

SIMONI APARECIDA BARBOSA CRUZ



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA E DO PERFIL
FITOQUÍMICO DE DUAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
FABACEAE: *BOWDICHIA VIRGILIOIDES* KUNTH E
PTERODON EMARGINATUS VOGEL.**

ANÁPOLIS, JULHO

2016



INSTITUTO FEDERAL
GOIÁS
Campus Anápolis

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS

**Termo de Autorização para Disponibilização do Trabalho de Conclusão de Curso
na Biblioteca do IFG – Câmpus Anápolis**

Eu, Símoni Aparecida Barbosa, portador(a) do RG. nº 4054880, Órgão Expedidor DGPC, inscrito(a) no CPF sob nº 95454322172, domiciliado(a) na Rua Colúmbia, Q.39, Lt. 01, bairro Boa Vista, na cidade de Anápolis - Goiás, matriculado no curso de Licenciatura em Química, nº de matrícula 20142060020017.

Na qualidade de titular dos direitos de autor que recaem sobre o meu Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado Avaliação da atividade tóxica e do perfil fitoquímico de duas espécies da família Fabaceae: *Bowdichia virgilioides* Kunth e *Pterodon emarginatus* Vogel, defendido em 22 de julho de 2016, autorizo o Instituto Federal de Goiás a disponibilizar gratuitamente a obra citada, sem ressarcimento de direitos autorais, para fins de leitura, impressão e/ou downloading pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada pela instituição, a partir desta data.

Estou ciente que o conteúdo disponibilizado é de minha inteira responsabilidade.

Simoni Aparecida Barbosa Oug
Assinatura do(a) autor(a)

Anápolis, 22 de julho de 2016.

SIMONI APARECIDA BARBOSA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA E DO PERFIL
FITOQUÍMICO DE DUAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA
FABACEAE: *BOWDICHIA VIRGILIOIDES* KUNTH E
PTERODON EMARGINATUS VOGEL.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em
Química, apresentado à Coordenação de Química do
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
de Goiás.

Orientadora: Prof.^a Ms. Gracielle Oliveira Sabbag
Cunha

**ANÁPOLIS, JULHO
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

C955 Cruz, Simoni Aparecida Barbosa
Avaliação da atividade tóxica e do perfil fitoquímico de duas espécies da família fabaceae: *bowdichia virgilioides* kunth e *pterodon emarginatus* Vogel. / Simoni Aparecida Barbosa Cruz. – Anápolis: IFG, 2016.
52 f. : il.
Inclui CD- Rom.

Orientador: Prof^a. Me. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha

Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura Plena em Química, Instituto Federal de Goiás, Campus Anápolis, 2016.

1. *Bowdichia virgilioides* kunth.
 2. *Pterodon emarginatus* vogel.
 3. Cunha, Gracielle Oliveira Sabbag.
- I. Título

CDD 540.7

Código 014.2016

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecária Claudineia Pereira de Abreu,
CRB-1/1956.

Biblioteca Clarice Lispector, Campus Anápolis
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

Simoni Aparecida Barbosa Cruz

Avaliação da atividade tóxica e do perfil fitoquímico de duas espécies da família
Fabaceae: *Bowdichia virgilioides* Kunth e *Pterodon emarginatus* Vogel

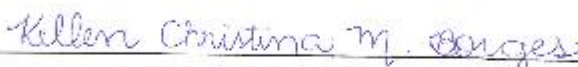
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Química do Instituto Federal de Goiás
– IFG – Campus Anápolis, como parte das exigências
do curso de Licenciatura em Química para obtenção do
título de licenciado em Química.

Área de concentração: Química

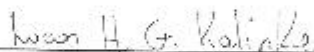
Aprovada em 22 de julho de 2016.



Profa. Orientadora Grazielle Oliveira Sabbag Cunha
IFG – Campus Anápolis



Profª. Kellen Christina Malheiros Borges
IFG – Campus Anápolis



Prof. Lucas Hoffmann Greggh Kalinke
IFG – Campus Anápolis

Anápolis - Goiás - Brasil
Julho - 2016

Ao meu amado esposo Frank Leandro, por estar sempre ao meu lado nesta luta árdua em busca do conhecimento, que com amor e carinho me deu forças nos momentos de dificuldades. Aos meus filhos Rafaela e Daniel, meus melhores e maiores presentes.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que durante toda a minha caminhada me fortaleceu.

Ao meu esposo Frank Leandro o meu profundo e eterno agradecimento pelo amor, compreensão e incentivo para o meu crescimento pessoal e profissional. Sem você eu não teria conseguido!!!

Aos meus filhos Rafaela e Daniel que com sua inocência de criança sempre foram compreensíveis e me mostram a mais pura forma de amar. Vocês fazem os meus dias mais felizes!!!

Aos meus pais Adão e Geralda pelo amor infinito e zelo com os netos, e aos meus irmãos grandes incentivadores para esta conquista.

A família e amigos pelas orações e torcida.

Aos professores do IFG Câmpus Anápolis e Câmpus Uruaçu por todos os ensinamentos e construção do conhecimento.

Aos técnicos do laboratório que auxiliaram nas pesquisas realizadas.

Ao Instituto Federal de Goiás que proporcionou a possibilidade da realização de um sonho.

A minha amável orientadora exemplo a ser seguido, professora Ms. Gracielle Oliveira Sabbag Cunha, pelos ensinamentos, disposição e amizade, dicas e sugestões enfim por ter acreditado em mim.

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram, torceram por mim e acreditaram no sucesso desse trabalho.

RESUMO

As plantas medicinais do cerrado brasileiro são largamente empregadas pelos populares com fins terapêuticos devido ao baixo custo e fácil acesso. As espécies *Bowdichia virgilioides* Kunth e *Pterodon emarginatus* Vogel são conhecidas popularmente como sucupira preta e sucupira branca respectivamente. Trata-se de espécies arbóreas, que são encontradas em Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. O presente trabalho apresenta o estudo fitoquímico e o teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach dos extratos etanólicos obtidos das cascas do caule e das folhas espécies *Bowdichia virgilioides* Kunth e *Pterodon emarginatus* Vogel. Dos quatro extratos avaliados, apenas o extrato das folhas de *P. emarginatus* Vogel mostrou-se ativo frente aos naúplios de *A. salina*, com $DL_{50} = 120,8 \mu\text{g. mL}^{-1}$ sendo considerada tóxica. Os demais extratos apresentaram $DL_{50} > 1000 \mu\text{g. mL}^{-1}$, sendo, portanto, consideradas atóxicas. A prospecção fitoquímica do extrato das cascas de *B. virgilioides* Kunth revelou a presença de saponina espumídica, açúcares redutores, catequinas e antraquinonas; enquanto o extrato das folhas dessa espécie apresentou a presença de esteroides, triterpenoides, flavanonas, catequinas, depsídeos e depsidonas. Quanto à espécie *P. emarginatus* Vogel, o extrato etanólico das cascas apresentou resultados positivos para alcaloides, fenóis, taninos, açúcares redutores, depsídeos e depsidonas; enquanto no extrato etanólico das folhas foram encontrados esteroides, triterpenoides, fenóis, taninos, depsídeos e depsidonas.

Palavras-chave: *Bowdichia virgilioides* Kunth. *Pterodon emarginatus* Vogel. Toxicidade. Prospecção fitoquímica.

ABSTRACT

Medicinal plants of the Brazilian cerrado are widely used for therapeutic purposes due to their low cost and availability. The *Bowdichia virgilioides* Kunth and *Pterodon emarginatus* Vogel species are popularly known as black sucupira and white sucupira respectively. These tree species are found in Minas Gerais, São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul. This paper presents a phytochemical study and toxicity test of ethanol extracts from the bark and leaves of the species *Bowdichia virgilioides* Kunth and *Pterodon emarginatus* Vogel against the microcrustacean *Artemia salina* Leach. Of the four extracts evaluated, only the extract of *P. emarginatus* Vogel leaves proved to be active against *A. salina* nauplii, with a $DL_{50} = 120,8 \mu\text{g. mL}^{-1}$ being considered toxic. The other extracts presented a $DL_{50} > 1000 \mu\text{g. mL}^{-1}$, being thus considered as atoxic. The phytochemical extract from *B. virgilioides* Kunth bark contained saponin foam, reducing sugars, anthraquinones and catechins; whilst the extract from the leaves of this species contained steroids, triterpenoids, flavanones, catechins, depsides and depsidones. As for the *P. emarginatus* Vogel species, the ethanol extract of the bark tested positive for alkaloids, phenols, tannins, reducing sugars, depsides and depsidones; while the ethanol extract of the leaves contained steroids, triterpenoids, phenols, tannins, depsides and depsidones.

