

Avaliações fitoquímica, fitotóxica e antifúngica da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens Benth* (sucupira branca)**Phytochemical, phytothoxic and antifungal evaluations of stem bark of *Pterodon pubescens Benth* (sucupira branca)**

DOI:10.34117/bjdv6n10-258

Recebimento dos originais: 13/09/2020

Aceitação para publicação: 13/10/2020

Claudemir Batalini

Doutor em Química Orgânica pela USP/FFCLRP - Ribeirão Preto - SP
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso - CUA
Endereço: Rod. MT 100, km 3,5 - Zona Rural, Pontal do Araguaia - MT
E-mail: pirapotimao@msn.com

Lucas Omar Stocco

Bacharel em Farmácia Generalista pela UFMT/CUA - Barra do Garças - MT
Instituição: Farmácia Mais Econômica, Porto Velho - RO
Endereço: Av. Jatuarana, 5630 - COHAB, Porto Velho - RO
E-mail: lucas_o_s@hotmail.com

Rubian Trindade da Silva Fernandes

Doutora em Saúde e Desenvolvimento pela UFMS - Campo Grande - MS
Instituição: Prefeitura Municipal de Barra do Garças - MT - UPA
Endereço: Rua José Maurício Zampa, s/n - Setor Industrial, Barra do Garças - MT
E-mail: rubiantdsf@gmail.com

Jair Marques Junior

Mestre em Ciência de Materiais pela UFMT/CUA - Barra do Garças - MT
Instituição: POLITEC - Gerência de Medicina Legal Paul Harris
Endereço: Rua Independência, 210, Barra do Garças - MT
E-mail: jairmarquesjunior@yahoo.com.br

RESUMO

Estudos químico-farmacológicos visando a obtenção de novos fármacos a partir de produtos vegetais são de grande importância na indústria. Este trabalho relata pela primeira vez a análise fitoquímica em meio hidrofílico e lipofílico para detecção de metabólitos secundários presentes no extrato bruto da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens Benth* (sucupira branca), uma planta típica do Cerrado, bem como as avaliações do potencial antifúngico e tóxico do extrato bruto da entrecasca e de quatro frações obtidas a partir do extrato bruto por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, ainda não descritos na literatura. Os resultados da análise fitoquímica foram realizados seguindo-se procedimento da literatura, informando dados positivos a uma série de metabólitos secundários, com destaque àqueles com potencial antioxidante. O extrato hidrofílico apresentou um maior número de resultados positivos para os metabólitos estudados. A investigação do potencial tóxico, tanto do extrato bruto como das quatro frações semipuras frente às larvas de *Artemia salina* Leach indicou valores de CL50 que comparado a dados da literatura situaram-se nas faixas de moderadamente a fracamente tóxicos. A avaliação da atividade antifúngica revelou que os extratos particionados hexano e acetato de etila são sensíveis à inibição de *Candida albicans*, comparado com padrão positivo, enquanto o extrato bruto lipofílico e as frações clorofórmio e 1-butanol

apresentam maior atividade de inibição. Os estudos realizados sinalizam que o extrato bruto hidroetanólico da entrecasca do caule de *P. pubescens* contém substâncias que possam conferir propriedades medicinais, além do uso seguro para fins terapêuticos.

Palavras-chave: Fitoquímica. Planta medicinal. Potencial antifúngico. *Pterodon pubescens*. Toxicidade.

ABSTRACT

Chemical-pharmacological studies aiming to obtain new drugs from plant products are of great importance in the industry. This work reports for the first time the phytochemical analysis in hydrophilic and lipophilic medium for detection of secondary metabolites present in the crude extract of the stem bark of *Pterodon pubescens* Benth (sucupira branca), a typical plant from the Cerrado, as well as the evaluations of the antifungal potential and toxic of the crude extract and of four fractions obtained from the crude extract by liquid-liquid partition with solvents of different polarities, not yet described in the literature. The results of the phytochemical analysis were performed following a procedure in the literature, reporting positive data to a series of secondary metabolites, with emphasis on those with antioxidant potential. The hydrophilic extract showed a greater number of positive results for the studied metabolites. The investigation of the toxic potential, both of the crude extract and of the four semi-pure fractions against the larvae of *Artemia salina* Leach indicated values of LC50 that compared to data in the literature were in the ranges of moderately to weakly toxic. The evaluation of antifungal activity revealed that the hexane and ethyl acetate partitioned extracts are sensitive to the inhibition of *Candida albicans*, compared to a positive pattern, while the crude lipophilic extract and the chloroform and 1-butanol fractions show greater inhibition activity. The studies carried out indicate that the crude hydroethanolic extract of the stem bark of *P. pubescens* contains substances that can confer medicinal properties, in addition to its safe use for therapeutic purposes.

Keywords: Phytochemistry. Medicinal plant. Antifungal potential. *Pterodon pubescens*. Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado se constitui em uma rica e singular biodiversidade, cuja importância é reconhecida mundialmente. Apenas atrás da Amazônia em extensão, o Cerrado compreende uma área com pouco mais de dois milhões de quilômetros quadrados (em torno de 24% do território brasileiro), tendo sua maior parte localizada na região Centro-Oeste do país (BRASIL, 2007; SANTOS *et al.*, 2020). Batalha (2011) defende que o Cerrado não se trata de um único bioma, mas sim uma constituição complexa de três biomas: campo tropical, floresta estacional e a savana, cada um com suas próprias características quanto à fauna e flora.

