

DIEGUE HENRIQUE NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Erythroxylum daphnites* Mart.**

BRASÍLIA, 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIEGUE HENRIQUE NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Erythroxylum daphnites* Mart.**

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

**Orientadora: Prof. Dra. Yris Maria
Fonseca-Bazzo**

BRASÍLIA, 2015

DIEGUE HENRIQUE NASCIMENTO MARTINS

**AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Erythroxylum daphnites* Mart.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____ de _____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo - Presidente

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Dâmaris Silveira

Faculdade de Ciências da Saúde da universidade de Brasília

Dr. Leonardo Luiz Borges

Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista – Suplente

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

BRASÍLIA, 2015

Dedico este trabalho a minha amada vovó Bernadete (*In memoriam*) por todo seu amor e apoio ofertado ao seu pequeno neto “Dedê”. A minha mãe Elizabete por ter sido sempre um exemplo de caráter e dedicação, ao meu “Paidrasto” Luiz e ao meu irmão Matheus por serem a melhor base e família que alguém gostaria de ter.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo pela oportunidade de realizar esse trabalho. Por sua dedicação, paciência, atenção, ensinamentos, humildade, competência, referência e por acreditar em um potencial que até então nem mesmo eu sabia que possuía. Foi um prazer imensurável trabalhar contigo e sinto-me honrado em ter sido um de seus discípulos.

A Professora Dra. Dâmaris Silveira por ter aberto a mim as portas para o mundo da pesquisa e por seu acolhimento desde o nosso primeiro encontro.

Aos professores Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, Maurício Homem de Mello e Maria de Fátima Borin pelo incentivo e sugestões que fizeram-se importantes na “construção” deste trabalho.

Quanto a coleta do material botânico deixo os meus mais sinceros agradecimentos aos amigos Patrícia Marques Rodrigues, Nathalia de Almeida Morais, Juliana de Freitas Ferreira, que me acompanharam nas aventuras pela Fazenda Água Limpa (FAL – UnB). Aproveito para deixar um agradecimento em especial ao Professor Dr. Christopher William Fagg, Newton e Professora Dra. Yris por toda disposição em me acompanhar nas coletas e dividir comigo todos os seus conhecimentos durante nossas aventuras pela “floresta”, e também por me salvar de mergulhos em córregos.

As alunas de estágio Aldenora, Priscila de Barros Veiga, Vanessa Barros Freire e Victória Baggi que me ajudaram em muitos trabalhos braçais e extremamente cansativos como por exemplo a catação de material botânico e concentração de extratos que “pareciam não acabar nunca”. Se não fosse por vocês eu ainda estaria com quilos de material para separar e concentrar.

Ao Professor Esp. Pedro Carvalho Brom do Instituto Federal de Brasília por toda contribuição e esclarecimento de inúmeras questões voltados para a área estatística. O conhecimento adquirido nunca será perdido.

Aos Téc. Diovaner Menezes Pires e Professora Dra. Selma Regina Maggioletto do Laboratório de Agroclimatologia da FAL – UnB, pela disponibilização dos dados meteorológicos e por toda ajuda prestada.

Aos meninos da Iniciação Científica Lorena Ferreira Gomes, Yuri Yabu de Barros, Felipe Sousa Bandeira, Samuel Cardoso, Juliana de Freitas Ferreira e Rachel Bedatt. O aprendizado obtido ao trabalhar ao lado de vocês foi imensurável e a minha jornada tornou-se uma aventura inesquecível.

Aos amigos Matheus Kiyoshi Silva Alimura, Frederico Millhomem, Blenda da Silva Martins, Luana Bernardes e Brenda Lins por toda paciência, comprometimento e esforço para manter a nossa amizade intacta. Obrigado por não desistirem de mim enquanto eu estava tão ausente.

À Eveline Camillo do Laboratório de Ensaios Químicos em Farmácia (Lab. de Ensino).

À Edigrês Alves de Sousa, Jaqueline de Almeida Sousa e a todos os funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela cordialidade e auxílio prestados ao longo do curso.

Aos colegas de bancada dos Laboratório de Controle da Qualidade e Laboratório de Produtos Naturais: Michele, Marcela Medeiros de Freitas, Amanda de Assis Carneiro, Gabriela Werneck, Paula Montenegro de Souza, Caroline Caniellas Caprara, Marline Dassoler, Luana Lima da Cunha, Raquel Dall Agnol e Ekaly Apangha que contribuíram direta e indiretamente.

Às amigas Renata P. C. de Almeida e Patrícia Marques Rodrigues, os meus sinceros agradecimentos por tudo o que aprendi sendo companheiro de bancada. Foi muito importante ter vocês para dividir a alegria das novas descobertas e frustrações das coisas que sempre “precipitavam”.

A toda minha família, por acreditarem em meus feitos.

À CAPES, CNPq e FAP-DF pelo suporte financeiro.

Aproveito para dizer que os dias que passei dentro do laboratório com os meus amigos de trabalho tornaram-se inesquecíveis. Não me importa a parte difícil, neste momento eu só consigo me recordar das coisas boas, sinto-me inteiramente privilegiado por ter conhecido tantas pessoas inteligentes e incríveis que dividiram um pouco de seus conhecimentos comigo. Sinto-me inteiramente grato a Deus por esta oportunidade e privilégio.

“Quão real é o tempo... alguma vez chegará a um fim? De onde vem a diferença entre o passado e o futuro? Por qual razão nos lembramos do passado mas não do futuro?”

Stephen Hawking

“O tempo não espera por ninguém.”

Toki wo kakeru Shoujo

RESUMO

A família Erythroxylaceae possui espécies que são popularmente empregadas como antibacterianos, anti-inflamatórios, diuréticos, em disfunções hepáticas, vesiculares e respiratórias. Essas espécies caracterizam-se pela presença de alcaloides tropânicos, taninos, terpenos, fenilpropanoides e flavonoides. A espécie *Erythroxylum daphnites* é conhecida popularmente como “muxiba”. E por pertencer ao bioma Cerrado, não ser tão conhecida e por apresentar escassez frente a relatos científicos, é fundamental a pesquisa desta, não só como fator da preservação da biodiversidade do bioma, mas também como ferramenta de identificação e registro dessa espécie frente ao seu potencial para a ciência. Pesquisas voltadas a influência de fatores ambientais sobre a produção dos metabólitos secundários para esta planta também são importantes, pois contribuem para o estabelecimento de parâmetros de cultivo, coleta e padronização de extrato. Neste trabalho foi avaliada a influência das variáveis ambientais temperatura, índice pluviométrico e radiação global sobre o teor de polifenóis e flavonoides, atividade antioxidante e rendimento dos extratos brutos aquosos, hexânicos e etanólicos das folhas de *E. daphnites* por um período de um ano. As espécies vegetais foram coletadas na área de Cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa – FAL/UnB. O doseamento de polifenóis e flavonoides totais foram realizados por método utilizando reagente de folin e cloreto de alumínio, respectivamente. O perfil cromatográfico por CCD dos extratos para avaliação da presença de flavonoides foi avaliado utilizando como eluente acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26) e revelador NP/PEG. E a determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método DPPH*. Os dados meteorológicos obtidos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Agroclimatologia da FAL/UnB. Os dados obtidos foram submetidos a análise de correlação de Person. Foi verificada a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides nos extratos analisados, sendo confirmados por CDD a presença rutina, ácido clorogênico e hiperosídeo para os extratos etanólicos; e rutina e ácido clorogênico para os extratos aquosos. Quanto à atividade biológica, o extrato etanólico da quinta coleta das folhas de *E. daphnites* demonstrou ter a melhor ação antioxidante (IC₅₀: 4,91 µg/mL) quando comparado aos demais extratos, mostrando atividade semelhante a rutina (IC₅₀: 4,53 µg/mL) e ácido ascórbico (IC₅₀: 2,6 µg/mL). Os extratos aquosos e hexânicos da segunda coleta também apresentaram potencial relevante com IC₅₀ de 5,17 µg/mL e 10,34 µg/mL, respectivamente. De acordo com este estudo foi demonstrado que parâmetros como temperatura máxima e diminuição da pluviometria apresentaram-se como fatores principais na variabilidade dos teores de polifenóis e flavonoides encontradas nas folhas de *E. daphnites*.

Palavras-chave: *Erythroxylum daphnites*; Cerrado; Sazonalidade; DPPH*; Flavonoides totais; Polifenóis totais.

ABSTRACT

Erythroxylaceae family has species that are popularly used as antibacterial, anti-inflammatory and diuretic, in liver, gallbladder and respiratory disorders. These species are characterized by the presence of tropanic alkaloids, tannins, terpenes, flavonoids and phenylpropanoids. *Erythroxylum daphnites* species is popularly known as "muxiba". In accordance with the fact that it belongs to the Cerrado, it is not well known and scientific reports are scarce, making its research fundamental, not only as a factor of preserving biome biodiversity, but also as an identification tool and record of this species due to its scientific potential. Researches related to the influence of environmental factors on the production of secondary metabolites for this plant are also important as they contribute to the establishment of cultivation, harvest parameters and standardized extract. It was evaluated the influence of environmental variables such as temperature, rainfall and global radiation on the polyphenol and flavonoids contents, antioxidant activity and yield of aqueous, hexane and ethanol extracts from the leaves of *E. daphnites* for a period of one year. The plants were collected in Cerrado *sensu stricto* Fazenda Água Limpa - FAL/UnB. The polyphenols and flavonoids contents assay was performed by using folin reagent and aluminum chloride respectively. The chromatographic profile of the extract by TLC to assess the presence of flavonoids was evaluated using as eluent ethyl acetate, formic acid, acetic acid and water (100: 11: 11: 26) and revealing NP / PEG. And the determination of antioxidant activity was evaluated by DPPH • method. The obtained seasonal data were kindly provided by Laboratório de Agroclimatologia - FAL/UnB. The data were subjected to Pearson correlation analysis. The presence of phenolic compounds, mainly flavonoids, such as rutin, chlorogenic acid and hyperoside was verified in ethanol extracts analyzed, and confirmed by TLC; and rutin and chlorogenic acid in aqueous extracts. For biological activity, the ethanol extract of the fifth harvest of *E. daphnites* leaves demonstrated the best antioxidant activity (IC₅₀: 4.91 µg/mL) when compared to other extracts, presenting similar activity as rutin (IC₅₀: 4.53 µg/mL) and ascorbic acid (IC₅₀: 2.6 µg/mL). The aqueous and hexane extracts of the second harvest also presented relevant potential with IC₅₀: 5.17 µg/mL and IC₅₀: 10.34 µg/mL, respectively. According to this study it was shown that parameters such as maximum temperature and decreased rainfall presented themselves as the major factors in the variability of polyphenols and flavonoids contents found in the leaves of *E. daphnites*.

Keywords: *Erythroxylum daphnites*; Cerrado; Seasonality; DPPH•; Polyphenols content; Flavonoids content.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Árvore, arbusto, flores e sementes de <i>Erythroxylum daphnites</i>	24
Figura 2.	Estrutura básica de um flavonoide.	25
Figura 3.	Processo de obtenção dos extratos hexânico e etanólico do rasurado das folhas de <i>E. daphnites</i>	35
Figura 4.	Processo de obtenção do extrato aquoso do rasurado das folhas de <i>E. daphnites</i>	36
Figura 5.	Dados meteorológicos obtidos do Laboratório de Agroclimatologia da FAL/UnB.	44
Figura 6.	Dados meteorológicos obtidos do Laboratório de Agroclimatologia da FAL/UnB tratados para correlação.	45
Figura 7A/7B.	Perfil cromatográfico por CCD para o Extrato Etanólico Bruto da primeira coleta (EEB1) do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	49
Figura 8A/8B.	Perfil cromatográfico por CCD para o Extrato Etanólico Bruto da primeira coleta (EEB1) do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	49
Figura 9A/9B.	Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para os Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	50
Figura 10A/10B.	Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para os Extratos Aquosos Brutos (EABs) do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	50
Figura 11A/11B/11C.	Estrutura química dos padrões rutina, hiperosídeo e ácido clorogênico.	52
Figura 12.	Teores de Polifenóis Totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	54
Figura 13.	Diagrama representativo para comparação estatística por ANOVA – Tukey dos teores extraíveis de polifenóis.	54
Figura 14.	Rendimento dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis.	56

Figura 15. Rendimento dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis.	56
Figura 16. Diagrama representativo para comparação estatística por ANOVA – Tukey dos teores extraíveis de flavonoides.	59
Figura 17. Teores de flavonoides totais em extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	60
Figura 18. Rendimento dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides.	61
Figura 19. Rendimento dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides totais.	62
Figura 20. Diagrama representativo para comparação estatística por ANOVA – Tukey do IC ₅₀ da redução do DPPH* para os extratos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	66
Figura 21. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos rendimentos.	68
Figura 22. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos rendimentos.	68
Figura 23. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos rendimentos.	69
Figura 24. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis.	70
Figura 25. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis.	71

Figura 26. Atividade antioxidante por redução do DPPH [*] dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides.	71
Figura 27. Atividade antioxidante por redução do DPPH [*] dos extratos etanólicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides.	72
Figura 28. Rendimentos dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionado com a média da temperatura mínima de 90 dias antes da coleta.	74
Figura 29. Rendimentos dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionado com a média da temperatura máxima referente ao dia anterior de cada coleta.	75
Figura 30. Rendimentos dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionado com a média da radiação global do dia anterior de cada coleta das folhas.	75
Figura 31. Rendimentos dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionado com a temperatura máxima do dia de cada coleta.	76
Figura 32. Rendimentos dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> correlacionado com a média da radiação global ao dia anterior de cada coleta.	76
Figura 33. Teor de polifenóis totais dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus índice pluviométrico com média de 30 dias anteriores as coletas.	78
Figura 34. Teor de polifenóis totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus índice pluviométrico do dia anterior de cada coleta.	79
Figura 35. Teor de polifenóis totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus índice pluviométrico e temperatura máxima do dia anterior de cada coleta.	79
Figura 36. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus temperatura máxima do dia de cada coleta.	82

Figura 37. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxyllum daphnites</i> versus radiação global com média de 90 dias antes da coleta.	82
Figura 38. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxyllum daphnites</i> versus temperatura mínima e pluviometria com média de 30 dias antes da coleta.	83
Figura 39. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxyllum daphnites</i> versus temperatura mínima e pluviometria do dia anterior a coleta.	83
Figura 40. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos hexânicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxyllum daphnites</i> correlacionado com a média das variáveis pluviometria e temperatura máxima de 90 dias anteriores a coleta.	86
Figura 41. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxyllum daphnites</i> correlacionado com os dados da variável temperatura máxima referente aos dias anteriores de cada coleta.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimentos finais dos extratos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	46
Tabela 2 - Teor de sólidos totais dos extratos fluídos brutos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i>	47
Tabela 3 - Compostos observados nos extratos etanólicos das folhas de <i>E. daphnites</i>	51
Tabela 4 - Compostos observados nos extratos aquosos das folhas de <i>E. daphnites</i>	51
Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) dos rendimentos dos extratos dos rasurados das folhas de <i>E. daphnites</i> versus o teor de polifenóis	55
Tabela 6 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) dos rendimentos dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus o teor de flavonoides	61
Tabela 7 - Atividade antioxidante por DPPH* para os extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> e controles positivos	65
Tabela 8 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) da atividade antioxidante por redução do DPPH*	67
Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) da atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus os teores de polifenóis e flavonoides	70
Tabela 10 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os rendimentos dos extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus as variáveis ambientais	74
Tabela 11 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) dos compostos polifenóis dos extratos de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus as variáveis ambientais	78
Tabela 12 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) dos teores de flavonoides totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus as variáveis ambientais	81
Tabela 13 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a atividade antioxidante dos extratos do rasurado das folhas de <i>Erythroxylum daphnites</i> versus as variáveis ambientais	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

APG II - *Angiosperm Phylogeny Group* (Grupo de Filogenia de Angiospérmicas)

BHA - Hidroxianisol de butila

BHT - Hidroxitolueno de butila

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2- difenil-1-picril-hidrazina

EAB - Extrato Aquoso Bruto

EEB - Extrato Etanólico Bruto

EHB - Extrato Hexânico Bruto

EROs - Espécies Reativas Oxidativas

FAL - Fazenda Água Limpa (UnB)

LDL - *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PEC - Proposta de Emenda à Constituição

PPPM/Ceme - Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos

UNEP - *United Nations Environment Programme*

SUS - Sistema Único de Saúde

RUT - Rutina

TLC - *Thin Layer Chromatography*

VIT C - Vitamina C

IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 PLANTAS MEDICINAIS	18
1.2 CERRADO	20
1.3 FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE E GÊNERO ERYTHOXYLUM	22
1.4 METABOLITOS SECUNDÁRIOS E APLICAÇÕES	24
1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
1.6 SAZONALIDADE	39
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 LISTA DE EQUIPAMENTOS E REAGENTES	32
3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	33
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>Erythoxylum daphnites</i>	33
3.4 ESTUDO DE SAZONALIDADE	37
3.4.1 Dados Climáticos	37
3.4.2 Cromatografia em Camada Delgada	38
3.4.3 Polifenóis Totais	39
3.4.4 Flavonoides Totais	40
3.4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante	40

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
4 RESULTADOS	43
4.1 DADOS METEOROLÓGICOS	43
4.2 RENDIMENTOS	45
4.3 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA	58
4.4 POLIFENÓIS TOTAIS	52
4.5 FLAVONOIDES TOTAIS	57
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	62
4.7 CORRELAÇÕES COM OS DADOS METEOROLÓGICOS	72
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Os registros mais antigos dos quais tem-se conhecimento quanto ao uso de plantas medicinais são de mais de sessenta mil anos, sendo que as primeiras descobertas foram realizadas em estudos arqueológicos em ruínas do Irã (1). No preâmbulo da era cristã, o grego *Pendamius Dioscorides* autor de “*De Matéria Médica*”, enciclopédia detentora de informações sobre botânica e medicina que foi empregada ao longo de quinze séculos por gregos, romanos, árabes e turcos, sendo que das 1.000 drogas narradas neste material, 600 eram plantas. Neste mesmo período o naturalista romano Caio Plínio Segundo (Plínio, o Velho), inseriu a ideologia de que para cada doença existia uma planta específica para tratá-la. Tal nacionalista, foi responsável por trinta e sete volumes de *Naturalis Historia*, um compêndio com inumeráveis menções a plantas medicinais (2).

Como uma das mais antigas formas de terapêutica utilizada pelos homens, encontra-se o uso de plantas medicinais direcionados para o tratamento, cura e prevenção de doenças, sendo que o conhecimento com o passar do tempo passou a sedimentar-se e resultar no acúmulo de conhecimentos empíricos a respeito das ações de espécies vegetais por variados grupos étnicos. (3).

Segundo a *United Nations Environment Programme* (UNEP), em estudo recente, foi dito que existem aproximadamente 8,7 milhões de espécies no planeta Terra, sendo que cerca de 6,5 milhões dessas espécies encontram-se na “terra” (solo) e 2,2 milhões vivem nas profundezas do oceano. Neste estudo também foi estimado que deste total de 2,2 milhões de espécies, 298.000 são plantas, dos quais 215.644 já foram descobertas e catalogadas no mundo (4).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) desde a década de 70 vem instigando o desenvolvimento de medicamentos a partir de espécies vegetais na inclusão dos serviços de saúde. Mesmo com os avanços relacionados às políticas públicas voltados para esta área, a OMS estimou que grande parte da população mundial devido a pobreza ou falta de acesso aos serviços de assistência, fazem uso das

plantas medicinais para atender suas necessidades básicas, inclusive, nos países com serviços assistenciais inteiramente disponíveis, é crescente a estima pelos medicamentos fitoterápicos e ervas medicinais (5).

As plantas medicinais assim como seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos da Medicina Tradicional e Medicina Complementar Alternativa e vêm sendo utilizadas também pela população brasileira. Segundo o Ministério da Saúde, as plantas medicinais e fitoterápicos são as alternativas mais vigentes entre as Práticas Integrativas e Complementares no SUS (Sistema Único de Saúde – Brasil), sendo a maioria das experiências presentes na atenção primária à saúde. Em países industrializados como Canadá, França, Alemanha e Itália o uso de produtos da medicina tradicional varia de 70% a 90%, sendo o uso de tais produtos denominados como medicina tradicional complementar, alternativa ou não convencional. No Brasil 82% da população faz uso de produtos à base de espécies vegetais de cunho medicinal motivados pela medicina popular (baseados na tradicionalidade cultural de uso), e pelos sistemas oficiais de saúde, que visam atestar a segurança e eficácia por meio de estudos científicos (6).

Deste modo está definido, desde 11 de setembro de 1981 por meio da Portaria nº 212 do Ministério da Saúde, como prioridades de investigação clínica, o estudo das plantas medicinais (7) Em 1982, o Ministério da Saúde lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (PPPM/Ceme) para a obtenção do desenvolvimento de terapêutica alternativa e complementar, de cunho científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos, com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular das plantas medicinais (8).

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta, que junto de sua acentuada diversidade étnica e cultural possui um rico conhecimento tradicional ligado ao uso de plantas medicinais. Deste modo, é reconhecido, a importância dos produtos naturais, inclusive os derivados destes no desenvolvimento de drogas terapêuticas modernas. Considerando o amplo patrimônio genético associado a sua diversidade cultural o Brasil possui potencial para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e soberano na área da saúde, com o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, preponderando o uso sustentável e promovendo a criação de riquezas (9). Levando também em consideração que grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não possuem estudos, e muitas destas são

utilizadas empiricamente sem embasamentos científicos quanto a sua eficácia e segurança, tais fatores mostram-se então importantes incentivadores para o desenvolvimento de estudos de espécies do reino vegetal nativas do Brasil (10).

1.2 CERRADO

O Cerrado está localizado entre os paralelos 3º e 24º latitude sul e entre os meridianos 41º e 61º longitude oeste (11). É o segundo maior bioma da América do Sul ocupando uma área de cerca de 2 milhões de Km², o que representa 22% do território brasileiro, sendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal além de partes do Amapá, Roraima e Amazonas, espaços com predominância deste bioma. O Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas, além de uma grande diversidade de habitats, o que determina uma notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias (12).

Em 07 de setembro de 2010, o bioma Cerrado tornou-se patrimônio nacional, após a aprovação da Proposta de Emenda à Constituição – PEC 51/03. Essa inclusão não está ligada somente ao fato deste bioma ocupar cerca de um quarto do território nacional, mas também porque engloba uma ampla variedade de ecossistemas e elevada diversidade biológica (13).

O bioma Cerrado é um complexo vegetacional, composto por três tipos de formações: florestais (32%), savânicas (61%) e campestre (7%), sendo mais característico a formação do tipo savana tropical, com destacada sazonalidade e presença de diferentes proporções, de formações herbáceas, arbustivas e arbóreas. Em relação à cultura agrícola, é predominante neste bioma plantios de soja, milho, feijão, algodão, café e cana-de-açúcar. E segundo o Edital Probio, a percentagem de cobertura vegetal natural encontrada para o Cerrado foi de 60,5%, sendo 38,9% de cobertura vegetal antrópica e 0,6% de massa de água de um total de 204.983.283 de hectares (14).

Esta região caracteriza-se com clima estacional, onde o período de chuva dura de outubro a março e é seguido por um período de seca com durabilidade de abril a dezembro, sendo a precipitação média anual de 1.500 mm e temperaturas amenas ao longo do ano entre 22 °C e 27 °C em média. Outra característica sazonal do bioma Cerrado são as queimadas naturais originadas por raio, estas são relativamente frequentes e com maior destaque durante a transição seca-chuva (15).

Em relação à alta frequência destas queimadas, normalmente não atingem grandes áreas, uma vez que a chuva posterior contribui evitando o desenvolvimento de queimadas de maior magnitude. Também existem relatos de que as queimadas contribuem para tornar as comunidades da flora mais heterogêneas (15). As queimadas também relacionam-se a estratégias ecológicas de espécies vegetais de defesa/resistência frente à passagem do fogo (11). Em ecossistema de campo Cerrado, observa-se que o fogo relaciona-se com a abertura de frutos e favorece a dispersão de sementes de algumas espécies. A diversidade de adaptações ao fogo, principalmente das espécies herbáceas, sugere que este é um elemento antigo do Cerrado (16).

Este bioma encontra-se incluso na lista dos *hotspots* mundial, sendo a sua inserção um aspecto positivo, pois significa o reconhecimento a nível mundial, de sua rica biodiversidade. Por outro lado, sua inclusão também considera-o como uma área crítica para as espécies, tanto da flora quanto da fauna que a compõem. É importante destacar que espécies nativas importantes, comercialmente e ecologicamente, estão desaparecendo em função da ocupação desordenada, da expansão urbana, agropecuária e exploração irracional. Deste modo, a sobrevivências destes fazem-se dependentes da conservação e preservação do ambiente em que vivem (17).

Segundo um estudo bibliográfico realizado por Neto e Moraes (2003), é dito ainda que mesmo que fosse realizado estudos extensos de revisão da literatura voltada para plantas medicinais do Cerrado brasileiro, muitas plantas ainda estariam fora do alcance dos olhares da ciência, uma vez que já é grande o número de espécies citadas como medicinais, ainda maiores devem ser a relação com as plantas que até então não foram listadas, mas que apresentam possibilidade de uso pela humanidade (18). Partindo desta premissa, faz-se então fundamental a pesquisa de espécies vegetais do Cerrado brasileiro, não só como fator da preservação da biodiversidade deste bioma, mas também como ferramenta importante na identificação e registro de

plantas com potencial terapêutico, alimentício e cosmético com foco também na sustentabilidade (19).