Key Words: *Bowdichia virgilioides* Kunth. *Pterodon emarginatus* Vogel. Toxicity. Phytochemical Prospection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| g | Gramas |
| kg | Quilogramas |
| cm | Centímetros |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| i.p. | Intra peritoneal |
| mL | Mililitro |
| DL ₅₀ | Dose Letal |
| mm | Milímetro |
| µm | Micrometro |
| µL | Microlitros |
| mg | Miligramas |
| W | Whats |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| PECE | <i>Pterodon emarginatus</i> casca etanólico |
| PEFE | <i>Pterodon emarginatus</i> folhas etanólico |
| BVCE | <i>Bowdichia Virgilioides</i> casca etanólico |
| BVFE | <i>Bowdichia Virgilioides</i> folhas etanólico |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Simplificação molecular da morfina nos derivados 4-fenil-piperidínicos | 18 |
| Figura 2- Ilustração das funções na estrutura da morfina estratégicas para o planejamento de simplificação molecular | 19 |
| Figura 3- Folhas (A), cascas (B) e frutos (C) de <i>P. emarginatus</i> Vogel | 22 |
| Figura 4 - Estrutura das moléculas de Lupeol e Betulina | 23 |
| Figura 5 - Caule (A) e folhas (B) de <i>B. virgilioides</i> Kunth | 25 |
| Figura 6- Estrutura das moléculas de Rutina, Quercetina e Ácido Cafeico..... | 27 |
| Figura 7- Ilustração do microcrustáceo de água salgada <i>A. salina</i> Leach..... | 28 |
| Figura 8- Obtenção dos extratos brutos de <i>P. emarginatus</i> Vogel e <i>B. virgilioides</i> Kunth..... | 30 |
| Figura 9- Esquema de preparação e execução do teste de Letalidade em <i>A. salina</i> Lech. | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Quantidade de materiais vegetais secos e rendimento dos extratos etanólicos da casca do caule e das folhas de <i>P. emarginatus</i> Vogel e <i>B. virgilioides</i> Kunth | 33 |
| Tabela 2 - Contagem de <i>A. salina</i> mortas após 24h de exposição ao extrato etanólico da casca do caule de <i>B. virgilioides</i> Kunth | 34 |
| Tabela 3 - Contagem de <i>A. salina</i> mortas após 24 de exposição ao extrato etanólico das folhas de <i>B. virgilioides</i> Kunth | 34 |
| Tabela 4 - Contagem de <i>A. salina</i> mortas após 24 de exposição ao extrato etanólico da casca do caule de <i>P. emarginatus</i> Vogel..... | 35 |
| Tabela 5 - Contagem de <i>A. salina</i> mortas após 24 de exposição ao extrato etanólico das folhas de <i>P. emarginatus</i> Vogel | 35 |
| Tabela 6. Avaliação da toxicidade em <i>A. salina</i> Leach (DL ₅₀) de extratos obtidos de <i>P. emarginatus</i> Vogel e seu intervalo de confiança de 95% | 36 |
| Tabela 7. Resultados dos testes fitoquímicos dos extratos brutos das espécies <i>P. emarginatus</i> Vogel e <i>B. virgilioides</i> Kunth | 37 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1. Fitoterápicos..... | 17 |
| 2.2. Família Fabaceae | 20 |
| 2.3. Gênero <i>Pterodon</i> | 21 |
| 2.4. Espécie <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel | 22 |
| 2.5. Gênero <i>Bowdichia</i> | 24 |
| 2.6. Espécie <i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth..... | 25 |
| 2.7. Ensaio de Letalidade com <i>Artemia salina</i> Leach..... | 27 |
| 3. OBJETIVOS | 29 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 29 |
| 3.2. Objetivos específicos | 29 |
| 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... | 29 |
| 4.1. Material vegetal | 29 |
| 4.2. Preparação dos extratos brutos | 30 |
| 4.3. Cultura e ensaio de letalidade de <i>Artemia salina</i> Leach..... | 31 |
| 4.4. Cálculo dos valores de DL ₅₀ | 32 |
| 4.5. Prospecção Fitoquímica..... | 33 |
| 5.1. Resultados da extração..... | 33 |
| 5.2. Avaliação da atividade tóxica de extratos de <i>P. emarginatus</i> Vogel e <i>B. virgilioides</i> Kunth | 34 |
| 5.3. Identificação da presença de metabólitos secundários..... | 36 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 41 |
| 7. REFERÊNCIAS | 43 |
| APÊNDICE 1. PREPARAÇÃO DOS REATIVOS | 51 |
| 1.1 Testes | 52 |

1. INTRODUÇÃO

A investigação científica com plantas medicinais envolve inúmeros aspectos importantes, tais como as características das drogas delas originadas, a morfologia dos vegetais e a composição química. O estudo das mesmas enfrenta problemas, obstáculos e cuidados, contudo permite aos pesquisadores terem conhecimentos mais amplos e ricos, até o prazer e o desafio de estudar detalhadamente uma espécie (DI STASI, 1996).

Milhares de compostos bioativos com propriedades inexploradas existem na natureza. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica possibilita identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (FERREIRA E DANTAS, 2014).

Muitos desses metabólitos secundários despertaram o interesse de cientistas em estudar a sua estrutura, biossíntese e distribuição. Novas substâncias com finalidade terapêutica são descobertas por meio de diversos processos, tais como: a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais, a extração, isolamento e purificação de novos compostos de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamentos (BRITO E BRITO, 1993).

O Brasil mostra uma extensa área territorial, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística os domínios fitogeográficos são classificados em amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica, pampas e pantanal com grande florística e diversidade cultural, que são uma rica fonte de compostos bioativos (MARQUEZ et al., 2013).

Rates (2001), afirma que o Brasil é um dos países mais ricos do mundo em biodiversidade, possui aproximadamente 20% do total de espécies medicinais existentes no planeta. O bioma cerrado dispõe de uma rica flora que abrange mais de 2 milhões de quilômetros quadrados no interior do Brasil e apresenta uma das maiores riquezas naturais em espécies vegetais além do grande potencial aquífero que favorece a sua biodiversidade (BURMAN, 1991).

Apesar de sua abundante variedade de plantas, o cerrado vem sucumbindo às práticas agrícola e agropecuária, o que tem provocado uma diminuição dos recursos naturais e possivelmente a extinção de espécies nativas deste Bioma (BORBA E MACEDO, 2006).

As comunidades tradicionais são detentoras de um saber significativo a respeito de métodos alternativos de cura das doenças mais frequentes que ainda são muito utilizadas

nos países em desenvolvimento como o Brasil, devido à facilidade ao acesso, e por apresentarem baixo ou nenhum custo (FRANCO E BARROS, 2006).

Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) mostra que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina popular ou de medicamentos à base de plantas como fonte primária de cuidados à saúde (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2009).

Ainda segundo a OMS, o mundo assiste atualmente a uma reformulação no modo de vida, os valores naturais retornam com grande força em todas as áreas do conhecimento científico. Na última década houve uma expansão global nas práticas da medicina tradicional que se tornaram mais populares, sendo incentivadas por profissionais da rede básica de saúde e pela medicina convencional. Desta forma, uma série de resoluções tem sido elaboradas salientando o potencial fitoterápico das plantas nos serviços de saúde regionais (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2009).

O uso popular não é o suficiente para conferir tal caráter, e assim com a demanda cada vez mais crescente da utilização de plantas medicinais tornou-se intenso o interesse de pesquisadores em conhecer os verdadeiros potenciais químicos e biológicos responsáveis por tais ações (IGNOATO, 2012).

Auricchio e Bacchi (2003) salientam que os materiais vegetais eram inicialmente utilizados da maneira como eram encontrados no meio ambiente e depois passaram a ser concentrados para melhora da intensidade e uniformidade de suas ações. À medida que os avanços da química surgiram, as substâncias ativas puderam ser identificadas, isoladas e usadas como moléculas sinteticamente elaboradas, com atividade terapêutica ainda maior para o controle e tratamento de diversas doenças (PEREIRA E CARDOSO, 2012).

Diante deste contexto, objetivando contribuir com o conhecimento fitoquímico e biológico e verificar a toxicidade de duas espécies da família Fabaceae: *Pterodon emarginatus* Vogel conhecidas popularmente como sucupira branca ou faveira e *Bowdichia virgilioides* Kunth, conhecida popularmente sucupira preta e sucupira do cerrado, este trabalho propõe a realização do ensaio de letalidade dos extratos da casca do caule e das folhas dessas espécies frente à *Artemia salina* Leach, além da prospecção fitoquímica desses extratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fitoterápicos

As plantas medicinais são amplamente utilizadas com fins terapêuticos desde os primórdios dos tempos. O extenso conhecimento adquirido por antecedentes foi repassado oralmente por meio de sucessivas gerações (FIRMO et al., 2011).

O Papiro de Erbes, datado a cerca de 3.000 anos a.C. é um dos primeiros registros que relatam o uso de plantas para o alívio e cura de dor e doenças, por meio de ingestão, infusões e uso externo. Em 1873 Georg Erbes decifrou-o e este ficou conhecido como o primeiro tratado médico que relata o uso da fitoterapia (SILVA, 2009).