Alvo de intenso processo de devastação, principalmente a partir da década de 70, os esforços no sentido de ampliar a conservação do Cerrado por meio de leis ainda são insuficientes e muitas vezes ineficientes, conforme relata Franco, Ganem e Barreto (2016). Estima-se que menos de 10% da área total do Cerrado encontra-se legalmente protegida (BARBOSA, 2017). Com relação à sua vegetação, encontram-se catalogadas em torno de 12 mil espécies (SANO *et al.*, 2019), entretanto, a

expressiva maioria ainda carente de estudos químico-farmacológicos. A importância do uso de produtos naturais na terapêutica é reconhecida desde tempos remotos (BARREIRO; FRAGA, 2001; DUTRA *et al.*, 2016). Neste contexto, produtos naturais obtidos a partir de plantas revelam um valor incalculável para a sociedade, contribuindo significativamente para a melhoria da qualidade de vida da população (DEVIANE; RADDI; POZETTI, 2004). As plantas superiores, desta maneira, constituem-se em matérias primas vitais para o desenvolvimento de novos fármacos.

Em dois artigos científicos recentes (CARVALHO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2020) descrevem uma série de espécies vegetais típicos do Cerrado que exibem propriedades medicinais e são usadas tradicionalmente pela população como recurso terapêutico, com destaque àquelas com ação diurética, adstringente, antifúngica, antiulcerogênica, antitumoral, antiinflamatória, hipoglicemiante, no tratamento de distúrbios gastrointestinais, dentre outros. A planta alvo deste trabalho é originária do Cerrado brasileiro e apresenta o nome oficial de *Pterodon pubescens* Benth e sinonímia *Pterodon emarginatus* Vogel. Recebe como nomes populares mais comuns “faveiro” ou “sucupira branca” (LORENZI, 2002). Na medicina popular, infusões do caule, raízes e do óleo das sementes são empregados como analgésicos e nos tratamentos de infecções de garganta e reumatismo (ALMEIDA *et al.*, 1998; HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010).

O presente estudo realizou investigações fitofarmacológicas a partir da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* (sucupira branca), que foram a identificação fitoquímica em meio hidrofílico e lipofílico de diferentes classes de metabólitos secundários presentes na entrecasca, bem como investigações do potencial tóxico e antifúngico do extrato bruto hidroetanólico e de quatro frações obtidas a partir do extrato bruto por extração com solventes de polaridades diferentes.

2 METODOLOGIA

Obtenção do material vegetal e processamento

A coleta da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* (sucupira branca) foi realizada em fevereiro de 2009, na Unidade I da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia, Pontal do Araguaia (MT), Brasil. A posição geográfica está localizada em 15°55'08.4"S 52°16'42.9"W. Foram coletados cerca de 3,5 kg de material com auxílio de facão. A identificação taxonômica da planta foi realizada no Herbário da UFMT/CUA - Unidade I, Pontal do Araguaia (MT), cadastrada sob número 1950. Inicialmente, todo o material vegetal foi mantido em estufa a 40°C para secagem, sem contato com a luz solar. Em seguida o material foi triturado em moinho de bolas até a forma de pó e armazenado à temperatura ambiente, em frasco fechado e sob o abrigo de luz.

Preparação do extrato bruto da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* (sucupira branca)

Para a preparação do extrato bruto, 1000 g de entrecasca do caule na forma de pó foi submetido à extração por 10 dias com 6 L de solução hidroetanólica etanol:água destilada (8:2), à temperatura ambiente, proteção de luz e agitação ocasional. Após esse período, o extrato foi filtrado, separando o material sólido do extrato hidroetanólico. O solvente foi recuperado em evaporador rotativo (Quimis) sob vácuo à 60°C. O extrato bruto obtido da entrecasca foi submetido à secagem posterior em estufa à cerca de 50-60°C, por cerca de 7 dias, até ser atingido o peso constante. Após esse processo o extrato bruto foi macerado num almofariz, com o auxílio de um pistilo e mantido sob refrigeração em torno de 7-10°C para evitar degradação (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) (Figura 1).

Preparação dos extratos particionados por diferença de polaridade

50,0 g de extrato bruto hidroetanólico obtido anteriormente foram inicialmente suspensos em 1 L de água destilada e agitado por 30 minutos em agitador magnético. O precipitado formado foi então removido por filtração e a parte do extrato que foi solubilizado em água foi submetido a um método sistemático de partição líquido-líquido, usando um funil de separação, com solventes de polaridades crescentes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e 1-butanol, visando uma semipurificação das substâncias (DOMINGUEZ, 1973; MATOS, 2009; YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001).

Para cada solvente de extração, foram realizados três procedimentos usando 100 mL para as extrações. Reuniu-se os solventes separadamente e os mesmos foram recuperados por rotaevaporação (aparelho Quimis). As frações semipuras foram secas em estufa à 40°C até obtenção de peso constante e macerados num almofariz, com o auxílio de um pistilo, sendo mantidos sob refrigeração em torno de 7-10°C para evitar degradação (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) (Figura 2 e Tabela 1).

Análise fitoquímica do extrato bruto da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens*

Para as análises fitoquímicas seguiu-se o método descrito por Matos (2009), com algumas adaptações, que se baseia na mudança de coloração ou formação de precipitado. Empregou-se 100 g de entrecasca do caule previamente seca de *P. pubescens* suspensos em 700 mL de etanol a 70% (v/v) e outras 100 g de entrecasca do caule em 570 mL de clorofórmio (CHCl₃), obtendo-se os extratos hidrofílico e lipofílico, respectivamente (Tabela 2). Os testes foram realizados em tubos de ensaio, com os reagentes específicos para cada grupo de metabólitos secundários.