1.3 FAMÍLIA ERYTHROXYLACEAE E GÊNERO *Erythroxylum*

A América tropical apresenta registros de 187 espécies de *Erythroxylum*, sendo o Brasil é um dos principais centros de diversidade com o registro destas mensuradas em 116 espécies. No nordeste brasileiro foram registradas 66 espécies, e estes dados demonstram a ocorrência de representantes de *Erythroxylum* na região semi-árida do Brasil por meio de levantamentos florísticos efetuados (20).

A posição sistemática da família Erythroxylaceae têm apresentado muitos debates relacionado ao posicionamento de sua ordem. Stebbins (1974) e Thorne (2000) classificaram-na como pertencente à ordem Geraniales, e Cronquist (1981) definiu-a na ordem Linales baseando-se na morfologia foliar, hábito arbóreo a herbáceo e na presença de vasos escalariformes. Em estudos moleculares mais recentes foi evidenciada grande afinidade entre as famílias Erythroxylaceae e Rhizophoraceae e recomendaram o seu posicionamento para a ordem Malpighiales. Uma classificação proposta pelo APG II (*Angiosperm Phylogeny Group* – Grupo de Filogenia de Angiospérmicas), que baseou-se no conjunto de caracteres compartilhados pelas duas famílias (alcaloides propanoicos e pirrolidínicos) contribuiu para que Erythroxylaceae e Rhizophoraceae fossem consideradas como uma só família, atribuindo a Rhizophoraceae, opcionalmente, como a família destas (21).

Esta família compreende aproximadamente 250 espécies divididas em quatro gêneros, que são: *Aneulophus*, *Nectaropetalum*, *Pinacopodium* e *Erythroxylum*, cujas espécies pertencentes ao gênero *Erythroxylum* estão distribuídas nas regiões tropicais da América do Sul, África e na ilha Madagascar e possuem como característica a presença de alcaloides tropânicos, taninos, terpenos, diterpenos e triterpenos (com esqueleto oleanano e lupano), fenilpropanoídes e flavonoides (22, 23).

Quanto à morfologia, o gênero *Erythroxylum*, exibe dimorfismo floral denominado de heterostilia do tipo distilia, apresentando flores com estiletos longos

(longistiladas) e flores com estiletos curtos (brevistiladas), ambas com filetes de comprimentos correspondentes. A heterostilia em *Erythroxylum* foi observada pela primeira vez por Charles Darwin (1877), que agregou este mecanismo à polinização cruzada. Depois, Ganders (1979), documentou o mesmo dimorfismo em *Erythroxylum coca* Lam. e associou-a ao mecanismo de proteção à auto-fecundação (24).

O interesse por este gênero aumentou no século XIX, depois da descoberta das atividades farmacológicas expostas pelas folhas de *E. coca*, que quimicamente caracteriza-se pela presença de alcaloides do grupo tropano, na qual a cocaína destaca-se. A cocaína é um alcaloide produzido por esta espécie vegetal e que foi utilizado como anestésico local em pequenas cirurgias (20).

Espécies de *Erythroxylum* são popularmente empregadas como: antibacterianos, antiinflamatórios, diuréticos; tratamentos de disfunções como: disfunção hepática, vesiculares, doenças renais e respiratórias; e também como tônico com propriedades estimulantes (23).

Um levantamento bibliográfico realizado por Oliveira (2010) revelou que das 230 espécies presentes dentro do gênero *Erythroxylum*, apenas 61 foram estudados quanto à sua composição química, o que resultou no isolamento e caracterização de 449 compostos, cujas classes de maior prevalência foram alcaloides tropânicos, terpenóides e flavonoides, com presença em menores quantidades de outras classes como alcaloides, benzenoides, cumarinas, quinonas, alcinos, esteroides, proteínas e lipídios (25).

Erythroxylum daphnites Mart. (Figura 1) é pertencente à família Erythroxylaceae. Esta espécie é classificada quanto a sua fitofisionomia/habitat (tipo de vegetação) como pertencente ao Cerrado (*latu senso*), mata de galeria, cerradão e campo sujo. Sua referência mais antiga encontrada é proveniente de 1843, no qual foi realizado a catalogação desta. Quanto à sua nomenclatura popular, é conhecida como “muxiba”, “fruto de pombo”, “chapadinho” (Goiás e Minas Gerais), “fruta-de-tucano” (Minas Gerais), “mercúrio” (Mato Grosso) e “pimenta” (Minas Gerais) (22, 26, 27). No território brasileiro, a espécie *E. daphnites* encontra-se distribuída no Distrito Federal e estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo. E comumente encontrada em áreas abertas do Cerrado, campo rupestre, mata mesófila semidecídua e nos bordos mais secos de áreas de mata ciliar (28).

Em estudo recente realizado por Simas (2013), é relatado o isolamento e identificação de compostos provenientes dos galhos e folhas de *E. daphnites*, sendo estes compostos representados por: esteroides, triterpenos, diterpenos, flavonoides, glicerídeo, e lignana (29).



Figura 1. Árvore, arbusto, flores e frutos de *Erythroxylum daphnites*. Amostras provenientes da Fazenda Água Limpa (FAL – UnB) do Distrito Federal – DF. Fonte: Diegue H. N Martins e Christopher W. Fagg.

1.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E APLICAÇÕES

Os compostos secundários ou induzidos, conhecidos também como metabólitos secundários, produzidas pelas plantas, são geralmente classificados de acordo com suas vias biossintéticas, sendo os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides considerados como três grandes famílias de moléculas (30, 31).

a) Flavonoides

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos naturais. São compostos bioativos de origem vegetal com propriedades antioxidantes e que agem como sequestradores de radicais livres, apresentando potencial como agentes redutores e protetores de reações oxidativas. Muitas das atividades das plantas são atribuídas aos compostos que pertencem a esta classe, podendo assim, ser utilizados como agentes de proteção da atividade vascular (diminuição do desenvolvimento de doenças cardiovasculares), agente antiosteoporático, antiinflamatório, antiproliferativo e estrogênico (32). São constituídos por uma estrutura básica formada por difenil propano que consiste em dois anéis aromáticos ligados por uma estrutura de três carbonos formando habitualmente um heterociclo oxigenado (Figura 2). (32, 33, 34).

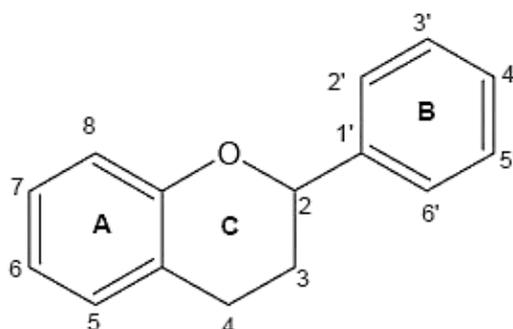


Figura 2. Estrutura básica de um flavonoide.

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular que podem estar ligados a sacarídeos (glicosídeos) ou que não estão ligados a moléculas de açúcares, denominados de agliconas. Sua diversidade estrutural é atribuída ao nível de oxidação e às variações na estrutura química básica que podem ser atribuídas por ocorrer reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. Estes compostos são subdivididos nas classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides. São compostos responsáveis pelo sabor, odor e cor de algumas espécies vegetais, sendo assim utilizados como flavorizantes e corantes de alimentos (35,36,37,38,39).

Os flavonoides são responsáveis também por importantes funções no crescimento, desenvolvimento e mecanismo de defesa de plantas versus patógenos. Esses compostos estão relacionados com a defesa da planta e podem ser divididos em dois grupos que são os compostos pré-formados e compostos "induzidos". Os flavonoides pré-formados são compostos inatos sintetizados durante o desenvolvimento normal do tecido da espécie vegetal. Estes compostos são normalmente armazenados em locais estrategicamente importantes, para que possam desempenhar uma sinalização e/ou um papel direto na defesa da planta. Os compostos induzidos são sintetizados por espécies vegetais como resposta a uma ação como por exemplo: lesão física, infecção ou estresse (35, 30).

b) Terpenoides

Os terpenos ou terpenoides são compostos orgânicos predominantes como metabólitos secundários de plantas, sendo que a maioria destes estão relacionados com papéis importantes dos seres vegetais nos quesitos reprodução, defesa e estresse (40). São classificados de acordo com as suas combinações entre as unidades de cinco carbonos e suas diversas formas de ciclização, podendo formar assim monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos e tetraterpenos (41).

Os terpenoides apresentam-se importantes frente aos ataques de insetos, uma vez que a planta demonstre principalmente em sua composição presença de limonoides, caracterizado por sua ação inseticida, que seria decorrente da inibição da acetilcolinesterase nos insetos. Outros terpenos amplamente estudados são os carotenoides sendo representado por β -caroteno, limonoides, luteína e licopenos (42). Os terpenoides são também os principais constituintes dos óleos essenciais e é importante destacar o seu uso comercial na fabricação de cosméticos, detergentes, perfumes e sabões (43).

Os terpenos apresentam características lipofílicas e possuem uma importante atividade antioxidante em sistemas lipofílicos, podendo atuar na inibição da oxidação da LDL, inibindo o desenvolvimento da aterosclerose (43).

c) Alcaloides

Os alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, porém, pode existir um órgão da planta preferencial para o acúmulo dessas substâncias. Nas plantas os alcaloides têm como função a proteção destas frente a radiação ultravioleta por conta de sua conformação estrutural, que é composta por núcleos aromáticos altamente absorventes dessa radiação. Dentre a família Erythroxylaceae o grupo de alcaloides tropanicos destaca-se, principalmente depois da descoberta da cocaína em *E. coca*. Também podem ser destacadas como alcaloides tropanicos a escopolamina, atropina e hiosciamina (20, 44, 45, 46).

Os alcaloides tropânicos podem ocorrer também na família Solanaceae, porém são mais encontrados em famílias como Erythroxylaceae, Convolvulaceae, Proteaceae e Rhizophnorceae. Medicamentos que possuem estes compostos são utilizados para a diminuição de cólicas nos ureteres e cólicas provocadas por cálculos renais, para asma brônquica, podem ser utilizados também em espasmos do trato gastrointestinal e usado como anestésicos locais (8).

1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Moléculas com elétrons desemparelhados são denominados de radicais livres, e como características apresentam-se como: espécies altamente instáveis, muito reativas quimicamente e com o tempo de meia vida curto. Podem ser gerados a partir de mecanismos endógenos, como por exemplo respiração aeróbica e inflamações, assim como pode ser gerado também por processos exógenos: radiação ultravioleta, medicamentos, alimentação e cigarro. Como exemplo destes radicais formados podem ser citados o dióxido de nitrogênio (NO_2), oxigênio molecular (O_2) e o radical hidroxila (OH) (48).

O antioxidante pode ser uma substância sintética ou natural com ação de prevenção ou redução da deterioração de produtos pela ação da presença de

oxigênio, sendo que na bioquímica ou medicina, os antioxidantes são enzimas ou compostos orgânicos capazes de agir contra danos da oxidação em tecido animal (49). A atividade de um antioxidante está relacionada ao seu potencial de redução, estabilidade do produto formado devido ao deslocamento de elétrons desemparelhados, reatividade deste grupo com outros antioxidantes e propriedade de quelar metais. Assim sendo, compostos antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias capazes de retardar ou inibir a atividade de radicais livre em processos oxidativos (50, 48).

Dentre os grupos de metabólicos secundários com atividade antioxidante, destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), a vitamina E e β -caroteno. E entre os antioxidantes sintéticos mais importantes destacam-se o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) (51).

Por apresentar atividade antioxidante, a vitamina C é a primeira linha de defesa contra radicais livres e tem grande importância fisiológica por causa da sua participação em diversos sistemas do organismo, contribuindo com a formação de tecidos conjuntivos, produção de hormônios e anticorpos, biossíntese de aminoácidos e prevenção de escorbuto. É considerado um dos mais potentes e o de baixa toxicidade entre os antioxidantes naturais (52, 53). O BHT junto do BHA, são os antioxidantes mais utilizados na indústria alimentícia, sendo estes bem mais efetivos na supressão da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais, também são eficientes frente o controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, como os que compõem, por exemplo, os óleos de coco e palma (54).

Em revisão bibliográfica realizada por Ferreira et. al. (1997), é dito que espécies reativas oxidativas (EROs) estejam ligadas a mais de 50 doenças ou ocorrência de distúrbios e tais eventos podem acometer por exemplo os pulmões, causando enfisema, displasia broncopulmonar, pneumoconiose, asma, toxicidade desencadeados pelo uso de bleomicina, paraquat, butilidroxitolueno, fibras minerais e fumo (55). O envelhecimento também é uma condição que pode estar relacionada ao estresse oxidativo e exemplos de doenças frequentes na velhice são: “mal de Parkinson”, o acidente vascular cerebral (AVC), o “mal de Alzheimer”, a esclerose múltipla e a catarata. As EROs, por sua vez, podem influenciar na alteração de células e resultar na alteração do ADN (Ácido Desoxirribonucleico), uma vez que sejam formados aldeídos, estes podem interagir com o ADN e essa interação pode ser associada com o câncer (56).

Deste modo, a busca por substâncias a partir de extratos de espécies vegetais objetivando a ação de captura de radicais livres faz-se importante como alternativa frente a terapias de diversas doenças, com grande importância do descobrimento de novos compostos capazes de inibir processos oxidativos que não causem danos aos seres humanos (57).

1.6 SAZONALIDADE

A sazonalidade está relacionada a periodicidade, podendo apresentar características em um determinado período baseando-se por exemplo em padrões climáticos. (58). Deste modo, o período em que a planta é coletada é um fator de extrema importância, uma vez que a quantidade ou até mesmo a natureza de seus constituintes, não mostrem-se constante durante o decorrer do ano. Também deve ser levado em consideração que variações ligadas ao próprio desenvolvimento da planta conjunto a algum tipo de alteração no seu ambiente proveniente por exemplo: de alterações no ritmo circadiano, radiação, índice pluviométrico, temperatura, altitude, padronização da coleta e padronização do extrato. Variações as quais podem resultar em maiores, menores ou até mesmo ausência das concentrações de compostos secundários (59, 60, 61).

Em estudo realizado por Luengas-Caicedo et. al. (2005) foi observado que os teores de flavonoides em folhas jovens e maduras provenientes de *Cecropia glaziovii* Snethl., foram mais elevados no período de estiagem quando comparados ao período chuvoso (62). Com uso da mesma planta Sosa et. al. (2005) realizou um estudo trabalhando com dois grupos de *C. glaziovii* provenientes de duas regiões distintas da Espanha com condições climáticas diferentes, sendo observado desta vez que a quantidade de flavonoides chegou a ser quatro vezes maior entre o inverno e o verão quando comparado com o segundo grupo, que mostrou-se apenas três vezes maior, apresentado por sua vez diferença significativa entre os grupos (63).

Em um estudo de revisão realizada por Gobbo-Neto et. al. (2007) é relatada a temperatura como sendo um dos fatores que desempenham maior influência no desenvolvimento das plantas, contribuindo à produção de metabólitos secundários, e

a alternância desta variável climática está ligada a outros fatores como altitude e sazonalidade. Quanto a pluviometria, os relatos de correlações significantes são maiores frente a concentrações de metabólitos secundários (60). Ainda são apresentados outros fatores que podem influenciar de forma direta ou indireta o conteúdo de metabólitos secundários presentes em espécies vegetais como radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica e ataques de patógenos (59, 64).

Os estudos sazonais não estão voltados apenas para a observação de mudanças da concentração de metabólitos. Existem também os estudos direcionados para a avaliação do comportamento e crescimento de espécies vegetais baseadas em variáveis climáticas ou do ambiente (altitude, exposição a luminosidade ou sombreamento) onde são observados quais os períodos de maior ou menor crescimento das plantas, formas de desenvolvimento e adaptação a novos habitats (65, 66, 67).

Baseado nessas informações um dos focos deste trabalho está ligado justamente com a observação de possíveis interações entre variáveis meteorológicas definidas e a relação de metabólitos secundários da espécie vegetal *E. daphnites*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência de fatores ambientais sobre a atividade antioxidante e sobre o teor de compostos fenólicos (polifenóis totais e flavonoides totais) nas folhas de *E. daphnites* provenientes do Cerrado brasileiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter amostras de folhas de *E. daphnites*;
- Obter os dados meteorológicos de radiação global, temperatura mensal máxima, temperatura mensal mínima e pluviometria da região de cada coleta;
- Avaliar possíveis variações na composição químicas nos diferentes extratos obtidos;
- Determinar o teor de polifenóis e flavonoides totais presentes nos diferentes extratos das folhas de *E. daphnites*;
- Avaliar a possível atividade antioxidante dos diferentes extratos obtidos;
- Avaliar a possível associação das variáveis climáticas sobre o perfil fitoquímico das folhas de *E. daphnites*, atividade antioxidante e rendimento de cada extrato bruto obtido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LISTA DE EQUIPAMENTOS E REAGENTES

a) Equipamentos

- Analisador de Umidade Infra-Vermelho (GEHAKA® IV 200);
- Bomba de vácuo (EXIPUMP – AAKE®);
- Câmara de UV - 365nm (Prodicil®);
- Capela de exaustão (Permutation®);
- Espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu®) contando com software UVProve 2.33.;
- Evaporador Rotativo (Heildolph®), contando com bomba de vácuo (Heildolph® Instruments D-91126) e refrigerador (Heildolph® MX07R-20-HD2E);
- Lavadora Ultrasônica (UNIQUE Ultrasonic Cleaner®);
- Liofilizador Advantage Plus XL-70 (SP Scientific®), contando com bomba de vácuo 2005SD (SP Scientific®) e compressor de ar (AIR COMPRESSOR 1NNE5 SP Scientific®);

b) Reagentes

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazina – DPPH (Sigma-Aldrich®);
- Ácido ascórbico (Fisher®);
- Ácido gálico (Fluka Sigma®);
- Álcool etílico (J.T.Baker®);
- Carbonato de sódio anidro (Vetec®);

- Cloreto de alumínio (Proquímios®);
- Dimetilsulfóxido (Vetec®);
- Folin Ciocautecau (Dinâmica®);
- Hexano (Vetec®);
- Hidroxitolueno de butila – BHT (Sigma®);
- Metanol (AnalytiCals®);
- Quercetina (Cromadex®);
- Rutina (Sigma®);
- Sílica gel 60G (Analítica®);

3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado na área de Cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa – FAL (15° 58 01. 1" S 47° 53. 16. 2" W) entre os horários de 9h30min às 10h30min (Horário Oficial de Brasília – DF/Brasil) nos seguintes períodos: 29 de Maio/2013 (1ª Coleta), 15 de Agosto/2013 (2ª Coleta), 28 de Novembro/2013 (3ª Coleta), 18 de Fevereiro/2014 (4ª Coleta) e 20 de Maio/2014 (5ª Coleta). Os espécimes de *Erythroxylum daphnites* passaram por aferição de suas circunferências, apresentando respectivamente 22; 10,8; 39,9 e 44,3 cm. As medidas foram obtidas a partir de 1,5 m de altura das respectivas árvores, sendo estas identificadas e uma exsicata depositada no herbário da Universidade de Brasília (UnB) pelo botânico Prof. Dr. Christopher Fagg do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília sob o *voucher* Fagg CW 2305.

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Erythroxylum. daphnites*

O preparo dos extratos foi realizado nos laboratórios de Controle da Qualidade e de Produtos Naturais da Universidade de Brasília (UnB) a partir das folhas da

espécie *E. daphnites*. Os procedimentos foram realizados segundo Azevedo et. al. (2010) (60), cujas as folhas foram retiradas de seus respectivos galhos e aplicou-se o processo de catação. O material vegetal dos quatro espécimes foram misturados para a obtenção dos extratos.

Todas as folhas passaram por secagem natural seguida por secagem artificial em estufa à temperatura de 37° C. Após a secagem, as partes aéreas foram submetidas mais uma vez ao processo de catação e posteriormente realizou-se a determinação de umidade por meio de analisador de umidade infra-vermelho sendo consideradas secas as folhas que apresentaram umidade com cerca de 8,5% (68).

A trituração das folhas de *E. daphnites* para obtenção do rasurado deu-se por uso de moinho de facas. O rasurado resultante foi armazenado em recipiente de vidro sob abrigo da luz (69).

a) Extratos hexânicos e etanólicos

Para a preparação dos extratos hexânico e etanólico foram realizados os procedimentos baseados na Farmacopeia Brasileira 5 ed. (70) com modificações. As folhas rasuradas foram maceradas em solvente hexano na proporção 1:10 por sete dias. Após este período o material foi percolado (gotejamento com vazão de 80 a 100 gotas/minutos). Posteriormente, o rasurado que havia sido submetido ao hexano, passou pelos mesmos processos, sendo desta vez macerado com solvente etanol na mesma proporção, período e vazão. Ao término desta etapa, o material percolado foi armazenado em vidro âmbar. Tanto os extratos fluídos hexânicos e etanólicos foram submetidos ao processo de concentração em Evaporador. Posteriormente, os extratos foram transferidos para frascos de vidro envolvidos com papel alumínio e submetidos a banho maria à 37 °C para evaporação do solvente residual. Após secagem o extrato foi pesado e em seguida acondicionado em freezer à -20 °C (Figura 3).

Os Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) e Extratos Hexânicos Brutos (EHBs), receberam a sua frente os números de 1 a 5, correspondentes a cada uma das coletas que foram realizadas neste trabalho (EEB1 para a 1ª coleta, EEB2 para a 2ª coletas e assim por diante, o mesmo aplicou-se aos extratos hexânicos).

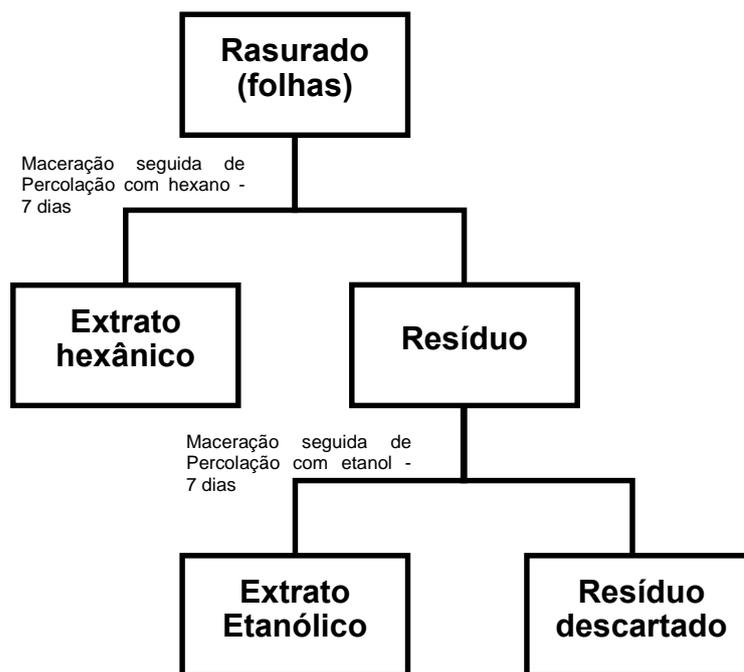


Figura 3. Processo de obtenção dos extratos hexânico e etanólico do rasurado das folhas de *E. daphnites*.

b) Extrato aquoso

Para a obtenção dos extratos aquosos realizou-se infusão na proporção de 1:10 com uso do rasurado de *E. daphnites*. Neste procedimento, a água deionizada foi aquecida até seu ponto de ebulição, esperou-se que atingisse a temperatura de 70 °C e então esta foi vertida sobre o material rasurado seguida de agitação mecânica. Em seguida, o recipiente foi coberto e esperou-se arrefecer até 50 °C para posterior filtração. O conteúdo resultante da filtração foi armazenado em potes de vidros envolvidos com papel alumínio e transferidos para freezer à -20 °C. Uma vez congelados, os extratos aquosos foram submetidos ao processo de liofilização, cujo o condensador foi ajustado para -70 °C e o vácuo para 15 mTorr. Após retirada do solvente pelo processo de liofilização, o recipiente com resíduo do extrato aquoso foi encaminhado para freezer à -20 °C (Figura 4).

Os Extratos Aquosos Brutos (EABs), receberam a sua frente os números de 1 a 5, correspondentes a cada uma das coletas que foram realizadas neste trabalho (EAB1 para a 1ª coleta, EAB2 para a 2ª coletas e assim por diante).

