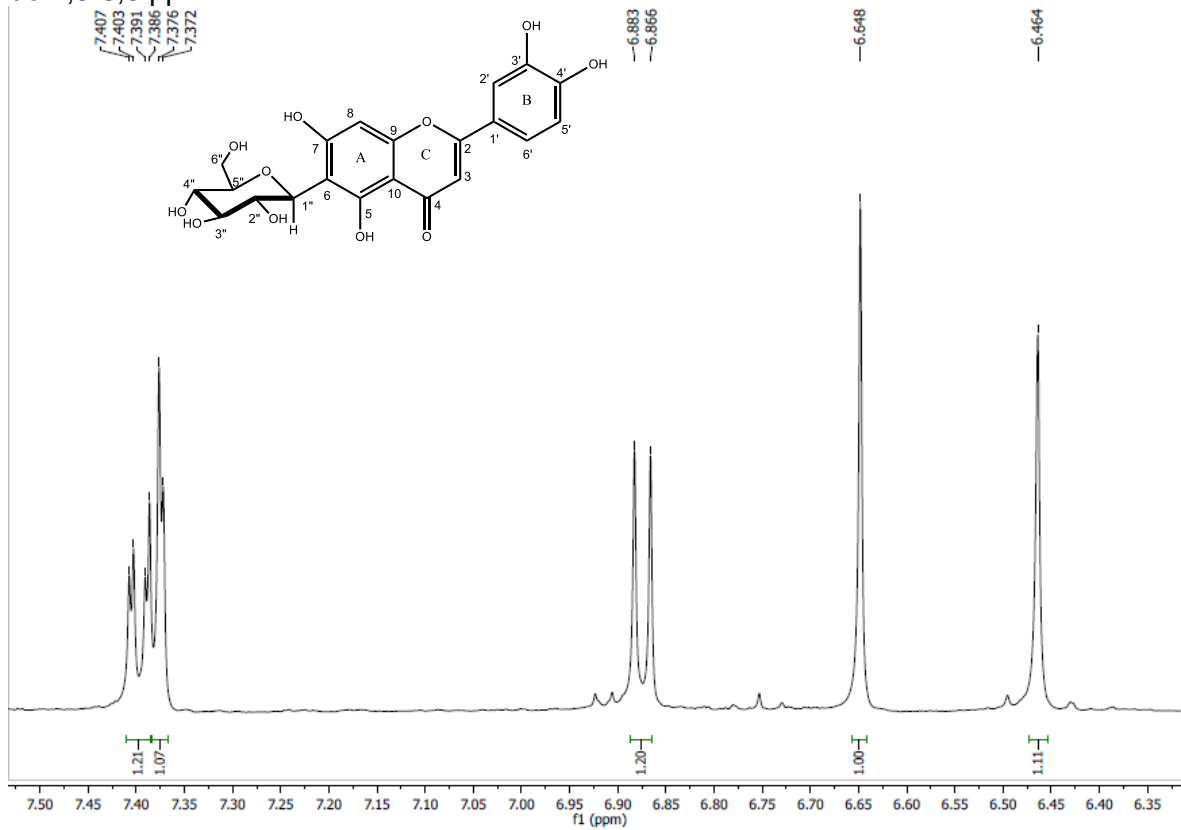
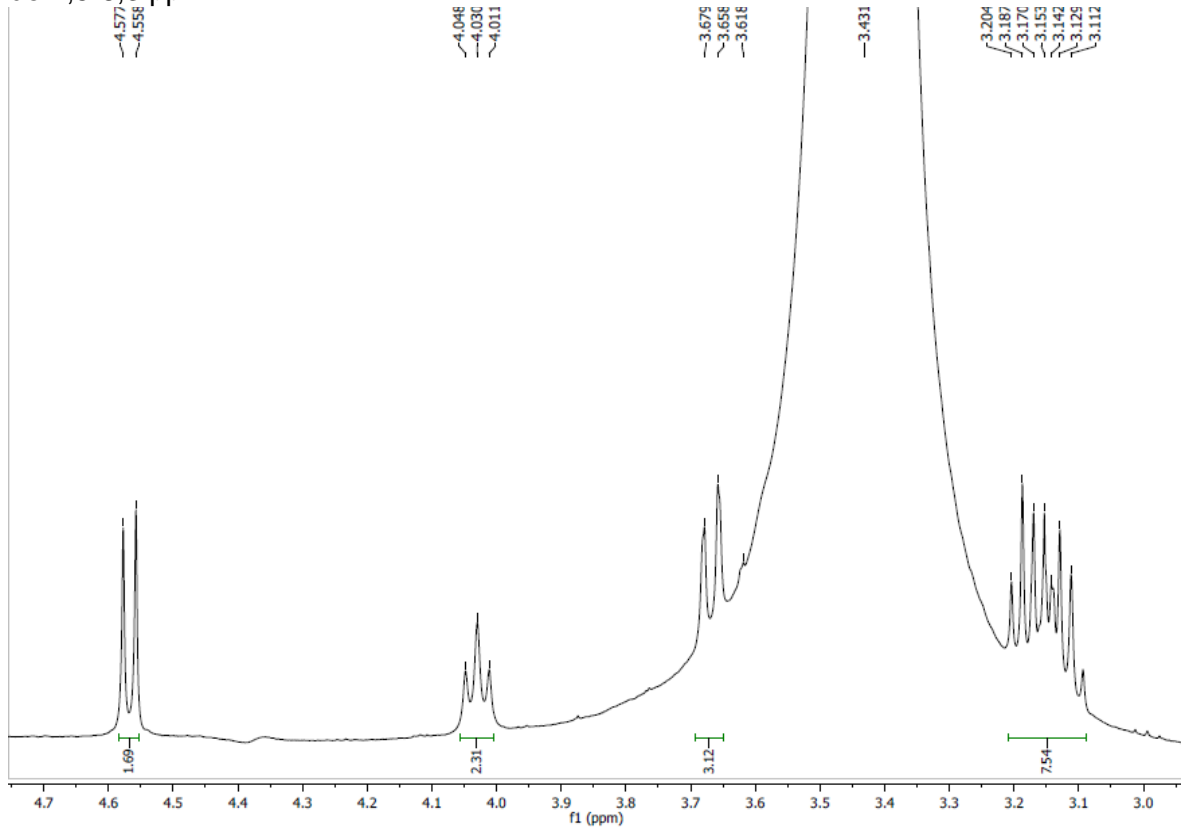


Figura 30 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-3** na região de 7,5-6,3 ppm.



5.4 Determinação estrutural de **Zb-4**.

A substância codificada como **Zb-4** foi isolada na forma de um sólido amorfo amarelado com massa de 2,5 mg (0,0000833% do peso de material vegetal seco).

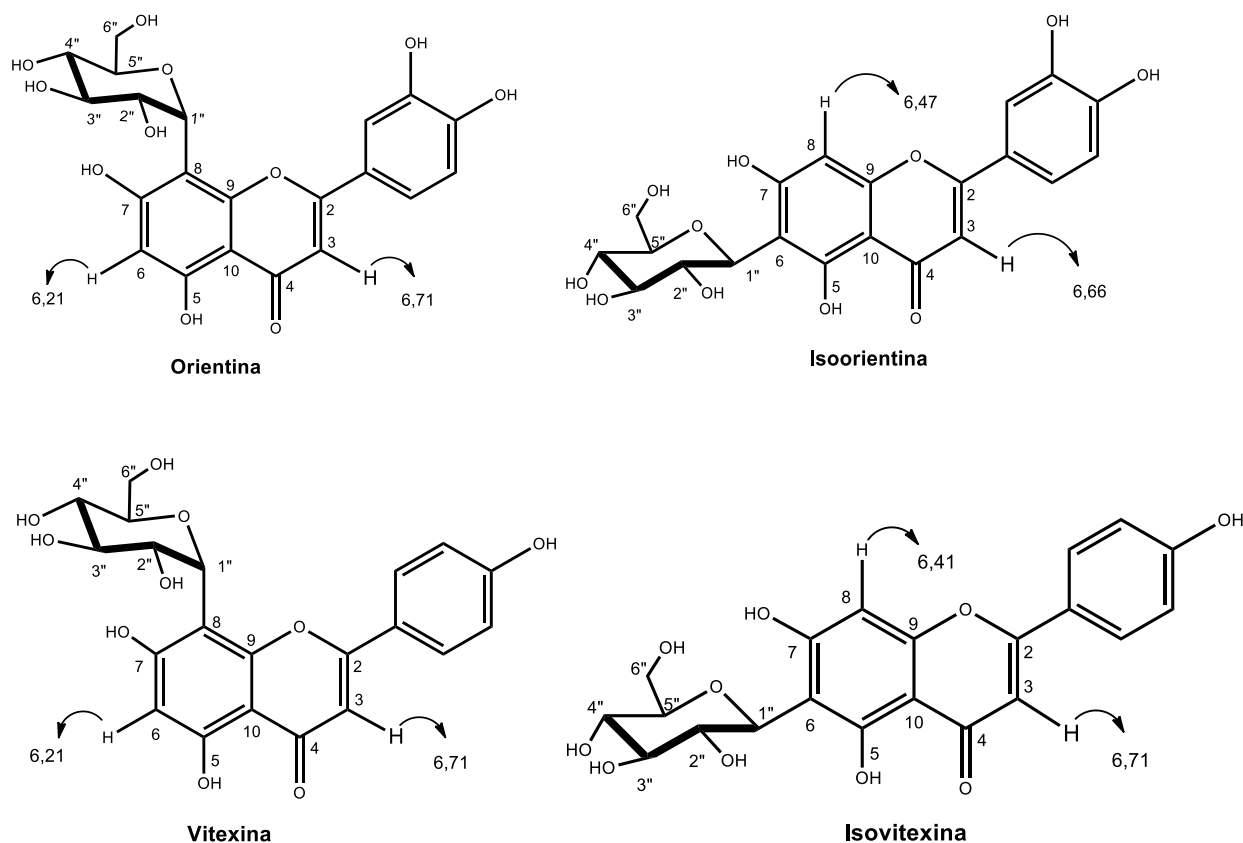
O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) (Figura 32, pág. 90) e suas expansões de **Zb-4** (Figura 33-34, pág. 90-91) demonstraram deslocamentos químicos que são semelhantes aos de **Zb-3** (Fig. 28, pág. 84), além de outras absorções compatíveis com outro padrão de substituição, revelando que **Zb-4** se trata de uma mistura.