Avaliação do potencial tóxico do extrato bruto e das frações particionadas da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens*

Essa avaliação do potencial tóxico frente à larvas de *Candida albicans* Leach foi realizada para o extrato bruto hidroetanólico obtido anteriormente, bem como os quatro extratos particionados com solventes de diferentes polaridades. Seguiu-se os procedimentos de Meyer *et al.* (1982), com algumas modificações, além das literaturas Sorgeloos, Van Der Wielen e Persoone (1978), Parra (2001), Pour e Sasidharan (2011) e Medeiros e colaboradores (2020). Para a obtenção das larvas de *A. salina*, ovos (adquiridos da empresa *Artemia salina* do RN) foram mantidos em uma solução aquosa de sal marinho (Mossoró) $0,037 \text{ g.mL}^{-1}$ (m/v), com pH ajustado para 7,0 (pela adição de solução aquosa de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), sob aeração e iluminação constante com uma lâmpada de 40 W (em torno de 27- 28°C), por 24 horas para a eclosão dos mesmos. Em seguida foi preparado uma solução de concentração $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, a partir da diluição de 50 mg de cada amostra analisada e etanol PA. Desta solução padrão foram transferidos 15 μL , 50 μL , 100 μL , 500 μL , 600 μL e 700 μL para tubos de ensaio, que foram mantidos em estufa a 50°C até evaporação total do solvente. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após a evaporação total do solvente, foram adicionados a cada tubo 3 mL da solução salina, 10 larvas de *A. salina* e completado o volume do tubo de ensaio com a adição de solução salina até 5 mL, obtendo-se as concentrações finais nos tubos de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $700 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O tubo controle foi preparado contendo somente 5 mL de solução salina e 10 larvas de *A. salina*. Decorridos 24 horas de exposição, com auxílio de lupa e bastão de vidro, foi feito a contagem do número de larvas sobreviventes, sendo consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação branda dos tubos. Foi então realizado o cálculo da concentração letal média (CL_{50}) do extrato bruto e das quatro frações semipuras a partir das concentrações estudadas utilizando o programa Statplus 2008 (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006) (Tabela 3).

Avaliação do potencial antifúngico do extrato bruto e frações particionadas da entrecasca do caule de *P. pubescens*

Foram testados o extrato bruto hidroetanólico obtido anteriormente, bem como os quatro extratos particionados com solventes de diferentes polaridades. O teste de susceptibilidade foi realizado em triplicata através da técnica de difusão em poço, utilizando o fungo *Candida albicans* em meio de cultura com Ágar Sbouroud-Dextrose. Os meios foram estriados com swab estéril umedecidos com a suspensão do inóculo. Perfurou-se poços com diâmetro de 6 mm com o auxílio de canudo com tamanho necessário e em seguida os poços foram preenchidos com o extrato nas concentrações de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada amostra, em etanol PA. Para controle negativo utilizou-se etanol PA e para controle positivo fluconazol 2%. As placas foram incubadas em estufas a 37°C por um período de 48 horas, realizando-se a primeira leitura com 24 horas e a segunda leitura com 48 horas. Como parâmetro de atividade, constatou-se a presença de halos de inibição de

crescimento, formado em volta dos poços, utilizando um paquímetro para a medição. Os resultados foram expressos em função do diâmetro (em mm) dos halos de inibição de crescimento. Considerou-se sensível ao extrato halos com diâmetro maior ou igual a 10 mm, parcialmente sensível as que apresentarem diâmetro superior a 5,0 mm e inferior a 10,0 mm e resistentes aqueles com diâmetro inferior a 5,0 mm (BAUER *et al.*, 1966). Foi utilizado o programa Excel para o cálculos de média aritmética e desvio padrão (Tabela 4).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características do material pulverizado, do extrato bruto e rendimento

Após a trituração da entrecasca do caule com vistas à preparação do extrato bruto hidroetanólico, obteve-se um pó com coloração marrom. Já o extrato bruto seco obtido apresentou características de um pó marrom escuro após maceração (Figura 1), contendo um odor característico de madeira, levemente achocolatado. Obteve-se 85,0 g de extrato bruto (rendimento: 8,5 %).

Figura 1 - Extrato bruto obtido da entrecasca do caule de *P. pubescens* (sucupira branca).

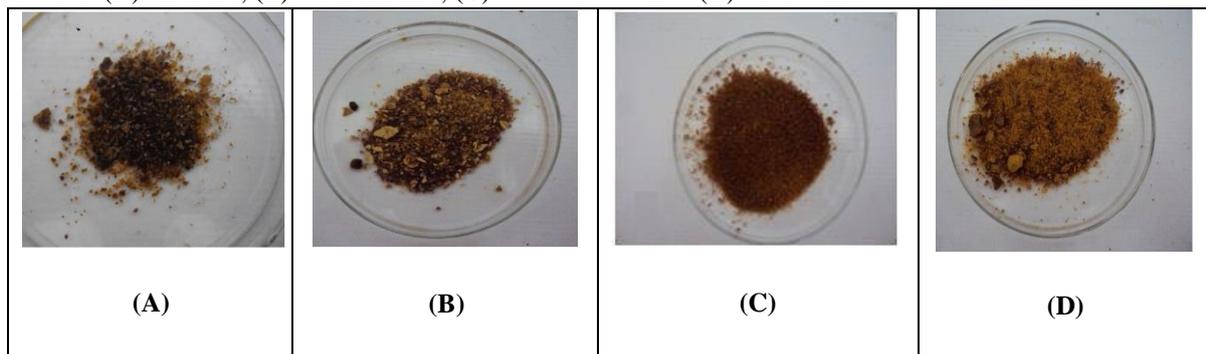


Fonte: Foto de Lucas Omar Stocco.

Características dos extratos particionados a partir do extrato bruto e rendimentos

Após suspensão de 50,0 g do extrato bruto seco obtido da entrecasca do caule de *P. pubescens* em 1 L de água destilada, formou-se uma parte solúvel de coloração alaranjada, com precipitado de coloração bege. Há suspeitas de que o precipitado formado seja característico de celulose com arginina. Após os procedimentos de extração com solventes de diferentes polaridades e secagem dos extratos particionados, foram observados materiais na forma de pó (Figura 2), cujas características e rendimentos são descritos na Tabela 1.