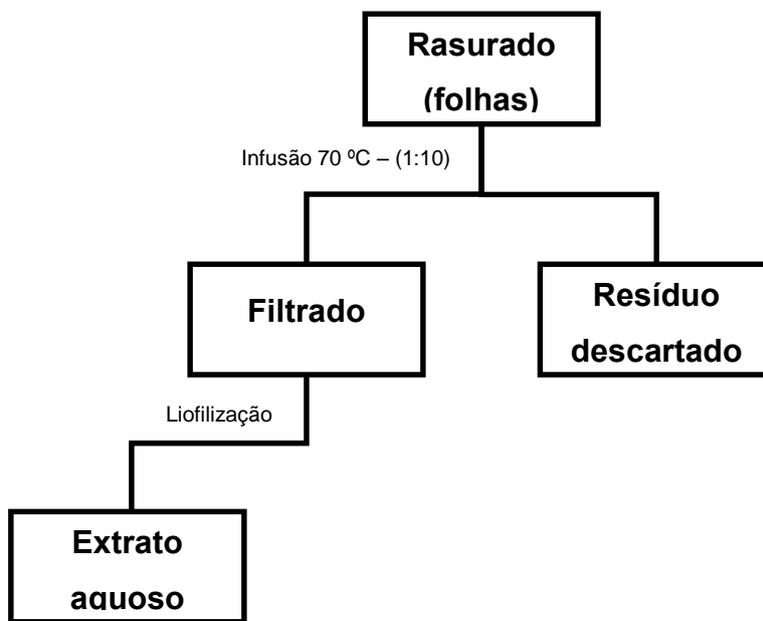


Figura 4. - Processo de obtenção do extrato aquoso do rasurado das folhas de *E. daphnites*.

c) Determinação de Sólidos Totais

A determinação dos sólidos totais foi realizada para os extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos das 3ª, 4ª e 5ª coletas, cujo 2 mL dos respectivos extratos fluídos foram depositados em pratos de alumínio e submetidos a analisador de umidade por infra-vermelho para avaliação do teor (%) de sólidos totais presentes em cada um dos extratos.

d) Determinação de Rendimentos Extrativos (%)

Para o cálculo de rendimento foi utilizado o peso (g) do rasurado das folhas de *E. daphnites* como sendo 100% do material utilizado, e após os processos de extração e secagem do material, os produtos foram pesados e uma relação entre o peso do produto final e peso das folhas inicial foi estabelecida.

$$\text{ReF (\%)} = \frac{100 \times \text{ReF (g)}}{\text{FoS}}$$

Em que:

ReF (%) = Rendimento Final (%)

ReF (g) = Rendimento Final (g)

FoS = Peso de folha seca rasurada

3.4 ESTUDO DE SAZONALIDADE

A sazonalidade foi avaliada por um período de um ano. Neste período, as folhas de *E. daphnites* foram coletadas a cada três meses (Maio, Agosto, Novembro de 2013 e Fevereiro e Maio de 2014).

Foi avaliado o comportamento sazonal com uso de variáveis climáticas sobre o perfil fitoquímico das folhas de *E. daphnites*, atividade antioxidante e rendimento dos extratos brutos aquoso, hexânico e etanólico em cada período.

3.4.1 Dados Climáticos

Os dados meteorológicos referentes à radiação global, temperatura máxima, temperatura mínima e pluviometria dos meses em que foram realizadas as coletas

foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Agroclimatologia da FAL – UnB e foram específicas para a área onde foram realizadas as coletas.

Ainda com uso dos dados meteorológicos obtidos, foram feitas médias de cada um dos parâmetros climáticos citados para os períodos de 90 dias e 30 dias anteriores a cada coleta, assim como também foram utilizados os dados referentes aos dias anteriores e dias de cada coleta. Tal metodologia fez-se importante para o tratamento dos dados e para traçar o perfil de correlação linear de Pearson entre os rendimentos, polifenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante dos extratos obtidos neste estudo.

3.4.2 Cromatografia em Camada Delgada

As amostras dos extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos referentes a cada uma das coletas foram preparadas na concentração de 2 mg/mL, sendo estes diluídos em seus solventes respectivos (água deionizada, etanol e hexano) e levados ao sonicador sob potência 220W e frequência 40kHz por 20 minutos.

As análises preliminares dos perfis cromatográficos para os extratos brutos de *E. daphnites* foram realizadas em placas de vidro com espessura de 2 mm, com tamanhos de 10 x 7 cm impregnadas com uma suspensão de sílica gel 60G preparada em água deionizada (1:2). As confecções das placas cromatográficas foram realizadas com auxílio de um espalhador. Posterior ao preparo das placas, estas secaram a temperatura ambiente em local isento de poeira ou contaminantes. Em seguida, as placas foram encaminhadas para a estufa para ativação em temperatura de 110 °C pelo período de uma hora. As aplicações das amostras foram realizadas imediatamente após a retirada das placas da estufa (71).

Para detecção de flavonoides (72) foi utilizado como eluente uma solução com os solventes acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26). Em cada placa foram aplicados os padrões rutina, ácido clorogênico e hiperosídeo seguidas dos extratos brutos etanólicos (EEB1, EEB2, EEB3, EEB4, EEB5) e os padrões novamente. Esta mesma ordem foi aplicada para os demais extratos brutos. Todos os extratos encontravam-se à 2 mg/mL e foram esgotados três vezes sobre a

cromatoplaça com auxílio de tubo capilar. Seguida a aplicação, cada placa foi colocada em uma cuba saturada com a solução eluente [acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26)]. Finalizada a eluição, as cromatoplaças foram reveladas com NP/PEG), apresentando assim o perfil cromatográfico para os extratos a partir dos rasurados das folhas de *E. daphnites*. A revelação das cromatoplaças foi realizada com o auxílio da Câmara de UV (365 nm) e em capela de exaustão.

Após a eluição foi calculado o fator de retenção (R_f) para cada ponto, com manchas referentes aos compostos presentes, para uma posterior comparação com padrões para a definição dos compostos químicos encontrados.

3.4.3 Polifenóis Totais

O ensaio para determinação do teor de polifenóis totais foi realizado com as amostras dos Extratos Aquosos Brutos (EABs) e Extratos Etanólicos Brutos (EEBs). E para este ensaio foi utilizado o método de Kumazawa et. al. (2004) adaptado (73). Em tubos de ensaios foram adicionados 0,5 mL do ácido gálico (3, 9, 12, 15, 18, 21 e 27 $\mu\text{g/mL}$), 0,5 mL de carbonato de sódio - Na_2CO_3 (10%) e 0,5 mL de Folin Ciocauteau 1N. Após a adição do reagente de Folin esperou-se 1 hora a temperatura ambiente para a realização da leitura em espectrofotômetro (760 nm). Com uso das absorvâncias obtidas das concentrações utilizadas do ácido gálico foi construído uma curva analítica e empregada a regressão linear para a obtenção da equação da reta. Para determinação da concentração de polifenóis nas amostras foram adicionados 0,5 mL das amostras (15 $\mu\text{g/mL}$), 0,5 mL de Na_2CO_3 (10%) e 0,5 mL de Folin Ciocauteau 1N. Para branco das amostras foram adicionados 0,5 mL das amostras (15 $\mu\text{g/mL}$), 0,5 mL de Na_2CO_3 (10%) e 0,5 mL de água deionizada. Para zerar o aparelho utilizou-se água deionizada. A partir da equação obtida foi possível calcular a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de polifenóis totais nos extratos em questão.

3.4.4 Flavonoides Totais

O ensaio para determinação do teor de flavonoides totais foi realizado com as amostras dos Extratos Aquosos Brutos (EABs), Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) e Extratos Hexânicos Brutos (EHBs).

Para este ensaio foi utilizado o método de Kumazawa et. al. (2004) adaptado (73). Para a condução do ensaio utilizou-se solução estoque de quercetina (1 mg/mL diluído em metanol), cloreto de alumínio – AlCl_3 2% em etanol 40%. A partir da solução mãe de quercetina (1 mg/mL) foi realizada uma diluição seriada, nas concentrações de 6,25; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 $\mu\text{g/mL}$. Em microtubos com fundo cônico e graduado foram adicionados 0,5 mL da quercetina (diluição seriada) e 0,5 mL de AlCl_3 2%, e mantidos por 1 hora a temperatura ambiente para a realização da leitura em espectrofotômetro (420 nm). Com uso das absorvâncias obtidas das concentrações utilizadas da quercetina foi construída uma curva analítica, e determinada a regressão linear para a obtenção da equação da reta. Para determinação da concentração de flavonoides nas amostras foram adicionados 0,5 mL das amostras (6,25 $\mu\text{g/mL}$) e 0,5 mL de AlCl_3 2%. Para o branco das amostras foram adicionados 0,5 mL das amostras (6,25 $\mu\text{g/mL}$) e 0,5 mL de etanol 40%. Para zerar o aparelho utilizou-se etanol 40%. A partir da equação obtida foi possível calcular a concentração ($\mu\text{g/mL}$) de flavonoides totais nos extratos etanólicos e aquosos.

3.4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante

a) Atividade redutora do radical DPPH \cdot

Soluções estoque das amostras de EABs e EEBs foram diluídas em álcool etílico 95% nas concentrações de 1 mg/mL. Para os EHBs as concentrações foram

de 5 mg/mL, sendo esses previamente diluídos em solução metanólica e DMSO 5% (Dimetilsulfóxido). Em estágio anterior foi realizada uma triagem para todas as amostras com a utilização das concentrações iniciais de 50, 100, 300, 500, 700, 900 e 1000 µg/mL para avaliação da atividade. A partir destas concentrações foram definidos pontos entre 25 e 400 µg/mL, para a construção da curva que demonstrasse o potencial de inibição dos extratos e da Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀). Para isto foram adicionados 0,1 mL da solução das diluições da amostra a 1 mL de etanol 95%, 1 mL de tampão acetato de sódio/ácido acético (100 mM) e 0,5 mL de DPPH^{*} 250 mM (2,2- difenil-1-picril-hidrazina). Para o controle negativo foram utilizados 1,1 mL de etanol 95%, 1 mL de tampão acetato de sódio/ácido acético (0,1 M) e 0,5 mL de DPPH^{*} 250 mM. Para o branco das amostras utilizou-se 1,5 mL de etanol, 1 mL de tampão mais 0,1 mL da amostra e para o branco do aparelho utilizou-se a tampão e etanol 1:1 (74). O momento da reação foi cronometrado totalizando 15 minutos, sendo que no momento zero, foi adicionado 0,5 mL de DPPH^{*} 250 mM nos tubos, com exceção dos brancos. Ao findar o tempo, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (517 nm). Como controles positivos foram utilizados os padrões ácido ascórbico, rutina e BHT. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata. A determinação do potencial de inibição foi realizada por meio da fórmula:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{100 - (\text{Absorbância Amostra} - \text{Absorbância Branco}) \times 100}{\text{Absorbância Controle}}$$

O IC₅₀ foi determinado por meio da equação da reta (y=ax+b) obtida para cada uma das amostras de acordo com Locatelli et. al. (2009) (75).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise estatísticas foram usados como softwares o Microsoft Office Excel® 2013, GraphPad Prism® Version 5.01 e Sistema Action® 2.7.

Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA associado ao teste de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

A correlação linear de Pearson (r) (76) foi utilizada para estabelecer o nível de associações entre os compostos fenólicos, rendimentos e as variáveis ambientais, assim como para com a atividade antioxidante de cada extrato obtido no estudo de sazonalidade. As correlações foram avaliadas de acordo com a abordagem clássica para distribuição de Pearson com a utilização dos seguintes critérios:

- $|r| < 0,3$ (Correlação fraca)
- $0,3 \leq |r| < 0,6$ (Correlação moderada)
- $|r| \geq 0,6$ (Correlação forte)

4 RESULTADOS

4.1 DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados com as informações meteorológicas foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Agroclimatologia da FAL/UnB, e com bases nessas informações foi possível observar que tais dados refletem uma das características do Cerrado que é o seu clima tropical sazonal, onde as temperaturas máximas (médias mensais) não variaram muito durante os meses do ano (26,46 °C – 29,90 °C para o ano de 2013). Outra característica, foi uma maior variação da média mensal da temperatura mínima quando comparado a temperatura máxima (9,43 °C – 17,40 °C). Quanto a precipitação, a média anual característica deste bioma fica entre 1.200 e 1.800 mm, sendo que a precipitação obtida para a área das coletas, de acordo com os dados obtidos, ficou sendo de 1.558 mm. Diferentemente da temperatura, a precipitação média mensal apresentou uma grande estacionalidade, onde o período chuvoso, geralmente dura de outubro a março, é seguido de um período de seca que ocorrem de maio a setembro, fatos estes que também puderam ser observados no decorrer deste estudo (Figura 5) (77).

De acordo com a Figura 5 também foi possível observar em quais meses houveram maior incidência de cada um dos parâmetros climáticos em questão levando em consideração os meses das coletas. Para a radiação global, a maior incidência ocorreu em ago/2013 (18,66 MJm⁻²d⁻¹), seguida de fev/2014 (17,01 MJm⁻²d⁻¹), nov/2013 (16,83 MJm⁻²d⁻¹), mai/2013 (15,99 MJm⁻²d⁻¹) e mai/2014 (15,84 MJm⁻²d⁻¹). Para o índice pluviométrico a maior incidência ocorreu no mês de nov/2013 (6,9 mm), seguida de fev/2014 (4,7 mm), mai/2013 (1,2 mm), mai/2014 (0,4 mm) seguido de ago/2013, cujo o índice pluviométrico para este período foi de zero. Para os dados de temperatura máxima a maior incidência ocorreu em ago/2013 (28,63 °C), seguida de fev/2014 (28,16°C), nov/2013 (27,93 °C), mai/2013 (27,62 °C) e mai/2014 (27,18 °C). E para os dados de temperatura mínima a menor incidência ocorreu no mês de ago/2013 (9,40 °C), seguida de mai/2013 (11,40 °C), mai/2014 (11,60 °C), fev/2014 (27,62 °C) e nov/2013 (27,18 °C).

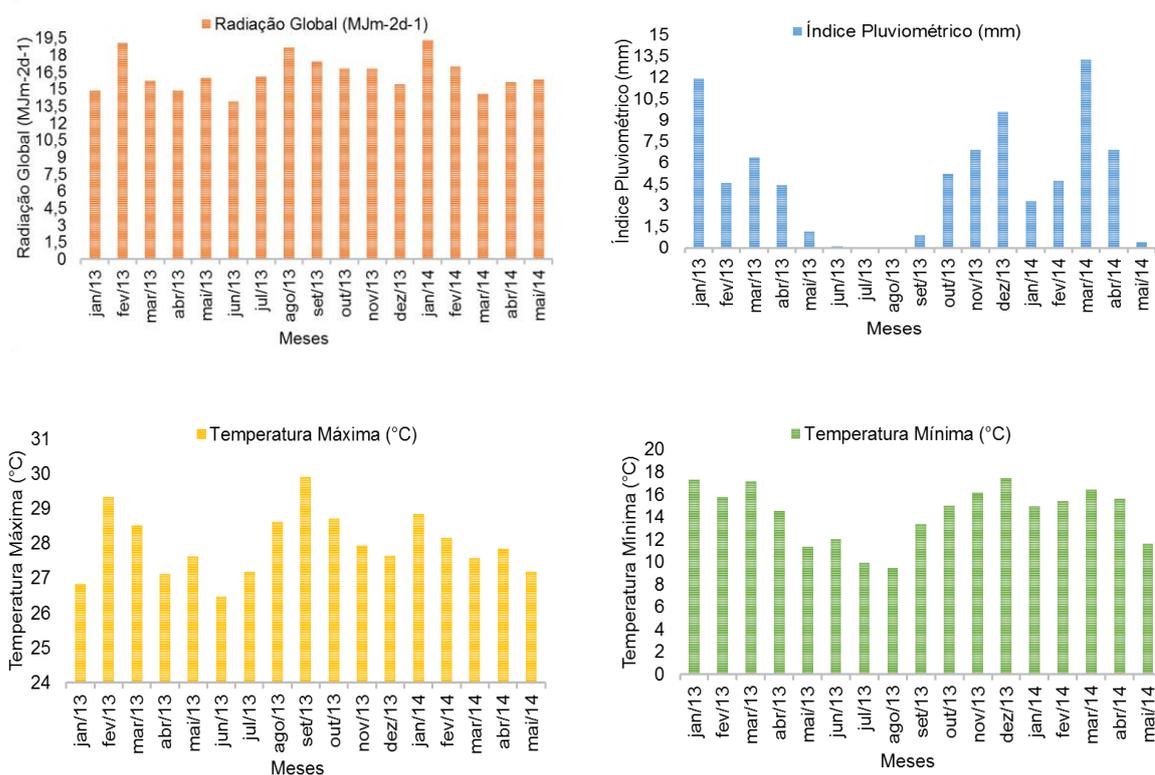


Figura 5. Dados meteorológicos obtidos do Laboratório de Agroclimatologia da FAL/UnB. Referentes a radiação global ($\text{MJm}^{-2}\text{d}^{-1}$), índice pluviométrico (mm), temperatura máxima ($^{\circ}\text{C}$) e temperatura mínima ($^{\circ}\text{C}$) do período de janeiro de 2013 a maio de 2014.

a) Tratamento dos dados Meteorológicos

Os dados meteorológicos foram agrupados e representados pela a média dos parâmetros em questão para posterior comparação com os dados do estudo de sazonalidade obtidos pelos extratos das folhas de *E. daphinites*. O agrupamento foi baseado nas médias dos 90 dias e 30 dias anteriores de cada coleta e dia anterior e o dia de cada coleta das folhas de *E. daphinites*.

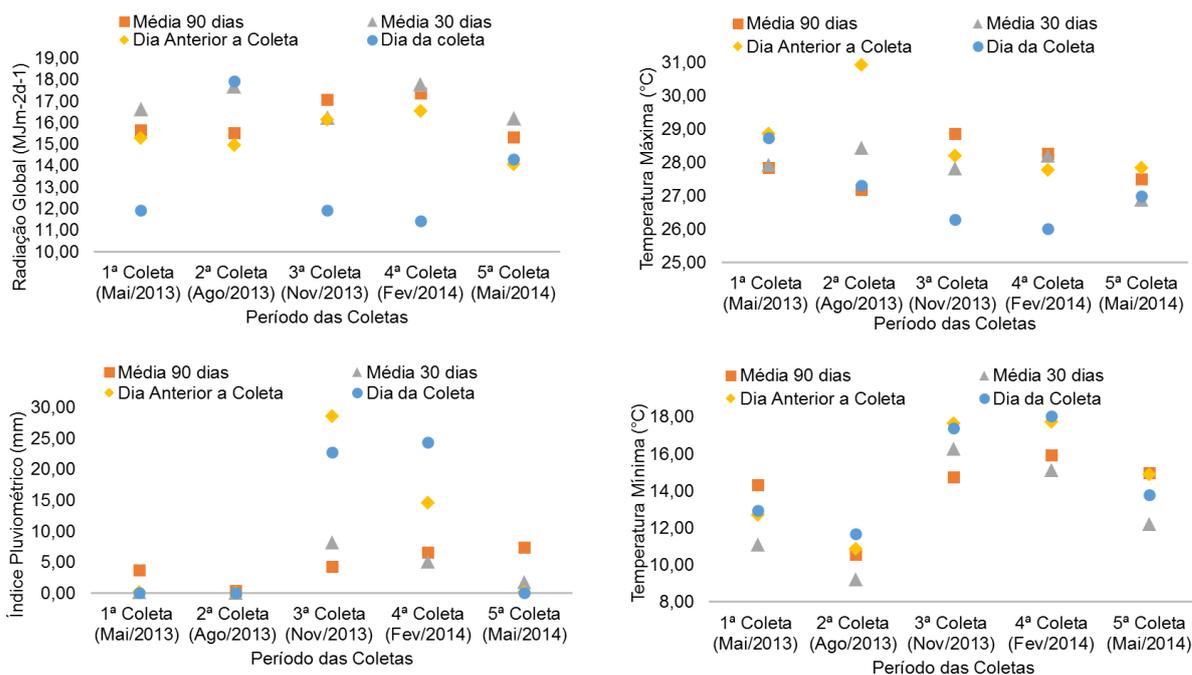


Figura 6. Dados meteorológicos obtidos do Laboratório de Agroclimatologia da FAL/UnB tratados para correlação. Dados tratados como médias dos 90 e 30 dias de cada coleta e dados do dia anterior e do dia de cada coleta.

4.2 RENDIMENTOS

a) Determinação do Rendimento

O rasurado das folhas de *E. daphnites* referentes as cinco coletas realizadas para os EABs resultaram em rendimentos respectivos de 8,00%; 14,07%; 10,57%; 9,71% e 11,08%. Para os EEBs obteve-se rendimentos de 4,00%; 8,84%; 12,75%; 10,78% e 11,48%. Os EHBs apresentaram rendimento de 0,48%; 5,82%; 0,98%; 0,89% e 0,71%. Sendo que dos extratos hexânicos obtidos do rasurado das folhas de *E. daphnites*, aquele que apresentou maior rendimento foi EHB2 (14,10 %). Dentre os extratos etanólicos o EEB3 (12,75%) se destacou. Para os extratos aquosos o maior rendimento foi EAB2 (5,82%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Rendimentos finais dos extratos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*

1ª Coleta – mai/2013				
Extratos	Peso Folha seca	Solvente	Rendimento	Rendimento
Brutos	Rasurada (g)	(mL)	Final (g)	Final (%)
EAB1	31,23	312,3	2,5	8,00
EEB1	62,46	624,6	2,5	4,00
EHB1	62,46	624,6	0,3	0,48
2ª Coleta – ago/2013				
EAB2	118,96	1189,6	16,74	14,07
EEB2	237,92	2379,2	21,04	8,84
EHB3	237,92	2379,2	13,85	5,82
3ª Coleta – nov/2013				
EAB3	107,33	1073,3	11,35	10,57
EEB3	214,66	2146,6	27,38	12,75
EHB3	214,66	2146,6	2,12	0,98
4ª Coleta – fev/2014				
EAB4	153,38	1533,8	14,90	9,71
EEB4	306,72	3067,2	33,07	10,78
EHB4	306,72	3067,2	2,75	0,89
5ª Coleta – mai/2014				
EAB5	55,03	550,30	6,1	11,08
EEB5	110,06	1100,60	12,64	11,48
EHB5	110,06	1100,60	0,79	0,71

Extratos obtidos do processo de maceração seguido de percolação (extratos alcoólicos) e infusão (extrato aquoso) a partir das folhas de *Erythroxylum daphnites*. EAB = Extrato Aquoso Bruto, EEB = Extrato Etanólico Bruto e EHB = Extrato Hexânico Bruto.

b) Sólidos Totais

O rasurado das folhas de *E. daphnites* referentes as três últimas coletas realizadas para os EABs resultaram em teores de sólidos totais respectivos de 1,8% e 1,53%. Para os EEBs obteve-se os teores de 1,66%; 0,9% e 1,43%. Os EHBs apresentaram teores de 0,06%; 0,06% e 0,0%. Sendo que dos extratos hexânicos obtidos do rasurado das folhas de *E. daphnites*, aquele que apresentou maior teor de sólidos totais mensurado foi EHB3 e EHB4 (0,06 %). Dentre os extratos etanólicos o EEB3 (1,66%) se destacou. Para os extratos aquosos o maior teor foi do EAB3 (1,8%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de sólidos totais dos extratos fluídos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxyllum daphnites*

Extratos Brutos	% Sólidos (Média n=3)
3 ^o Coleta (Nov/2013)	
EHB3	0,06
EEB3	1,66
EAB3	1,8
4 ^a Coleta (Fev/2014)	
EHB4	0,06
EEB4	0,90
EAB4	1,53
5 ^a Coleta (Mai/2014)	
EHB5	0,00
EEB5	1,43
EAB5*	-

Extratos obtidos de maceração seguida de percolação (extratos alcoólicos) e infusão (extrato aquoso) a partir das folhas de *E. daphnites* das coletas realizadas entre novembro de 2013 e maio de 2014.

*Extrato foi liofilizado antes de passar pelo ensaio de teor de sólidos totais. EHB (Extrato Hexânico Bruto), EEB (Extrato Etanólico Bruto) e EAB (Extrato Aquosos Bruto).

4.3 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

A Figura 7A/7B mostra o perfil CCD para o EEB1, com seis manchas principais. O Rf dos padrões de ácido ascórbico, miricetina, ácido cafeíco, cumarina, ácido clorogênico, rutina e hiperosídeo foram comparados com o Rf das manchas referentes aos compostos presentes no EEB1. Apenas rutina, ácido clorogênico e hiperosídeo apresentaram Rf semelhante aos compostos presentes no EEB1. Deste modo, foi realizado a técnica de ponto misto para estes compostos, sendo confirmada a presença de rutina (Figura 11A), ácido clorogênico (Figura 11B) e hiperosídeo (Figura 11C) no EEB1.

Para os extratos EEB1, EEB3, EEB4 e EEB5 obtidos do rasurado das folhas de *E. daphnites* observa-se o mesmo perfil cromatográfico com presença de seis pontos. O EEB2 também obtido do rasurado das folhas de *E. daphnites* demonstrou um perfil distinto quando comparado aos demais extratos. Para o EEB2 também é possível que a queimada que ocorreu em maio de 2013 tenha influenciado na síntese de metabólitos da planta, contribuindo assim para uma produção de compostos distintos quando comparados aos extratos etanólicos obtidos de outros períodos. Quando comparados aos padrões utilizados, são confirmadas a presença de rutina, ácido clorogênico (Figura 7A/7B) e hiperídeo (Figura 8A/8B) para os extratos EEB1, EEB3, EEB4 e EEB5 e apenas sugerido presença de rutina para o EEB2 (Figura 9A/9B) (Tabela 3).