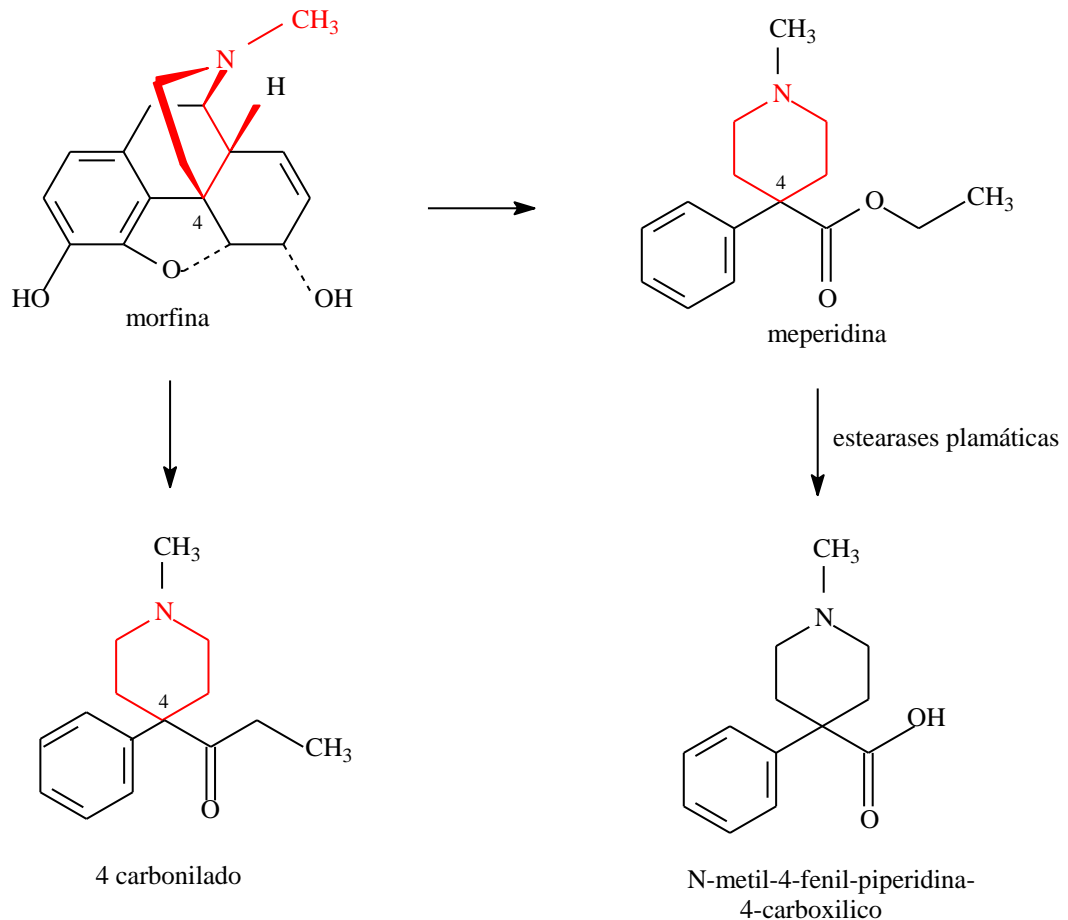
NA medicina egípcia antiga eram observados o uso do sene, do zimbros, das sementes do linho, do funcho, do rícino e de muitas outras plantas, apesar da mesma se apoiar em elementos mágicos e religiosos (CUNHA, 2003).

Apesar de representarem por muito tempo a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, com o desenvolvimento da química farmacêutica as plantas passaram a ser a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (HOSTETTMANN et al., 2003).

No século XVIII o sueco Scheele (1742-1786), já havia isolado o ácido benzoico, a sacarose e a cânfora. Assim se começa a isolar e determinar estrutura dos princípios ativos dos vegetais que contém propriedades medicinais com a obtenção, na sua farmácia de Koping, de vários ácidos orgânicos e ainda a lactose e a glicerina, todos sempre obtidos a partir de produtos naturais (CUNHA, 2003).

Em 1804, o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam isolou a morfina (Figura 1), que inspirou a descoberta posterior dos derivados 4-fenil-piperidínicos como uma nova classe de hipoanalgésicos de emprego mais efetivo e seguro. Esta simplificação molecular permitiu empregar técnicas que possibilitassem melhor compreensão do mecanismo de ação analgésica deste alcaloide, originalmente isolado de *Papaver somniferum* (BARREIRO E MANSSOUR, 2008).

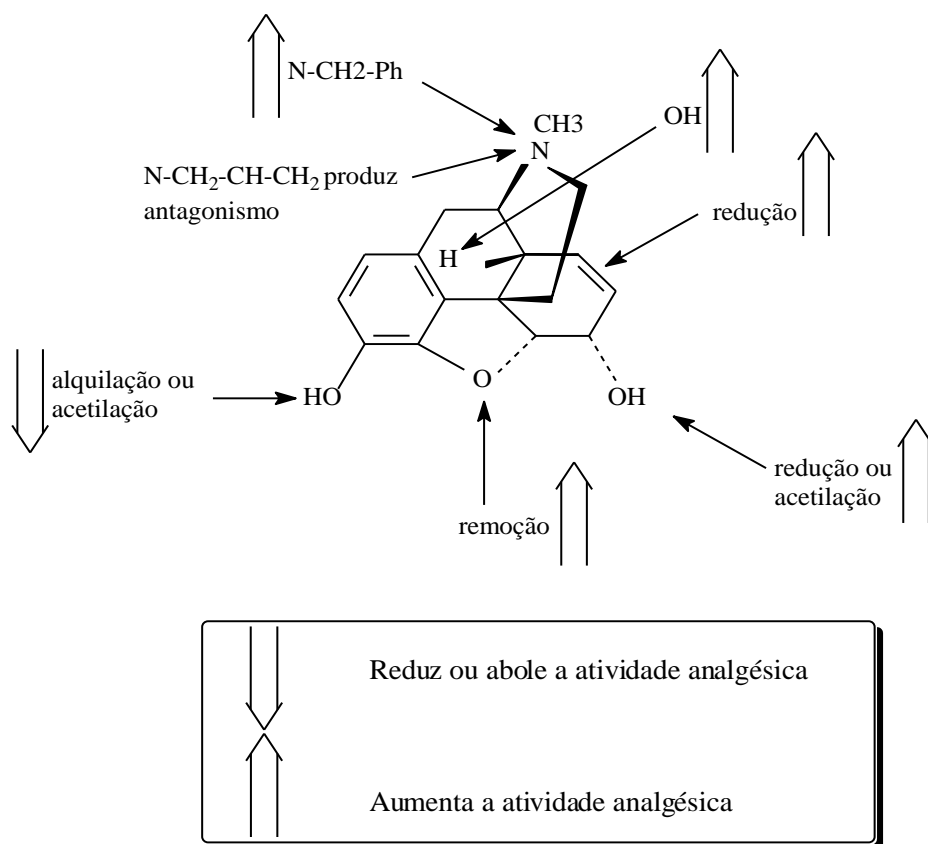
Figura 1- Simplificação molecular do alcaloide morfina nos derivados 4-fenil-piperidínicos.



Fonte: BARREIRO E BOLZANI, 2009.

As propriedades farmacológicas podem ser alteradas por meio de pequenas alterações na estrutura química da molécula. A estrutura molecular fornece dados pelos quais se torna possível identificar propriedades como o tamanho e forma da molécula, posição e orientação dos grupos com carga ou capazes de fazer ponte de hidrogênio, e, orientação dos grupos quimicamente interativos na sua superfície. Desta forma, torna-se possível elaborar um modelo mais preciso do sitio receptor e desenvolver um congênere que apresente uma relação de efeito terapêutico X tóxico mais favorável. Estes modelos detalhados permitem racionalizar a síntese de novos compostos ou criar congêneres com maior eficácia, seletividade, afinidade ou efeitos regulatórios, ou mesmo melhorar suas propriedades farmacocinéticas, pois o propósito do fármaco e sua atividade intrínseca são definidas por sua estrutura química (Figura 2) (MACHADO, 2013).

Figura 2. Ilustração das funções na estrutura da morfina estratégicas para o planejamento de simplificação molecular.



Fonte: BARREIRO E BOLZANI, 2009.

Na constante busca por novas drogas ou mesmo aperfeiçoamento das existentes, os vegetais são excelentes fontes de matéria prima, pois apresentam uma diversidade molecular superior àquela derivada dos processos de síntese química. Dos medicamentos aprovados pelo Ministério da Saúde, entre os anos de 1984 e 1994, 6% foram extraídos diretamente de espécies vegetais, 9% foram desenvolvidos por meio de modelagem molecular de estruturas químicas de compostos vegetais que serviram como protótipos e 24% foram produzidos a partir de produtos derivados de vegetais, fato que confirma a grande importância dos compostos de origem vegetal na medicina moderna (ALVES, 2005).

Doenças como Parkinson, Alzheimer, *diabetes mellitus*, câncer, envelhecimento e disfunção cerebral estão relacionadas com a geração de radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Várias pesquisas vêm sendo realizadas para a descoberta de produtos naturais isolados ou mesmo frações de plantas com atividades antioxidantes que permitam a substituição dos fármacos (PAREJO et al., 2003; SILVA, B.A. et al., 2005).

Nesse contexto é possível observar que o estudo fitoquímico das plantas ainda é um processo lento se considerada a quantidade de plantas existentes no planeta, e que ocorre de forma restrita, pois nem todas as plantas usadas tradicionalmente na medicina popular foram investigadas levando a conhecer seus componentes químicos.

2.2. Família Fabaceae

A família Fabaceae mostra-se como uma das maiores famílias botânicas, sendo a terceira maior família das angiospermas. Esta família está mundialmente distribuída, ocorrendo em diferentes tipos de habitats, presentes em todas as regiões dentro do círculo ártico ao Equador, contudo elas sofrem influência da área de localização e se diferenciam em ocorrência e, sobretudo, em abundância. Os membros desta família apresentam uma grande diversidade de hábito de crescimento, desde ervas perenes até árvores de grande porte (IGNOATO, 2012).

Os representantes da família Fabaceae estão distribuídos em mais de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies com hábitos variados, podendo ser herbáceas, trepadeiras, arbustivas ou arbóreas. As espécies Fabaceae estão subdivididas em 3 subfamílias: *Faboideae*, que se apresenta como maior subfamília, possuindo cerca de 429 gêneros e 12.615 espécies, seguida por *Caesalpinioideae* com cerca de 150 gêneros e 2.700 espécies e *Mimosoideae* com 40 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (SILVA, 2009).