Figura 2 - Extratos particionados a partir do extrato bruto da entrecasca de *P. pubescens*, por solvente de diferentes polaridades: (A) - hexano; (B) - clorofórmio; (C) - acetato de etila e (D) - 1-butanol.



Fonte: Fotos de Lucas Omar Stocco.

Tabela 1 - Características dos extratos obtidos usando solventes de diferentes polaridades a partir do extrato bruto da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* (sucupira branca).

Extratos obtidos	Coloração	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Fração hexano	Marrom	2,40	4,8
Fração clorofórmio	Marrom	6,30	12,6
Fração acetato de etila	Marrom escuro	5,60	11,2
Fração 1-butanol	Marrom claro	9,35	18,7

Fonte: Os autores.

Análise fitoquímica do extrato bruto da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens*

Na tabela 2 tem-se os resultados obtidos das análises dos metabólitos secundários a partir do extrato bruto da entrecasca do caule de *P. pubescens* (sucupira branca), realizados em meio hidrofílico e lipofílico.

Tabela 2 - Resultados da análise química dos metabólitos secundários do extrato bruto hidroetanólico da entrecasca do caule de *P. pubescens* (sucupira branca).

Classe de metabólito secundário	Extrato hidrofílico	Extrato lipofílico
Ácidos fixos fortes	(+)	(-)
Agliconas - esteroides e terpenoides	(-)	(0)
Agliconas - flavonoides	(-)	(0)
Alcaloides	(+)	(-)
Antocianinas e antocianidinas	(-)	(-)
Antranóis	(-)	(-)
Auronas e chalconas	(+)	(-)
Bases quaternárias	(+)	(-)
Cumarinas	(+)	(+)

Esteroides livres	(+)	(-)
Fenóis	(+)	(-)
Flavanonas	(+)	(-)
Flavonas, flavonoides, flavononóis e xantonas	(-)	(-)
Flavonas, flavonoides, flavononóis e xantonas - confirmação	(-)	(-)
Leucoantocianidinas	(-)	(-)
Quinonas	(-)	(-)
Resinas	(+)	(0)
Saponinas	(+)	(0)
Taninos catequéticos	(+)	(+)
Taninos pirogálicos	(-)	(-)
Triterpenoides pentacíclicos	(+)	(-)

Legenda: (+) = positivo ; (-) = negativo ; (0) = não realizado.

Fonte: Os autores.

As substâncias presentes nas diferentes partes de uma planta e conhecidas como metabólitos secundários apresentam diversas funções importantes, como por exemplo agir como substâncias de atração a animais polinizadores, proteção contra herbívoros, dentre outros (TAIZ; ZEIGER, 2013). Observou-se a presença de um maior número de classes de metabólitos secundários no meio hidrofílico analisado que no meio lipofílico, em que foram evidenciados apenas a presença de cumarinas e taninos catequéticos. O extrato hidrofílico evidenciou a presença significativa de metabólitos secundários que apresentam potencial antioxidante, com destaque para auronas e chalconas, cumarinas, fenóis, flavanonas, taninos e triterpenos, como descritos na literatura (VIANNA *et al.*, 2012; AQUINO *et al.*, 2017; JAIN; KHATANA; VIJAYVERGIA, 2019). Alguns estudos relacionam a produção excessiva de radicais livres no organismo ao desencadeamento de estresse oxidativo e isso poderia estar associado ao aparecimento de certas doenças carcinogênicas (BARBOSA *et al.*, 2010). O emprego de substâncias ou extratos com comprovada atividade antioxidante, como encontrado em nossos resultados, poderia ajustar esse equilíbrio oxidativo e impedir o desenvolvimento desse tipo de doença. A busca por novos compostos com potencial antioxidante originados de materiais vegetais tem despertado bastante interesse na comunidade científica, uma vez que alguns estudos tem alertado sobre a ocorrência de certos tipos de câncer quando o emprego de antioxidantes sintéticos é excessivo (BAKKALI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2016).

A literatura exibe um número de publicações bem maior de estudos químico-farmacológicos relacionados com o óleo das sementes de *P. pubescens* quando comparado com as raízes, folhas ou entrecasca do caule. Possivelmente o emprego popular bastante disseminado do óleo por comunidades do Cerrado para combater infecções de garganta justifique esse fator. Produtos fitoterápicos cadastrados e que apresentam na constituição o óleo de sucupira purificado já podem ser encontrados e comercializados em farmácias.

Coube a Bustamante *et al.* (2010) o levantamento preliminar pioneiro dos metabólitos secundários presentes na entrecasca do caule de *P. emarginatus*, coletadas na cidade de Bela Vista, estado de Goiás. Os testes fitoquímicos realizados em extrato hidroalcoólico evidenciaram a presença de flavonoides, heterosídeos saponínicos, resinas e traços de esteroides e triterpenoides. Com exceção dos flavonoides, os metabólitos testados positivos pelos pesquisadores estão em concordância com os encontrados neste trabalho. Também em extrato hidrofílico da entrecasca do caule, a presença de compostos fenólicos foi verificada em *P. emarginatus* por Hansen *et al.* (2010); tais compostos fenólicos revelaram positivo no extrato hidrofílico estudado neste trabalho para *P. pubescens*.

As isoflavonas isoladas e elucidadas pelo grupo de pesquisa do professor Raimundo Braz Filho, em 1971 parecem ter sido as primeiras moléculas puras obtidas a partir da entrecasca do caule de *P. pubescens* (BRAZ FILHO *et al.*, 1971). Ainda são destaques as pesquisas que levaram ao isolamento de alcaloides (TORRENEGRA; BAUEREIB; ACHENBACH, 1989) e dos triterpenos betulina e lupeol (MORAES *et al.*, 2012).