Esta proposta é evidenciada, já que foram observados dois singletos em δ_{H} 6,63 e δ_{H} 6,43, ambos com integral para um hidrogênio cada, atribuídos às posições H-3 e H-8 da isoorientina como identificado na fração **Zb-3**. Além disso, foram observados outros dois singletos em δ_{H} 6,75 e δ_{H} 6,47, assim demonstrando que a outra substância da mistura **Zb-4** possui um esqueleto flavonoidico do tipo flavona. Neste mesmo espectro foi possível observar um conjunto de absorções na região de hidrogênios alifáticos entre δ_{H} 3,09 e 4,04, que associados à presença de um dubleto em δ_{H} 4,57 ($J = 10,0$ Hz) com integral para dois hidrogênios, característico com o hidrogênio anomérico, possibilitou confirmar que as unidades osídicas estão ligadas ao esqueleto das flavonas por uma ligação do tipo C-C e que estas são a β -glicose (ÇALIS et al., 2006). Estas informações corroboram com uma mistura de flavonoides com o mesmo esqueleto, e que a ligação osídica está na mesma posição em ambas as substâncias, sugerindo uma mistura entre a isoorientina e isovitexina (RINALDO et al., 2007) (ver Figura 31, pág. 87).

A mistura da isoorientina e isovitexina em **Zb-4** é reforçada pelos padrões de substituição encontrados no espectro. Um duplo dubleto em δ_{H} 7,40 ($J = 2,0$ e 8,0 Hz) acoplando *orto* com δ_{H} 6,86 (*d*, $J = 8,5$ Hz) e *meta* δ_{H} 7,37 (*d*, $J = 2$ Hz) que são condizentes com os hidrogênios H-6', H-5' e H-2' respectivamente, confirmando a tri-substituição existente no anel B, existente na isoorientina (confirmado em **Zb-3**), um padrão de hidrogenação do tipo ABX. É observado ainda, absorções na forma de um dubleto em δ_{H} 6,92 ($J = 9,0$ Hz) acoplando *orto* com o dubleto em δ_{H} 7,92 ($J = 9,0$ Hz) ambos com integrais para dois hidrogênios cada, atribuídos respectivamente aos H-3'/5' e H-2'/6', corroborando com a existência de um sistema AA'BB' ou uma *para*-substituição no anel B compatível com a proposta da isovitexina (MOHAMMED et al, 2014). Outros sinais em δ_{H} 13,53 (s) e δ_{H} 13,55 (s) são atribuído a hidroxila na

posição 5 quelada com a carbonila em 4 para isoorientina e isovitexina, respectivamente (ver Tabela 7, pág. 89).

Figura 31 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os hidrogênios H-3 e H-8, em $\text{DMSO-}d_6$, para as flavonas glicosiladas orientina. Isoorientina, vitexina e isovitexina (RINALDO et al., 2007).

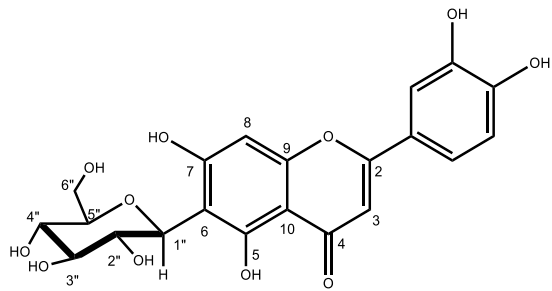


Após a eluição de **Zb-4** em CLAE-DAD, foi obtido o perfil cromatográfico (Figura 35, pág. 92) apresentando dois picos com tempos de retenção em 13 min 39 s e 15 min 09 s, ambos com o índice de pureza igual a 0,99999. Os tempos de retenção foram semelhantes aos dos padrões também eluídos: isoorientina e isovitexina, respectivamente. A comparação dos espectros de absorvância dos picos dos padrões com os picos correspondentes na fração **Zb-4** e a avaliação do índice de similaridade de 0,99995 e 0,99994 para os flavonoides isoorientina (Luteolina-6-C- β -glicopiranosídeo) e isovitexina (Apigenina-6-C- β -glicopiranosídeo), respectivamente, confirmam a presença destes na fração **Zb-4**.

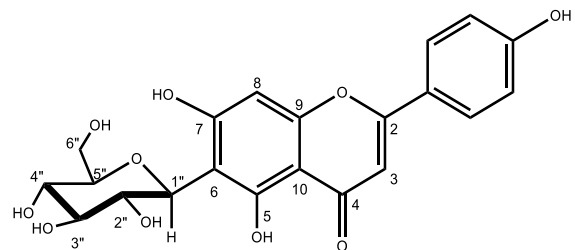
A proporção de cada um destes flavonoides na mistura pode ser calculada pela integral dos picos. A integral de H-3 da isoorientina mais a integral de H-3 da isovitexina correspondem a 100% da área referente a um hidrogênio na mistura, e

desta forma, pode-se descobrir a proporção de cada uma das substâncias na mistura, pois se pode calcular quanto cada integral dessas contribui para o 100% da aérea referente a um hidrogênio na mistura.

Desta forma **Zb-4** é composta por isoorientina e por isovitexina, ambos relatados pela primeira no gênero *Zornia*.



Isoorientina



Isovitexina

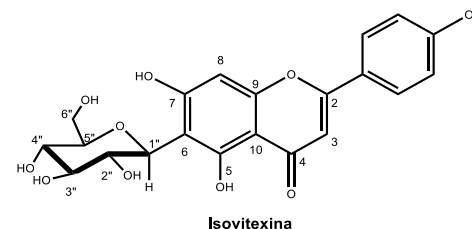
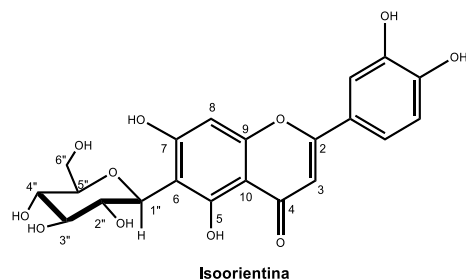


Tabela 7 - Dados comparativos de ^1H de **Zb-4** em $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz) e da isoorientina e isovitexina, ambas em $\text{DMSO}-d_6$ (300 e 500 MHz, respectivamente) (Mohammed et al., 2014 e Çalis et al., 2006)

Nº	Zb-4	Isoorientina (Çalis et al., 2006)	Zb-4	Isovitexina (Mohammed et al, 2014)
2	-	-	-	-
3	6,63 (s)	6,66 (s)	6,75 (s)	6,71 (s)
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	6,43 (s)	6,48 (s)	6,47 (s)	6,50 (s)
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	7,37 (d, $J = 2,0$ Hz)	7,39 (d, $J = 2,2$ Hz)	6,92 (dd, $J = 9,0$ Hz)	6,89 (dd, $J = 8,4$ Hz)
3'	-	-	7,92 (dd, $J = 9,0$ Hz)	7,86 (dd, $J = 8,4$ Hz)
4'	-	-	-	-
5'	6,90 (d, $J = 8,5$ Hz)	6,89 (d, $J = 8,3$ Hz)	7,92 (dd, $J = 9,0$ Hz)	7,86 (dd, $J = 8,4$ Hz)
6'	7,40 (dd, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz)	7,41 (dd, $J = 8,3$ e $2,2$ Hz)	6,92 (dd, $J = 9,0$ Hz)	6,89 (dd, $J = 8,4$ Hz)
1''	4,57 (d, $J = 9,5$ Hz)	4,58 (d, $J = 9,8$ Hz)	4,57 (d, $J = 9,5$ Hz)	4,54 (d, $J = 9,8$ Hz)
2''	4,04 (t, $J = 9,8$ e $9,3$ Hz)	4,03 (dd, $J = 9,8$ e $9,3$ Hz)	4,04 (t, $J = 9,8$ e $9,3$ Hz)	4,0
3''	3,20-3,09 (m)	3,22-3,11 (m)	3,20-3,09 (m)	3,7-3,1 (m)
4''	3,20-3,09 (m)	3,22-3,11 (m)	3,20-3,09 (m)	3,7-3,1 (m)
5''	3,20-3,09 (m)	3,22-3,11 (m)	3,20-3,09 (m)	3,7-3,1 (m)
6''	3,68 (d, $J = 10,5$ Hz)	3,68 (dd, $J = 11,8$ e $1,5$ Hz) 3,40 (dd, $J = 11,8$ e $6,0$ Hz)	3,68 (d, $J = 10,5$ Hz)	3,7-3,1 (m)
5-OH	13,55 (s)	13,57 (s)	13,53 (s)	-

Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-4**.