A importância econômica da família Fabaceae é grande, pois apresenta vasta variedade de espécies: grão-de-bico (*Cicer arietinum*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culvaris*), feijão-mungo (*Vigna radiata*), e a soja (*Glycine max*), todos utilizados na alimentação humana (JARDINE E BARROS, 2015).

Algumas espécies como o timbó branco (*Albizia inundata*) fornecem ainda madeira de boa qualidade (BALDIN E MARCHIOR, 2014), além de se obter látex, resinas, matéria-prima na fabricação de tintas e inseticidas. A grama-amendoim (*Arachis repens* Handro), utilizada na produção de ração animal (SILVA E SOUZA, 2011) e a produção de drogas medicinais no seu estado bruto, como a espécie *Dioclea megacarpa*, suas sementes possuem princípios ativos contra fungos fitopatogênicos (BATISTA E VASCONCELOS, 2015).

A maioria das espécies da família Fabaceae apresenta como característica importante a fixação biológica de N₂ quando em associação com bactérias do solo do grupo dos rizóbios. Ocorre com maior frequência nas espécies da subfamília *Mimosoideae* seguida

da subfamília *Caesalpinioideae* (SOUZA, 2010). Elas podem crescer em solos pobres em nitrogênio, pois desenvolvem nódulos em suas raízes que contêm bactérias simbióticas que promovem a fixação do nitrogênio atmosférico suprindo a planta (CORBY, 1981).

Uma grande variedade de metabólitos secundários é produzida por plantas da família Fabaceae, tais como alcaloides, aminoácidos não proteicos, aminas, fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonoides, compostos fenólicos, esteroides e ésteres de ácido graxo (IGNOATO, 2012).

As espécies desta família são particularmente ricas em flavonoides devido à frequência e relativa abundância em que estes são encontrados nas três subfamílias. A ocorrência dos mesmos resulta na utilização etnobotânica das espécies para a produção de tintura, inseticidas e drogas medicinais. Apresentam também funções quimioecológicas exercendo a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta, de fungos e bactérias (HEGNAUER E GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

2.3. Gênero *Pterodon*

O gênero *Pterodon* é representado por quatro espécies na flora brasileira: *P. abruptus* Benth., *P. apparicioi* Pedersoli., *P. polygalaefflorus* Benth. e *P. emarginatus* Vogel conhecido em algumas regiões do Brasil por *P. pubescens* Benth., pertencentes a subfamília Faboideae, (CARVALHO, 2004).

As árvores pertencentes a esse gênero geralmente são de grande porte, estão presentes em todo o cerrado, na caatinga e em áreas de transição da floresta semidecidual da bacia do Rio Paraná. Desenvolvem-se em um processo lento, pois seu crescimento é vagaroso, porém são bem adaptadas a solos pobres em minerais e muito resistentes a luz solar (BOTINI et al., 2015).

São documentados na composição química a presença de isoflavonoides e alguns triterpenos no caule de *Pterodon polygalaefflorus* Benth. (MARQUES et al., 1998) e diterpenos nos frutos das quatro espécies pertencentes ao gênero (FASCIO et al., 1976). Na espécie *P. apparicioi* foram encontrados alcaloides na casca (TORRENEGRA et al., 1989) e isoflavonas em óleo das sementes (BRAZ E GOTTLIEB, 1971). Há ainda relatos da presença de flavanoides na espécie *P. polygalaefflorus* Benth (ARRIAGA et al., 2000).

A espécie *P. emarginatus* Vogel também denominada *P. pubescens* é amplamente utilizada na medicina popular contra vários sintomas, sendo que as partes mais utilizadas são a casca e a favinha (fruto) também chamada de semente, como depurativo do sangue, no

combate a verminose, secreções vaginais, reumatismo, infecções em geral, dor de garganta, rins, dores de coluna, úlceras estomacais e infecções gastrointestinais. São usadas de várias formas, in natura, infusões alcoólicas, chás e xaropes (BOTINI et al., 2015).

2.4. Espécie *Pterodon emarginatus* Vogel

Pterodon emarginatus Vogel é uma espécie vegetal arbórea, rústica e aromática, nativa do Cerrado, presente também na Caatinga e nas regiões intermediárias entre Mata Atlântica e Cerrado. A espécie é conhecida popularmente pelo nome de sucupira, sucupira-branca ou faveira (LORENZI, 2010), e adapta-se facilmente a solos de baixa fertilidade, podendo atingir até 15 metros de altura, possui cascas de cor cinza-claro, levemente ásperas; e floresce entre abril e maio, suas flores apresentam uma coloração lilás com aspectos ornamentais, frutificando entre maio e junho. A maturação dos frutos ocorre entre junho e agosto, conforme representado na figura 3 (SILVA, I.D. et al., 2005).

Figura 3. Folhas (A), cascas (B) e frutos (C) de *P. emarginatus* Vogel.



Fonte: Própria do autor

Amplamente usada na medicina popular, a espécie *P. emarginatus* Vogel apresenta importante potencial fitoterápico contra o reumatismo, possui ação anti-inflamatória (CARVALHO, 2004), é utilizada no tratamento de hemorragias e doenças estomacais (PEREIRA et al., 2014).

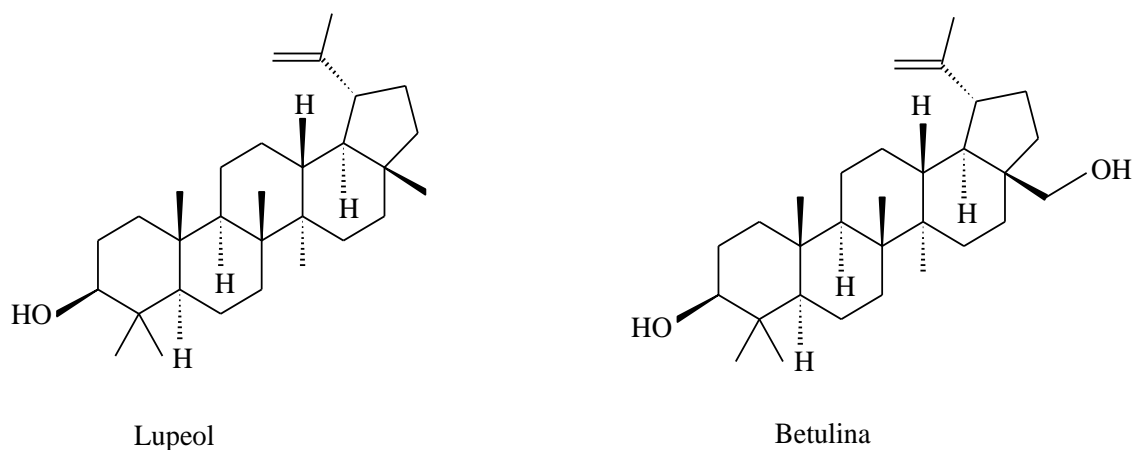
Os frutos, quando macerados, liberam um óleo fortemente aromático, com sabor característico amargo, que misturado com água é empregado na forma de gargarejo para inflamação de garganta. Já os infusos hidroalcoólicos são utilizados como antirreumático, no tratamento de problemas de coluna, depurativo e fortificante (SANTOS et al., 2010b). É

comum a alta demanda das sementes da *P. emarginatus* Vogel em comércios populares, devido ao conhecimento popular dos efeitos fitoterápicos da mesma (ARRIAGA et al., 2000). As cascas do caule são utilizadas para infecções ginecológicas (ALMEIDA et al, 1975).

São documentadas na caracterização fitoquímica desta planta, a presença de flavonoides, heterosídeos saponínicos, resinas e traços de esteroides e triterpenoides. O extrato etanólico bruto das cascas da espécie *P. emarginatus* Vogel, evidenciou ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra o fungo *Candida albicans* (BUSTAMANTE, et al.,). O óleo extraído das cascas e folhas da planta são utilizados no tratamento do reumatismo (PEREIRA et al., 2014). No entanto, o óleo extraído das sementes mostra atividades antibacteriana (RODRIGUES, 2009).

Estudos anteriores evidenciaram a ação analgésica, anti-inflamatória e antioxidante presentes nas cascas da *P. emarginatus* Vogel. Identificou-se na fração hexânica o Lupeol, um triterpenoide da família dos lupanos e foi possível observar a presença da Betulina, ilustrados na Figura 4 (MORAES, 2007).

Figura 4. Estrutura das moléculas de Lupeol e Betulina.



O Lupeol, substância isolada da casca da *P. emarginatus*, foi avaliado quanto à sua toxicidade em células leucêmicas K – 562 (*in vitro*) que apresentavam fenótipos de resistência à fármacos, e em camundongos a fim de verificar sua sobrevida. O triterpeno causa toxicidade sistêmica nas células normais, entretanto quando aliado a lipossomas estes inconvenientes são amenizados. Possibilita então, a ação antitumoral de forma expressiva, proporcionando assim um aumento da sobrevida dos camundongos de até 50% (SANTOS, 2011).

A fração diclorometano e fração de acetato de metila do extrato etanólico bruto da casca do caule, e extrato etanólico bruto das folhas observados em outra triagem, apresentaram atividade antioxidante considerável devido à presença de fenóis e compostos triterpênicos. Estes constituintes químicos são capazes de capturar radicais livres e formar compostos estáveis. Assim pressupõe que a espécie possa oferecer diversas possibilidades para o desenvolvimento de fármacos antioxidantes (SANTOS, 2008).

Além das propriedades farmacêuticas da sucupira branca já conhecidas pela medicina popular e comprovadas por estudos como sendo antinociceptiva e antimicrobiana, existem outras propriedades a serem avaliadas (BARROS, 2014).