Avaliação do potencial tóxico do extrato bruto e das frações particionadas da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* frente à larvas de *Artemia salina* Leach

Avaliou-se o potencial tóxico do extrato bruto hidroetanólico e das frações obtidas por partição líquido-líquido da entrecasca do caule de *P. pubescens*, utilizando como parâmetro a CL₅₀ (concentração letal suficiente para matar 50% das larvas de *Artemia salina*), decorridas 24 horas de exposição às concentrações de 15 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 600 µg.mL⁻¹ e 700 µg.mL⁻¹, de solução salina do extrato bruto da entrecasca de *P. pubescens*. Os testes foram realizados em triplicata. Observou-se uma porcentagem de mortes extremamente baixa de larvas de *A. salina*, tanto para o extrato bruto quanto para as frações semipuras. O controle não apresentou nenhuma larva de *A. salina* morta. Não houve mortes de larvas até a concentração de 400 µg.mL⁻¹, enquanto apenas uma morte observada para praticamente todas as amostras nas concentrações de 500, 600 e 700 µg.mL⁻¹. Na tabela 3 encontram-se os resultados de CL₅₀ encontrados.

Tabela 3 - Valores de CL_{50} encontrados nas análises de toxicidade do extrato bruto e das frações semipuras da entrecasca do caule de *P. pubescens* frente à larvas de *Artemia salina*.

Amostras	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Extrato bruto	228,5
Fração hexano	300,0
Fração clorofórmio	550,0
Fração acetato de etila	300,0
Fração 1-butanol	550,0

Fonte: Os autores.

A literatura nos contempla alguns trabalhos com valores de padronização de potencial tóxico usando larvas de *Artemia salina*, seja para substâncias puras (NOLDIN *et al.*, 2003; CANSIAN *et al.*, 2017), sistemas nanoparticulados (RAJABI *et al.*, 2015) ou para extratos vegetais (NGUTA *et al.*, 2011). Este trabalho, como envolve extratos vegetais, tomou como referência a padronização dos pesquisadores Nguta *et al.* (2011), onde consideram que tanto extratos orgânicos quanto extratos aquosos obtidos de fontes vegetais que apresentem valores de CL_{50} menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são classificados como muito tóxicos, CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados moderadamente tóxicos, CL_{50} entre 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam fraca toxicidade e CL_{50} acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados atóxicos. Com base nessa referência, os valores descritos na tabela 3 indicam moderado potencial tóxico para o extrato bruto etanólico e frações hexânica e acetato de etila, enquanto que para as fração clorofórmica e 1-butanol, os valores indicam toxicidade moderada.

Visando melhor credibilidade nos resultados encontrados de potencial tóxico do extrato bruto e das frações obtidas por diferentes polaridades apresentados na tabela 3, foi realizado um estudo computacional (modelo *in silico*) para determinar a concentração letal 50% (CL_{50}) e avaliar o potencial tóxico em concentrações menores e maiores além das estabelecidas no experimento prático, a fim de simular a dizimação total das larvas de *Artemia salina*, na intenção de comparar se, tanto o experimento prático quanto modelo *in silico* corroboram com o mesmo espectro de potencial tóxico (PEREIRA, 2017; CAIANA, 2018; CRUZ *et al.*, 2019). A simulação *in silico* foi realizada na faixa de concentração de 15, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 e $7000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A figura 3 (A a E) apresentam os gráficos obtidos de potencial tóxico da simulação e os valores de CL_{50} são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de CL_{50} encontrados nas análises de simulação *in silico* de toxicidade do extrato bruto e das frações semipuras da entrecasca do caule de *P. pubescens* frente à larvas de *Artemia salina*.

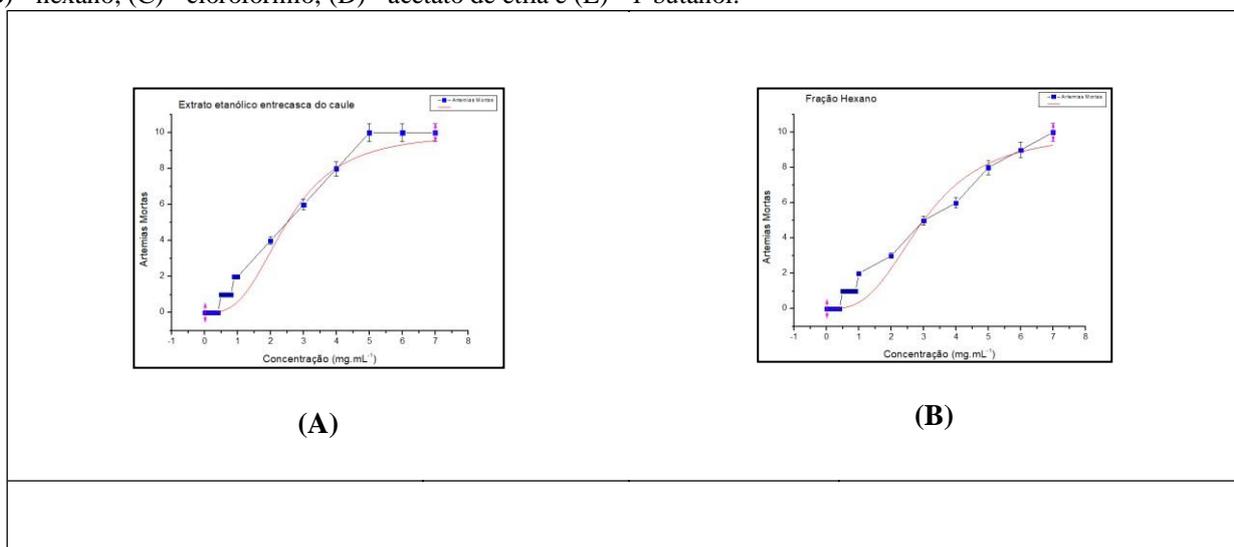
Amostras	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Extrato bruto	2500,0
Fração hexano	3000,0
Fração clorofórmio	3500,0
Fração acetato de etila	4000,0
Fração 1-butanol	3500,0