Para os extratos EAB1, EAB3, EAB4 e EAB5 obtidos do rasurado das folhas de *E. daphnites* observa-se o mesmo perfil cromatográfico com presença de 4 pontos. O EAB2 também obtido do rasurado das folhas de *E. daphnites* foi o único entre os extratos aquosos que apresentou mancha laranja (Rf ~ 0,87), porém esta ficou encoberta pela mancha azul, que é sugestiva de ácido clorogênico. Também é possível observar por meio da imagem da cromatoplaça que EAB3 quanto fluorescência mostrou-se mais intenso quando comparado com os demais extratos aquosos. Quando comparados aos padrões utilizados, sugere-se a presença de rutina e ácido clorogênico para todos os extratos aquosos (Figura 10A/10B) (Tabela 4).

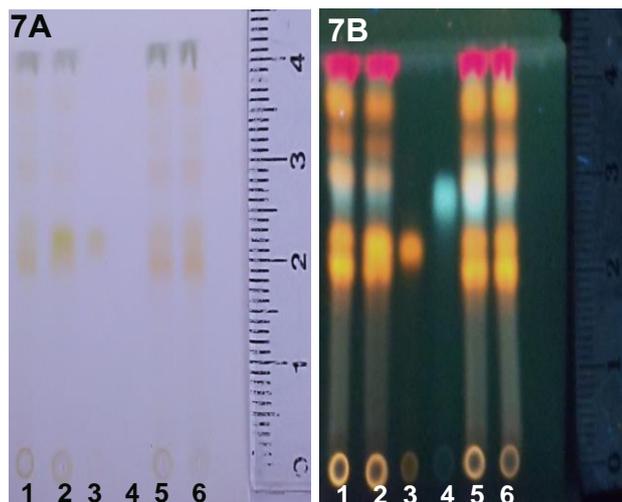


Figura 7A/7B. Perfil cromatográfico por CCD para o Extrato Etanólico Bruto da primeira coleta (EEB1) do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*. A: CCD → vis e B: CCD → UV-365 nm. 1 – EEB1; 2 - ponto misto do EEB1 com rutina; 3 – rutina ($R_f \sim 0,05$); 4 – ácido clorogênico ($R_f \sim 0,6$); 5 – ponto misto do EEB1 com ácido clorogênico; 6 – EEB1. Solução eluente: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26).

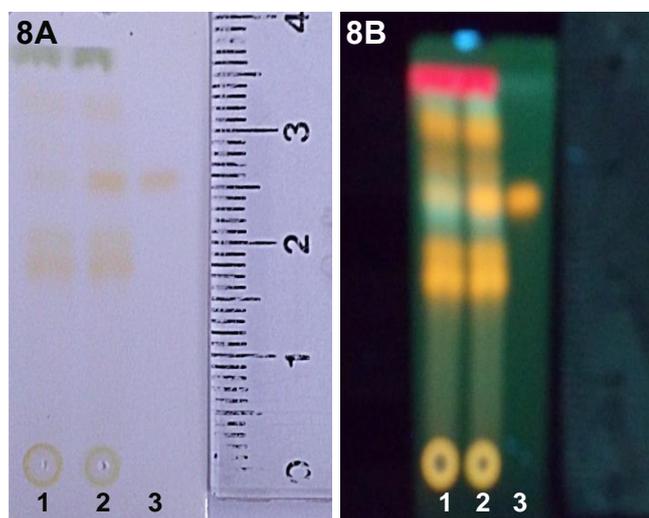


Figura 8A/8B. Perfil cromatográfico por CCD para o Extrato Etanólico Bruto da primeira coleta (EEB1) do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*. A: CCD → vis e B CCD → UV-365 nm. 1 – EEB1; 2 – ponto misto do EEB1 com hiperosídeo; 3 – hiperosídeo ($R_f \sim 0,7$). Solução eluente acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26).

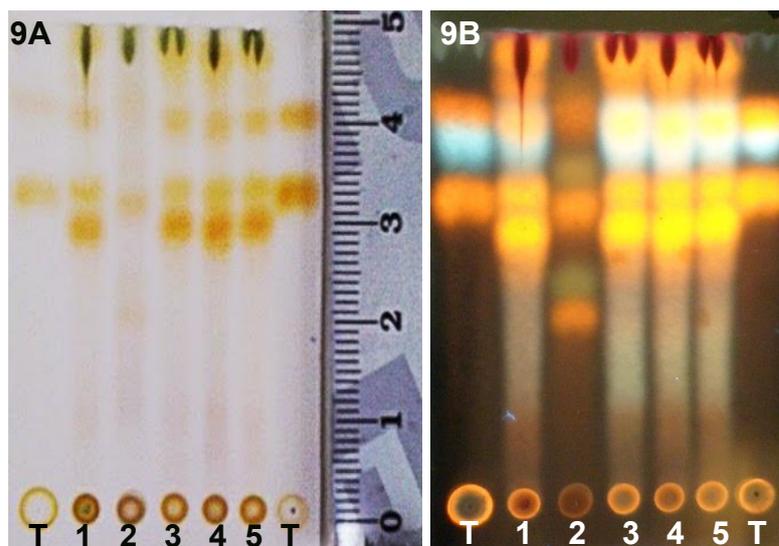


Figura 9A/9B. Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para os Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*. A: CCD → vis e B: CCD → UV-365 nm. T: Rutina (Rf ~ 0,6530), Ácido Clorogênico (Rf ~ 0,7551) e Hiperosídeo (Rf ~ 0,8367); Extratos → 1: EEB1; 2: EEB2; 3: EEB3; 4: EEB4 e 5: EEB5 (Numeração refere-se a cada coleta, onde o EEB1 = 1ª coleta). Solução eluente: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26).

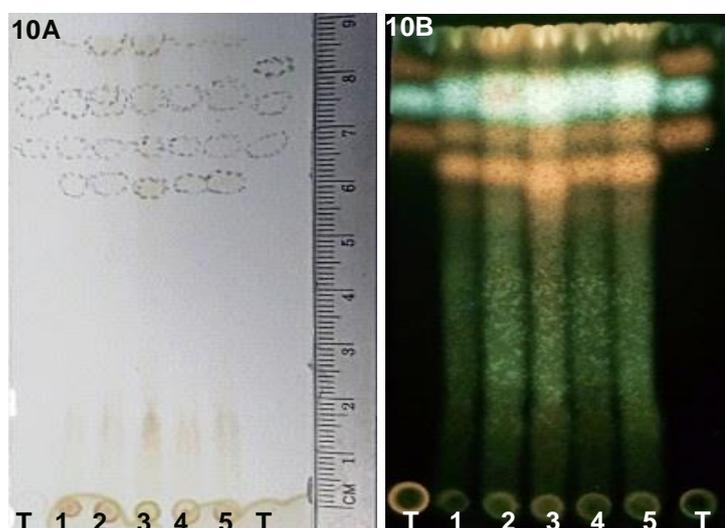


Figura 10A/10B. Perfil cromatográfico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para os Extratos Aquosos Brutos (EABs) do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*. A: CCD → vis e B: CCD → UV-365 nm. T: Rutina (Rf ~ 0,75), Ácido Clorogênico (Rf ~ 0,86) e Hiperosídeo (Rf ~ 0,87); Extratos → 1: EAB1; 2: EAB2; 3: EAB3; 4: EAB4 e 5: EAB5. (Numeração refere-se a cada coleta, onde o EEB1 = 1ª coleta). Solução eluente acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26).

Tabela 3 - Compostos observados nos extratos etanólicos das folhas de *E. daphnites*

R _f	Extratos Etanólicos				
	EEB1	EEB2	EEB3	EEB4	EEB5
0,41	–	Presente	–	–	–
0,49	–	Presente	–	–	–
0,59	Presente	–	Presente	Presente	Presente
0,63	–	Presente	–	–	–
* 0,65	Presente	–	Presente	Presente	Presente
0,71	–	Presente	–	–	–
** 0,76	Presente	–	Presente	Presente	Presente
0,82	Presente	–	Presente	Presente	Presente
*** 0,84	–	Presente	–	–	–
0,90	Presente	–	Presente	Presente	Presente
0,96	Presente	–	Presente	Presente	Presente

* Rutina; **Ácido Clorogênico; ***Hiperosídeo.

Tabela 4 – Compostos observados nos extratos aquosos das folhas de *E. daphnites*

R _f	Extrato Aquoso				
	EAB1	EAB2	EAB3	EAB4	EAB5
0,78	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
*0,75	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
**0,86	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
***0,87	-	Presente	-	-	-
0,96	-	Presente	Presente	-	Presente

* Rutina; **Ácido Clorogênico; ***Hiperosídeo.

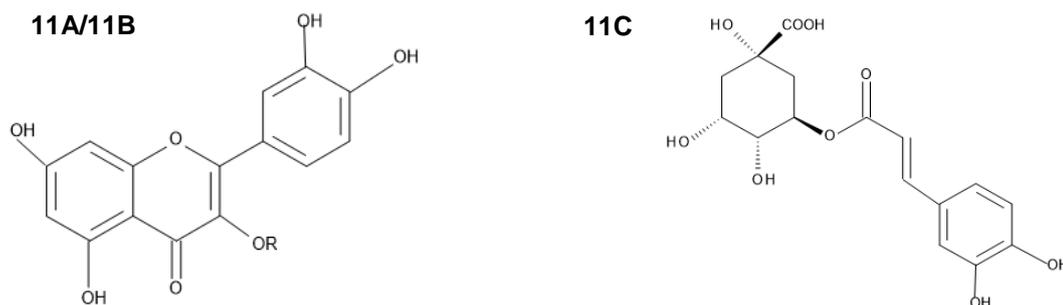


Figura 11A/11B/11C. Estrutura química dos padrões rutina, hiperosídeo e ácido clorogênico. 11A: Rutina, R = Glu – Rha. 11B: hiperosídeo, R = Gal. 11C: ácido clorogênio.

4.4 POLIFENÓIS TOTAIS

Neste ensaio ocorre a formação de um complexo azul, sendo que a cor formada, é dependente do número de hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis (50, 78).

Com base nos dados obtidos a partir das absorvâncias foi possível calcular a regressão linear da curva analítica de ácido gálico obtendo-se assim a equação da reta ($y = 0,0982x - 0,0183$, $r = 0,9989$) e a partir desta foi estabelecido os teores (%) de polifenóis totais em cada extrato.

Para a diferenciação entre os extratos e tratamentos foi aplicado o método de ANOVA – Tukey.

Os teores de polifenóis totais encontrados a partir dos rasurados das folhas de *E. daphnites* variaram de 25,88% à 36,34% entre os extratos aquosos. E a variação entre os extratos etanólicos foi de 22,44% à 27,47% (Figura 13).

Levando em consideração os extratos EABs, EEBs e EHBs utilizados para os ensaios frente o teor de polifenóis totais (%) foi observado que EAB1 (25,88 %) apresentou teor de polifenóis semelhante a todos os EEBs e EAB5. Apresentando teor significativamente menor quando comparado aos extratos aquosos EAB2, EAB3 e EAB4 (Figura 13).

EAB2 (31,90 %) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB3, EAB4, EAB5 e extrato etanólico EEB3. Apresentando teor

significativamente maior que o extrato aquoso EAB1 e extratos etanólicos EEB1, EEB2, EEB4 e EEB5 (Figura 12 e 13).

EAB3 (36,33 %) apresentou teor de polifenóis semelhante ao extrato aquoso EAB2. Apresentando teor significativamente maior que os extratos aquosos EAB1, EAB4 e EAB5, e todos os EEBs (Figura 12 e 13).

EAB4 (31,50 %) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB2 e EAB5. Apresentando teor significativamente maior que o extrato aquoso EAB1 e extratos etanólicos EEB1, EEB4 e EEB5 (Figura 12 e 13).

EAB5 (30,00 %) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB1, EAB2, EAB4 e extratos etanólicos EEB2, EEB3 e EEB4. Apresentando teor significativamente maior que os extratos etanólicos EEB1 e EEB2 e teor significativamente menor quando comparado ao extrato aquoso EAB3 (Figura 12 e 13).

EEB1 (22,44%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao extrato aquoso EAB1 e extratos etanólicos EEB4 e EEB5. Apresentando teor significativamente menor que extratos aquosos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5, e extratos etanólicos EEB2 e EEB3 (Figura 12 e 13).

EEB2 (27,28%) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB1, EAB4 e EAB5, e extratos etanólicos EEB3, EEB4 e EEB5. Apresentando teor significativamente maior que o extrato etanólico EEB1 e menor que extratos aquosos EAB2 e EAB3 (Figura 12 e 13).

EEB3 (27,46%) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB1, EAB2, EAB4 e EAB5, e extratos etanólicos EEB2, EEB4 e EEB5. Apresentando teor significativamente maior que o extrato etanólico EEB1 e menor que o extrato aquoso EAB3 (Figura 12 e 13).

EEB4 (26,38%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao extrato aquoso EAB1 e EAB5, e todos os EEBs. Apresentando teor significativamente menor que EAB2, EAB3 e EAB4 (Figura 12 e 13).

EEB5 (23,62 %) apresentou teor de polifenóis semelhante ao extrato aquoso EAB1, e todos os EEBs. Apresentando teor significativamente menor que os extratos aquosos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5 (Figura 12 e 13).

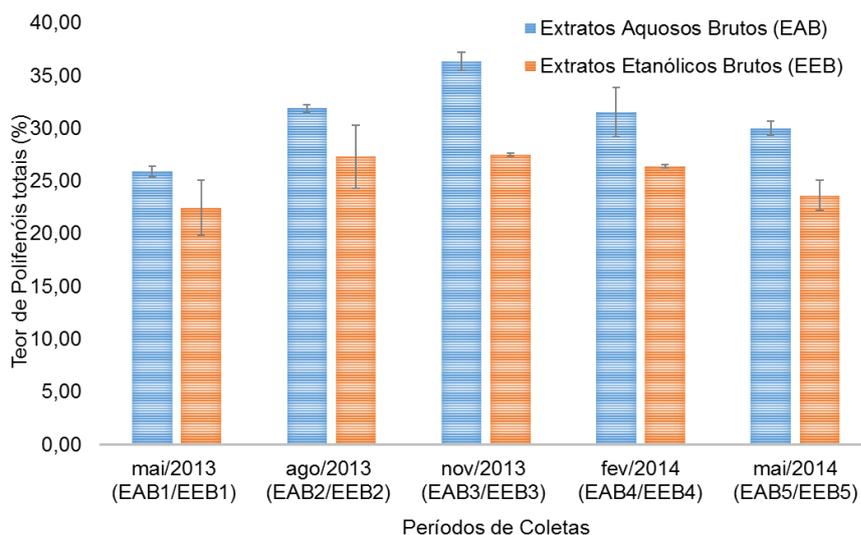


Figura 12. Teores de Polifenóis Totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*.

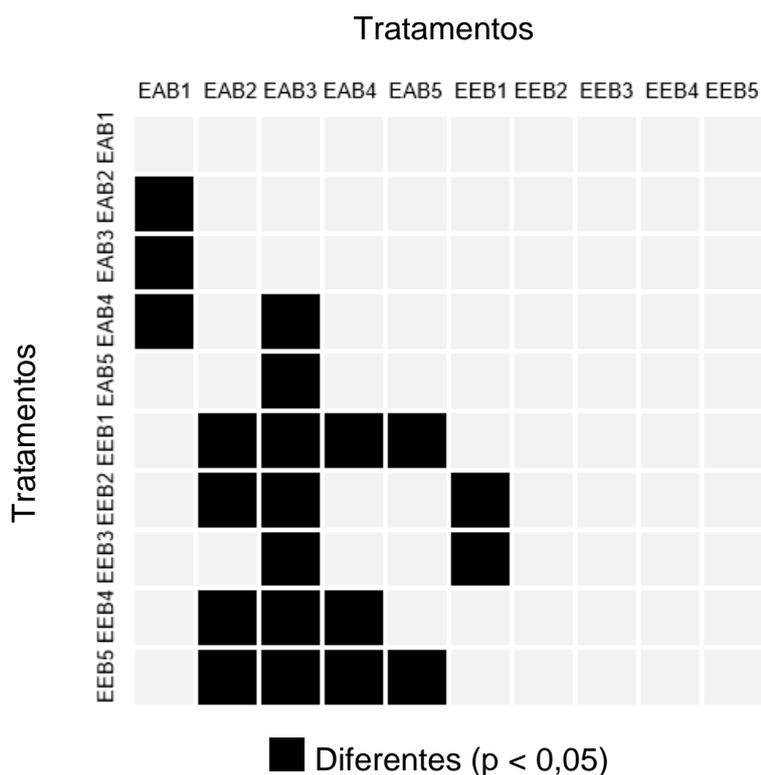


Figura 13. Diagrama representativo para comparação estatística por ANOVA – Tukey dos teores extraíveis de polifenóis. Referentes aos Extratos Aquosos Brutos (EABs) e Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) provenientes das folhas rasuradas de *Erythroxylum daphnites*. A numeração a frente de cada sigla EAB e EEB refere-se a cada coleta, onde o EEB1 = 1ª coleta e assim sucessivamente.

a) Polifenóis versus Rendimentos

Foi feita a correlação dos dados obtidos do rendimento dos extratos EABs e EEBs provenientes de seus respectivos métodos extrativos utilizados neste trabalho com os teores de polifenóis de cada um destes extratos (Tabela 5).

Foi observada uma correlação moderada não significativa ($p = 0,44$) entre o teor de polifenóis e o rendimento dos extratos aquosos ($r = 0,4545$) (Figura 14 e Tabela 5).

E para os extratos etanólicos foi observada uma correlação forte não significativa ($p = 0,25$) para com os seus rendimentos respectivos ($r = 0,6252$) (Figura 15) (Tabela 5). Para esta correlação é dito que, à medida que aumenta-se o rendimento dos extratos, maior será o teor de polifenóis, porém só foi possível observar esse comportamento para os extratos EEB2, EEB3 e EEB4. Outro fato que pode ser observado implicitamente pelo gráfico, são os rendimentos dos EEB1 e EEB5, eles pertencem ao mês de maio de anos distintos. No ano de 2013, semanas antes da coleta das folhas de *E. daphnites* no mês de maio, houve uma queimada. Pode ser que esta tenha influenciado na produção de metabólitos da planta, contribuindo assim para a menor produção de polifenóis dentro os períodos em que foram realizadas as coletas neste estudo.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) dos rendimentos dos extratos dos rasurados das folhas de *E. daphnites* versus o teor de polifenóis

	EABs	EEBs
Polifenóis	*0,4545	**0,6252

*($p = 0,44$). **($p = 0,25$). Não foram detectados valores significativos ($p < 0,05$). EABs = Extratos Aquosos Brutos e EEBs = Extratos Etanólicos Brutos.

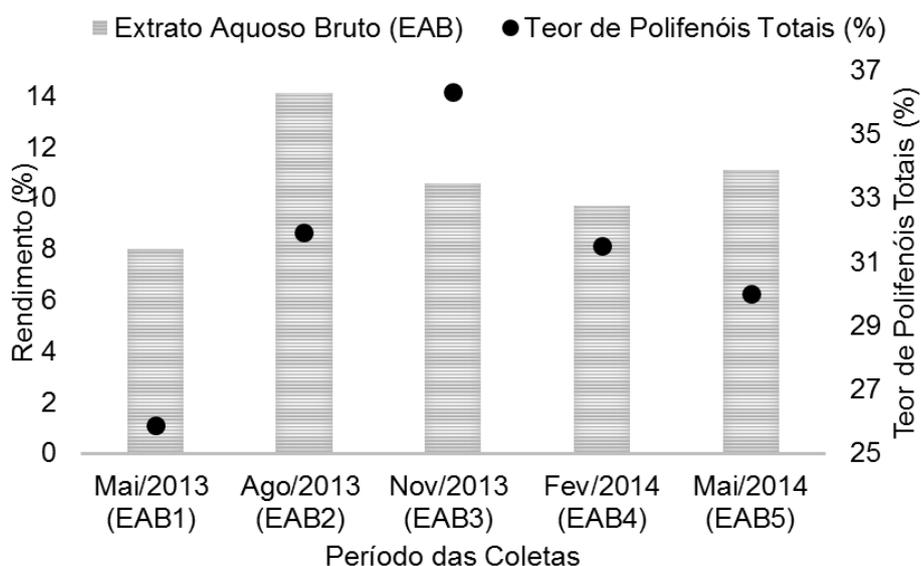


Figura 14. Rendimento dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis. Correlação moderada positiva não significativa ($p = 0,44$).

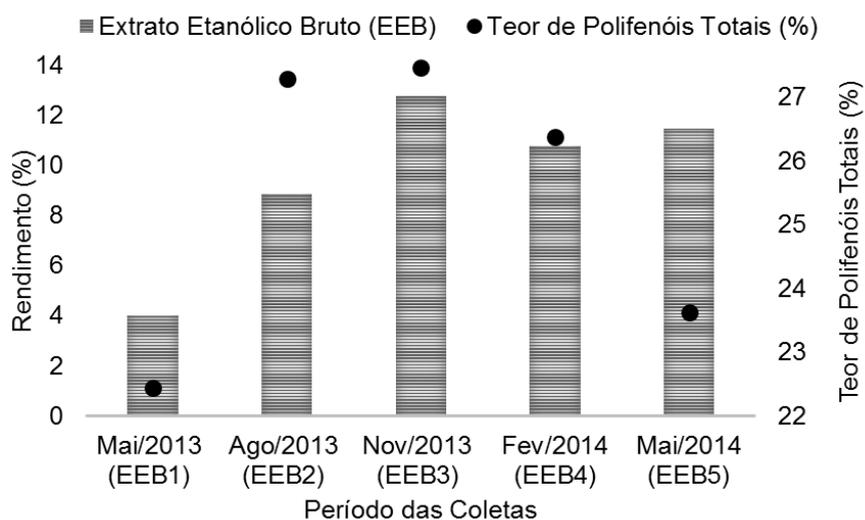


Figura 15. Rendimento dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis. Correlação forte positiva não significativa ($p = 0,25$).

4.5 FLAVONOIDES TOTAIS

Neste ensaio ocorre a formação de um complexo de coloração amarela entre o íon alumínio, Al (III) e os grupos carbonila e hidroxila de flavonoides presentes nas amostras (79).

Com base nos dados obtidos a partir das absorvâncias foi possível calcular a regressão linear da curva analítica de quercetina obtendo-se assim a equação da reta ($y = 0,083x - 0,0103$, $r = 0,998$) e a partir desta foram calculados os teores (%) de flavonoides totais em cada extrato.

Para a diferenciação entre os extratos e tratamentos foi aplicado o método de ANOVA – Tukey.

Levando em consideração os extratos EABs, EEBs utilizados para os ensaios frente o teor de flavonoides totais (%) foi observado que EAB1 (27,51 %) apresentou maior teor de polifenóis quando comparado a todos os EABs e EEBs (Figura 16 e 17).

EAB2 (19,11%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao extrato aquoso EAB3 e extratos etanólicos EEB1 e EEB2. Apresentando teor significativamente maior que os extratos aquosos EAB4 e EAB5, e extratos etanólicos EEB3, EEB4 e EEB5. E teor significativamente menor que EAB1 (Figura 16 e 17).

EAB3 (19,86%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao EAB2 e extratos etanólicos EEB1 e EEB2. Apresentando teor significativamente maior que os extratos aquosos EAB4 e EAB5, e extratos etanólicos EEB3, EEB4 e EEB5. E teor significativamente menor que o EAB1 (Figura 16 e 17).

EAB4 (15,52%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao extrato aquoso EAB5 e aos extratos etanólicos EEB2, EEB3, EEB4 e EEB5. Apresentando teor significativamente menor que os extratos aquosos EAB1, EAB2 e EAB3 e extrato etanólico EEB1 (Figura 16 e 17).

EAB5 (16,54%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao EAB4 e aos extratos etanólicos EEB2 e EEB5. Apresentando teor significativamente maior que os extratos etanólicos EEB3 e EEB4. E teor significativamente menor que os extratos aquosos EAB1, EAB2 e EAB3 e etanólico EEB1 (Figura 16 e 17).

EEB1 (21,46%) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB2 e EAB3. Apresentando teor significativamente maior que os extratos aquosos EAB4 e EAB5, e todos os EEBs (Figura 16 e 17).

EEB2 (18,04%) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5. Apresentando teor significativamente maior que os extratos EEB3, EEB4 e EEB5. E teor significativamente menor que o EAB1 e EEB1 (Figura 16 e 17).

EEB3 (13,70%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao extrato aquoso EAB4 e extratos etanólicos EEB4 e EEB5. Apresentando teor significativamente menor que os extratos aquosos EAB1, EAB2, EAB3 e EAB5, e extratos etanólicos EEB1 e EEB2 (Figura 16 e 17).

EEB4 (13,91%) apresentou teor de polifenóis semelhante ao EAB4, e extratos etanólicos EEB3 e EEB5. Apresentando teor significativamente menor que os extratos aquosos EAB1, EAB2, EAB3 e EAB5, e extratos etanólicos EEB1 e EEB2 (Figura 16 e 17).

EEB5 (14,93%) apresentou teor de polifenóis semelhante aos extratos aquosos EAB4 e EAB5, e extratos etanólicos EEB3 e EEB4. Apresentando teor significativamente menor que os extratos aquosos EAB1, EAB2, EAB3 e extratos etanólicos EEB1 e EEB2 (Figura 16 e 17).