Ademais, relatos populares afirmam que esta planta é tóxica se usada em grandes quantidades. A ingestão de folhas de *P. emarginatus* Vogel por bovinos em períodos de seca, nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul ocasionaram a morte dos mesmos. A intoxicação foi reproduzida em laboratório a fim de comprovar a toxidade da planta. Foram administradas a dose mínima de 20g/kg para ovinos e 6g/kg para bovinos, ambos foram colocados em jejum antes de receberem a dose tóxica. Entre 24 e 72 horas iniciaram os primeiros sintomas: apatia, depressão, pressão da cabeça e a morte ocorreu entre 12 a 36 horas. Os bovinos que resistiram à fase aguda apresentaram hepatomegalia no fígado, hemorragias nas serosas abdominais e torácicas, necrose coagulativa hepatocelular. Esse fato caracteriza a *P. emarginatus* como planta hepatotóxica (CRUZ et al., 2012).

2.5. Gênero *Bowdichia*

O gênero *Bowdichia* pertence à subfamília *Faboideae* e é constituído por 19 espécies; entre elas estão *B. brachypetala*, *B. brasiliensis*, *B. ferrugínea* Benth., *B. nitida* e *B. virgilioides* Kunth. As espécies desse gênero são largamente utilizadas na extração de madeira. Sua madeira é considerada nobre e muito utilizada na fabricação de pisos e móveis (MATSUNO, 2009).

Nos últimos anos, pesquisas têm demonstrado o potencial químico e farmacológico das plantas desse gênero sendo que *B. nitida* e *B. virgilioides* Kunth são as duas espécies que mais apresentaram resultados. Recentes estudos fitoquímicos com a espécie *B. nitida* revelaram a presença de alcaloides, xantonas, triterpenoides e isoflavonoides com importantes atividades biológicas, incluindo atividade anticâncer e antiparasitária (MATSUNO et al., 2008; 2009). As duas espécies são tradicionalmente utilizadas para tratar

diversos distúrbios, incluindo reumatismo, úlceras de pele, diabetes, herpes, gonorreia, disenteria, icterícia, asma, infecção brônquica e como abortiva (CALIXTO et al., 1998).

2.6. Espécie *Bowdichia virgilioides* Kunth

Conhecida popularmente como sucupira preta e sucupira do cerrado, *Bowdichia virgilioides* Kunth é uma árvore de tamanho médio, com tronco reto ou retorcido, de casca grossa, fendilhada e cinzenta e com folhas pinadas, conforme ilustrado na Figuras 5. Quando as folhas caem, a copa da árvore é totalmente tomada por flores de 2-3 cm de comprimento, lilás-escuras dispostas em panículas que conferem um aspecto ornamental pois tomam toda a copa da árvore; floresce de agosto a setembro. Os frutos são vagens de aproximadamente 5 cm de comprimento e amadurecem de outubro a dezembro quando já não há mais folhas presentes. Possui madeira pardo-escura, fato que incentivou aos populares de chama-la de sucupira preta. A madeira é muito empregada para acabamentos internos, como molduras, portas, assoalhos além de ser largamente utilizada para esteios, postes, trabalhos de marcenaria e carpintaria (BRAGA, 1953).

Figura 5. Caule (A) e folhas (B) de *B. virgilioides* Kunth.



Fonte: Própria do autor

O uso da *B. virgilioides* é muito comum na medicina popular, principalmente na região Nordeste do Brasil. As partes mais utilizadas são as cascas do caule e os tubérculos, as folhas e as sementes. Os tubérculos são utilizados contra reumatismos crônicos e deformantes. Sua casca é tradicionalmente usada contra úlceras, diabetes, diarreia, adstringente e tônico (MACEDO E FERREIRA, 2005).

As sementes em infusão são empregadas em combate à febre, inflamações, gota, artrite e são depurativas. As folhas podem aliviar dores nas articulações e na garganta (THOMAZZI et al., 2010). De pequenos orifícios, abertos nas cascas do caule da *B. virgilioides* Kunth emana uma seiva que em contato com o ar forma uma espécie de goma ou resina. Esta seiva possui as mesmas características das cascas e são usadas para os mesmos fins.

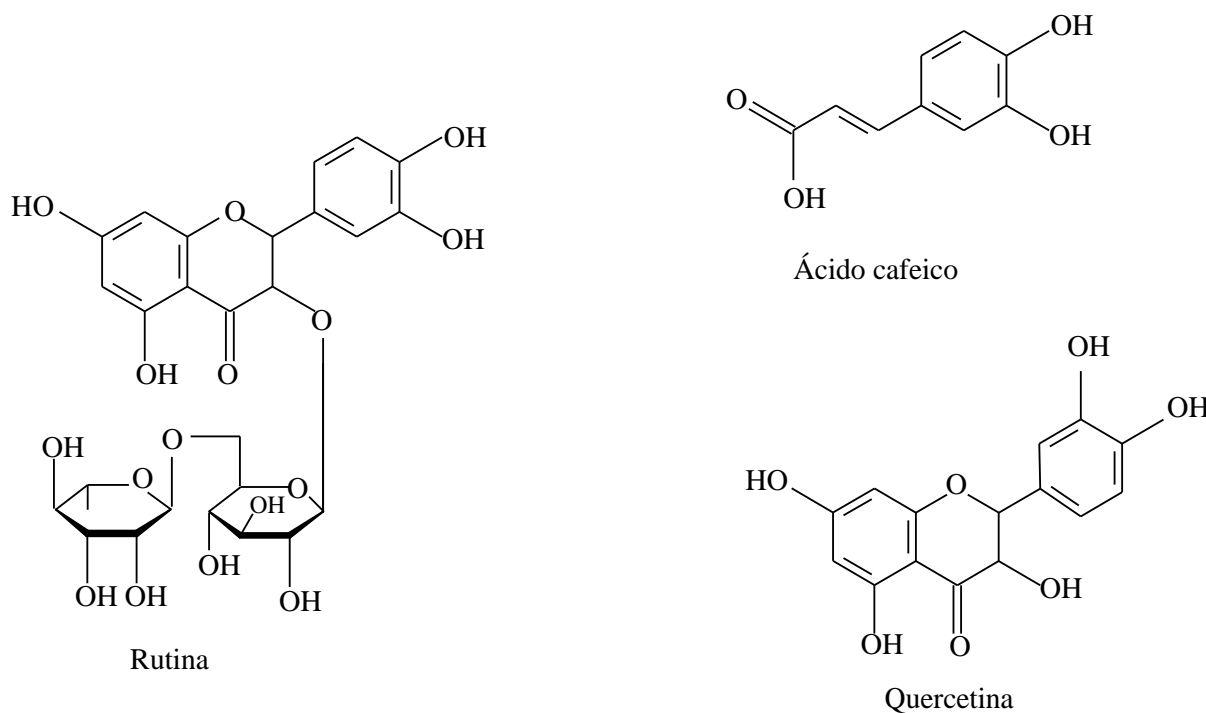
Devido a sua importância medicinal, esta planta foi incluída na Farmacopeia Brasileira (BRANDÃO et al., 2006). Várias bioatividades desta espécie já foram comprovadas: antimalárica (DEHARO et al., 2001), antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante (THOMAZZI et al., 2010), hipoglicêmica (BARBOSA-FILHO et al., 2005) e inibidora da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA-FILHO et al., 2006).

O estudo fitoquímico das cascas das raízes resultaram no isolamento da substância Lupeol, que mostrou bom potencial antileishmanicida para a inibição da forma promastigota de *Leishmania chagasi* causadora da leishmaniose visceral (SILVA, 2009).

Estudos anteriores de investigação química desta espécie resultaram no isolamento de diversas substâncias como flavonoides (VELOZO et al., 1999a; VELOZO et al., 1999b; ARRIAGA et al., 2000), benzofuranoides (MELO et al., 2001), triterpenoides (TORRENEGRA et al., 1985; MARINHO et al., 1994; MELO et al., 2001) e alcaloides (TORRENEGRA et al., 1989; MARINHO et al., 1994; BARBOSA-FILHO et al., 2004). Estas substâncias são conhecidas por apresentarem atividades biológicas importantes, dentre estas a atividade antimicrobiana assim como potencializadora de antibióticos (DIXON et al., 1983; HO et al., 2001).

O extrato etanólico da casca do caule desta planta foi analisado em uma triagem fitoquímica anterior, por meio da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), indicou a presença de fenóis ácidos (ácido clorogênico, ácido cafeico) e os flavonoides (quercetina, rutina e kaempferol), com concentrações diversas, conforme representado na Figura 11. Os flavonoides estão presentes em todas as partes do vegetal, enquanto quantidades significativas de alcaloides foram encontradas na casca (LEITE et al., 2014).

Figura 6. Estrutura das moléculas de Rutina, Quercetina e Ácido Cafeico.



Testes da toxicidade aguda foram realizados em camundongos por meio da administração do extrato aquoso das cascas do caule de *B. virgilioides* Kunth via intraperitoneal (i.p.) na dose de 100 mg.kg^{-1} durante 7 dias. A dose utilizada era dez vezes acima daquela responsável por causar os efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e imunossupressores. Não foi observada nenhuma alteração clínica ou morte, sustentando assim o uso popular do extrato aquoso desse vegetal, pois o mesmo não apresenta nenhum efeito tóxico (SILVA, 2009).