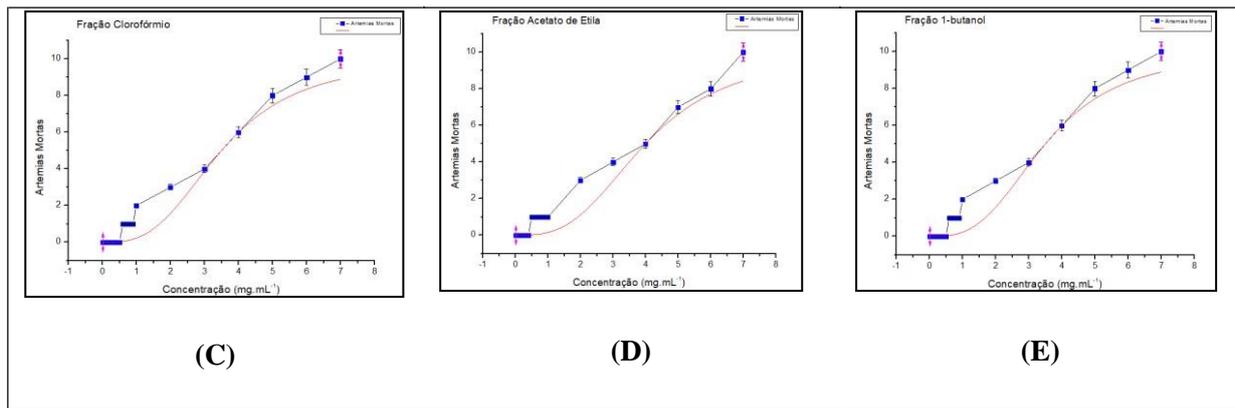
Fonte: Os autores.

Elevando-se as concentrações até $7000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi possível obter o valor de concentração máxima para eliminação total das larvas de *Artemia salina*, o que possibilitou estipular o perfil tóxico baseado na análise probit, estabelecendo a susceptibilidade da população dizimada, considerando como uma variável aleatória com distribuição normal nos casos do uso da função logística, atuando na formação da curva sigmoide para linear, validando assim o perfil da concentração letal para matar 50% dos microcrustáceos.

Com base na classificação da literatura de padronização do potencial tóxico e dos valores reais da CL_{50} obtidos no experimento, bem como os gráficos das simulações, permitiram determinar que os valores de CL_{50} na simulação encontraram-se em um espectro distinto de toxicidade em relação aos valores de CL_{50} do teste experimental, cuja classificação enquadra-se no contexto atóxico para o extrato bruto e frações do caule de *P. pubescens*, haja vista que as CL_{50} estão todas acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (NGUTA *et al.*, 2011).

Figura 3 - Simulação *in silico* de toxicidade do extrato bruto de *P. pubescens* e frações semi puras: (A) - Extrato bruto; (B) - hexano; (C) - clorofórmio; (D) - acetato de etila e (E) - 1-butanol.





Fonte: Os autores.

Portanto, os valores de CL_{50} do experimento e da simulação produziram curvas sigmóides distintas que corroboraram para a classificação do potencial tóxico de ambos os experimentos; a CL_{50} obtida no experimento encaixou no perfil de toxicidade moderada tendo em conta o parâmetro de valores entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ considerados moderadamente tóxicos, conquanto esses valores ainda assim poderiam ser revelados pela curva sigmoide como atóxicos se a população total de artemias fossem eliminadas completamente para levantamento dos dados estatísticos e determinação da concentração letal, porém essa mensuração para obtenção do valor da CL_{50} ocorreu com apenas 10% dos dados colhidos da dizimação das larvas. Isso se deu em detrimento da concentração de $700 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ter resultado em apenas 1 morte de 10 larvas. Por conseguinte, aplicou-se a fórmula e estabeleceu-se as respectivas CL_{50} . Em contrapartida, a CL_{50} obtida com a simulação *in silico* encaixou no perfil de atoxicidade; o procedimento consistiu em elevar a concentração das substâncias até alcançar dizimação total das larvas que ocorreu na concentração de $7000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ampliando assim os dados em 100% a fim de estabelecer a dose que erradicou 50% da população; com a aplicação da fórmula e construção dos gráficos, os mesmos revelaram valores de CL_{50} superiores a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que permitiu determinar que o extrato bruto e frações do caule de *P. pubescens* se classificaram como substâncias atóxicas. Assim sendo, as mortes das larvas obtidas no experimento serviram como base para aplicação da simulação, e ambos os testes permitiram traçar o perfil de toxicidade demonstrando a transição classificatória da condição de “moderadamente tóxico” com apenas uma morte para a condição de “atóxico” quando finalizou com dez mortes.

Segundo Meyer *et al.* (1982), concentrações letais que apresentam-se acima de $1000,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ indicam a presença de substâncias potencialmente ativas. Dessa maneira, os dados encontrados são indicadores de que o extrato bruto hidroetanólico da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* contém substâncias que possam lhe conferir propriedades medicinais.

Avaliação do potencial antifúngico do extrato bruto e frações particionadas da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens*

Na tabela 5 encontram-se os resultados encontrados dos halos de inibição do extrato bruto obtido da entrecasca do caule de *P. pubescens*, bem como dos quatro subextratos particionados com solventes de diferentes polaridades, frente à *Candida albicans*, comparados com o controle positivo.