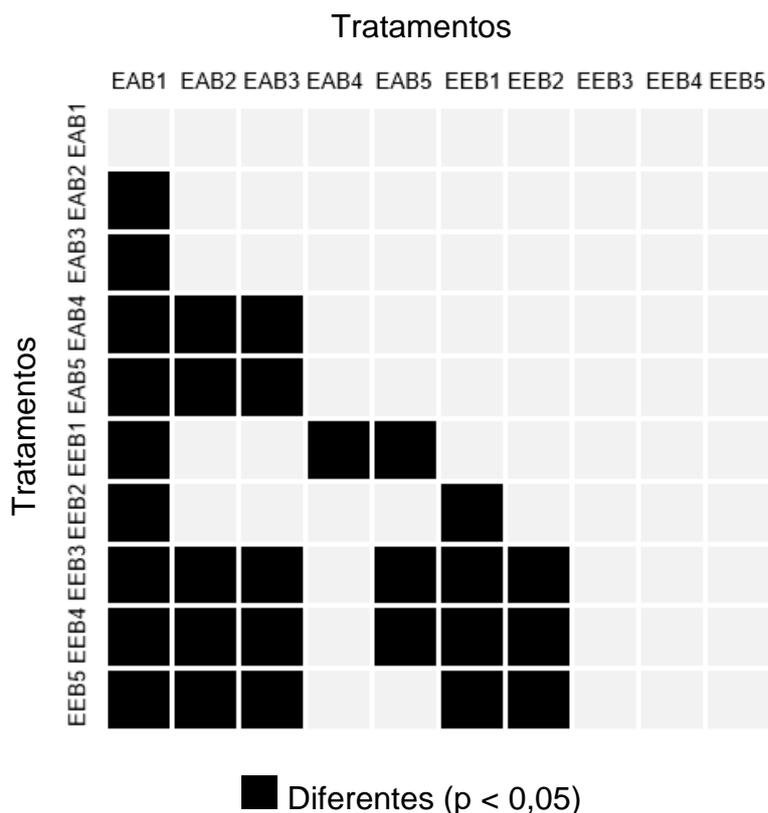


Figura 16. Diagrama representativo para comparação estatística por ANOVA – Tukey dos teores extraíveis de flavonoides. Referentes aos Extratos Aquosos Brutos (EABs) e Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) provenientes das folhas rasuradas de *Erythroxylum daphnites*. A numeração a frente de cada sigla EAB e EEB refere-se a cada coleta, onde o EEB1 = 1ª coleta e assim sucessivamente.

Os maiores teores para flavonoides totais observados encontram-se nos extratos aquosos e etanólico da 1ª coleta com respectivamente 27,52% e 21,47% de flavonoides totais. Outro ponto observado quanto ao teor de flavonoides totais é que, quando comparados os extratos de cada coleta, os extratos aquosos contra os extratos etanólicos, é visto que o EAB1 é maior que o EEB1 (teor flavonoides totais) EAB3 é maior EEB3 (teor de flavonoides totais), já os demais extratos respectivos a suas coletas demonstraram estaticamente ter os mesmos teores. No período da 1ª coleta houve queimada na região onde encontravam-se os espécimes de *E. daphnites* (Figura 17).

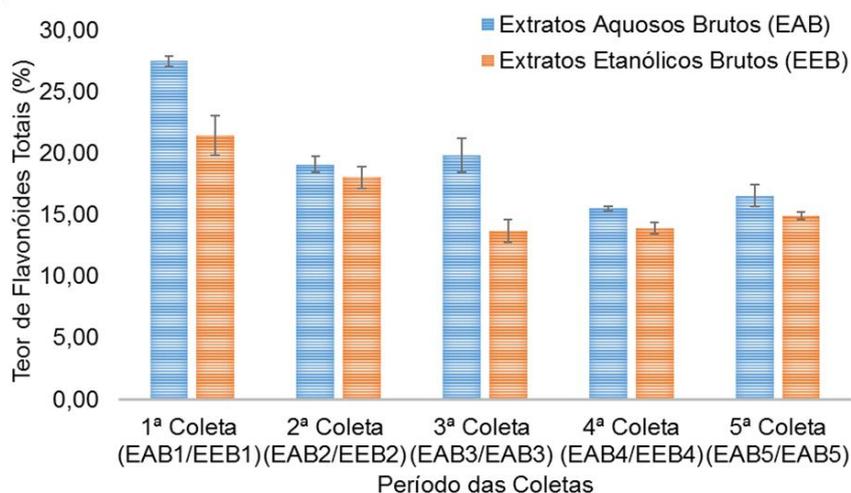


Figura 17. Teores de flavonoides totais em extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*. Numeração a frente de cada sigla EAB e EEB refere-se a cada coleta, onde o EAB1 = 1ª coleta e assim sucessivamente.

a) Rendimentos versus Flavonoides Totais

Foi feita a correlação dos dados obtidos do rendimento dos extratos EABs e EEBs provenientes de seus respectivos métodos extrativos com o teor de flavonoides.

Foi observada uma correlação moderada negativa ($p = 0,41$) não significativa entre o teor de flavonoides e o rendimento dos extratos aquosos ($r = -0,4804$) (Figura 18). E para os extratos etanólicos foi observada uma correlação forte negativa ($r = -0,9660$) para com os seus rendimentos respectivos, sendo esta significativa ($p = 0,007$) (Figura 19). Tais correlações dizem que a medida que o rendimento dos extratos diminui, a tendência é que maiores sejam os teores de flavonoides totais nestes extratos, porém essa associação, foi melhor visualizada na correlação entre rendimentos dos extratos etanólicos e os seus teores de flavonoides totais respectivos (Tabela 6).

Tabela 6 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) dos rendimentos dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus o teor de flavonoides

	EABs	EEBs
Flavonoides	*-0,4804	** -0,9660

*($p = 0,41$). **($p = 0,007$). Valores em negrito são significativos ($p < 0,05$). EABs = Extratos Aquosos Brutos e EEBs = Extratos Etanólicos Brutos.

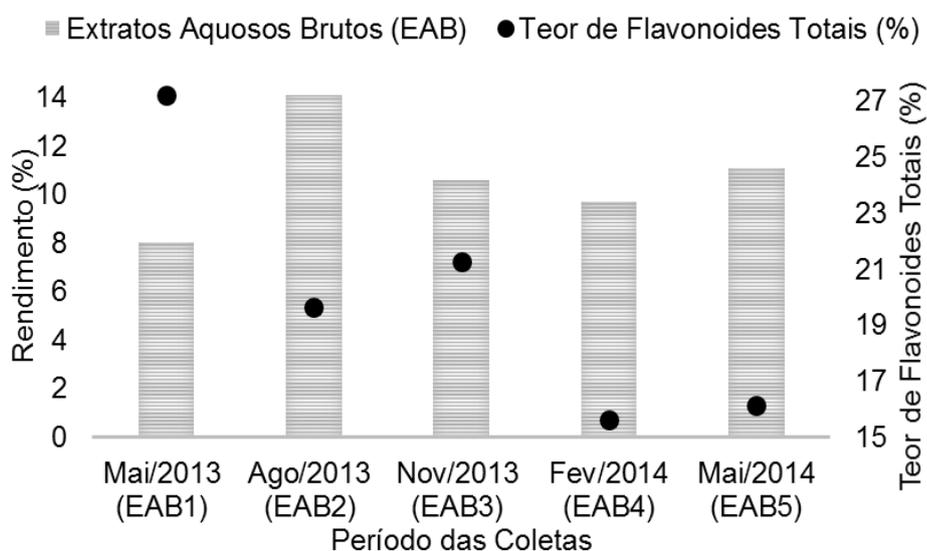


Figura 18. Rendimento dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides. Correlação moderada negativa não significativa ($p = 0,41$).

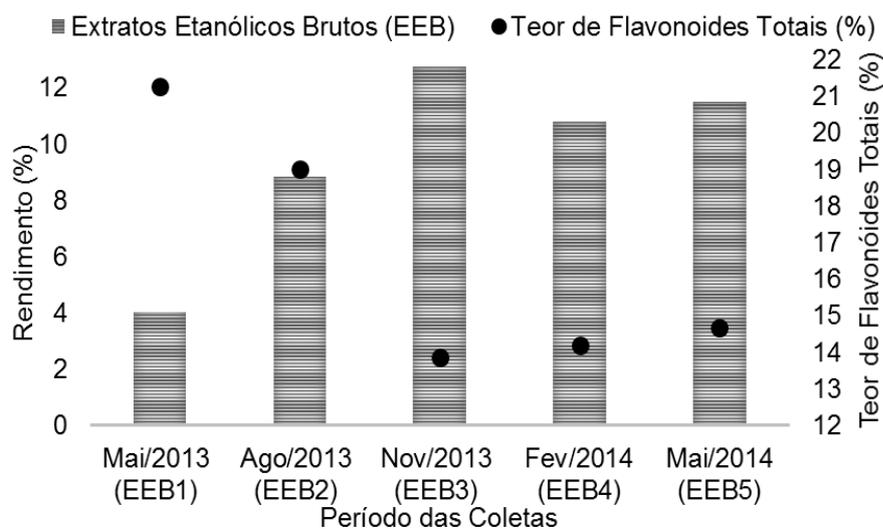


Figura 19. Rendimento dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides totais. Correlação forte negativa significativa ($p = 0,007$).

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

a) Determinação do IC_{50} para os extratos brutos de *E. daphnites*.

O ensaio por DPPH[•] trata-se de uma técnica espectrofotométrica que baseia-se na capacidade descorante da amostra. É um método indireto para a determinação da atividade antioxidante e determinante na quantificação do potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados, alimentos e amostras biológicas relevantes. O radical possui cor púrpura e por ação de um antioxidante “(AH)” ou uma espécie radicalar “(R)” o DPPH[•] é reduzido e forma o difenil-picril-hidrazina, apresentando assim coloração amarela devido ao desaparecimento da absorção que pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (80).

A ação antioxidante das folhas de *E. daphnites* foram analisadas por meio da capacidade dos compostos presentes nas amostras de reduzirem o radical livre

DPPH*, sendo que, quanto maior é a redução deste radical pela amostra, maior será sua atividade antioxidante (Tabela 7).

Para a diferenciação entre os extratos e tratamentos foi aplicado o método de ANOVA – Tukey.

Levando em consideração os tratamentos ácido ascórbico, BHT e rutina (padrões) e os tratamentos EABs, EEBs e EHBs utilizados para os ensaios frente a atividade antioxidante por DPPH* foi observado que o ácido ascórbico ($IC_{50} = 2,6 \mu\text{g/mL}$) mostrou-se mais ativo que o BHT, que os extratos etanólicos EEB1, EEB2, EEB3 e EEB4 e todos os extratos brutos aquosos e hexânicos. E apresentou atividade semelhante ao padrão rutina e ao extrato etanólico EEB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O BHT ($37,90 \mu\text{g/mL}$) mostrou-se diferente de todos os extratos e padrões, porém mostrou-se mais ativo apenas frente aos extratos hexânicos EHB1, EHB3, EHB4 e EHB5 (Tabela 7 e Figura 20).

A rutina ($4,53 \mu\text{g/mL}$) mostrou-se mais ativa que o EEB1, extratos aquosos EAB1, EAB4 e EAB5 e todos os extratos hexânicos. Apresentando atividade semelhante aos extratos etanólicos EEB2, EEB3, EEB4, EEB5 e extratos aquosos EAB2 e EAB3 (Tabela 7 e Figura 20).

O EEB1 ($7,62 \mu\text{g/mL}$) mostrou-se mais ativo que o padrão BHT e mais ativo que todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante aos extratos etanólicos EEB2, EEB4, e com os extratos aquosos EAB1, EAB3, EAB4 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EEB2 ($5,34 \mu\text{g/mL}$) é mais ativo que o padrão BHT, extrato aquoso EAB1 e todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante ao padrão rutina e aos extratos etanólicos EEB1, EEB3, EEB4, EEB5 e extratos aquosos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EEB3 ($5,03 \mu\text{g/mL}$) foi mais ativo que o padrão BHT, extratos EEB1, EAB1 e todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante ao padrão rutina, e aos extratos etanólicos EEB2, EEB4 e EEB5 assim como com os extratos aquosos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EEB4 ($5,66 \mu\text{g/mL}$) foi mais ativo que o padrão BHT, extrato EAB1 e todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante ao padrão rutina e com todos os extratos etanólicos e com os extratos aquosos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EEB5 (4,93 µg/mL) foi mais ativo que o padrão BHT e os extratos EEB1, EAB1 e todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante aos padrões rutina e ácido ascórbico, extratos etanólicos EEB2, EEB3 e EEB4, assim como com os extratos aquosos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EAB1 (9,08 µg/mL) foi mais ativo que o padrão BHT, e que os extratos hexânicos EHB1, EHB3, EHB4 e EHB5. Apresentou atividade semelhante aos extratos EEB1, EAB5 e EHB2 (Tabela 7 e Figura 20).

O EAB2 (5,17 µg/mL) foi mais ativo que o padrão BHT e que os extratos EEB1, EAB1 e todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante ao padrão rutina e aos extratos etanólicos EEB2, EEB3, EEB4 e EEB5, assim como com os extratos aquosos EAB3, EAB4 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EAB3 (6,26 µg/mL) foi mais ativo que o padrão BHT e os extratos EAB1 e todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante ao padrão rutina, e a todos os extratos etanólicos e aos extratos aquosos EAB2, EAB4 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EAB4 (6,40 µg/mL) foi mais ativo que o padrão BHT e que os extratos EAB1 e que todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante a todos os extratos etanólicos e aos extratos aquosos EAB2, EAB3 e EAB5 (Tabela 7 e Figura 20).

O EAB5 (7,27 µg/mL) foi mais ativo que o padrão BHT e todos os extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante a todos os extratos etanólicos e aquosos (Tabela 7 e Figura 20).

O EHB1 (99,83 µg/mL) Não mostrou-se mais ativo que nenhum padrão utilizado neste estudo, porém apresentou-se mais ativo que os extratos hexânicos EHB4 e EHB5. Também não apresentou atividade semelhante aos padrões e demais extratos deste estudo (Tabela 7 e Figura 20).

O EHB2 (10,34 µg/mL) foi mais ativo que o padrão BHT e demais extratos hexânicos. Apresentou atividade semelhante ao do EAB1 (Tabela 7 e Figura 20).

O EHB3 (74,38 µg/mL) não mostrou-se mais ativo que nenhum padrão utilizado neste estudo, porém apresentou-se mais ativo que os extratos hexânicos EHB1, EHB4 e EHB5. Não apresentou atividade semelhante aos padrões e demais extratos usados neste estudo (Tabela 7 e Figura 20).

O EHB4 (110,46 $\mu\text{g/mL}$) Não mostrou-se mais ativo que nenhum padrão utilizado neste estudo, porém apresentou-se mais ativo que o EHB5. Não apresentou atividade semelhante aos padrões e extratos usados neste estudo (Tabela 7 e Figura 20).

O EHB5 (123,08 $\mu\text{g/mL}$) Não mostrou-se mais ativo que nenhum padrão ou extratos, assim como não apresentou atividade semelhante aos padrões e extratos utilizados neste estudo (Tabela 7 e Figura 20).

Tabela 7 – Atividade antioxidante por DPPH* para os extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* e controles positivos

Sigla	IC ₅₀	
	($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão
VIT C	2,60	0,47
RUT	4,53	0,99
BHT	37,90	0,42
EAB1	9,08	0,07
EAB2	5,17	0,13
EAB3	6,26	0,05
EAB4	6,40	0,03
EAB5	7,27	0,07
EEB1	7,62	0,14
EEB2	5,34	0,09
EEB3	5,03	0,03
EEB4	5,66	0,16
EEB5	4,93	0,08
EHB1	99,83	0,90
EHB2	10,34	0,19
EHB3	74,38	1,08
EHB4	110,46	2,53
EHB5	123,08	1,21

VIT C = vitamina C, RUT = rutina, BHT = hidroxitolueno de butila, EABs = Extratos Aquosos Brutos, EEBs = Extratos Etanólicos Brutos, EHBs = Extratos Hexânicos Brutos. As numerações a frente de cada sigla referem-se a cada coleta, onde o EEB1 = 1ª coleta e assim sucessivamente.

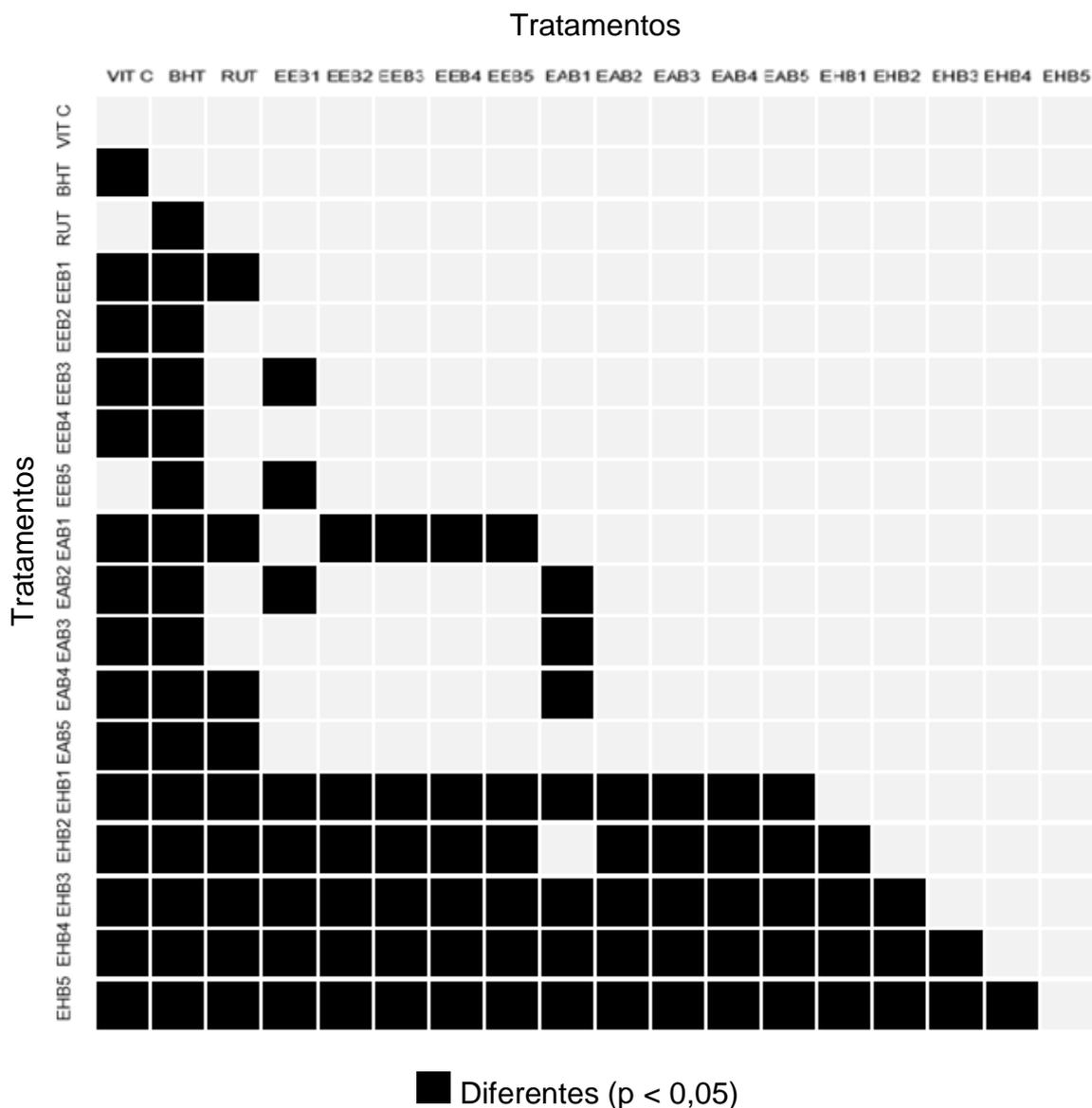


Figura 20. Diagrama representativo para comparação estatística por ANOVA – Tukey do IC₅₀ da redução do DPPH* para os extratos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites*. VIT C = vitamina C, RUT = rutina, BHT = hidroxitolueno de butila, EABs = Extratos Aquosos Brutos, EEBs = Extratos Etanólicos Brutos, EHBs = Extratos Hexânicos Brutos. As numerações a frente de cada sigla referem-se a cada coleta, onde o EEB1 = 1ª coleta e assim sucessivamente.

b) Atividade Antioxidante versus rendimento

Para este foi aplicada a correlação de Pearson (r) utilizando os valores de IC_{50} obtidos dos extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos frente ao ensaio de redução do radical livre DPPH^{*} com os valores de rendimentos destes respectivos extratos.

Foi possível observar correlação forte negativa significativa ($p = 0,02$) entre o rendimento do extrato etanólico frente a atividade antioxidante ($r = -0,9343$) (Figura 21) assim como entre o rendimento dos extratos hexânicos ($r = -0,9262$) (Figura 22) com a atividade antioxidantes dos mesmos. Também vale destacar que houve correlação forte negativa não significativa ($p = 0,07$) da atividade antioxidante dos extratos aquoso ($r = -0,6988$) com seus respectivos rendimentos (Figura 23), porém estes não se mostraram significativos (Tabela 8). Deste modo é possível observar que quanto maior o rendimento, mais ativo é o extrato pois seu IC_{50} foi menor.

Tabela 8 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) da atividade antioxidante por redução do DPPH^{*}

	EABs (IC_{50})	EEBs (IC_{50})	EHBs (IC_{50})
Rendimentos	*-0,8450	** -0,9343	** -0,9262

*($p = 0,07$). **($p = 0,02$). Valores em negrito são significativos ($p < 0,05$). IC_{50} por DPPH^{*} dos EABs, EEBs e EHBs dos rasurados das folhas de *E. daphnites* versus os rendimentos dos extratos. As numerações a frente de cada sigla referem-se a cada coleta, onde o EEB1 = 1^a coleta e assim sucessivamente.

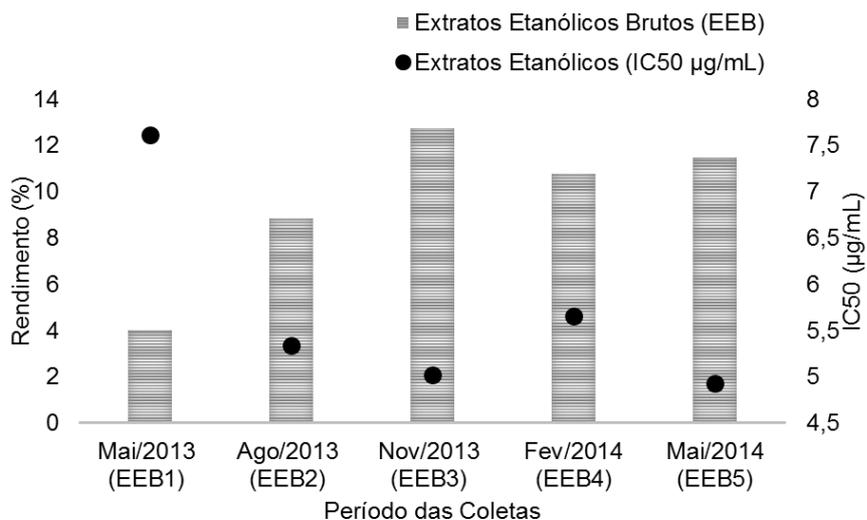


Figura 21. Atividade antioxidante por redução do DPPH^{*} dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos rendimentos. Correlação forte negativa significativa ($p = 0,02$).

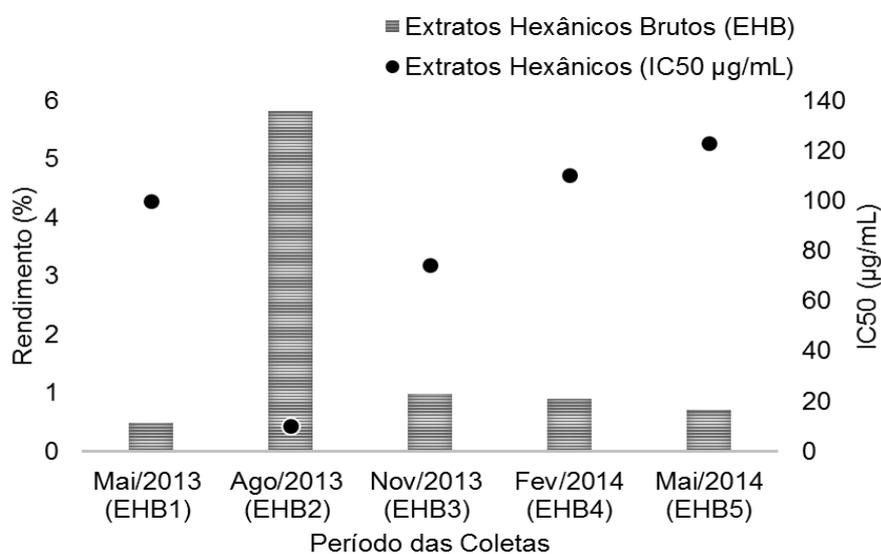


Figura 22. Atividade antioxidante por redução do DPPH^{*} dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos rendimentos. Correlação forte negativa significativa ($p = 0,02$).