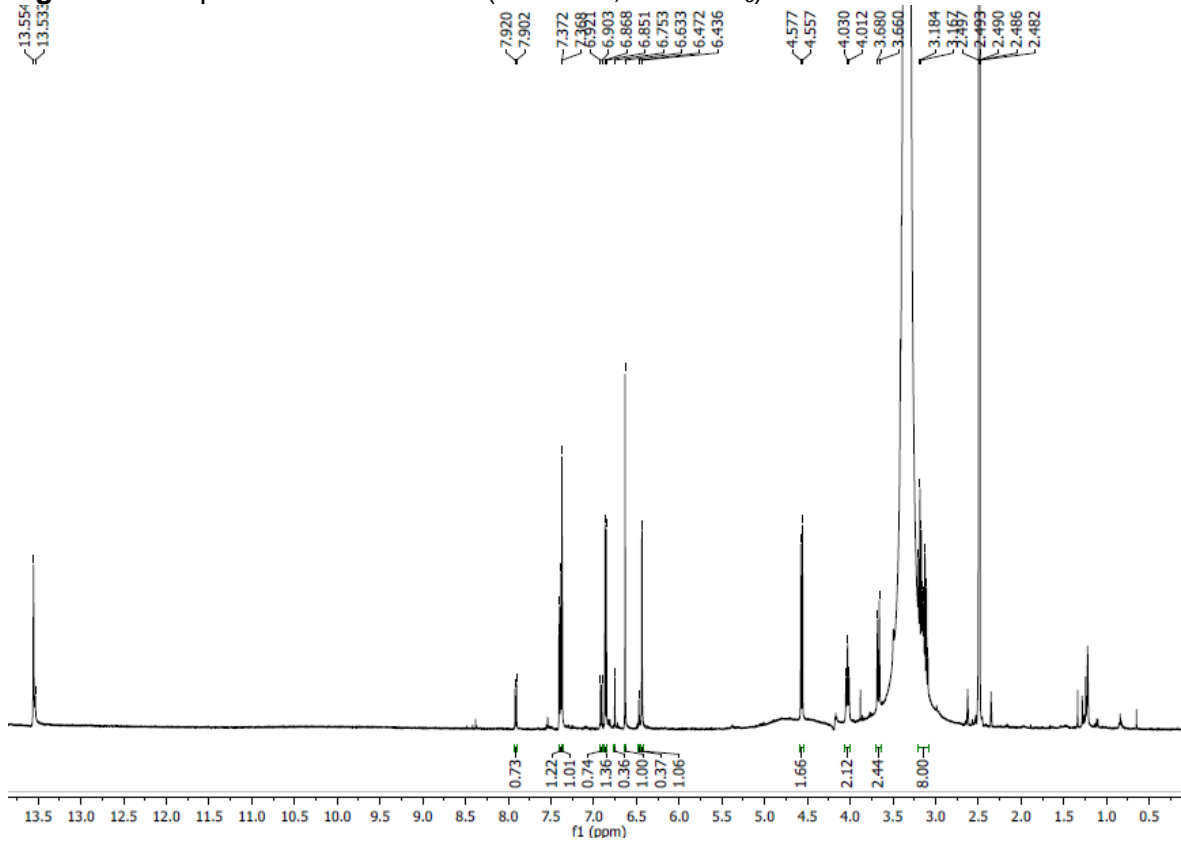


Figura 33 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-4** na região de 8,1-6,3 ppm.

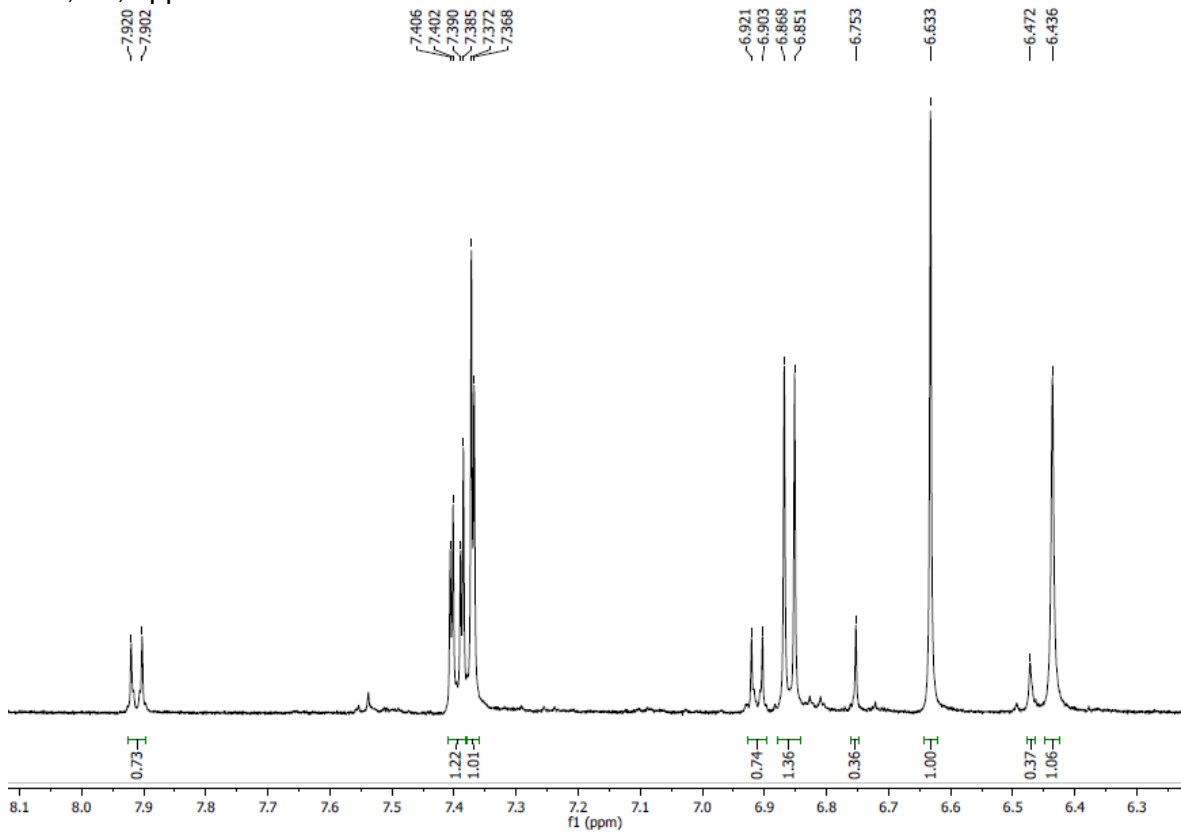


Figura 34 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **Zb-4** na região de 8,1-6,3 ppm.