Marquez e colaboradores (2013), salientam um alto teor tóxico nos extratos das sementes de *B. virgilioides* Kunth. Foi realizado o ensaio de letalidade com *A. salina* para a avaliação da toxicidade, considerando que extratos que apresentam valores de CL_{50} (Concentração Letal) a abaixo de $1000/\text{mL}^{-1}$ foram tomados com tóxicos. Os mesmos indicaram valores de CL_{50} de $3,53/\text{mL}^{-1}$ sendo considerados ativos. O extrato das hastes também apresentou-se tóxico para as larvas de *A. salina*.

2.7. Ensaio de Letalidade com *Artemia salina* Leach

Os compostos bioativos presentes em frutas, legumes e verduras são benéficos a saúde humana favorecendo o bom funcionamento dos órgãos e até a prevenção de algumas

doenças. Entretanto, como os compostos bioativos presentes em extratos vegetais quase sempre apresentam toxidades em altas doses, os testes de toxicidade possibilitam avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos (FORBES E FORBES, 1994).

Os efeitos produzidos por uma substância aplicada a animais de laboratório são similares aos que ocorrem no homem, desse modo, os testes de toxicidade animal, como o bioensaio com *A. salina*, viabiliza atentar para possíveis riscos nos humanos. Muitos ensaios com o microcrustáceo foram elaborados para identificar compostos bioativos em extratos vegetais fracionados de forma rápida e simples (AMARAL E SILVA, 2008).

A. salina pertence ao filo Arthropoda, classe Crustácea, subclasse Branquiopoda, é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, da família Artemidae e Gênero *Artemia* (PIZZOLOTTO, 2010). Esta espécie adulta mede cerca de 10 mm de comprimento, conforme ilustrada na Figura 7, os cistos possuem diâmetro médio de 250 μm e os náuplios recém-eclodidos possuem em média 450 μm de comprimento. Os cistos dormentes formados são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco, fornecendo material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manter culturas contínuas de organismos-teste (BARBOSA et al., 2003).

Figura 7. Ilustração do microcrustáceo de água salgada *A. salina* Leach.



Fonte: Pizzolotto (2010)

A *A. salina*, conhecida como camarão de água salgada, é considerada um bioindicador sensível a pequenas variações na qualidade do ambiente, no entanto ela é de fácil manipulação em condições laboratoriais e tem sido largamente utilizada em testes de

toxicidade. O bioensaio para as larvas é, em geral, simples, rápido, sensível e barato (VEIGA; VITAL, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Contribuir com o conhecimento sobre a atividade tóxica e o perfil fitoquímico das espécies *Pterodon emarginatus* Vogel e *Bowdichia virgilioides* Kunth.

3.2. Objetivos específicos

- Obter extratos da casca do caule e das folhas de *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth.
- Verificar a toxicidade dos extratos de *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth através do ensaio de toxicidade frente as larvas de *Artemia salina*.
- Definir a DL₅₀ (Dose letal do extrato para 50% da população) dos extratos.
- Realizar testes fitoquímicos com os extratos para identificar as principais classes de metabólitos secundários.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Material vegetal

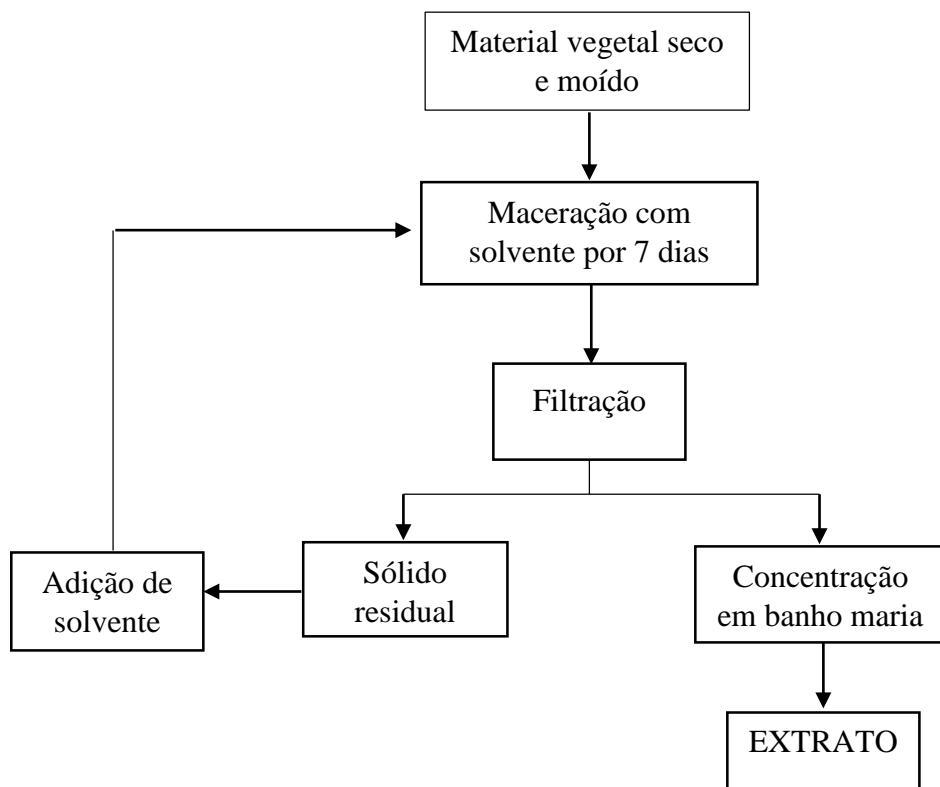
As cascas do caule e folhas de *P. emarginatus* Vogel (sucupira branca ou faveira) foram coletadas na Fazenda Boa Vista da Grama, situada no município de Anápolis – Goiás, enquanto a coleta das cascas do caule e folhas de *B. virgilioides* Kunth (sucupira preta) foi realizada na Fazenda Jatobá, situada no município de Abadiânia – Goiás. A coleta das cascas de ambas as espécies foi realizada no mês de junho de 2015, enquanto as folhas foram coletadas no mês de janeiro de 2016. A extração foi realizada com o auxílio de facão e para o armazenamento temporário e transporte foram utilizados sacos plásticos. A identificação das mesmas se deu por meio de comparação com dados da literatura.

4.2. Preparação dos extratos brutos

As amostras da casca do caule e folhas foram submetidas a um processo de triagem e limpeza, exposto em ambiente arejado até secura total. As folhas das duas espécies foram moidas utilizando-se moinho de facas enquanto as cascas foram trituradas manualmente.

O material vegetal seco e pulverizado foi pesado e colocado em frascos de vidro submerso em álcool etílico PA por 7 dias para a extração. Após este período, foi realizada a filtração e evaporação do solvente em banho-maria, a temperatura de aproximadamente 50°C, conforme o procedimento ilustrado na Figura 8. Este processo foi repetido por duas vezes.

Figura 8- Obtenção dos extratos brutos de *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth.



4.3. Cultura e ensaio de letalidade de *Artemia salina* Leach

Os ensaios de letalidade de *A. salina* foram realizados de acordo com a técnica descrita por Meyer et al. (1982).

Na realização dos ensaios foram utilizados água destilada e sal marinho para a preparação de uma solução salina de concentração igual a 40gL^{-1} . Também foram adicionados cerca de 0,0005 g de extrato de levedura. Foram preparados dois litros de solução salina, sendo que um litro foi utilizado para a eclosão das larvas de *A. salina* e um litro para a renovação da água após a eclosão.

A solução salina foi levada a autoclave. Após o esfriamento da solução, 100 mg de ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em um kitassato com bomba de oxigênio por um período de 36 horas em uma capela com temperatura ambiente, sob luz de 100 W.

Após este período, os náuplios foram coletados do kitassato para um bécker. Uma nova solução salina foi adicionada para a renovação dos nutrientes.

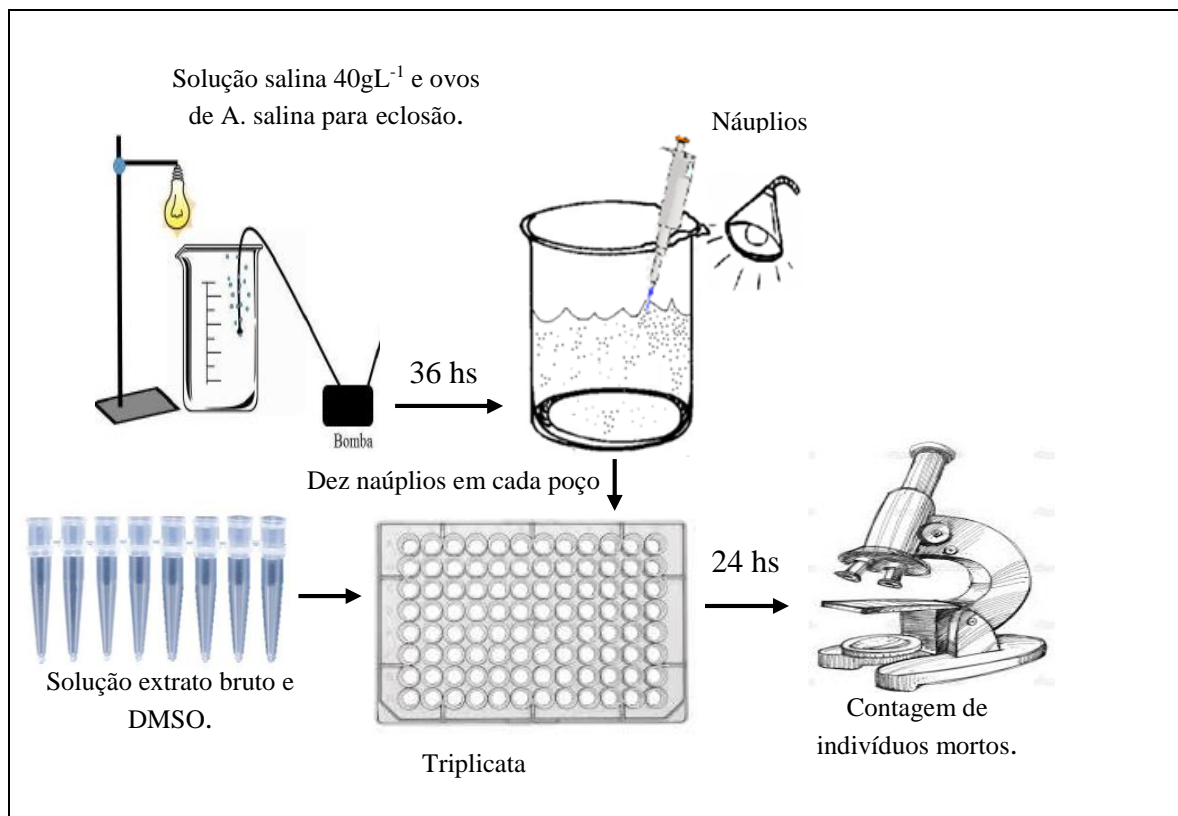
Os extratos (0,01g) foram solubilizados em 0,3 mL de DMSO e em seguida foram acrescentados 9,7 mL de solução salina. Os extratos foram preparados em cinco concentrações diferentes: $1000\ \mu\text{g. mL}^{-1}$, $500\ \mu\text{g. mL}^{-1}$, $250\ \mu\text{g. mL}^{-1}$, $125\ \mu\text{g. mL}^{-1}$ e $62,5\ \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Para a realização dos ensaios, 10 náuplios de *A. salina* foram transferidos com uma micropipeta para a placa de Elisa (96 poços). Ao final da transferência, cada poço possuía 10 náuplios em 100 μL de solução salina, acrescentou-se a cada poço 100 μL dos extratos diluídos.