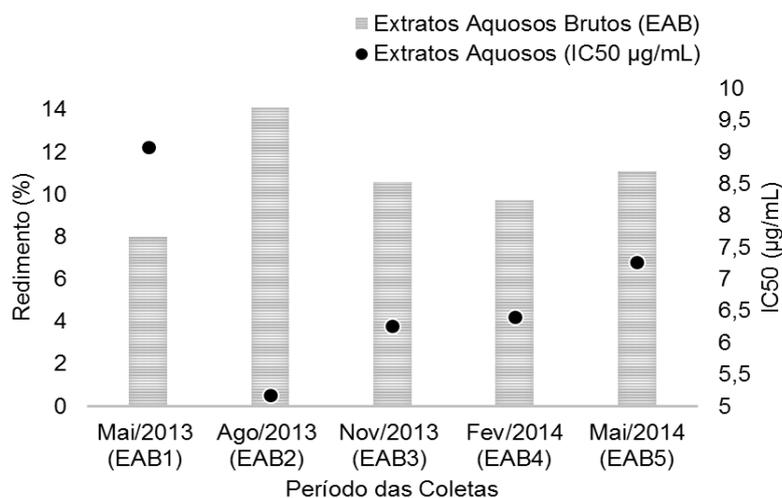


Figura 23. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos rendimentos. Correlação forte negativa não significativa ($p = 0,07$).

c) Polifenóis e Flavonoides versus Atividade Antioxidante

Para este foi aplicado o método de correlação de Pearson para avaliar a existência de uma possível correlação entre a presença de compostos polifenóis dos extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos com a atividade antioxidante pelo ensaio de redução do radical livre DPPH*.

Foi observado uma correlação forte negativa da atividade antioxidante dos extratos aquosos ($r = -0,6393$) (Figura 24) e etanólicos ($r = -0,7609$) (Figura 25) com seus respectivos teores de polifenóis, porém estas correlações não se mostraram significativas ($0,15 < p < 0,50$) (Tabela 9). Esta correlação diz que a medida que o teor de polifenóis aumenta, a tendência do IC₅₀ é diminuir. Isto quer dizer que a medida que o teor de polifenóis aumenta, melhor é a atividade antioxidante dos extratos em questão.

Para a atividade dos extratos aquosos ($r = 0,6861$) (Figura 26) e etanólicos ($r = 0,8335$) (Figura 27) correlacionados com os seus respectivos teores de flavonoides

totais foi observado correlação forte positiva não significativa ($0,05 < p < 0,15$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Pearson (r) da atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus os teores de polifenóis e flavonoides

	EABs	EEBs
Polifenóis	*-0,6393	**0,7609
Flavonoides	*0,6861	**0,8335

*($p < 0,25$). **($p < 0,15$). Não foram detectados valores considerados significativos ($p < 0,05$). EABs = Extratos Aquosos Brutos e EEBs = Extratos Etanólicos Brutos.

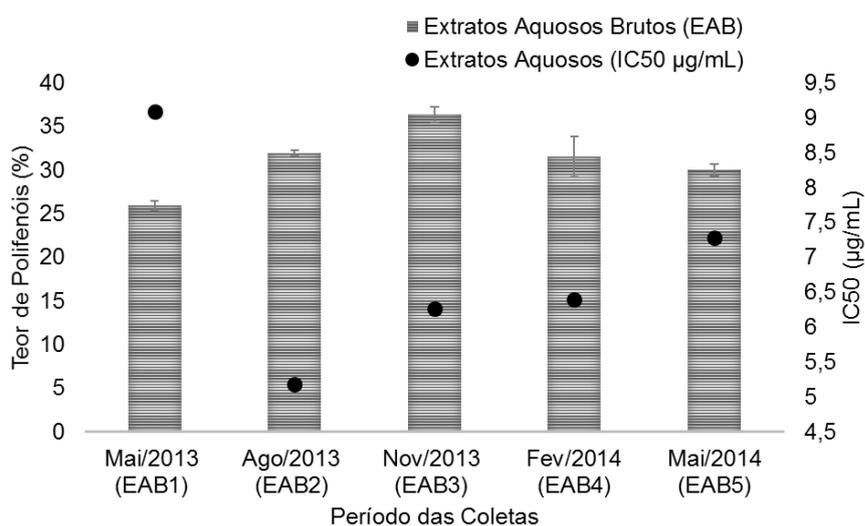


Figura 24. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis. Correlação forte negativa não significativa ($p < 0,24$).

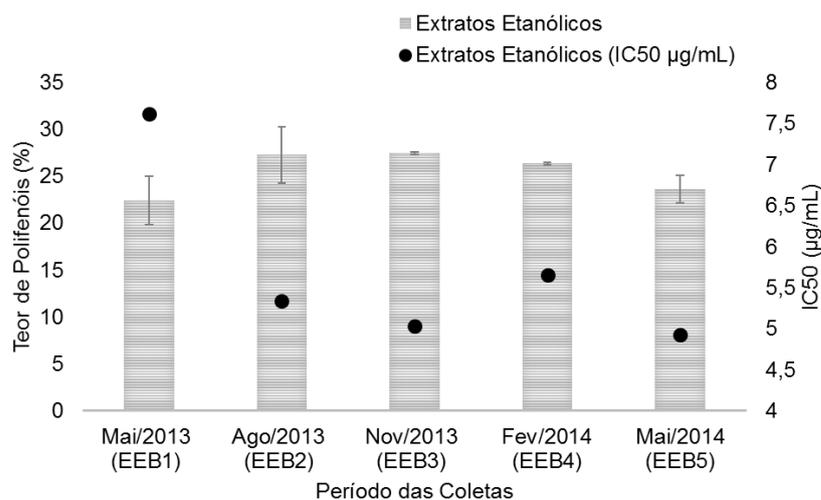


Figura 25. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de polifenóis. Correlação forte negativa não significativa ($p < 0,13$).

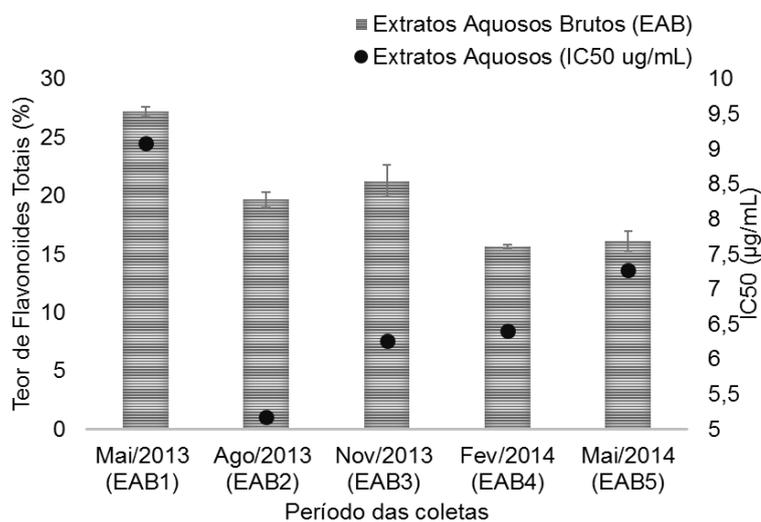


Figura 26. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides. Correlação forte positiva não significativa ($p < 0,20$).

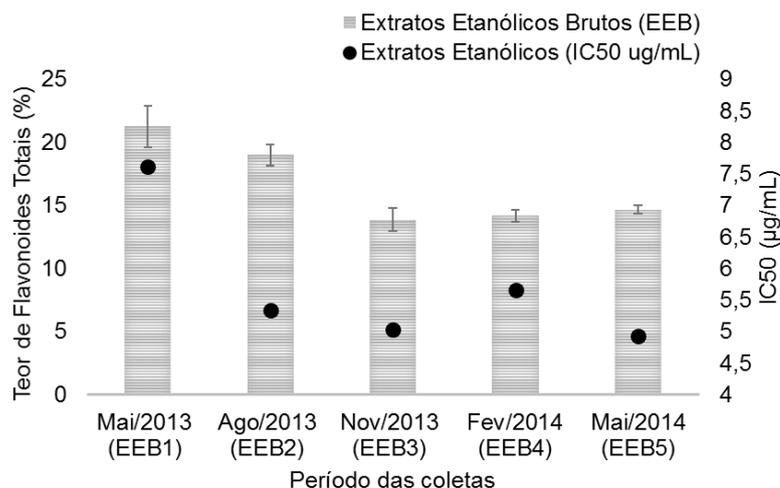


Figura 27. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos etanólicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionados com seus respectivos teores de flavonoides. Correlação forte positiva não significativa ($p < 0,07$).

4.7 CORRELAÇÕES COM OS DADOS METEOROLÓGICOS

a) Rendimento dos extratos brutos versus os dados meteorológicos

Para o modelo com a média de 90 dias anteriores as coletas, foi possível observar uma correlação forte negativa entre a temperatura mínima ($r = -0,9403$) e os rendimentos dos extratos hexânicos, sendo que para este, o p-valor foi significativo ($p = 0,01$) (Figura 28). Também houve uma correlação forte negativa não significativa entre o índice pluviométrico e os rendimentos dos extratos hexânicos ($r = -0,8138$) ($0,15 < p < 0,50$). Tais correlações podem ser interpretadas da seguinte forma: a medida que a temperatura e índice pluviométrico diminuem os rendimentos dos extratos tendem a aumentar (Tabela 10).

Rendimentos dos EEBs não demonstraram relação forte frente ao modelo com 90 dias. Os rendimentos dos EABs frente ao modelo de 90 dias apresentaram correlação forte negativa com a temperatura mínima ($r = 0,7662$) ($0,05 < p < 0,15$) (Tabela 10).

Para o modelo da média dos 30 dias anteriores a cada coleta não foi observado correlações significativas, contudo foi possível observar uma correlação forte negativa entre os rendimentos dos EHBs com a temperatura mínima ($r = -0,6298$) ($0,50 < p < 1,00$); Duas correlações fortes negativas para os rendimentos dos EEBs com pluviometria ($r = 0,7170$) ($0,15 < p < 0,50$) e temperatura mínima ($r = 0,6261$) ($0,15 < p < 0,50$); Em relação aos EABs todas as correlações foram fracas (Tabela 10).

Para o modelo com a utilização dos dados climáticos referentes ao dia anterior de cada coleta, foi observado que houve uma correlação forte positiva significativa ($p = 0,02$) entre os rendimentos dos EHBs e a temperatura máxima ($r = 0,9220$) (Figura 29). Para essa correlação observa-se que a medida que a temperatura aumenta, o rendimento (%) dos EHBs tendem a aumentar em proporção direta; Correlação forte positiva não significativa ($0,15 < p < 0,50$) entre a pluviometria ($r = 0,6182$) e a temperatura mínima ($r = 0,6625$) para os respectivos rendimentos dos EEBs; E correlação forte positiva não significativa ($0,15 < p < 0,50$) dos rendimentos dos EABs com a temperatura máxima ($r = 0,6661$) (Tabela 10).

No modelo utilizando os dados climáticos obtidos para cada dia da coleta foi possível observar correlações significativas ($p = 0,03$) entre os rendimentos dos EHBs com a radiação global ($r = 0,8996$) demonstrando assim uma correlação forte positiva (Figura 30). Essa correlação indica que a medida que a radiação global aumenta, os rendimentos dos EHBs tendem a aumentar em proporção direta (Tabela 10).

Com o uso do modelo de 30 dias, também foi possível observar uma correlação forte negativa significativa ($p = 0,02$) entre os rendimentos dos EEBs com a temperatura máxima ($r = -0,9156$) (Figura 31), sendo que tal correlação indica que a medida que a temperatura diminui a tendência é que o rendimento aumente.

Para o dia da coleta foi observado correlação forte positiva significativa ($p = 0,03$) entre os rendimentos dos EABs com a radiação global ($r = 0,9012$) (Figura 32), que indica que, com o aumento da radiação, a tendência é o aumento do rendimento para os extratos aquosos (Tabela 10).

Tabela 10 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os rendimentos dos extratos de *Erythroxylum daphnites* versus as variáveis ambientais

Rendimentos dos Extratos Aquosos Brutos (EABs) - (r)				
Dados Meteorológicos	90	30	Dia A	Dia C
Radiação Global	***-0,2943	***0,3324	***-0,3387	0,9012
Índice Pluviométrico	** -0,5137	***-0,1817	***-0,1617	***-0,2327
Temperatura Máxima	** -0,4934	***0,2077	**0,6661	***-0,2668
Temperatura Mínima	*-0,7662	** -0,4105	***-0,4021	***-0,3815
Rendimentos dos Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) - (r)				
Radiação Global	**0,4602	***-0,1462	***0,1581	***-0,0103
Índice Pluviométrico	***0,3978	**0,7170	**0,6182	**0,5764
Temperatura Máxima	***0,3981	***-0,2834	***-0,3833	-0,9156
Temperatura Mínima	***0,2553	**0,6261	**0,6625	**0,5961
Rendimentos dos Extratos Hexânicos Brutos (EHBs) - (r)				
Radiação Global	***-0,3337	***0,5719	***-0,2053	0,8996
Índice Pluviométrico	*-0,8138	***-0,4067	***-0,3125	***-0,3387
Temperatura Máxima	** -0,5781	***0,5653	0,9220	***0,0497
Temperatura Mínima	-0,9403	***-0,6298	** -0,6591	** -0,5544

Valores em negrito foram considerados significativos ($p < 0,05$). *($0,05 < p < 0,15$). **($0,15 < p < 0,50$). ***($0,50 < p < 1,00$). 90 = 90 dias anteriores a coleta, 30 dias anteriores a coleta, Dia A = Dia anterior a coleta e Dia C = Dia da coleta.

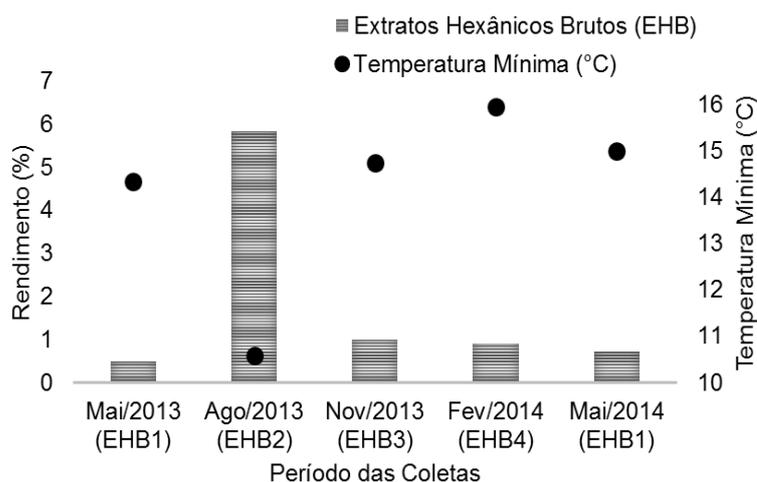


Figura 28. Rendimentos dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionado com a média da temperatura mínima de 90 dias antes da coleta. Correlação forte negativa significativa ($p = 0,01$).

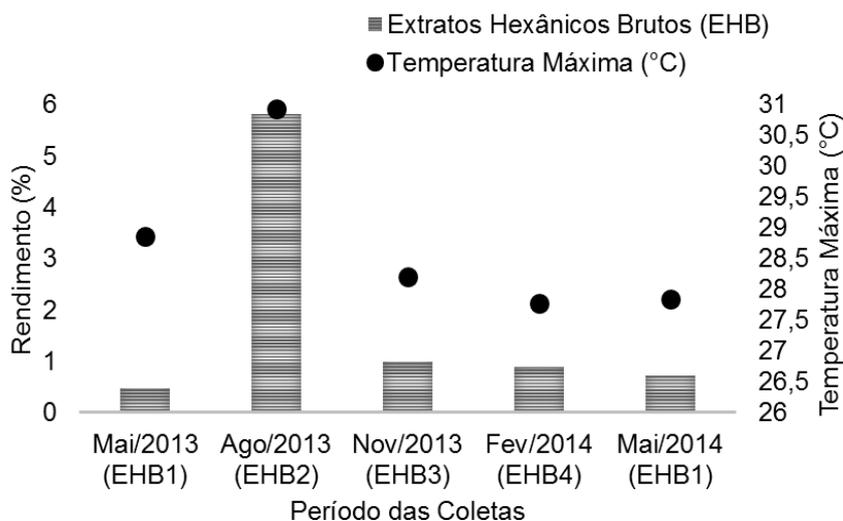


Figura 29. Rendimentos dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionado com a média da temperatura máxima referente ao dia anterior de cada coleta. Correlação forte positiva significativa ($p = 0,02$).

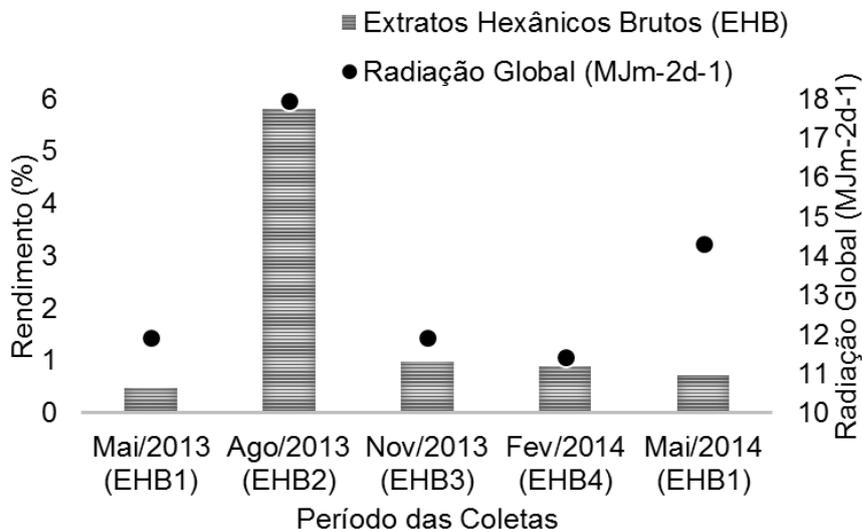


Figura 30. Rendimentos dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionado com a média da radiação global do dia de cada coleta das folhas. Correlação forte positiva significativa ($p=0,03$).

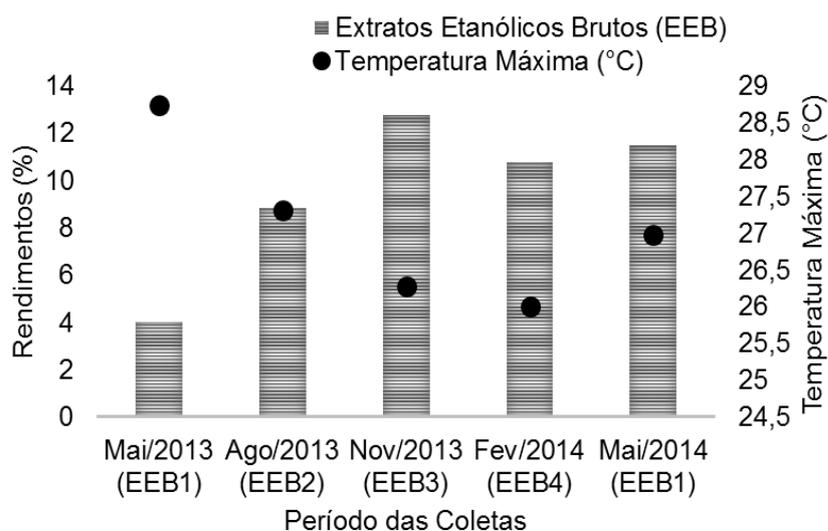


Figura 31. Rendimentos dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionado com a temperatura máxima do dia de cada coleta. Correlação forte negativa significativa ($p = 0,02$) com a temperatura máxima.

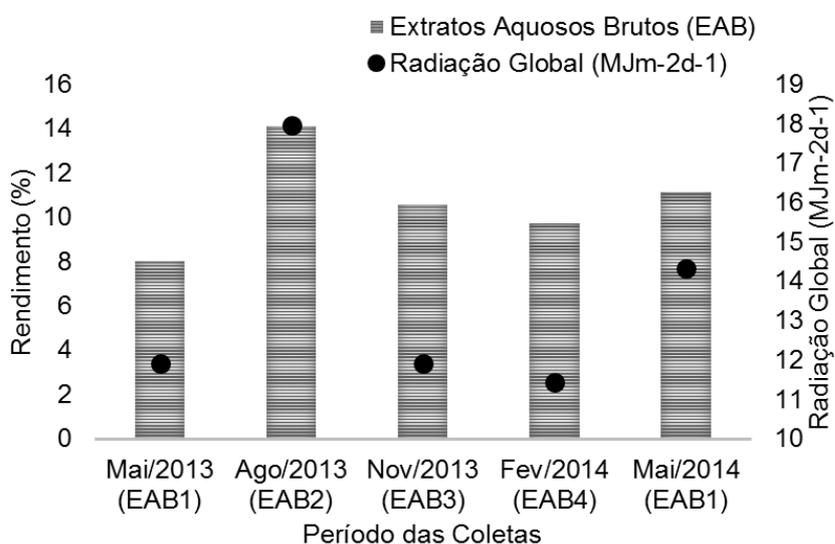


Figura 32. Rendimentos dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionado com a média da radiação global ao dia de cada coleta. Correlação forte positiva significativa ($p = 0,03$) com a radiação global.

b) Dados Meteorológicos versus Polifenóis Totais.

Para analisar a influência de fatores meteorológicos foi utilizado o coeficiente linear de Pearson. Deste modo foram realizados os tratamentos dos dados meteorológicos de acordo com a média dos 90 e 30 dias referentes aos dias anteriores a cada coleta, assim como o dia anterior e o dia de cada uma das coletas.

Foi possível observar que segundo a correlação de Pearson, os dados climáticos utilizados correlacionados à presença de polifenóis em extratos aquosos e extratos etanólicos não apresentaram correlações significativas ($p < 0,05$) (Tabela 11) quando utilizado o método com médias de 90 dias, 30 dias, dia anteriores e dia da coleta. Ainda assim, foi possível observar que no modelo com uso de 30 dias anteriores a coleta o teor de polifenóis para os extratos aquosos apresentou correlação forte positiva com a pluviometria ($r = 0,7860$) ($p = 0,11$) (Figura 33), quanto a essa correlação pôde-se observar que a medida que a pluviometria aumenta, a tendência é que o teor de polifenóis também aumente. Para o modelo com dia anterior, foi observada uma correlação forte positiva entre a pluviometria com a presença de polifenóis nos extratos aquosos ($r = 0,7980$) ($p = 0,10$) e extratos etanólicos ($r = 0,6097$) ($p = 0,27$) (Figura 34), mesmo com esta correlação, é importante destacar que, quando os extratos foram comparados pelo método ANOVA, eles não mostraram-se significativamente diferentes com relação aos teores de polifenóis. Foi o caso, por exemplo, dos EAB2, EAB4 e EAB5 que mesmo com as variações da pluviometria, ainda mantiveram os seus teores de polifenóis iguais.

Para o modelo do dia da coleta foi observado uma correlação forte positiva entre os polifenóis e a pluviometria ($r = 0,6568$) ($p = 0,22$) e também uma correlação forte negativa entre polifenóis dos extratos aquosos ($r = -0,8028$) ($p = 0,10$) e etanólicos ($r = -0,7161$) ($p = 0,17$) com a temperatura máxima (Figura 35). Graficamente foi possível observar uma relação entre a temperatura máxima com os extratos em questão, sendo esta correlação inversamente proporcional, ou seja, a medida que a temperatura máxima diminui, a presença de teores de polifenóis tendem a aumentar em proporção direta. Para a pluviometria, a correlação forte positiva diz que a medida que o índice pluviométrico aumenta, a quantidade de polifenóis dos

extratos tendem a aumentar, porém graficamente não foi possível visualizar esta correlação para todas as coletas (Tabela 11).

Tabela 11 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os compostos polifenóis dos extratos de *Erythroxyllum daphnites* versus as variáveis ambientais

Teor de Polifenóis Totais dos Extratos Brutos Aquosos (r)				
Dados Meteorológicos	90	30	Dia A	Dia C
Radiação Global	**0,5735	***-0,0342	**0,4049	***0,0448
Índice Pluviométrico	***-0,0580	*0,7860	*0,7980	**0,6568
Temperatura Máxima	**0,5428	***0,1335	***-0,0544	*-0,8028
Temperatura Mínima	***-0,0318	**0,5880	**0,5244	**0,5470
Teor de Polifenóis Totais dos Extratos Brutos Etanólicos (r)				
Radiação Global	**0,5515	**0,4232	**0,5054	***0,2548
Índice Pluviométrico	***-0,3521	**0,5540	**0,6097	**0,5878
Temperatura Máxima	***0,3191	**0,5422	***0,2787	**0,7161
Temperatura Mínima	***-0,3081	***0,3302	***0,2714	***0,3882

*(0,05 < p < 0,15). **(0,15 < p < 0,50). ***(0,50 < p < 1,00). 90 = 90 dias anteriores a coleta, 30 dias anteriores a coleta, Dia A = Dia anterior a coleta e Dia C = Dia da coleta.