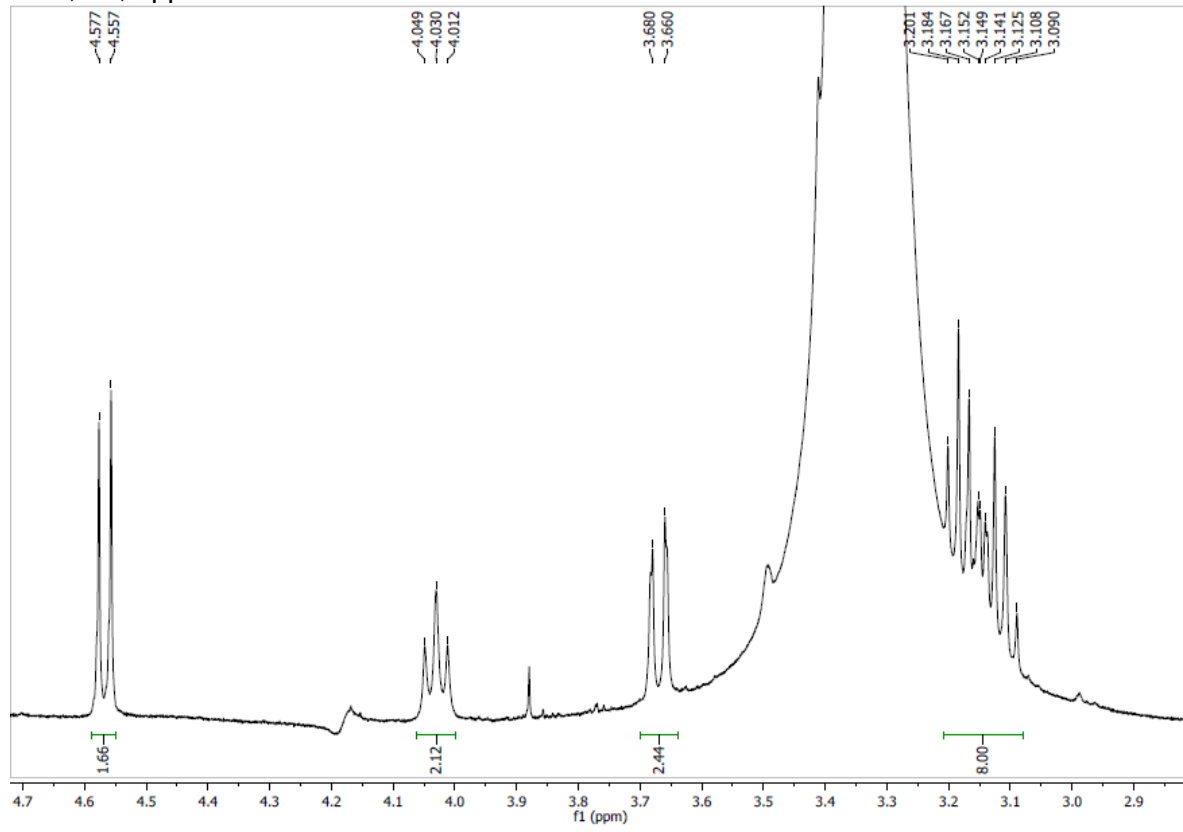
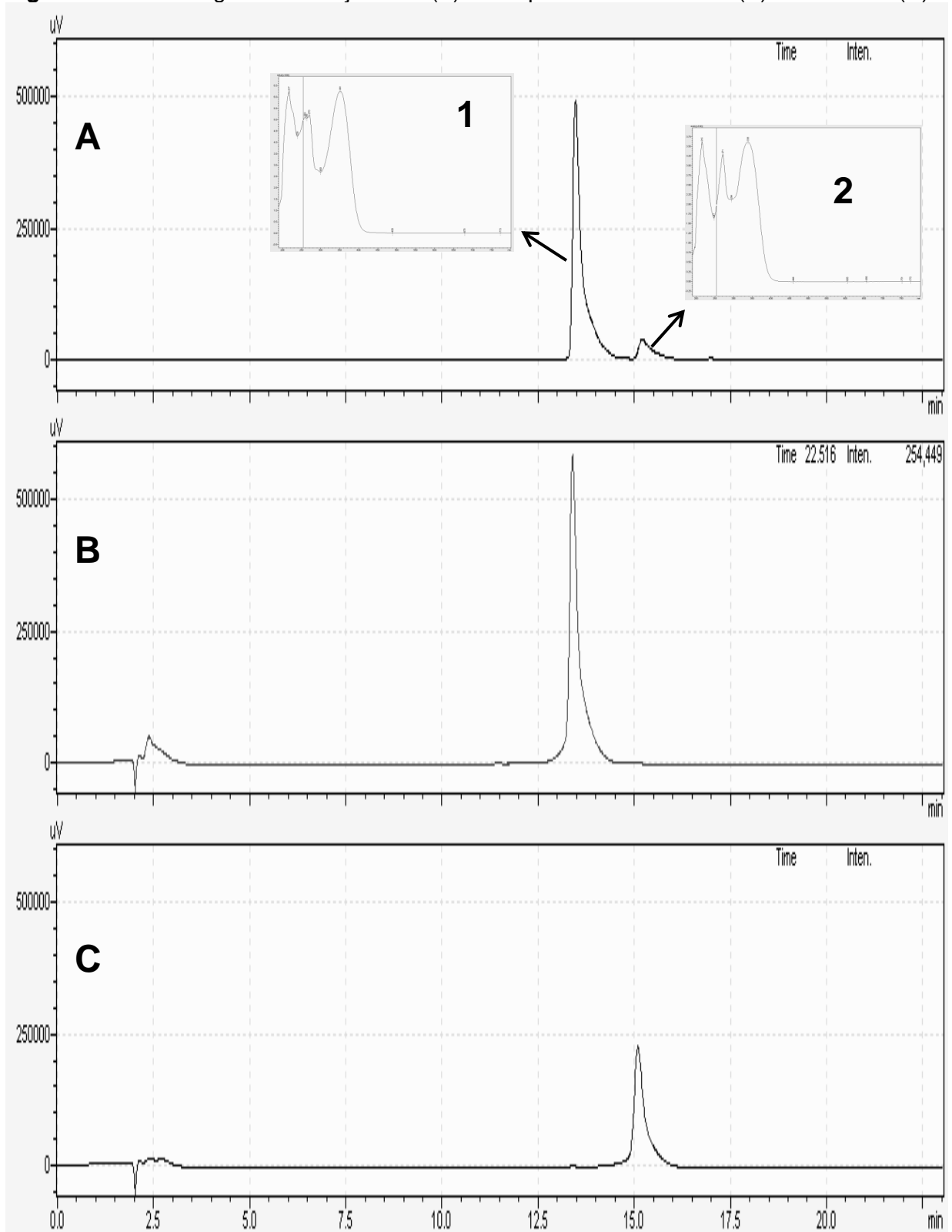


Figura 35 - Cromatograma da fração Zb-4(A) e dos padrões: isoorientina(B) e isovitexina(C).

(1): Espectro de UV da isoorientina.

(2): Espectro de UV da isovitexina

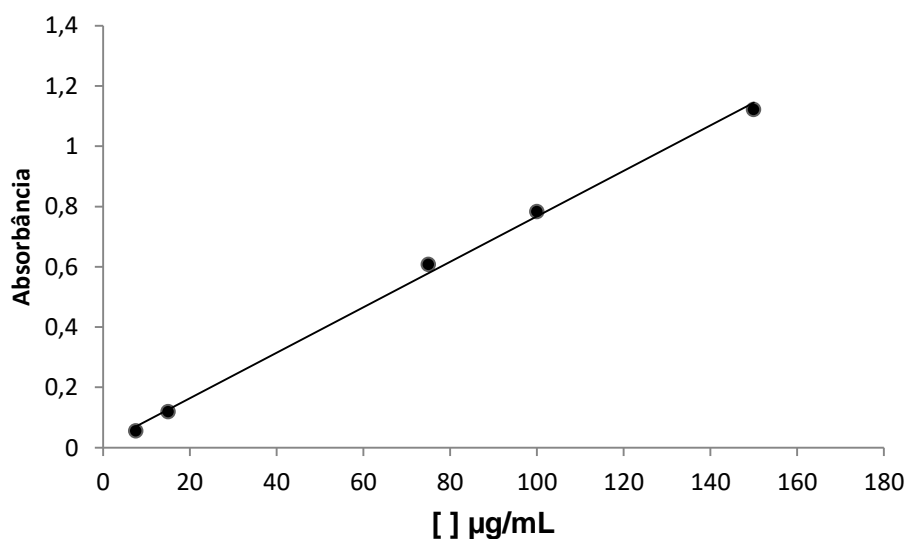
5.5 Avaliação do teor de fenólicos totais e da atividade antioxidante do EEB e frações de *Zornia brasiliensis*

5.5.1 Determinação do Teor de Fenólicos Totais

A realização da quantificação do teor de fenólicos das amostras a serem testadas foi realizada utilizando o método fotocolorimétrico Folin-Ciocalteu. Foi obtida uma curva padrão de ácido gálico, para posterior interpolação dos valores de absorbância obtidos nas amostras testadas. Após a regressão linear das concentrações de ácido gálico em função da absorbância foi fornecida a equação da curva de calibração: $y = 0,0075x + 0,013$, onde y é a absorbância a 765 nm, x é a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9977. (Figura 36, pág 93).

Os dados foram analisados por ANOVA e o pós-teste aplicado foi o de Tukey. A análise estatística mostra que as concentrações de fenólicos das amostras testadas são diferentes com o valor de $p < 0,001$. Os dados do pós-teste mostraram que as frações acetato de etila e acetato de etila-metanol 10% e as frações diclorometano e acetato de etila-metanol 50% não apresentam diferenças estatísticas significativas (Ver Figura 37, pág. 97).

Figura 36 - Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico versus as absorbâncias (765 nm) para o ensaio de Folin-Ciocalteu.



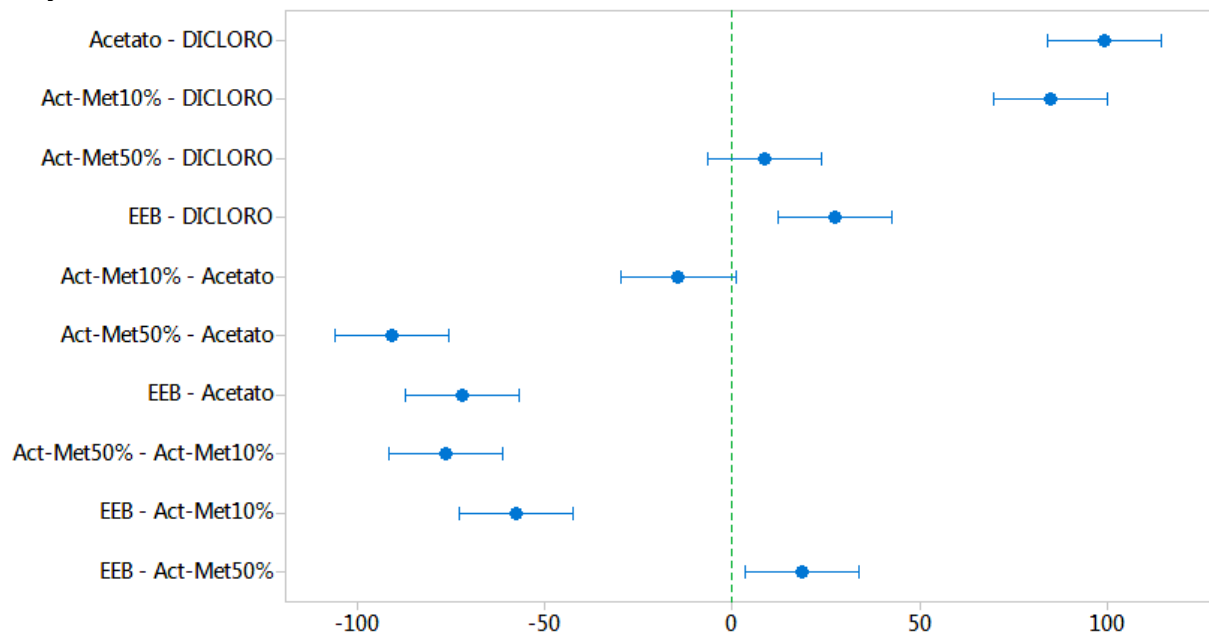
Foi observado nos valores encontrados referentes à quantificação de fenólicos totais (Ver Tabela 8, pág. 94), que as entre amostras analisadas, as que exibiram maiores concentrações desses compostos foram: a fração acetato de etila ($133,39 \pm 3,34$ mg EAG/ g) e a fração acetato de etila-metanol 10% ($119,5 \pm 5,68$ mg EAG/ g). Entre as frações testadas a fase acetato de etila, acetato de etila-metanol 10% e EEB apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos e a melhor atividade antioxidante entre as amostras testadas. Estes compostos provavelmente podem ser os responsáveis por este resultado.