Os testes foram realizados em triplicatas e também verificou-se o comportamento dos náuplios frente ao branco (DMSO e solução salina) e ao dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

Em seguida, a placa foi tampada e deixada em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, a placa foi analisada utilizando um microscópio para registrar a quantidade de náuplios mortos e vivos em cada poço.

Figura 9- Esquema de preparação e execução do teste de Letalidade em *A. salina* Lech.



Fonte: Própria do autor

Os dados das larvas vivas, em relação ao aumento da concentração dos extratos testados, foram analisados e plotados em uma equação linear simples, a qual foi utilizada para estimar a DL_{50} .

4.4. Cálculo dos valores de DL_{50}

A obtenção da dose que causa letalidade de 50% dos náuplios (DL_{50}) foi feita por cálculos do método PROBIT de análise, através do software estatístico com 95% de confiança.

“O probit é um método que estima com eficiência a dose letal de um indivíduo a 50% (DL_{50}) [...] Estima doses críticas em ensaios de dose-resposta, onde uma determinada droga é administrada em k diferentes doses (níveis), d_1, d_2, \dots, d_k em, respectivamente, m_1, m_2, \dots, m_k indivíduos, obtendo-se como resposta, após um período especificado, y_1, y_2, \dots, y_k indivíduos que mudam de estado (ocorrência de um sucesso, por exemplo, morte). Neste tipo de ensaio uma amostra com indivíduos de uma mesma espécie é selecionada. Tal amostra é dividida em k grupos, cada um com m_i indivíduos, $i = 1, 2, \dots, k$. Cada dose é aplicada a cada grupo e o número de sucessos por grupo (morte do indivíduo, por exemplo) é contado. Uma informação que é de interesse prático em experimentos de dose-resposta é a medida

de Susceptibilidade ou Tolerância de uma unidade experimental ao tratamento a que ela foi submetida. Esta tolerância pode ser entendida como o valor crítico que o tratamento assume no limiar entre sucesso ou fracasso do ensaio, por exemplo, nos experimentos de dose-resposta, ela pode ser entendida como a menor dose possível para matar um determinado indivíduo, ou seja, a dose letal (*lethal dose* - DL) do indivíduo. Esta Tolerância é uma variável aleatória contínua que não pode ser medida diretamente. O que pesquisador tem em mãos são as proporções de sucessos (ou fracassos) para cada grupo do qual foi submetido o tratamento”.

4.5. Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Barbosa (2001) para a identificação dos seguintes compostos: saponina espumídica, ácidos orgânicos, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, flavonoides, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavanonóis e xantonas, chalconas e auronas, leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas, alcaloides, catequinas, esteroides e triterpenoides, depsídios e depsidonas, derivados da cumarina, antraquinonas. Para a realização dos testes, foram preparados os reativos conforme descrito no Apêndice 1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Resultados da extração

As quantidades de materiais vegetais secos e extratos brutos etanólicos de *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth em massa, obtidas durante o processo, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de materiais vegetais secos e rendimento dos extratos etanólicos da casca do caule e das folhas de *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth.

| Código | Peso seco (g) | Solvente | Massa do extrato obtida (g) | Rendimento % |
|--------|---------------|----------|-----------------------------|--------------|
| PECE | 1021,0 | Etanol | 37,8 | 3,70 |
| PEFE | 950,0 | Etanol | 19,66 | 2,07 |
| BVCE | 676 | Etanol | 31,3 | 3,26 |
| BVFE | 830 | Etanol | 15,1 | 1,82 |

PECE – Extrato etanólico das cascas de *P. emarginatus* Vogel. PEFE – Extrato etanólico das folhas de *P. emarginatus* Vogel. BVCE – Extrato etanólico das cascas da *B. virgilioides* Kunth. BVFE – Extrato etanólico das folhas da *B. virgilioides* Kunth.

5.2. Avaliação da atividade tóxica de extratos de *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth

Os extratos brutos das cascas do caule e das folhas foram submetidos ao bioensaio de toxicidade frente à *A. salina*. A quantidade de náuplios de *A. salina* mortos após a exposição aos extratos dessas espécies estão descritas nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2 - Contagem de *A. salina* mortas após 24h de exposição ao extrato etanólico da casca do caule de *B. virgilioides* Kunth.

| | Concentração do extrato bruto | Quantidade de <i>A. salina</i> expostas | Média de <i>A. salina</i> mortas |
|---|-------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth (BVCE) | 1000 µg/mL | 10 | 9 |
| | 500 µg/mL | 10 | 3 |
| | 250 µg/mL | 10 | 0 |
| | 125 µg/mL | 10 | 0 |
| | 62,5 µg/mL | 10 | 0 |
| | Controle | 10 | 10 |
| | Branco | 10 | 0 |

Tabela 3 - Contagem de *A. salina* mortas após 24 de exposição ao extrato etanólico das folhas de *B. virgilioides* Kunth.

| | Concentração do extrato bruto | Quantidade de <i>A. salina</i> expostas | Média de <i>A. salina</i> mortas |
|---|-------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth (BVFE) | 1000 µg/mL | 10 | 10 |
| | 500 µg/mL | 10 | 9 |
| | 250 µg/mL | 10 | 0 |
| | 125 µg/mL | 10 | 0 |
| | 62,5 µg/mL | 10 | 0 |
| | Controle | 10 | 10 |
| | Branco | 10 | 0 |

Tabela 4 - Contagem de *A. salina* mortas após 24 de exposição ao extrato etanólico da casca do caule de *P. emarginatus* Vogel

| | Concentração do extrato bruto | Quantidade de <i>A. salina</i> expostas | Média de <i>A. salina</i> mortas |
|---|-------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (PECE) | 1000 µg/mL | 10 | 1 |
| | 500 µg/mL | 10 | 1 |
| | 250 µg/mL | 10 | 0 |
| | 125 µg/mL | 10 | 0 |
| | 62,5 µg/mL | 10 | 0 |
| | Controle | 10 | 10 |
| | Branco | 10 | 0 |

Tabela 5 - Contagem de *A. salina* mortas após 24 de exposição ao extrato etanólico das folhas de *P. emarginatus* Vogel.

| | Concentração do extrato bruto | Quantidade de <i>A. salina</i> expostas | Média de <i>A. salina</i> mortas |
|---|-------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (PEFE) | 1000 µg/mL | 10 | 10 |
| | 500 µg/mL | 10 | 10 |
| | 250 µg/mL | 10 | 10 |
| | 125 µg/mL | 10 | 3 |
| | 62,5 µg/mL | 10 | 2 |
| | Controle | 10 | 10 |
| | Branco | 10 | 0 |

A quantidade de náuplios mortos descritos nas Tabelas 2, 3 e 4, apresentaram valores muito baixos, assim, não foi possível a realização do cálculo da DL_{50} pelo PROBIT. No entanto, de acordo com Westerlon (2006) quando isso ocorre, considera-se os valores da $DL_{50} > 1000 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

De acordo com Meyer et al., (1982) são consideradas atóxicas as amostras que apresentam $DL_{50} > 1000 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e tóxicas as que apresentam $DL_{50} < 1000 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Assim, os extratos das cascas de *P. emarginatus* Vogel e das cascas e folhas da espécie *B. virgilioides* Kunth podem ser consideradas atóxicas frente às larvas de *Artemia salina* Leach.

Os resultados coincidem com testes realizados em camundongos, utilizando as cascas do caule de *P. emarginatus* Vogel, que indicam que o extrato aquoso apresenta uma

toxicidade muito baixa, sendo que nenhuma morte ou outros sinais de toxicidade puderam ser detectados (MORAES, 2008).