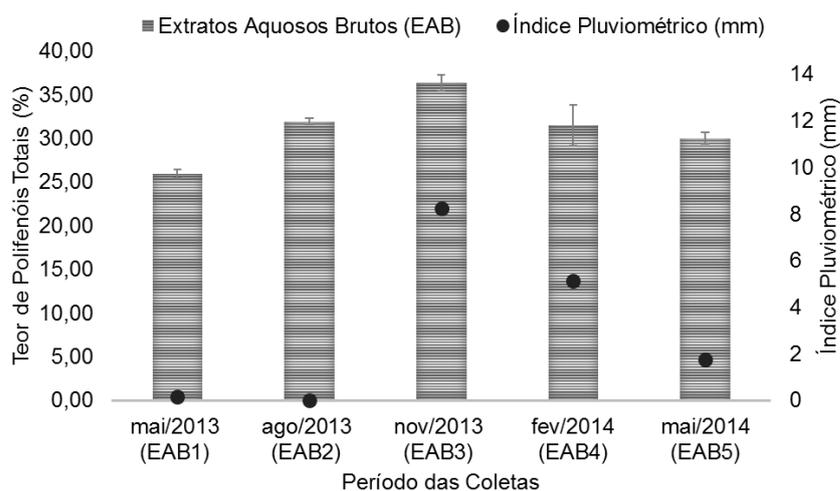


Figura 33. Teor de polifenóis totais dos extratos aquosos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxyllum daphnites* versus índice pluviométrico com média de 30 dias anteriores as coletas. Correlação Forte Positiva não significativa ($p = 0,11$).

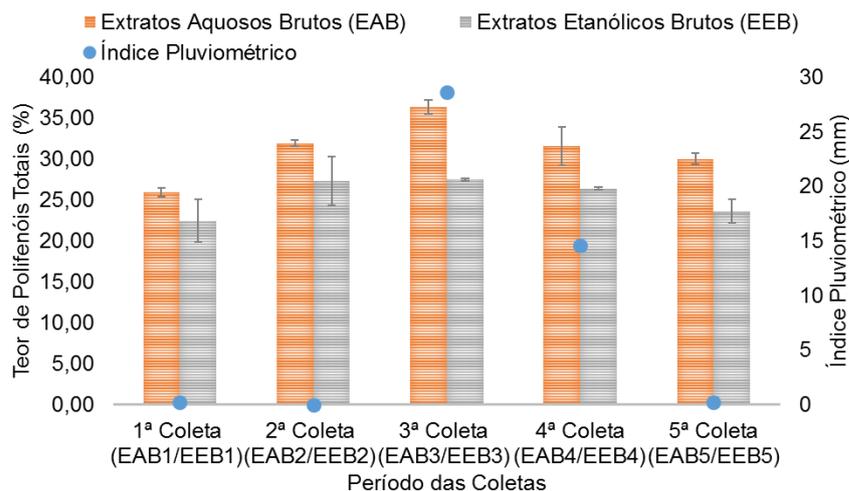


Figura 34. Teor de polifenóis totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus índice pluviométrico do dia anterior de cada coleta. Correlação forte positiva não significativa ($p = 0,27$).

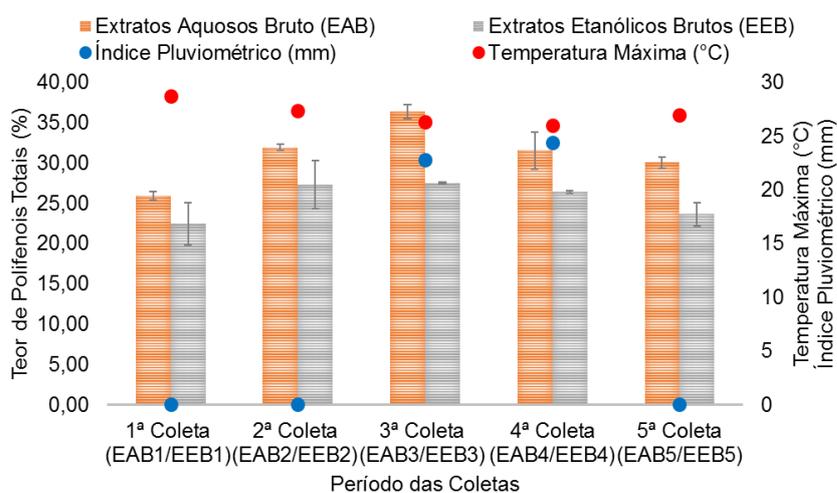


Figura 35. Teor de polifenóis totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus índice pluviométrico e temperatura máxima do dia anterior de cada coleta. Correlação Forte Negativa ($p = 0,17$) com a temperatura máxima e correlação forte positiva ($p = 0,22$) com pluviometria. Ambas correlações não foram significativas.

c) Dados Meteorológicos versus Flavonoides Totais.

A análise da influência dos fatores meteorológicos foi realizada segundo os mesmos parâmetros utilizados no item “a” descrito no capítulo “4.4 POLIFENÓIS TOTAIS”.

Foi possível observar uma correlação forte positiva entre temperatura máxima (°C) (dados do dia da coleta) e teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos ($r = 0,9668$) ($p=0,007$) (Figura 36).

No modelo de 90 dias anteriores a coleta, o teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos apresentaram uma correlação forte negativa com a radiação global ($r = -0,6175$) ($p = 0,26$) (Figura 37). No modelo de 30 dias anteriores a coleta, o teor de flavonoides totais para os extratos etanólicos apresentaram uma correlação forte negativa com a pluviometria ($r = -0,7833$) ($p = 0,11$) e a temperatura mínima ($r = -0,7495$) ($p = 0,14$) (Figura 38). Para o modelo com uso do dia anterior a coleta, foi observado também uma correlação forte negativa com a pluviometria ($r = -0,6692$) ($p=0,21$) e temperatura mínima ($r = -0,8038$) ($p = 0,10$) (Figura 39) (Tabela 12).

Outro fato a ser destacado foi que, tanto o modelo da média de 30 dias anteriores a cada coleta, quanto os modelos de dia anterior e dia da coleta apresentaram correlação forte negativa não significativa entre as variáveis ambientais de índice pluviométrico e temperatura mínima com os teores de flavonoides totais dos EEBs. Tal correlação significa que, à medida que a pluviometria diminui e temperatura aumenta, a presença de flavonoides nas folhas tendem a aumentar. Tais informações corroboram com a correlação forte positiva significativa ($p = 0,007$) dos EEBs com a temperatura máxima ($r = 0,9668$) para o dia da coleta. Mesmo com as variáveis de pluviometria e temperatura mínima não apresentando correlação significativa foi possível visualizar indicativo de influência. Tais informações mostram-se importantes, pois, com o aumento da temperatura, a produção de compostos flavonoides tende a aumentar (Figura 36). E isso aconteceu para o modelo com o uso da variável temperatura máxima relacionado ao dia da coleta das folhas de *E. daphnites* (Tabela 12).

Esta observação também está corroborada com os índices de correlação de Pearson presentes na Tabela 12, que mostra uma interação entre pluviometria e

temperatura mínima como uma relação negativa, significando assim que existe uma correlação linear de proporção inversa direta entre essas variáveis, porém não foi significativa.

Tabela 12 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) dos teores de flavonoides totais dos extratos brutos aquosos e etanólicos de *Erythroxylum daphnites* versus as variáveis ambientais

Teor de Flavonoides Totais dos Extratos Brutos Aquosos (r)				
Dados Meteorológicos	90	30	Dia A	Dia C
Radiação Global	***-0,3193	***-0,2751	***-0,0596	***-0,1795
Índice Pluviométrico	** -0,4215	***-0,3677	***-0,2324	** -0,4047
Temperatura Máxima	***-0,0125	***0,1562	***0,2616	*0,8648
Temperatura Mínima	***-0,1684	***-0,3393	** -0,4604	** -0,4289
Teor de Flavonoides Totais dos Extratos Brutos Etanólicos (r)				
Radiação Global	** -0,6175	***0,0623	** -0,3210	***0,2063
Índice Pluviométrico	** -0,5420	* -0,7833	** -0,6692	** -0,7150
Temperatura Máxima	** -0,5029	***0,2437	**0,5404	0,9668
Temperatura Mínima	** -0,4454	* -0,7495	* -0,8038	* -0,7560

Valores em negrito apresentaram-se significativos ($p < 0,05$). *($0,05 < p < 0,15$). **($0,15 < p < 0,50$). ***($0,50 < p < 1,00$). 90 = 90 dias anteriores a coleta, 30 dias anteriores a coleta, Dia A = Dia anterior a coleta e Dia C = Dia da coleta.

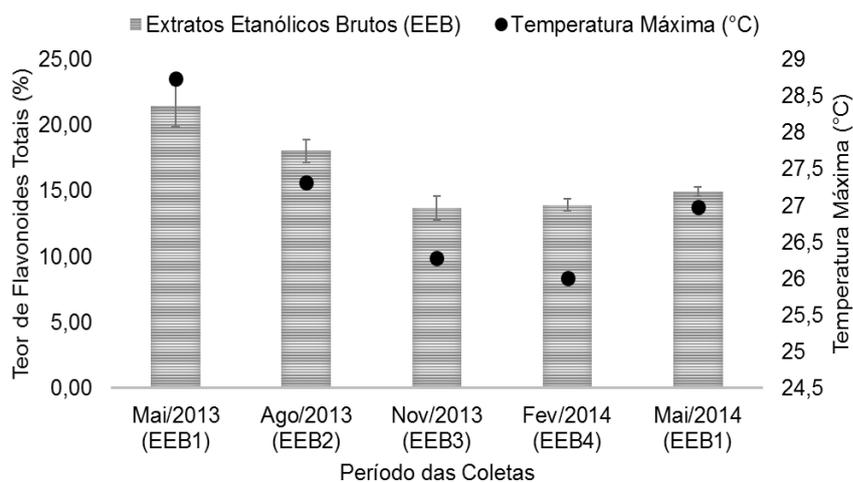


Figura 36. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus temperatura máxima do dia de cada coleta. Correlação forte positiva significativa ($p=0,007$).

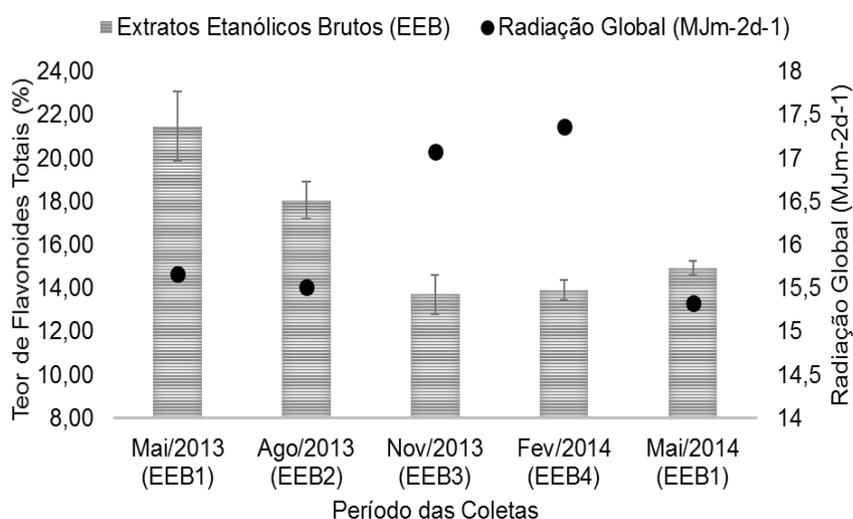


Figura 37. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus radiação global com média de 90 dias antes da coleta. Correlação forte negativa não significativa ($p = 0,26$).

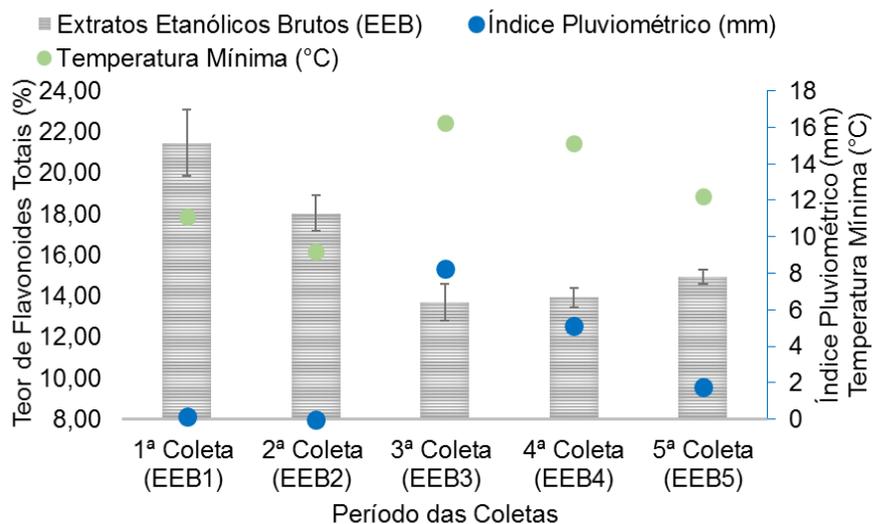


Figura 38. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus temperatura mínima e pluviometria com média de 30 dias antes da coleta. Correlação forte negativa não significativa com temperatura mínima ($p = 0,14$) e pluviometria ($p = 0,11$).

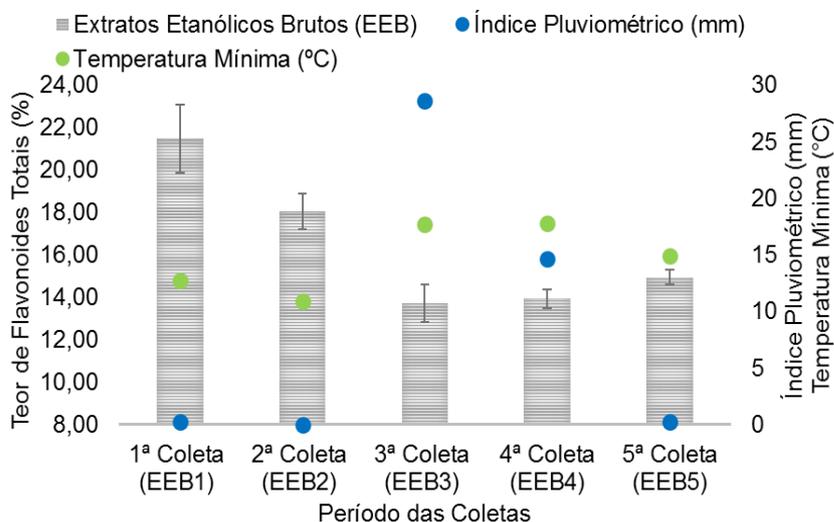


Figura 39. Teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus temperatura mínima e pluviometria do dia anterior a coleta. Correlação forte negativa não significativa com temperatura mínima ($p = 0,10$) e pluviometria ($p = 0,21$).

d) Dados Meteorológicos versus Atividade Antioxidante por DPPH*

A análise da influência de fatores meteorológicos foi realizada segundo os mesmos parâmetros utilizados no item “a” descrito no capítulo “4.4 POLIFENÓIS TOTAIS”.

Foi possível observar correlação forte positiva significativa ($p = 0,02$) entre a pluviometria ($r = 0,9340$) e temperatura mínima ($r = 0,9224$) para as atividades antioxidantes dos extratos brutos hexânicos, sendo que para esta foram utilizadas as variáveis ambientais em questão com a média de 90 dias antes da coleta (Figura 40) (Tabela 13).

Foi possível observar correlação forte negativa significativa ($p = 0,02$) entre a temperatura máxima ($r = -0,9193$) e a atividade antioxidante dos extratos brutos hexânicos, quando utilizadas as informações desta variável ambiental do dia anterior a coleta em confronto com o IC_{50} dos respectivos extratos (Figura 41 e Tabela 13).

Houve também uma correlação forte negativa não significativa entre temperatura máxima e a atividade antioxidante dos extratos hexânicos ($r = -0,6661$) ($p = 0,22$), quando utilizado a média de 30 dias anteriores a coleta da variável em questão correlacionado com os IC_{50} destes extratos (Tabela 13).

Com a utilização dos dados referentes ao dia de cada coleta também foi possível observar correlação forte positiva não significativa entre a atividade antioxidante dos EEBs com a temperatura máxima ($r = 0,7948$) ($p = 0,10$). Correlação forte positiva entre a atividade dos EABs com a temperatura máxima ($r = 0,6743$) ($p = 0,21$) e correlação forte negativa entre a atividade dos EHBs com a radiação global ($r = -0,7386$) ($p = 0,15$) (Tabela 13).

Foram observadas mais correlações classificadas como fracas e moderadas do que correlações fortes entre a atividade antioxidante dos extratos brutos aquosos e etanólicos frente as variáveis ambientais utilizadas neste estudo, sendo os extratos hexânicos brutos os que mais apresentaram correlações significativas (Tabela 13).

Tabela 13 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a atividade antioxidante dos extratos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* versus as variáveis ambientais

Atividade Antioxidante (IC ₅₀) dos Extratos Aquosos Brutos (EABs) - (r)				
Dados Meteorológicos	90	30	Dia A	Dia C
Radiação Global	***-0,2604	** -0,4853	***-0,1787	***-0,5518
Índice Pluviométrico	***0,3395	***-0,2853	***-0,3004	***-0,3159
Temperatura Máxima	***0,0393	***-0,4028	***-0,3970	**0,6743
Temperatura Mínima	**0,4636	***-0,0648	***-0,0625	***-0,1415
Atividade Antioxidante (IC ₅₀) dos Extratos Etanólicos Brutos (EEBs) - (r)				
Radiação Global	***-0,1763	***0,0523	***0,1002	***-0,3431
Índice Pluviométrico	***-0,1877	** -0,4482	***-0,3597	***-0,2987
Temperatura Máxima	***-0,0724	***0,2527	***0,0932	*0,7948
Temperatura Mínima	***0,0576	***-0,3086	***-0,3558	***-0,2862
Atividade Antioxidante (IC ₅₀) dos Extratos Hexânicos Brutos (EHBs) - (r)				
Radiação Global	***0,1791	** -0,4327	***0,0127	*-0,7386
Índice Pluviométrico	0,9340	***0,2085	***0,0609	***0,1921
Temperatura Máxima	***0,3059	** -0,6661	-0,9193	***-0,0808
Temperatura Mínima	0,9224	***0,4712	***0,5714	**0,4447

Valores em negrito apresentaram-se significativos ($p < 0,05$). *($0,05 < p < 0,15$). **($0,15 < p < 0,50$). ***($0,50 < p < 1,00$). 90 = 90 dias anteriores a coleta, 30 dias anteriores a coleta, Dia A = Dia anterior a coleta e Dia C = Dia da coleta.

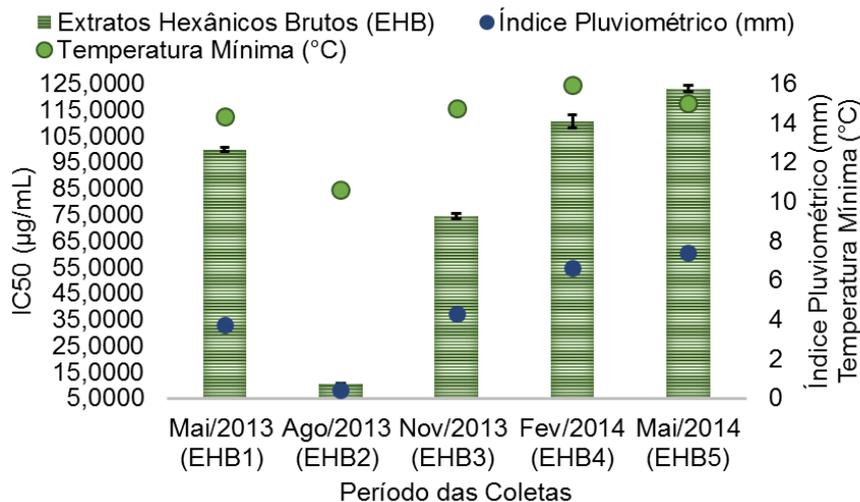


Figura 40. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos hexânicos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionado com a média das variáveis pluviometria e temperatura máxima de 90 dias anteriores a coleta. Correlação forte positiva significativa ($p < 0,02$) com a pluviometria e temperatura máxima.

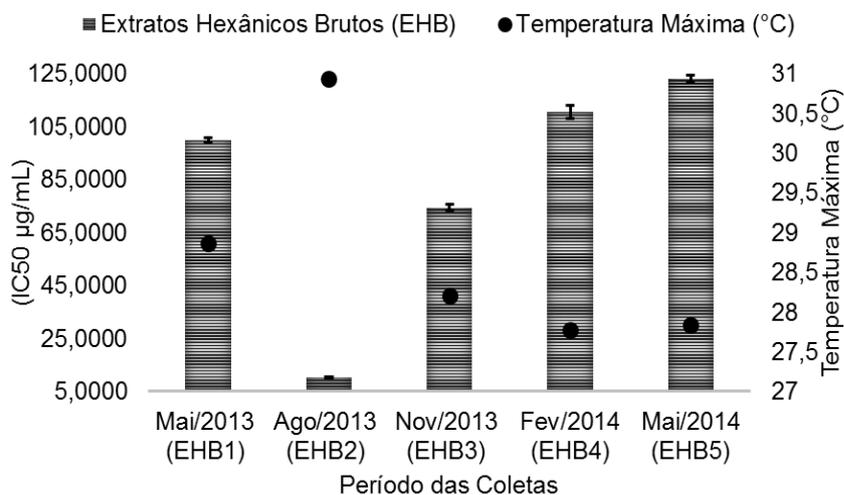


Figura 41. Atividade antioxidante por redução do DPPH* dos extratos hexânicos brutos do rasurado das folhas de *Erythroxylum daphnites* correlacionado com os dados da variável temperatura máxima referente aos dias anteriores de cada coleta. Correlação forte negativa significativa ($p < 0,02$) com a temperatura máxima.

5 DISCUSSÃO

A presença de compostos fenólicos faz-se frequente no reino vegetal, sendo os polifenóis participantes das relações ecológicas da planta com o meio ambiente. Desempenhando funções relacionadas a alelopátia, proteção da planta contra radiação UV, insetos, herbívoros, patógenos, e também influenciam em diversos processos metabólicos essenciais à planta, como por exemplo o crescimento vegetal e germinação de sementes (81).

Os teores de polifenóis totais encontrados a partir dos rasurados das folhas de *E. daphnites* variaram de 25,88% à 36,34% entre os extratos aquosos. E a variação entre os extratos etanólicos foi de 22,44% à 27,47%. Também foi possível observar que o método mais eficiente para a extração de polifenóis foi a técnica de infusão com utilização do solvente água para extração, uma vez que o teor de polifenóis para os extratos EAB2, EAB3, EAB4 e EAB5 foram maiores do que para os extratos etanólicos das respectivas coletas, sendo que, os EABs possuíam médias significativamente diferentes dos EEBs quando comparado aos extratos de cada coleta.

Entre os extratos aquosos, o EAB3 apresentou maior teor de polifenóis (36,33%), sendo a média deste, estatisticamente diferente dos demais EABs. Entre os extratos etanólicos, o que mais apresentou extraíveis de polifenóis foi o EEB3 (27,46%), mostrando-se estatisticamente diferente apenas do EEB1.

Deste modo o destaque frente ao teor de polifenóis foi do EAB3 (36,33%) proveniente das folhas de *E. daphnites* e quando comparado a extratos vegetais de outros estudos, com a utilização da mesma técnica de doseamento, mostrou ter teor de polifenóis (%) superior à por exemplo: *Tetratagonisca angustula* (5,00%), *Scaptotrigona bipunctata* (6,05%), *Ilex paraguariensis* (9,61%), *Psidium guajava* (24,67%), *Camelia sinensis* (30%) e *Parapiptadenia rígida* (30,47%) (82, 81, 83).

Outro fato a ser destacado foi que o EAB1 mostrou-se não significativamente diferente quando comparado ao teor de polifenóis do EAB5. Ambos foram extratos provenientes do mês de maio, porém o EAB1 foi proveniente de mai/2013 e o EAB5 foi de mai/2014, sendo que para maio de 2013 foi detectada a presença de queimada e deste modo sugere-se então que, o fator queimada, não tenha sido tão influente na variação do teor de polifenóis dos extratos obtidos do rasurado das folhas de *E.*

daphnites. Quanto as correlações com as variáveis climáticas, não foram encontradas nenhuma correlação significativa, contudo foi possível observar correlações fortes negativas entre temperatura máxima e os EABs e EEBs quando utilizado os dados do dia da coleta, o que significa que, à medida que a temperatura diminui, a planta tende a aumentar a sua produção de polifenóis, tal fato também corroborou para correlação forte positiva com a pluviometria, que significa que, à medida que o índice pluviométrico aumenta, a tendência é que haja o aumento de polifenóis também.

Este achado fez-se importante, pois existem relatos em outros trabalhos que discutem a influência de baixas temperaturas sobre a produção de metabólitos secundários. Em 2007, Gobbo-Netto et. al. realizou um estudo de revisão em que foi discutido o aumento de cerca 60% nos níveis de artemisina em *Artemisia annua* causado por estresse metabólico acarretado por geada. Outro exemplo foi o aumento de quatro a cinco vezes no conteúdo de escopolamina em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) após submissão da planta a baixas temperaturas (60).