Tabela 8 - Concentração média \pm coeficiente de variação de fenólicos totais encontradas no EEB e nas frações de *Zornia brasiliensis*.

Amostra	Teor de Fenólicos Totais (mg EAG*/ g)
EEB	$61,48 \pm 8,33$
Fração diclorometano	$34,19 \pm 8,92$
Fração acetato de etila	$133,39 \pm 3,33$
Fração acetato de etila-metanol 10%	$119,05 \pm 5,68$
Fração acetato de etila-metanol 50%	$42,69 \pm 18,05$

*Equivalente de ácido gálico.

Figura 37 - Valores das concentrações de fenólicos expressa em mg EAG / g do EEB e frações *Zornia brasiliensis*.



Se um intervalo não contiver o zero, as médias correspondentes serão significativamente diferentes. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A determinação do teor de compostos fenólicos totais é um importante parâmetro de avaliação da atividade antioxidante, pois esses compostos são objeto de estudo em inúmeros relatos encontrados na literatura, onde são os principais responsáveis nos vegetais pela atividade antioxidante apresentada (RAMOS, 2015).

Contudo, acredita-se que a atividade antioxidante de um extrato não pode ser explicada apenas com base em seu teor de fenólicos totais, sendo necessária também, a caracterização da estrutura do composto ativo (SOUZA et al., 2007; MELO et al., 2008; MORAIS et al., 2009). Assim, as diferentes características estruturais, os diversos mecanismos de ação dos compostos bioativos das amostras (MELO et al., 2008; SILVA et al., 2010) e a dependência das características do ambiente em que se encontram (pH e solubilidade) (PORTO, 2012), são possíveis explicações para os distintos resultados entre vários estudos (GONÇALVES; SANTOS; MORAIS, 2015).

5.5.2 Atividade Antioxidante

Os valores das concentrações da CE_{50} das amostras testadas e do ácido ascórbico, analisados pelo método do sequestro do radical DPPH estão demonstrados na Tabela 9 (pág. 96). Foi obtida uma curva padrão de ácido ascórbico como demonstrado na Figura 38 (pág. 95). Os dados foram analisados por ANOVA e o pós-teste aplicado foi o de Tukey. A análise estatística mostra que os valores da CE_{50} das amostras testadas e do padrão são diferentes com o valor de $p < 0,001$. Os dados do pós-teste mostraram que o EEB e as frações acetato de etila e acetato de etila-metanol 10% não apresentam diferenças estatísticas significativas (Ver Figura 39, pág. 96).

Figura 38 - Curva padrão para o teste de DPPH – ácido ascórbico.

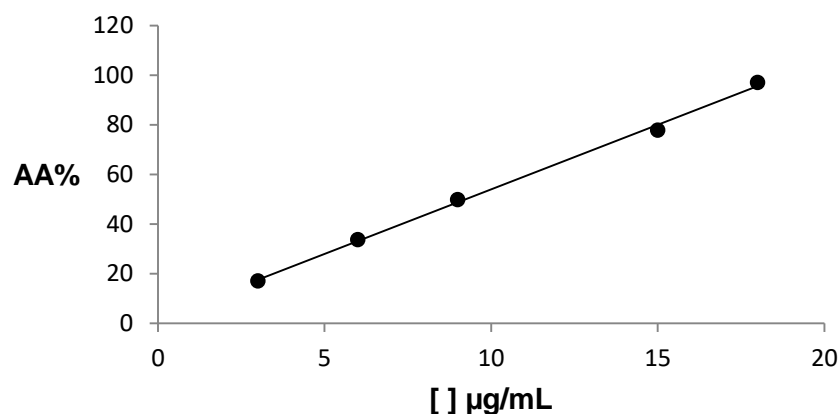
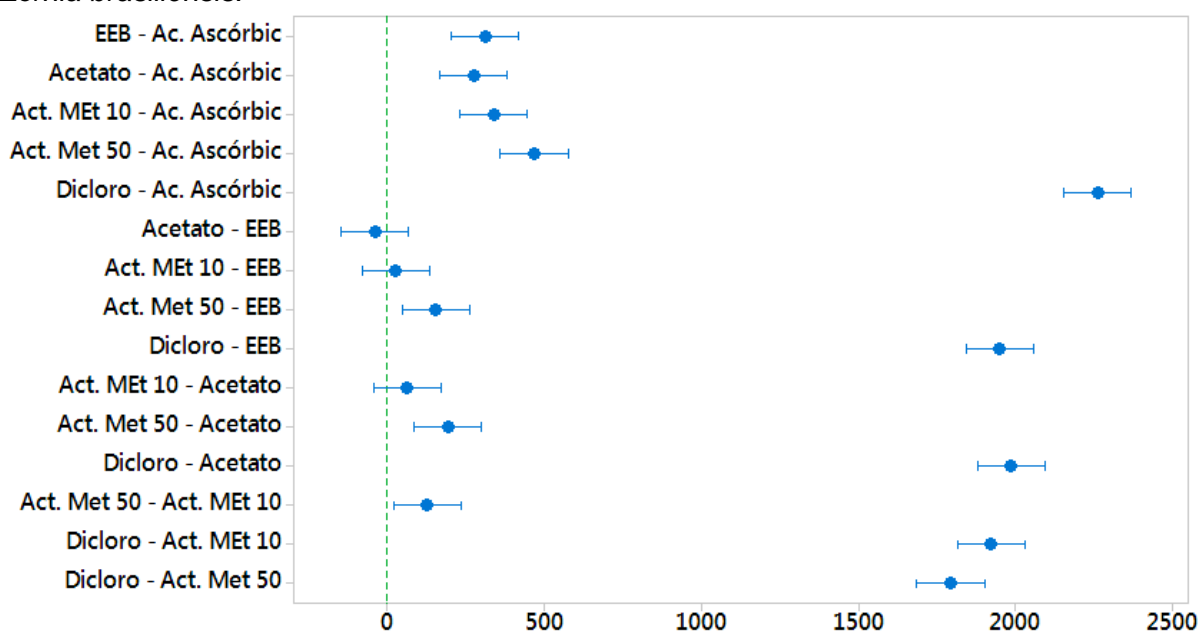


Tabela 9 - Determinação da CE_{50} a partir do teste de sequestro do DPPH.

Amostra	$CE_{50} \pm DP$ ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido Ascórbico	9,23 \pm 0,29
EEB	322,64 \pm 2,65
Fração diclorometano	2272,19 \pm 4,18
Fração acetato de etila	284,59 \pm 0,77
Fração acetato de etila-metanol 10%	350,19 \pm 0,85
Fração acetato de etila-metanol 50%	478,25 \pm 1,34

CE_{50} : Concentração efetiva para o antioxidante reduzir 50% do radical DPPH.

DP: Desvio padrão.

Figura 39 - Valores das CE_{50} expressa em $\mu\text{g/mL}$ do ácido Ascórbico, do EEB e frações *Zornia brasiliensis*.

Se um intervalo não contiver o zero, as médias correspondentes serão significativamente diferentes. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Todas as amostras testadas não apresentaram atividade antioxidante significativa comparada com o padrão utilizado, o ácido ascórbico.

A fração diclorometano apresentou a maior $CE_{50} = 2272,34 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$, desta forma apresentou uma atividade antioxidante irrelevante frente ao padrão utilizado no teste. Algumas características são fundamentais para a capacidade de sequestro de radicais na estrutura dos flavonoides, como a presença de um grupo catecol no anel B, já que a oxidação ocorre no anel B quando este grupo está presente, além de ter grande capacidade de doação de elétrons (BORS et al., 1999). Resultados

fitoquímicos dessa fração revelou o isolamento de três flavonas: 7-metoxiflavona, 5,7-dimetoxiflavona e 5-hidroxi-7-metoxiflavona (Quadro 1, pág. 33) (SILVA A., 2013). Os dados fitoquímicos corroboram com os resultados da atividade antioxidante da fração diclorometano, uma vez que nenhum destes flavonoides isolados desta fração apresenta hidroxilas fenólicas localizadas no anel B.