Tabela 5 - Resultados da avaliação do potencial antifúngico do extrato bruto da entrecasca do caule de *P. pubescens* e frações semipuras frente à *Candida albicans*.

AMOSTRAS	Média do diâmetro dos halos formados (mm)				Desvio Padrão (DP)			
	50 µg.mL ⁻¹		75 µg.mL ⁻¹		50 µg.mL ⁻¹		75 µg.mL ⁻¹	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Extrato Bruto	15,0	13,0	16,0	16,0	2,00	1,15	1,15	2,00
Fração Hexano	12,0	12,0	13,0	12,0	2,51	2,32	1,51	1,52
Fração Clorofórmio	16,0	16,0	18,0	17,0	0,57	1,15	2,08	2,08
Fração Acetato de Etila	12,0	11,0	14,0	12,0	1,73	1,52	0,57	0,57
Fração 1-butanol	20,5	19,5	19,5	19,5	0,70	0,70	0,70	0,70
Controle positivo (fluconazol 2%)	15,0	14,0	–	–	2,88	2,51	–	–
Controle negativo (etanol PA)	0,0	0,0	–	–	–	–	–	–

Fonte: Os autores.

Os resultados revelaram primeiramente uma equivalência entre os halos formados no extrato bruto e as frações particionadas em ambas as concentrações e intervalos de tempo. Observa-se que o extrato bruto (na maior concentração), a fração clorofórmica e a fração 1-butanol apresentaram halos de inibição superior ao apresentado pelo controle positivo (fluconazol 2%), sugerindo assim que apresentam um significativo potencial antifúngico. Os valores dos halos de inibição do extrato bruto na menor concentração foram equivalentes aos valores encontrados pelo controle positivo. Já as frações hexânica e acetato de etila, nas duas concentrações, apresentaram halos de inibição inferiores ao controle positivo, entretanto, acima de 10,0 mm, considerando os mesmos como sensíveis quanto à inibição do fungo (BAUER *et al.*, 1966).

Em testes realizados por nosso grupo de pesquisa, foi evidenciada a atividade antibacteriana, especificamente contra bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* (SILVA, 2009) do extrato hidroetanólico da entrecasca do caule de *P. pubescens*. Bustamante *et al.* (2010) descreve atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas esporuladas e não esporuladas, Gram-negativas e atividade antifúngica para a *C. albicans* com extrato etanólico da casca de *P. emarginatus*. Neves *et*

al. (2007) observaram atividade antifúngica do extrato semi-sintético hexanoico das cascas de *P. ermaginatus* contra fungos dermatófilos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*.

Uma boa parte dos metabólitos secundários presentes nas diferentes partes das plantas tem revelado ação inseticida, fungicida e potencial tóxico. Essas características podem ser a chave para o desenvolvimento de novos pesticidas naturais mais sustentáveis e menos agressivos à natureza (WINK, 2010). Os resultados obtidos da ação antifúngica do extrato bruto da entrecasca e das frações particionadas da entrecasca do caule de *P. pubescens* (sucupira branca) podem estar relacionados à forte presença de metabólitos secundários ligados à ação antioxidante encontrados na análise fitoquímica. Alguns trabalhos na literatura sustentam essa relação, em que principalmente a presença de fenóis e taninos, clássicos metabólitos descritos com propriedades antioxidantes, parecem indicar a atividade antifúngica, como por exemplo o potencial antifúngico apresentado pelo extrato hidrofílico obtido das folhas de *Plinia cauliflora* (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010) e na fração acetato de etila das raízes de *Cochlospermum regium* (CARVALHO *et al.*, 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O levantamento da presença de metabólitos secundários na entrecasca do caule de *P. pubescens* (sucupira branca), pela primeira vez descrito na literatura em meio hidrofílico e lipofílico, revelou a presença de um número significativo de metabólitos, principalmente no meio hidrofílico. Houve predominância da presença de metabólitos que são descritos na literatura com potencial antioxidante. Os valores obtidos de CL₅₀ acima de 1000 µg.mL⁻¹, tanto para o extrato bruto da entrecasca do caule como para as quatro frações obtidas por partição líquido-líquido denotam extratos atóxicos, credenciando-os dessa maneira como produtos naturais que propiciam segurança ao uso popular benéfico à saúde. Os que os extratos particionados hexano e acetato de etila são sensíveis à inibição de *Candida albicans*, comparado com padrão positivo, enquanto o extrato bruto lipofílico e as frações clorofórmio e 1-butanol apresentam maior atividade de inibição. A forte presença de metabólitos com propriedades antioxidantes podem ser responsáveis pela atividade antifúngica encontrada. Os resultados sinalizam que os extratos investigados apresentam-se bioativos e são base importante para futuros estudos interáreas, principalmente a Química e Farmácia.

AGRADECIMENTOS

À UFMT - Campus Universitário do Araguaia e aos membros pesquisadores do LAPQUÍM - Laboratório de Pesquisas em Química de Produtos Naturais, UFMT/CUA.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P., PROENÇA, C. E. B., ENO, S. S., RIBEIRO, J. F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa, 1998.
- AQUINO, V. V. F.; COSTA, J. G. M.; ANGÉLICO, E. C.; MEDEIROS, R. S.; ARAÚJO, M. F.; RODRIGUES, O. G. Metabólitos secundários e ação antioxidante de *Croton heliotropiifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 7-10, 2017.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, F. M. **Cerradania**: alumeia e óia pros encantamentos dos cerratenses. 1. ed. Brasília: Clube de Autores, 2017.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- BATALHA, M. A. O Cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 21-24, 2011.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Biodiversidade do Cerrado e Pantanal**: áreas e ações prioritárias para conservação. 1. ed. Brasília: MMA, 2007.
- BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; ASSUMPCÃO, R. M. V. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 11, p. 2835-2836, 1971.
- BUSTAMANTE, K. G. L. I; LIMA, A. D. F. I; SOARES, M. L. I; FIUZA, T. S. I; TRESVENZOL, L. M. F.; BARA, M. T. F.; PIMENTA, F. C.; PAULA, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 341-345, 2010.
- CAIANA, R. R. A. **Glicosídeo 2,3-insaturado: síntese, caracterização, estudo farmacológico e toxicológico in vitro e in silico**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) - Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande - Paraíba - Brasil, 2018.