Ao observar as cromatoplasmas foi possível visualizar que tanto o EAB3 quanto o EEB3 apresentam compostos com maior intensidade fluorescente em UV quando comparados aos demais. Esta intensidade pode ser justificada pelo teor de polifenóis, uma vez que o EAB3 e o EEB3 foram os extratos que mais apresentaram teores de polifenóis (%) a partir do rasurado das folhas de *E. daphnites*. O ensaio por CCD também revelou a variação qualitativa de metabólitos secundários produzidos pela planta em diferentes períodos, sendo que no EEB2 foi possível visualizar um perfil distinto de compostos flavonoides quando comparado com os demais extratos etanólicos brutos submetidos ao método de detecção de flavonoides por CCD. Ainda em relação ao EEB2, pode ser que a queimada que ocorreu em maio de 2013 tenha, por sua vez, influenciado na síntese de metabólitos da planta, contribuindo assim, para uma mudança deste perfil cromatográfico.

Em relação ao flavonoides, foi observado que o percentual de flavonoides totais presentes nas folhas de *E. daphnites* apresentaram variação entre 18,62% à 33,02%, sendo esta também a mesma variação para os extratos aquosos, enquanto que os extratos etanólicos apresentaram variação de 20,54% à 32,20%. Entre os extratos aquosos, o que mais apresentou teor de flavonoides foi o EAB1 (27,51 %), sendo este estatisticamente diferente dos demais EABs. Entre os extratos etanólicos o que mais

apresentou teor de flavonoides foi o EEB1 (21,46%), sendo este estatisticamente diferente dos demais EEBs.

Deste modo, o destaque frente ao teor de flavonoides totais foi do EAB1 (275,18 mg equivalente de quercetina por g de extrato – mg QE/g) proveniente das folhas de *E. daphnites* e quando comparado a extratos vegetais de outros estudos, com a utilização da mesma técnica de doseamento, mostrou teor de flavonoides (mg EQ/g) superior à por exemplo: *Polygonum multiflorum* (0,07 mg QE/g), *Cassia renigera* (45,87 mg QE/g), *Moringa oliefera* (70,8 mg QE/g), *Gentiana scabrida* (71,14 mg QE/g) e *Spatoglossum schroederi* (215,39 mg QE/g) (84, 85, 86, 87, 88).

A presença da queimada no mês de maio de 2013 parece ter influenciado a produção de flavonoides da planta *E. daphnites*, uma vez que os maiores teores de flavonoides foram observados para o extrato deste período (EEB1), sendo que, estresse, lesão física ou infecções ocorridas em uma planta podem desencadear a síntese de metabólitos secundários como resposta. Pode ser que, a maior produção de flavonoides pela planta esteja ligada a um ou mais destes fatores (30). Os flavonoides, por sua vez, são amplamente distribuídos no reino vegetal e apresentam diversificadas ações biológicas, como por exemplo: capacidade de agir sobre a inflamação e sistema imunológico, tornando esta classe de metabolito secundário uma alternativa promissora frente aos processos inflamatórios (89),

Quanto às correlações com as variáveis climáticas, foi identificada uma correlação significativa, sendo esta uma correlação forte positiva entre os EEBs e a temperatura máxima com os dados do dia da coleta. Tal correlação significa que a medida que a temperatura aumenta, o teor de flavonoides tende a aumentar em proporção direta. Foi possível observar que a temperatura máxima no dia da coleta foi de 28,74 °C, sendo a mais alta quando comparada com as demais coletas. Outro ponto a ser destacado foi que para o período da 5ª coleta não houve presença de queimadas e a temperatura do dia da coleta para este foi de 26,98 °C, e o teor de flavonoides observado para os EAB5 e EEB5 foram respectivamente de 16,54 e 14,93% e os EAB1 e EEB1 foram de 27,51 e 21,46%, sendo estes significativamente diferentes. Outros fatos destacados foram as correlações fortes negativas entre índice pluviométrico e temperatura mínima com os teores de flavonoides dos EEBs, mesmo esta correlação não sendo significativa, fez-se importante a interpretação desta correlação a nível qualitativo, pois a medida que o índice pluviométrico diminui e a

temperatura aumenta, a tendência é que haja um aumento na produção de flavonoides por parte da planta. Assim, tais fatores (queimada, decréscimo da pluviometria e temperatura alta) observados de forma exploratória foram importantes para a planta, no quesito, produção de compostos do tipo flavonoides. Também houve correlação forte positiva não significativa entre EABs e temperatura máxima.

O método de DPPH*, no contexto deste trabalho mostrou-se relevante, uma vez que auxiliou na determinação da presença de compostos antioxidantes nas folhas de *E. daphnites*, tornando-a uma planta com potencial para a prevenção de ataque de radicais livres e doenças degenerativas. Neste estudo foi possível observar que houve diferença significativa entre as atividades antioxidantes (IC₅₀ - µg/mL), avaliadas pelo método de redução do DPPH*, onde os extratos etanólicos mostram-se mais ativos que os extratos aquosos e hexânicos abordados nesse trabalho.

Baseado na correlação de atividade antioxidante e teor de flavonoides também foi observado que, à medida que o teor de flavonoides aumenta, a tendência é que a atividade diminua, portanto esta associação tornou-se um forte indicador de que, a atividade antioxidante por redução do radical DPPH*, não esteja diretamente ligada a presença de compostos flavonoides dos extratos brutos etanólicos e aquosos obtidos do rasurado das folhas de *E. daphnites*.

Ainda em relação ao teor de flavonoides foi observado que houve um aumento destes metabólitos para o período de maio de 2013. Com isso é possível que a planta *E. daphnites* tenha passado por um estresse oxidativo, que por sua vez contribuiu para a síntese de compostos distintos a longo prazo, uma vez que o perfil cromatográfico do EEB2 (ago/2013) mostrou-se totalmente diferente do EEB1 (maio/2013) e dos demais EEBs como foi visualizado na figura 9A/9B. Deste modo mais estudos devem ser realizados para observação de uma possível atividade pro-oxidante.

Quanto a atividade antioxidante dos EEBs e EABs correlacionada a variável ambiental temperatura máxima para o dia da coleta, observou-se uma correlação forte positiva. Esta correlação significa que, à medida que a temperatura aumenta, o IC₅₀ tende a aumentar em proporção direta, o que torna os extratos por sua vez menos ativos. Mesmo esta correlação não sendo significativa, é importante destacar que segundo Callegari-Jacques, o coeficiente de correlação (*r*) pode ser avaliado qualitativamente (76).

Também foi observado que a medida que os rendimentos aumentam, a tendência do IC₅₀ dos extratos é diminuir e o mesmo aplicou-se para os EABs, EEBs e EHBs. Deste modo foi observado que a medida que a concentração dos compostos presentes nas folhas de *E. daphnites* aumentam, a atividade da planta tende a ser mais ativa.

O destaque frente a atividade antioxidante por redução de DPPH* foi do EEB5 (IC₅₀: 4,93 µg/mL) proveniente do rasurado das folhas de *E. daphnites* que quando comparado a extratos vegetais de outros estudos, mostrou ter um IC₅₀ menor que por exemplo: a *Mentha piperita* (IC₅₀: 13,32 µg/mL), *Matricaria chamomilla* (IC₅₀: 78,22 µg/mL), *Mentha spicata* (IC₅₀: 87,89 µg/mL), *Aesculus hippocastanum* (IC₅₀: 165,0 µg/mL), *Orthosiphon grandiflorus* (IC₅₀: 217,2 µg/mL) e *Houttuynia cordata* (IC₅₀: 341,5 µg/mL) (90, 91, 92, 93).

Baseado na correlação de atividade antioxidante e teor de polifenóis, também foi observado que, à medida que o teor de polifenóis aumenta, a tendência é que a atividade aumente, portanto esta associação tornou-se um forte indicador de que, a atividade antioxidante por redução do radical DPPH*, esteja diretamente ligada a presença de compostos polifenóis dos extratos brutos etanólicos e aquosos obtidos do rasurado das folhas de *E. daphnites*.

Frente as correlações com os dados meteorológicos realizados para 90 dias, 30 dias, dia anterior e dia da coleta, foi observado que a maioria das correlações significativas ocorreram para os dados meteorológicos obtidos do dia de coleta, sendo estas correlações fortes e a variável mais presente entre estas foi a temperatura máxima. Outro ponto destacado são as correlações fortes que mesmo quando não apresentaram p-valor significativo foram importantes na análise exploratória frente a influência de variáveis climáticas com a produção de metabólitos secundários da planta *E. daphnites*.

6 CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo de sazonalidade e monitoramento da atividade antioxidante por redução do DPPH* em extratos brutos aquosos, etanólicos e hexânicos do rasurados das folhas de *E. daphnites*.

O estudo de sazonalidade com a utilização de variáveis como dados meteorológicos, metabólitos secundários (polifenóis e flavonoides totais) e atividade biológica neste trabalho foram fundamentais para demonstrar que pode existir alteração na composição de metabolitos produzidos por uma planta, uma vez que esta seja coletada em períodos distintos.

Com este estudo foi possível verificar que a produção de polifenóis e flavonoides totais obtidos dos extratos brutos de *E. daphnites* variaram quando comparadas com os períodos de coleta realizadas. A produção destes compostos pode estar relacionada com a variabilidade climática, sendo estes fatores associados a variação do potencial da atividade biológica que uma planta pode vir apresentar no decorrer de um ano.

De acordo com os estudos preliminares por CCD neste trabalho foi encontrado presença de compostos flavonoides, sendo as *fingerprints* obtidas dos EABs e EEBs de *E. daphnites*, as primeiras cromatoplasas, até o momento, feitas para esta planta a serem publicada. Também foi a primeira vez que foram reveladas as presenças de rutina, ácido clorogênico e hiperosídeo para os EEBs por CCD.

Em CCD foi possível observar uma mudança no perfil de compostos presentes em EEBs provenientes das folhas de *E. daphnites*, uma vez que o EEB2 apresentou-se distinto do perfil obtido para os demais extratos etanólicos.

Os EABs mantiveram o mesmo perfil perante o perfil cromatográfico obtido, porém é possível observar com dados complementares a partir dos polifenóis e flavonoides totais que os seus teores sofreram alterações no decorrer do ano e o mesmo é observado para os extratos etanólicos.

Sugere-se presença de rutina e ácido clorogênico para os EABs. Tais resultados juntamente com os achados provenientes dos ensaios para polifenóis e flavonoides totais, sugerem que a presença desses compostos esteja ligada a ação antioxidante detectada neste trabalho.

Quanto à atividade biológica, o EEB5 das folhas de *E. daphnites* mostrou melhor ação antioxidante (IC_{50} 4,91 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado aos demais extratos. O que apresentou melhor atividade para os extratos aquosos foi o EAB2 (IC_{50} 5,17 $\mu\text{g/mL}$). E para os extratos hexânicos a melhor atividade antioxidante foi do EHB2 (IC_{50} 10,34 $\mu\text{g/mL}$).

O extrato bruto mais ativo de *E. daphnites* foi o EEB5, que apresentou atividade diferente significativo quando comparado aos padrões rutina e ácido ascórbico, e aos extratos etanólicos EEB2, EEB3 e EEB4. É importante destacar também que o EEB5 não só foi o mais ativo entre os demais extratos testados no decorrer deste estudo, como também apresentou-se tão ativo quanto os padrões ácido ascórbico e rutina e mais ativo que o BHT que foram utilizados como controles positivos. Sendo o primeiro estudo de avaliação da atividade antioxidante por redução de DPPH^{*} em folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart. até o momento.

Os resultados obtidos por meio do ensaio de redução do DPPH^{*} mostraram que as folhas da *E. daphnites* são ricas em compostos com atividade antioxidante, substâncias estas capazes de inibir a formação de radicais livres *in vitro*.

Foram observadas respostas diferentes quando utilizados dados com as médias 90, 30 e dia anterior e dia da coleta, quando correlacionados com os extratos, polifenóis, flavonoides e atividade biológica, sendo que as melhores correlações foram obtidas para os dias da coleta. Foi demonstrado que a variável temperatura máxima junto a ocorrência de queimada, mostraram-se como fatores principais na variabilidade dos teores de polifenóis e flavonoides encontradas nas folhas de *E. daphnites*.

REFERÊNCIAS

1. Rezende HA, Cocco MIM. A Utilização de Fitoterapia no Cotidiano de uma População Rural. Rev. esc. enferm. USP. 2002; 36(3):282-8.
2. Alves LF. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. RVq. 2013; 5(3):450-13.
3. Perfeito JPS. O Registro Sanitário de Medicamentos Fitoterápicos no Brasil: Uma Avaliação da Situação Atual e das Razões de Indeferimento [Dissertação]. Brasília. Universidade de Brasília - UnB; 2012.
4. United Nations Environment Programme (UNEP). How Many Species on Earth? 8.7 Million, Says New Study. [Internet]. Cambridge; World Conservation Monitoring Centre (UNEP-WCMC); 2011 [citado em 24 dez 2014]. Disponível em: <http://www.unep.org/newscentre/default.aspx?DocumentID=2649&ArticleID=8838>.
5. WHO. Guidelines for the Appropriate use of Herbal Medicines. Manila: Regional Office for the Western Pacific; 1998. p.88.
6. Ministério da Saúde (BR). Práticas Integrativas e Complementares: Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. p.156.
7. Ministério da Saúde (BR). A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p.11.
8. ANVISA (BR). Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2011. p.126.
9. Ministério da Saúde (BR). Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 60.

10. Foglio MA, Queiroga CL, Souza IMO, et. al. Plantas Medicinais como Fontes de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. MultiCiências. 2006; 7(1):64-9.
11. Souza GM. Monitoramento sazonal e recuperação pós-fogo da vegetação do Cerrado usando dados do sensor MODIS. [Trabalho de conclusão de curso]. Brasília: Universidade Nacional de Brasília, Curso de Engenharia Florestal; 2014.
12. O Bioma Cerrado. [Internet]. Brasília. [acesso em 15 dec 2014]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado?tmpl=component&print=1>.
13. Pontual HD, Vidigal Cristina. Aprovada PEC que inclui caatinga e cerrado como patrimônio nacional. [Internet]. Brasília. [acesso em 20 dec 2014]. Disponível em: <http://www12.senado.gov.br/noticias/materias/2010/07/07/aprovada-pec-que-inclui-caatinga-e-cerrado-como-patrimonio-nacional>.
14. Embrapa Cerrado. Mapeamento da Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado. Edital Probio02/2004. Relatório Final; 2007.
15. Medeiros MB, Fiedler NC. Incêndios Florestais no Parque Nacional da Serra da Canastra: Desafios para a Conservação da Biodiversidade. Ciência Florestal. 2003; 14(2):157-68.
16. Melo MM, Saito CH. Regime de Queima das Caçadas com Uso de Fogo Realizadas pelos Xavantes no Cerrado. Biodiversidade Brasileira. 2011; 2(1):97-109.
17. Fiedler NC, Azevedo INC, Rezende AV et. al. Efeito de Incêndios Florestais na Estrutura e Composição Florística de uma Área de Cerrado *sensu stricto* na Fazenda Água Limpa – DF. Revista Árvore. 2004; 28(1):129-38.
18. Neto GG, Moraes RG. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um Estudo Bibliográfico. Acta bot. bras. 2003; 17(4): 561-84.
19. Borges LL. Variabilidade de Compostos Fenólicos e Óleo Essencial das Folhas e Casca do Caule de *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. [Dissertação] – Universidade Federal de Goiás; 2012.

20. Loiola, MIB. Flora fanerogâmica nordestina: diversidade, distribuição e potencial econômico. Caderno de Cultura e Ciência. 2007; 2(2):15-6.
21. Loiola MIB, Agra MF, Baracho GS, et. al. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxyloaceae Kunth. Acta bot. bras. 2007; 2(21):473-87.
22. Silverio ASV, Silva TG. Atividade antitumoral de extrato metanólico do caule de *Erythroxyllum caategae*. XV Congresso de Iniciação Científica da UFPE. Pernambuco; 2007.
23. Filho HDL. Estudo Fitoquímico de Espécies do Gênero *Erythroxyllum* com Potência Atividade Vasodilatadora e Inibidora da Enzima Conversora de Angiotensina. Minas Gerais. [Dissertação]. Ouro Preto. Universidade Federal de Ouro Preto; 2009.
24. Granja MB. Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxyllum* P. Br. (Erythroxyloaceae do Brasil). Rev Bras Bot. 1998; 21(2):159-66.
25. Oliveira SL. Fitoquímica de espécies de *Erythroxyllum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos. [Tese]. João Pessoa. Universidade Federal da Paraíba; 2012.
26. Loiola MIB, Costa-Lima JL. Erythroxyloaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro; [acesso em 24 dez 2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7697>>.
27. Ribeiro JF, Walter BMT, et. at. Flora Vascular do Bioma Cerrado. Cerrado: ecologia e flora. EMBRAPA Cerrados. Planaltina; 1998.
28. Barbosa AVG, Amaral A. Flora dos Estados De Goiás e Tocantins: Erythroxyloaceae. Goiânia. Editora da UFG, 2001.
29. Simas PH. Diterpenoides, derivados de fenilpropanoides e outros constituintes químicos de *Erythroxyllum daphnites* Mart. Quim Nova. [Resumo]. 2013.
30. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ Chem Lett. 2006; 4(1):147-57.

31. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, et. al. Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 2001; 161(1): 839–51.
32. Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC et. al. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. *Alimentos e Nutrição*. 2004; 15(3):285-9.
33. Routray W, Orsat V. Microwave-Assisted Extration of Flavonoids: A Review. *Food Bioprocess Tech*. 2012; 5(1):409-424.
34. Kandaswami C. Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. *Adv Exp Med Biol*. 1994; 366(1):351-76.
35. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA et. al. Flavonoids: old and new aspects of class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*. 1999; 65(4):337-53.
36. Manfredini V, Martins VD, Benfato MS. Chá Verde: Benefícios para a Saúde Humana. *Infarma*. 2004; 16(9):68-70.
37. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary, sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998; 56(1):317-33.
38. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemical. *Journal of the American Dietetic Association*. *J Acad Nutr Diet*. 1999; 99(1):213-8.
39. Tahara S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Biosci., Biotechnol., Biochem*. 2007; 71(6):1387-404.
40. Langenheim JH. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol*. 1994;20(6):1223-80.
41. Di Stasi LC. *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo. Unesp, 1996.
42. Viegas C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova*. 2003; 26(3):390-400.

43. Grabmann J, Hippeli S, Spitzenberger R, Elstner EF. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine*. 2005; 12(6-7):416-23.
44. Henriques AT, Kerber VA, Moreno PRH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. Ed. UFRGS/UFSC. Porto Alegre, 2000.
45. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, et. al. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Porto Alegre: editora UFRGS, 2004. p.1104.
46. Martinez ST, Almeida MR, Pinto AC. Alucinógenos naturais: um voo da europa medieval ao Brasil. *Quím Nov*. 2009; 9:2501-7.
47. Bacchi EA. Alcalóides tropânicos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis. Ed. UFRG/ Ed. UFSC, 2007.
48. Bianchi MPL, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*. 1999; 12(2):123-30.
49. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(1):1841-56.
50. Archela E, Antonia LHD. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *R. C. Exatas e Tecnol.*. 2013; 34(2):193-210.
51. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI et. al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -Caroteno/Ácido Linoleico e método de sequestro de radicais DPPH*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*. 2006. 2(26):446-52.
52. Bendich A, Langseth L. The health effects of vitamin C supplementation, a review. *J Am Coll Nutr*. 1995. 14(2):124-36.
53. Weber P, Bendich A, Schalch W. Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements. *Int J Vitam Nutr Res Suppl*. 1996; 66(1):19-30.

54. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova*. 2006; 29(4):755-60.
55. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1997; 43:61-8.
56. Medeiros MHG, Carvalho VM, Farias LP et. al. DNA Damage Induced By Secondary Lipid Oxidation Products. *Cien. Cult*. 1995; 47(6): 336-9.
57. Huang W, Cai Y, Xing J et. Al. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Econ. Bot.*. 2007; 61(1):14-30.
58. Ferreira ABH. Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa. 5ª ed. São Paulo. Positivo.
59. Sobrinho TJSP, Cardoso KCM, Gomes TLB et. al. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonoides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. *Rev. bras. farmacogn*. 2009; 3(19):740-45.
60. Gobbo-Neto L, Lopes BP. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova*. 2007; 30(2):374-81.
61. Sonaglio D, Petrovick PR, Bassan VL. Padronização De Extratos Vegetais: Extrato hidroalcoólico de *Achirocline satureioides* (LAM) DC. Compositae (Marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. *Cad. farm*. 1986; 2(1):55-74.
62. Luengas-Caicedoa PE, Braga FC, Brandão GC et. al. Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* Sneth. Leaves from native and cultivated specimens. *Int J Biosci*. 2007; 62(10):701-9.
63. Sosa T, Alías JC, Escudero JC et. al. Interpopulational variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L exudate. *Biochem Syst Ecol*. 2005; 33(4):353-64.
64. Carneiro FB, Júnior ID, Lopes QP, et. al. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. *Rev. bras. farmacogn*. 2010; 20(4):600-6.

65. Machado AS, Zamim NT, Nascimento RGM et. al. Efeito de Variáveis Climáticas no Crescimento Mensal de *Pinus taeda* e *Araucaria angustifolia* em Fase Juvenil. *Floram.* 2014; 21(2):170-81.
66. Schock AA, Ramm A, Martinazzo EG et. al. Crescimento e fotossíntese de plantas de pinhão-manso cultivadas em diferentes condições de luminosidade. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* 2014; 18(1):3-9.
67. Dousseau S, Alverenga AA, Santos MO et. al. Influência de diferentes condições de sombreamento sobre o crescimento de *Tapirira guianense* Alb. *Rev Bras Biocienc.* 2007; 5(1):477-79.
68. Azevedo CD, Moura MA. *Cultivo de Plantas Medicinais: Guia Prático.* Rio Rural. Niterói. 2010.
69. Braga CM. *Histórico da Utilização de Plantas Medicinais.* [Trabalho de conclusão de curso]. Brasília. Universidade de Brasília, Curso de Licenciatura em Biologia à Distância. 2010.
70. Brasil. *Farmacopéia Brasileira.* 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
71. Marques JP, Borges CPF. *Práticas de Química Orgânica.* 2ª Edição. Campinas. Editora Átomo, 2012.
72. Wagner H, Bladt. S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.* 2ª Edition. New York: Springer Verlag, 2001.
73. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 2004; 84(3):329-39.
74. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958; 26(4617):1199-1200.
75. Locatelli M, Gindro R, Travaglia F et. al. Study of the DPPH* - scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem.* 2009; 114(1):889-7.

76. Callegari-Jacques SM. Bioestatística: Princípios e Aplicações. São Paulo: Editora Artmed S.A.; 2003.
77. Klein AL. Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. São Paulo: Editora da Unesp, 2000.
78. Singleton VL, Rossi JAJR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic.. 1965; 16(1):144-58.
79. Pontis JA, Costa LAMA, Silva SJR et. al. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. Food Sci. Technol (Campinas). 2014. 34:69-73.
80. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. SJST. 2004; 26(2):211-19.
81. Donaduzzi CM, Cardozo EL, Donaduzzi EM, et. al. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR. 2003; 7(2):129-34.
82. Fianco ALB, Falcão MA, Cassel E, et. al. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna). Revista Liberato. 2013; 14(21):21-8.
83. Araújo AA, Soares LAL, Ferreira MRA et. al. Quantifications of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. J Ethnopharmacol. 2014; 156(1):88-96.
84. Quesado S, Carneiro VHA, Fontenelle TPC et. al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extract and its fractions from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi*. J Appl Phycol. [Internet]. 2014 Dec. [citado em Springer Link; 10.1007/s10811-014-0497-x].

85. Hossain M, Mondal M, Hossain P et. al. In vitro antioxidant, brine shrimp lethality and antimicrobial activities of methanol and petroleum ether extracts of *Cassia renigera* fruit. Food Measure. 2014 Set [citado em Springer Link; DOI 10.1007/s11694-014-9211-6].
86. Thiruvengadam M, Praveen N, Kim E et. al. Production of anthraquinones, phenolic compounds and biological activities from hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. Protoplasma. 2014; 251(1):555-66.
87. Huang S, Chen E, Wu C et. al. Comparative analysis among three Taiwan-specific *Gentiana* species and Chinese medicinal plant *Gentiana scabra*. Bot Stud. 2013; 1(1):54-54.
88. Subudhi BB, Bhoi A. Antioxidative effects of *Brassica juncea* and *Moringa oliefera* prepared by different processing methods. JFST. 2014; 51(4):790-4.
89. Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. RVq. 2009; 1(3):241-56.
90. Vicentino ARR, Menezes FS. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. Rev. bras. farmacogn. 2007; 17(3):384-7.
91. Nuengchamnong N, Krittasilp K, Ingkaninan K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC–ESI–MS coupled with DPPH assay. Food Chem. 2009; 117(1):750-6.
92. Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M. Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. IJPR. 2008; 7(3):203-9.
93. Dulcey AJC, Martínez JHI. Total phenolics antioxidant activity and phytochemical profile of some plants from the Yotoco National Protected FOREST. Valle del Cauca, Colombia. Revista de Ciências. 2013; 17(7(1):35-44.