A fração acetato de etila apresentou menor $CE_{50} = 284,59 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$. As substâncias isoladas por Silva, A. (2013) nesta fração: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano e 2'-4'-dihidroxichalcona (Quadro 1, pág. 33), não apresentam os determinantes estruturais responsáveis por esta atividade nos flavonoides. Desta forma, faz-se necessário um maior aprofundamento fitoquímico nesta fração a fim de determinar quais substâncias fenólicas que podem estar relacionada com esta atividade antioxidante, tendo em vista que esta fração apresentou o maior teor de fenólicos totais.

A fração acetato de etila-metanol 10% exibiu uma $CE_{50} = 350,19 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ e apresentou o teor fenólicos totais semelhante à fração acetato de etila. Neste trabalho relatamos o isolamento de uma isoflavona glicosilada nesta fração: a ononina (ver pág. 67). As isoflavonas possuem o anel B na posição 3 do anel heterocíclico, afetando grandemente a capacidade de sequestro de radicais, de tal forma que se tornam mais potentes. O grupo 4'-hidroxi é necessário para a atividade de sequestro, sendo também importante a presença das substituições 5,7-diidroxi no anel A, contudo a metilação diminui a potência de atividade. Outro aspecto é a glicosilação dos flavonoides, que por sua vez, influencia de forma negativa a capacidade de sequestro de radical (OLDONI, 2007). A ononina por se tratar de uma isoflavona glicosilada, metoxilada e não possuir hidroxilas fenólicas não tem potencial de sequestrar radicais livres. A existência deste composto fenólico ou de outros com as mesmas características nesta fração acetato de etila-metanol 10% podem contribuir para com a diminuição da atividade antioxidante, contudo é necessário um maior aprofundamento fitoquímico nesta fração a fim de determinar quais substâncias fenólicas que podem estar relacionada com esta atividade antioxidante, tendo em vista que esta fração apresentou o maior teor de fenólicos totais.

A fração acetato de etila-metanol 50% exibiu uma $CE_{50} = 478,25 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, uma atividade não expressiva comparada com o ácido ascórbico. Nesta fração foram isoladas as flavonas: isoorientina e isovitexina (ver pág. 89). Apesar de estas flavonas possuírem uma dupla na posição 2 e 3 conjugada com uma carbonila em

4, o qual é responsável pelo deslocamento de elétrons no anel B (BORS et al, 1999) e hidroxilas fenólicas neste mesmo anel, em 4'(isorientina) e 3',4' formando o grupo catecol (isovitexina), mas a glicosilação, como em todos os flavonoides, reduz grandemente esta capacidade de sequestrar radicais (PIETTA, 2000). Esta redução da atividade antioxidante da fração acetato de etila-metanol 50% em relação à fração acetato de etila, é apoiada nos resultados encontrados na determinação dos fenólicos totais, além disto, esta diminuição de atividade pode estar relacionada com a presença destes compostos isolados ou de outros compostos glicosilados presentes nesta fração acetato de etila-metanol 50%.

O EEB apresentou uma $CE_{50} = 322,64 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ e o teor de fenólicos totais ($61,48 \pm 8,33 \text{ mgEAG/ g}$). Esta atividade antioxidante em extratos brutos é relacionada com as características estruturais dos constituintes fenólicos que estejam presentes neste extrato (SOUZA et al.,2007; MELO et al., 2008; MORAIS et al., 2009) e suas concentrações, já que esses compostos fenólicos podem atuar como agentes antioxidantes em baixas doses e pró-oxidantes em altas doses (ATSUMI et al., 2001; FUJISAWA et al., 2002; SAKIHAMA et al., 2002). Outro fator que pode ser determinante na atividade é o ambiente em que se encontram (pH e solubilidade) esses constituintes (PORTO, 2012). Além do mais, quando se trata de extratos, um ponto a ser considerado é o tipo de solvente utilizado na extração, então a seleção de uma metodologia de extração apropriada pode aumentar a concentração de compostos antioxidantes, potencializando o efeito, no entanto não existe uma que seja considerada mais eficiente (GONÇALVES, SANTOS, MORAIS, 2015). Diante disto, o efeito antioxidante de um extrato bruto, provavelmente seja uma resultante desses fatores que podem influenciar favoravelmente ou de forma negativa a capacidade de sequestrar radicais livres e conseqüentemente a atividade antioxidante. Neste estudo, o EEB não apresentou diferenças estatísticas significativas para a fração acetato de etila e acetato de etila-metanol 10%, sendo provável que estes constituintes presentes nestas duas frações sejam responsáveis pela atividade demonstradas pelo EEB.

*Considerações
finais*

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* resultou no isolamento de quatro substâncias. Da fração acetato de etila-metanol 10% foi isolado um isoflavonoide glicosilado, a ononina. Da fração acetato de etila-metanol 50% foram isolados o D-pinitol, a isoorientina e a isovitexina. Com exceção da ononina, os compostos foram isolados pela primeira vez no gênero *Zornia*.

O teste de avaliação do teor de fenólicos totais apresentou uma maior concentração destes compostos na fração acetato de etila e acetato de etila-metanol 10%. O estudo da atividade antioxidante através do método do sequestro do radical DPPH revelou uma maior atividade nas frações acetato de etila, acetato de etila-metanol 10% e EEB, resultado que pode ser associado ao fato destas frações terem apresentado os maiores teores de compostos fenólicos entre as frações testadas, sendo provável que os constituintes presentes nestas duas frações sejam responsáveis pela atividade demonstradas pelo EEB. Os compostos fenólicos relatados na literatura das frações diclorometano, e os obtidos neste estudo nas frações acetato de etila-metanol 10% e acetato de etila-metanol 50% corroboram com os resultados obtidos na atividade antioxidante.

As substâncias relatadas nesta pesquisa já são conhecidas na literatura, contudo este trabalho contribuiu evidenciando que esta espécie é bioprodutora de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides como demonstrado neste estudo fitoquímico corroborando com a quimiotaxonomia do gênero *Zornia* e da família Leguminosae. Apesar de já existir relatos da atividade antioxidante do EEB de *Z. brasiliensis*, este é o primeiro trabalho no qual as frações oriundas do EEB também são avaliadas.

É necessário que outros estudos fitoquímicos sejam realizados a fim de diminuir a escassez de relato de substâncias encontradas no gênero *Zornia*. Espera-se dar continuidade aos estudos de prospecção fitoquímica em *Z. brasiliensis*, além da padronização do EEB. Serão realizados os testes de atividades antitumoral e de citoproteção com diferentes extratos de *Z. brasiliensis*, uma vez que estas atividades são relacionadas aos compostos fenólicos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 398-406, ago./dez. 2013
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café : avaliação in vitro e em modelo alimentar** / Ana Amélia Paolucci Almeida. Belo Horizonte – MG, 2007
- ALMEIDA, M. V.; SILVA, A. D.; SOUZA, M. V. N; BENÍCIO, A. A. A. A cascata dos inositóis. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 105 - 111, 2003.
- ALMEIDA, M.N. Eficiência de um inseticida botânico no controle de ninfas de *Euphalerus clitoriae* (hemiptera: psyllidae). **Revista Controle Biológico** (BE-300) 2010. Online.http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTÃO, A. M. R. **Estudo de compostos bioactivos e actividades biológicas de *Plectranthus ecklonii* Benth.**/ ANA MARGARIDA RIBEIRINHA ANTÃO. Lisboa – Portugal, 2015.
- APROTOSOAIE, A. C.; RAILEANU, E.; ADRIANA, T.; CIONCĂ, O. The polyphenolic content of common Lamiaceae species available as herbal tea products in Romanian pharmacies. **Revista medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști**, v. 117, n. 1, p. 233–237, 2013.
- ARUNKUMAR, R.; NAIR, S. A., SUBRAMONIAM, A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v.3, p.233-41, 2012.
- ARUNKUMAR, R.; NAIR, S.A.; RAMESHKUMAR, K.B.; SUBRAMONIAM, A.The essential oil constituents of *Zornia diphylla* (L.) Pers, and anti-inflammatory and antimicrobial activities of the oil (Article). **Records of Natural Products**, v. 8, n. 4, p. 385-393, 2014.
- ASIF, M.; KHODADADI, E. Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 119-138, 2013.
- ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; FUJISAWA, S.; UEHA, T.. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. **Biomaterials**, v. 22, p.1459-1466, 2001.

AYMARD, G. A. *Zornia*. In STEYERMARK, J. A.; BERRY, P. E.; YATSKIEVYCH, K.; HOLST, B. K. (ed). **Flora of the Venezuela Guayana**. Missouri Botanic Garden Press. St. Louis. v. 5, 1999.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.12, n. 1, p. 43, 2013.

BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v,11, n. 3, p. 313-322, 2007.

BATES, S. H.; JONES, R. B.; BAILEY, C. J. Insulin-like effect of pinitol. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p.1944-1948, 2000.

BATISTA, T. M. Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vog. (fabaceae)./ **Trabalho de conclusão de curso (Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB**. p. 36. 2013.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza online**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BLARDI, P.; DE LALLA, A.; VOLPI, L.; DI PERRI, T. Stimulation of endogenous adenosine release by oral administration of quercetin and resveratrol in man. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 25, p. 105-110, 1999.