CANSIAN, R. L. VANIN, A. B.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S. P.; PUTON, B. M. S.; CARDOSO, R. I.; GONÇALVES, I. L.; HONAISSER, T. C.; PAROUL, N.; OLIVEIRA, D. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 155-161, 2017.

CARVALHO, J. T. G.; BALDIVIA, D. S.; LEITE, D. F.; ARAÚJO, L. C. A.; ESPINDOLA, P. P. T.; ANTUNES, K. A.; ROCHA, P. S.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Medicinal plants from Brazilian Cerrado: antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n. 4, p.1-16, 2019.

CARVALHO, R. S.; CAROLLO, C. A.; MAGALHÃES, J. C.; PALUMBO, J. M. C.; BOARETTO, A. G.; NUNES e SÁ, I. C.; FERRAZ, A. C.; LIMA, W. G.; SIQUEIRA, J. M.; FERREIRA, J. M. S. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 181-187, 2018.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CRUZ, J. H. A.; MOREIRA, I. C. S.; ALVES, M. F. V.; OLIVEIRA, H. M. B. F.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; ALVES, M. A. S. G. Análise da atividade farmacológica e toxicológica do monoterpene relacionado à Odontologia: estudo *in silico*, **Arch. Health Invest.**, v. 8, n. 11, p. 674-680, 2019.

DEVIANNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DOMÍNGUEZ, X. A. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. 1. ed. México: Editorial Limusa S. A., 1973.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FERRERA, T. S.; HELDWEIN, A. B.; SANTOS, C. O.; SOMAVILLA, J. C.; SAUTTER, C. K. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-de-são-paulo sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 588-596, 2016.

FRANCO, J. L. A.; GANEM, R. S.; BARRETO, C. Devastação e conservação no bioma cerrado: duas dinâmicas de fronteira. **Expedições**. Teoria da história e historiografia, v. 7, n. 2, p. 56-83, 2016.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of “sucupira” (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 607-616, 2010.

JAIN, C.; KHATANA, S.; VIJAYVERGIA, R. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 2, p. 494-504, 2019.

LHULLIER, C.; HORTA, P.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 2009.

MEDEIROS, H. I. R.; SILVA, B. B. M.; AGUIAR, C. E. R.; BRITO, T. A. M.; FERREIRA, F. E. S.; FERNANDES, N. D.; MOURA, E. P.; JÚNIOR, F. C. M. Síntese, elucidação da arquitetura molecular e avaliação do potencial citotóxico de um promissor candidato a fármaco derivado de amidoxima. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 66070-66079, 2020.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MORAES, W. F.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; VANDERLINDE, F. A.; BARA, M. T. F.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R. Triterpenes involved in the antiinflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 1, p. 202–207, 2012.

NEVES, F. A.; SANTOS, D. R.; LUCENA, P. A.; SOUZA JÚNIOR, G. F.; OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, M. R. R. Teste de suscetibilidade de dermatófilos ao extrato semi-sintético hexanoico de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Eletrônica de Farmácia**, suplemento v. 4, n. 2, p. 44-46, 2007.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacology on line**, v. 2, p. 458-78, 2011.

NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

PARRA, A. L.; SARDIÑAS, I. G.; YHEBRA, R. S.; BUELBA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* Leach and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PEREIRA, J. A. **Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero cândida e perfil farmacológico e toxicológico em estudos *in silico***. 2017. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

POUR, B. M.; SASIDHARAN, S. In vivo toxicity study of *Lantana camara*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 3, p. 230-232, 2011.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20-30, 2015.

SANO, E. E.; RODRIGUES, A. A.; MARTINS, E. S.; BETTIOL, G. M.; BUSTAMENTE, M. M. C.; BEZERRA, A. S.; COUTO JR, A. F.; VASCONCELOS, V.; SCHÜLER, J.; BOLFE, E. L. Cerrado ecoregions: a spatial framework to assess and prioritize Brazilian savana environmental diversity for conservations. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 818-828, 2019.

SANTOS, L.; VIEL, A. M.; TAROSSO, L. F.; MOMESSO, L. S.; PALMIERI, D. A.; SPERA, K. D. Medicinal plants of the Brazilian Cerrado: knowing to preserve. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 556-567, 2020.

SILVA, R. T. **Estudos fitoquímicos preliminares e atividades antibacteriana e citotóxica das cascas do caule de sucupira branca (*Pterodon pubescens*)**. 2009. 81 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Curso de Farmácia - Habilitação em Análises Clínicas. UFMT-CUA, Pontal do Araguaia (MT), 2009.

SORGELOOS, P.; Van Der WIELEN, C. R.; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests. A critical analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 2, n. 3-4, p. 249-255, 1978.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TORRENEGRA, R.; BAUEREIB, P.; ACHENBACH, H. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2219-2221, 1989.

VIANNA, D. R.; BUBOLS, G.; MEIRELLES, G.; SILVA, B. V.; ROCHA, A.; LANZMASTER, M.; MONSERRAT, J. M.; GARCIA, S. C.; POSER, G. V.; EIFLER-LIMA, V. L. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized Coumarins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 7260-7270, 2012.

WINK, M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In: M. WINK, ed. **Annual plant reviews: biochemistry of plant secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, v. 40, p. 1-19, 2010.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.