BORS, W.; MICHEL, C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11/12, p. 1413–1426, 1999

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In : CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, gene expression and cellular function**. Marcel Decker: New York, v.105, p.1-25, 1997.

BRAHMACHARI, G.; GHOSH, S.; MONDAL, S.; JASH, S. K.; MANDAL, L. C.; MONDAL, A. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. **Biochemistry: An Indian Journal**, v. 3, n. 1, p. 32-35, 2009.

BRASIL, 2015. Biodiversidade Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidadebrasileira> Acesso em: 07/02/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012. 156 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica ; n. 31)

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes em Subprodutos do Pseudofruto de Caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p. 902-908, out./dez., 2007.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Ed. Acribia S.A., 1ª ed., 594 p. 1991.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI T. L. C.; PRADO A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009

ÇALIS, İ.; S. BIRINCIOĞLUB S.; KIRMIZIBEKMEZA, H.; PFEIFFERC, B.; HEILMANN J. Secondary Metabolites from *Asphodelus aestivus*. **Z. Naturforsch**, v. 61b, p. 1304 – 1310, 2006.

CAMMERER. M. A. **Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo, inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado** / MAGDA AMBROS CAMMERER. Porto Alegre – RS. 2012.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C.. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology** v. 51, n.15, 2012.

CARVALHO, H. F.. **Avaliação da adição dos protetores celulares mio-inositol e ácido ferúlico ao meio de congelação na qualidade do sêmen criopreservados de equinos** / Henrique Fulaneti Carvalho. – São Paulo-SP. 2013.

CARVALHO, J. S. B. et al. Acúmulo de solutos orgânicos em genótipos de bananeira (*Musa* spp.) sob estresse salino in vitro. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, MG, v. 2, n. 1, p. 1-52, 2006.

CHAUBAL, R. et al. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of Dpinitol– a bioactive carbohydrate. **Chemistry & Biodiversity**. vol.2, 2005.

CHIAPPETA, A. D. A.; DE MELO, J. F.; Higher Plants with biological activity. Plants of Pernambuco. II. III. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 11, n.1/2, p. 99-111, 1984.

COSTA, E. V.; MENEZES, L. R. A.; ROCHA, S. L. A.; BALIZA, I. R. S.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P.: Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n.07, p. 563-567, 2015

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoides and phenolic acids. **Towards Prolongation of the Healthy Life Span**, v.854, p.435-443, 1998.

DA SILVA, A. D. S.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; DA MATTA, C. B. B.; DE FARIAS SILVA, D.; DE ARAÚJO, M. V.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, M. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated

from *Zornia brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1695-1699, 2013.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.

DAVIES, K.J.A. Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects. Oxford: **Pergamon**, p. 910, 1991.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33- 40, Jan./Jun., 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products : a biosynthetic approach** / Paul M. Dewick. – 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd. 2009

DO NASCIMENTO, S. C.; DE MELO, J. F.; CHIAPPETA, A. D. A. Cytotoxic agentes. Experiments with KB cells. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 22, n. 1/2, p. 19-26, 1985.

DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T. B.; GARCIA, F. C. P. Papilionoideae (Leguminosae) nos campos ferruginosos do parque estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: florística e fenologia. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 493-504, 2005.

EINHELLIG, F. A. Mode of action of phenolic compounds. Pp. 217-238. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G (Ed.). Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals. **Boca Raton**, CRC Press. 2004.

ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Beneficial effects of soy isoflavones on chronic diseases. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 43-52, 2001.

FEDOREYEV, A. S.; BULGAKOV, V. P.; GRISHCHENKO, O. V.; VESELOVA, M. V.; KRIVOSCHEKOVA, O. E.; KULESH, N. I.; DENISENKO, V. A.; TCHERNODED, G. K.; ZHURAVLEV, Y. N., Isoflavonoid Composition of a Callus Culture of the Relict Tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7023–7031, 2008.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@ambiente**, On-line, v. 2, p. 57-60, 2008.

FIRMINO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO-SANTOS, M.; OLEA, R. S. G. CONTEXTO HISTÓRICO, USO POPULAR E CONCEPÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS. **Caderno de Pesquisa**. São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Revista MultiCiência**, São Paulo, n. 7. out. 2006.

FORTUNA-PEREZ, A. P.; LEWIS, G. P.; QUEIROZ, R. T.; SANTOS-SILVA J.; TOZZI, A. M. G. A.; RODRIGUES, K. F. Fruit as diagnostic characteristic to

recognize Brazilian species of *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae). **Phytotaxa**, v.219, n. 1, p.027–042, 2015.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S. de; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. **Síntese da diversidade brasileira**. In: FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F.; BICUDO, C. E. M.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. (Ed.). Catálogo de plantas e fungos do Brasil Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1 p. 21-42, 2010.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v. 177, p. 39-54, 2002.

GARCEZ, F. R.; W. S. GARCEZ, HAMERSKI, L.; MIGUITA C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009

GONÇALVES, J. H. T.; SANTOS, A. S.; MORAIS, H. A. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 486-497, 2015.

GONÇALVES, T. L.. Avaliação do estresse oxidativo e da atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase em pacientes transplantados de medula óssea / **Tese de doutorado (Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS**. p. 107. 2008

GREENWOOD, M. et al. D-pinitol augments whole body creatine retention in man. **Journal of Exercise Physiology**, v. 4, n. 4, nov., 2001.

GREETHA, K. M.; SHILPA, S.; MURUGAN, V. Anticonvulsant Activity of the Methanolic Extract of Whole Plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 7, p. 3670-3672, 2012.

GUARIN NETO, G.; MORAIS, R. G.. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasilica**, v. 17, n.4. p. 1, 2003.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since. **Phytochemistry**, v.52, p.481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HUANG, D.; GUO, W.; GAO, J.; CHEN, J.; OLATUNJI, J. O. *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau Ethanol Extract Inhibits Hepatoma in Mice through Upregulation of the Immune Response. **Molecules**, v. 20, p. 17405-17428, 2015.

IGNOATO, M. C. **Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico – Paraná** / Marlene Capelin Ignoato – 2012. xxiii, 209 f. : il. ; 30 cm

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY.
Nomenclature of Cyclitols. Disponível em:
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/cyclitol> <acesso: 16/01/2016>.

JEE, J. P.; LIM, S. J.; PARK, J. S.; KIM, C. K. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 2, p. 134-9, 2006.

KIATKOSKI, E. C. Estudo fitoquímico dos frutos e sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel E *Pterodon polygalaeiflorus* Benth. / **Dissertação de mestrado (Ciências Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.** p. 97. 2011.

KLOOS, H.; THIONGO, F. W.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E. Preliminary evaluation of some wild and cultivated plants for snail control in machakos district, Kenya. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 197-204, 1987.

LAXANE, S .N.; SWARNKAR, S. K., SETTY, M. M. Antioxidant studies on the ethanolic extract of *Zornia gibbosa*. **Pharmacologyonline**, v.1, p. 319-330, 2008.

LAXANE, S. N.; SWARNKAR, S. K.; ZANWAR, S. B.; MANJUNATH SETTY, M. Anti-inflammatory studies of the alcoholic extract of *Zornia gibbosa*. **Pharmacology online**, v. 1, p. 67-76, 2011.

LEUNER, O.; HAVLIK, J.; PROKUDINA, J. H. E.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 92, n. 15, 2012.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens, Kew**, p.577, 2005.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**. v. 325, p. 161-165, 2009.

LIMA, H. C. Leguminosas arbóreas da mata atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florística em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro. / **Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.** p. 151. 2000.

LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; SOUZA, V. C.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; FORTUNATO, R. H.; VAZ, A. M. S. F.; SOUZA, E. R., FILARDI, F. R.; VALLS, J. F. M.; GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M.; SILVA, R. C. V. M.; FORTUNA-PEREZ, A. P.; MANASANO, V.; MIOTTO, S. T. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MEIRELES, J. E.; LIMA, L. C. P.; OLIVEIRA, M. L. A. A.; FLORES, A. S.; TORKE, B. M.; PINTO, R. B.; LEWIS, G. P.; BARROS, M. J. F.; RIBEIRO, R. D.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, R. T.; KLITGAARD, B. B.; RANDO, J.

G.; SCALON, V. R.; CARDOSO, D. B. O. S.; COSTA, L. C.; SILVA, M. J.; MOURA, T. M.; BARROS, L. A. V.; SILVA, M. C. R.; QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B.; CAMARGO, R. 2010. Fabaceae. In **Catálogo das Plantas e Fungos do Brasil** (FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J. F.; BICUDO, C. E. M.; JUNIOR, A. C.; A. COSTA; COSTA, D. P.; HOPKINS M. J. G.; LEITMAN P.; LOHMANN, L. G.; MAIA, MARTINELLI, L. C.; MENEZES, G. M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J.; SYLVESTRE, L.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D., org.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 2, p. 989-1102, 2010.

LIRA, D. P. Flavonóides isolados de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae) / **Dissertação de mestrado (Produtos Naturais) – Universidade Federal da Paraíba - João Pessoa – PB.** p. 169. 2009.

LOEWUS F. A.; MURTHY P.P.N *myo*-Inositol metabolism in plants **Plant Science**, v. 150, p. 1 – 19, 2000.

LOLINGER, J. The use of anioxidante in food, In: O Auroma & B . Halliwell, Free radical in food additives. London, **Taylor & Francis**, p. 121,1991.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A. S. Flavonoides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 17, p. 18-22, 2000.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, n. 20, p, 2399-407, 2005 .

MEDINA, J. H.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; MARDER, M.; WASOWSKI, C.; CALVO, D.; PALADINI, A. C. Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. **Neurochemical Research**, v. 22, p. 419-425, 1997.

MELO, E. A. et al. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladasde frutas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 67-72, 2008.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v. 48, n. 3, p. 577-99, 2000.

MESQUITA NETO, J. N.; SOUZA, L. F. Etnoecologia de plantas medicinais: uma compilação de dados do cerrado goiano. In: IX Congresso de Ecologia do Brasil, 2009, SãoLourenço. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**. São Lourenço: Sociedade de Ecologia do Brasil, set. 2009. p. 1-3.

MINGUZZI, S.; BARATA, L. E. S.; CORDELL, G. A.. Derivados citotóxicos de vitanolidos isolados das folhas de *Acnistus arborescens*. **Química Nova** [online], v.34, n. 2, p. 237-241, 2011.

MIOTTO, S. T. S., LÜDTKE, R.; OLIVEIRA, M. L. A. A. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 269-290, jul./set., 2008.

MOHAMMED, R. S.; ABOU ZEID, A. H.; EL HAWARY, S. S.; SLEEM, A. A.; ASHOUR, W. E. Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 547–553, 2014.

MOHLENBROCK, R.H. A monograph of the leguminous genus *Zornia*. **Webbia**, v. 16, p. 1-141, 1961.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NGUYEN, A.; LAMANT, A. Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedlings of maritime pine. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3423-3427, 1988.

NOVAES, P. **Alelopatia e bioprospecção em *Rapanea ferruginea* e *Rapanea umbellata***/ Paula Novaes. São Carlos - SP, 2011.

NUNES, X. P. et al., Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 718-723, 2008.

OBI, C. L.; RAMALIVHANA, J.; SAMIE, A.; IGUMBOR, E. O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolated from stool samples of patients in the venda region of South Africa. **Journal Health Population Nutrition**, v, 25, n. 4, p. 428-235, 2007.

OLDONI, T. L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* / **Dissertação de mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP.** p. 104. 2007.

OLIVEIRA, M. M.; EINICKER - LAMAS, M. Inositol metabolism in *Trypanosoma cruzi*: potential target for chemotherapy against chagas' disease. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 3, p. 413 - 419, 2000.

OLIVEIRA, R. R. B.; GÓIS, R. M. O.; SIQUEIRA, R. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V. R.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.3. João Pessoa, 2009.

OSTLUND, R. E.; SHERMAN, W. R. Pinitol and derivatives there of for the treatment of metabolic disorders. **United States Patent no. 5,8827,896**. 1996.

PALACE, V. P.; KHAPER, N.; QIN, Q.; SINGAL, P. K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n.5-6, 1999.

PALADINI, A. C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J. H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 519-526, 1999.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D. Estudo farmacognóstico das folhas de Pimenta *pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum - Myrtaceae **Revista Brasileira de farmacognosia**, vol.18, n. 2, João Pessoa, Abr./Jun, 2008

PEREZ, A. P. F. O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia. / **Tese de doutorado (Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP**. p. 271. 2009.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products, Pittsburgh**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: **Varela**; 2005.

POLHILL, R. M. Classification of the Leguminosae. In BISDY, F. A.; BUCKINGHAM, J.; HARBORNE, J. B. (ed.) **Phytochemical Dictionary of the Leguminosae**. Chapman & Hall, New York, v. 1, p. 35-48, 1994.

POONGOTHAI, G.; SRIPATHI, S. K. A review on insulinomimetic pinitol from plants. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 992 – 1009, 2013.

Porto, Marília de Paula. **Ação moduladora do citral e eugenol em eventos genéticos em macrófagos murinos in vitro**. / Marília de Paula Porto. – Botucatu - SP: [s.n.], 2012

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Journal of Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-36, 2007.

Ramos, R. F. de A. **CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Roupala paulensis* Sleumer (PROTEACEAE)** / Roseana de Araújo Farias Ramos. – João Pessoa-PB, 2015.

RAPORU, S. **Yabani Sinameki (*Colutea cilicica* Boiss et Bal.) Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi** / Sonuç Raporu. Tukat, 2012.

REN, F. Z.; GAO, Y. Q.; CHENG, X. X.; LI, L. H.; CHEN, S. H.; ZHANG, Y. L. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 03, 2012.

RINALDO, D.; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, J.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. New flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** [online], v.18, n.6, p. 1132-1135, 2007.

ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS, J. I.; SERRANO, V.; PACHECO, S. Spasmolytic activity of some plants used by the otomi indians of queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, v. 6, n. 5, p. 367-371, 1999.

SAFRANY, S. T.; CAFFREY, J. J.; YANG, X. N.; SHEARS, S. B. Diphosphoinositol polyphosphates: The final frontier for inositide research? **Biological Chemistry**, v. 380, p. 945-951, 1999.

SAIARDI, A., SCIAMBI, C., MCCAFFERY, J.M., WENDLAND, B., SNYDER, S.H. Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 14206-14211, 2002.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, v. 177, p. 67-80, 2002.

SALDANHA, L. A.. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguaiense*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)** / Luciana Arias Saldanha. – São Paulo, 2005.

SANDHAR, H.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, v. 1, n. 1, p. 25–41, 2011.

SCIAMARELLI, A. *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo. / Alan Sciamarelli – Campinas - SP, 1994.

SCIAMARELLI, A.; TOZZI, A. M. G. A. *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica*, v. 10, p. 237-266, 1996.

SHAHIDI, F; JANITHA; P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 32, n.1, p. 67-103, 1992.

SHEN, X.; XIAO, H.; RANALLO, R.; WU, W.H.; WU, C. Modulation of ATPdependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphate. *Science*, v. 299, p. 112-114, 2003.

SILVA, A. D. S.. Flavonoides de *Zornia brasiliensis* e atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona / **Dissertação de mestrado (Produtos Naturais) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.** p. 151. 2013.

SILVA, A. E. S.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica das cascas do caule do cajueiro (*Anacardium occidentale* L. – Anacardiaceae). *Estação Científica (UNIFAP) Macapá*, v. 3, n. 2, p. 81-88, jul.-dez. 2013

SILVA, C. A. Análise da composição da madeira de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau-brasil): subsídio para o entendimento de sua estrutura e resistência a organismos xilófagos/ **Tese de doutorado (Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.** p. 132. 2007.

SILVA, C.L.; SILVA K.G.S.; FEITOSA A. C. S.. A expansão do diabetes e o uso de fitoterápicos extraído das plantas do gênero *Bauhinia*. *Revista Digital de Pesquisa CONQUER da Faculdade São Francisco de Barreiras*, v.3, 2008.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

- SILVA, T. S. Constituintes químicos e atividades farmacológicas de *Calliandra umbellifera* Benth. (Fabaceae) / **Dissertação de mestrado (Produtos Naturais) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.** p. 150. 2013.
- SIMÕES, C.M.O. [et al] (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2007.
- SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae) **Biota Amazônia**, Macapá, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015.
- SINGH, R. K. et al. Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. **Fitoterapia**, v. 72, p. 168-170, 2001.
- SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMESRSCHI MIDT, R.; SAFIR, G. R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, n. 1, p. 63-121, 1991.
- SLATER TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**; v.222, n.1, p.1-15, 1984.
- SOARES, M.; WELTER, L.; MARTA, E.; KUSKOSKI, L.; GONZAGA, R. F. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante da Casca de Uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 059-064, Março, 2008.
- SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v 15, n.1, p.71-81, jan./abr., 2002.
- SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SPRENT, J. I. "Nitrogen fixation e growth of non-crop legume species in diverse environments". **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, , v. 2/2, p. 149, 1999.
- SZABO, M. E. Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica in vitro) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae) / **Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.** p. 108. 2015.
- TUCKER, S. C. Floral Development in Legumes. **Plant Physiology**, v.131. p. 911–926, 2003.
- VAN WYK, B-E.; ALBRECHT, C. A review of the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 119, p. 620–629, 2008.
- VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 519-528, 2005.
- VEIGA-JÚNIOR, C.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERNON, D. M.; TARCZYNSKI, M. C.; JENSEN, R. G.; BOHNERT, J. Cyclitol production in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v. 4, p. 199-205, 1993.

VIDHATE, M.; RANADE, A.; VIDHATE, B.; BIRAJDAR, P. Isolation, characterisation and quantification of extracted d-pinitol from *Bougainvillea spectabilis* stem bark. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 7, p. 1669-1683, 2015.

WENG, X. C.; WANG, W. Antioxidante activity of compo unds isolated from *Salvia plebeia*. **Food Chemistry**, v. 71, p. 489-493, 2000.

YORK, J. D.; ODOM, A. R.; MURPHY, R.; IVES, E. B.; WENTE, S. R. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. **Science**, v. 285, p. 96-100, 1999.

YU, DE-HONG, BAO, YONG-MING, WEI, CHAO-LIANG, AN, LI-JIA Studies of Chemical Constituents and Their Antioxidant Activities From *Astragalus mongholicus* Bunge **BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES**, v. 18, p. 297-301, 2005.