Dos quatro extratos analisados, apenas um apresentou resultados significativos, com $DL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação da toxicidade em *A. salina* Leach (DL_{50}) do extrato obtido das folhas de *P. emarginatus* Vogel, com intervalo de confiança de 95%.

| Amostra | DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Intervalo de confiança 95% | |
|---------|--------------------------------|----------------------------|-----------------|
| | | Limite inferior | Limite superior |
| PEFE | 120,8 | 85,0 | 165,8 |

P = *Pterodon*; E = *emarginatus*; F = folha; E = etanol

No trabalho realizado por Santos (2008), a toxicidade dos extratos brutos das folhas da espécie *P. emarginatus* Vogel foi observada em camundongos via intra-gástrica, e não provocou morte e/ou lesões, demonstrando baixa toxicidade, fato relacionado à ingestão do extrato aquoso por humanos. Porém, mortes em bovino e ovinos foram relatadas após a ingestão das folhas dessa espécie que passou a ser considerada hepatóxica (CRUZ et al., 2003).

5.3. Identificação da presença de metabólitos secundários

A triagem fitoquímica possibilitou a identificação da presença de metabólitos secundários. Testes foram realizados com os extratos brutos das cascas (PECE, BVCE) e folhas (PEFE, BVFE) de *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth para identificar diferentes compostos orgânicos e os resultados são apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Classe de metabólitos secundários, evidencias experimentais e resultados dos testes fitoquímicos dos extratos brutos das espécies *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth.

| Classes de metabólitos secundários | Reação Positiva | Resultados | | | |
|------------------------------------|---|------------|------|------|------|
| | | PECE | BVCE | PEFE | BVFE |
| Saponina espumídica | Formação de camada de espuma estável por 30 | - | + | - | - |

| | minutos | | | | |
|---------------------------------|---|---|---|---|---|
| Ácidos orgânicos | Descoloração do reativo | - | - | - | - |
| Açúcares redutores | Formação de precipitado vermelho tijolo | + | + | - | - |
| Polissacarídeos | Coloração azul | - | - | - | - |
| Fenóis | Coloração inicial entre o azul e vermelho, frente ao teste em branco (água + solução de cloreto de ferro III) | + | - | + | + |
| Taninos | Coloração verde frente ao teste em branco (água + solução de cloreto de ferro III) | - | - | - | + |
| Esteroides | Coloração vermelho intenso | - | + | - | - |
| Flavonoides | Coloração rósea | - | - | - | - |
| Antocianinas e antocianidinas | Coloração vermelha (pH 3), lilás (pH 8.5) e azul púrpura (pH 11). | - | - | - | - |
| Flavonas, flavonóis e xantonas | Coloração amarela (pH 11) | - | - | - | - |
| Chalconas e auronas | Coloração vermelha (pH 3) e vermelho-purpura (pH 11) | - | - | - | - |
| Flavanonóis | Coloração vermelho-laranja (pH 11) | + | - | - | - |
| Leucoantocianidinas | Coloração vermelha quando acidificado e aquecido. | - | - | - | - |
| Catequinas (Taninos catéquicos) | Coloração pardo-amarela quando acidificado (pH 1 | - | - | - | + |

| | | | | | |
|---|--|---|---|---|---|
| | - 3) e aquecido | | | | |
| Flavanonas | Coloração vermelho-alaranjado quando alcalinizado e aquecido | - | - | - | + |
| Flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas | Aparecimento ou intensificação de coloração vermelha. | - | - | - | - |
| Alcaloides | Precipitado vermelho tijolo frente ao reativo de Dragendorf | + | - | - | - |
| Esteroides e triterpenoides | Sucessão de cores, de azul evanescente a verde persistente | - | - | + | + |
| Depsídeos e depsidonas | Coloração verde, azul ou cinza | - | + | + | + |
| Catequinas | Coloração vermelho intenso | - | + | - | - |
| Derivados da cumarina | Fluorescência azul na parte exposta da mancha | - | - | - | - |
| Antraquinonas | Coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa. | - | + | - | - |

P = *Pterodon*; E = *emarginatus*; B = *Boudichia*; V = *virgilioides*; C = casca; F = folha; E = etanol
(+) Presença do metabólito; (-) Ausência do metabólito

Os testes realizados nos extratos brutos para a identificação de saponina espumídica apresentou resultado positivo somente para a amostra do extrato da casca da espécie *B. virgilioides* Kunth na qual foi possível observar a formação de uma camada de espuma que teve duração de um período superior a trinta minutos.

As duas espécies apresentaram resultados negativos quanto à presença de ácidos orgânicos. A formação de precipitado com coloração vermelho tijolo indicou resultados positivos para açúcares redutores nos extratos da casca do caule tanto de *P. emarginatus* Vogel quanto de *B. virgilioides* Kunth. Essas substâncias fazem parte do grupo dos carboidratos. No extrato da casca do caule de *P. emarginatus* Vogel houve o surgimento de

precipitado com coloração vermelho tijolo que indicou resultados positivos para alcaloides frente ao reativo de Dragendorff.

Os testes para fenóis e taninos apresentaram resultados positivos para taninos catéquicos no extrato das folhas de *B. virgilioides* Kunth, pois adquiriu coloração verde que variou da coloração verde inicial. Os extratos da casca do caule e extrato das folhas apresentaram resultados positivos para fenóis, pois, frente ao teste em branco (água + solução de cloreto de ferro III) pode ser observado a coloração inicial entre o azul e o vermelho para a espécie *P. emarginatus* Vogel. O extrato das cascas do caule da espécie *B. virgilioides* Kunth apresentara resultados positivos para esteróis.

Os compostos flavonólicos são suscetíveis a alteração do pH, pois o mesmo atribui disposição diferente nas estruturas destes compostos (SILVAL et al., 2013). Ademais, a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa da presença de outro (OLORIS et al., 2014). Foi possível observar a presença de flavanonóis no extrato das cascas de *P. emarginatus* Vogel ao alcalinizar a solução a pH 11. Os demais extratos apresentaram resultados negativos.

Em outro teste, os extratos brutos alcalinizados a pH11 apresentaram resultado positivo para flavanonas no extrato das folhas de *B. virgilioides* Kunth. Entre os que foram acidulados a pH1 foi possível identificar a presença de catequinas (Taninos catéquicos) também no extrato das folhas de *B. virgilioides* Kunth.

No teste realizado houve o surgimento de uma coloração vermelho intenso indicando a presença de catequinas no extrato das cascas da espécie *B. virgilioides* Kunth. Esteroides e triterpenoides para as folhas das espécies *B. virgilioides* Kunth e *P. emarginatus* Vogel, ambos apresentaram coloração que variou do azul evanescente ao verde persistente, apresentaram também a formação de coágulos e precipitado, respectivamente.

Os testes fitoquímicos permitiram a identificação do composto fenólico antraquinona nos extratos da casca da espécie *B. virgilioides* Kunth. Assim como a presença de depsídeos e depsidonas, que puderam ser observados por meio da manifestação da coloração verde e ainda a presença de precipitado para as folhas das duas espécies, o extrato das cascas da espécie *B. virgilioides* Kunth apresentou coloração cinza.

No estudo fitoquímico realizado com os extratos obtidos das cascas do caule de *P. emarginatus* Vogel foi observado a presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, alcaloides. Em estudos anteriores foi detectada a presença de flavonoides, heterosídeos saponínicos, resinas e traços de esteroides e triterpenoides (BUSTAMANTE et al, 2010),

além de diterpenos (FASCIO et al. 1975, ARRIAGA et al., 2000), alcaloide (TORRENEGRA et al., 1989).

A caracterização fitoquímica do extrato das folhas de *P. emarginatus* Vogel realizada por Cavalcante e colaboradores (2014) demonstrou a presença de fenóis, taninos flobafênicos, flavonas, flavonóis, flavononois, xantonas e saponinas (CAVALCANTE, et al, 2014). Foi isolada em um outro estudo uma mistura de fitoesteróides β -sitosterol e estigmasterol de ampla ocorrência nos vegetais (SANTOS et al., 2010). Nos testes realizados foi possível observar a ocorrência de fenóis, taninos, depsídeos, depsidonas, esteroides e triterpenoides. Não houve a constatação de saponinas e dos compostos flavonílicos.

A avaliação do extrato da casca do caule de *B. virgilioides* Kunth apresentou resultados positivos para catequinas, açúcares redutores, antraquinonas, esteróis e saponinas. De acordo com Leite e colaboradores (2014), esta espécie possui esteroides, triterpenoides, flavonoides e alcaloides em grandes quantidades.

Há registros da presença dos metabólitos secundários flavonoides (VELOZO, 1999), esteroides, triterpenoides, alcaloides em pequena quantidade (SILVA et al., 2010) nas folhas da espécie *B. virgilioides* Kunth. Os testes realizados apresentaram resultados positivos para catequinas, esteroides, triterpenoides, flavanonas, depsídeos e depsidonas.

Os princípios ativos resultantes do metabolismo secundário estão distribuídos por toda a planta, porém, variam em quantidade e localização nas diferentes partes do vegetal. As três principais classes são: alcaloides, compostos fenólicos e terpenos (DELBONE E LANDO, 2010). Contudo, os extratos das partes estudadas da espécie *P. emarginatus* Vogel apresentou em comum para os extratos das cascas do caule e folhas foram somente os metabólitos secundários fenóis e taninos e demonstrou divergência nos demais metabólitos encontrados. Já na espécie *B. virgilioides* Kunth os princípios ativos encontrados em comum nos extratos das cascas do caule e folhas foram: fenóis e taninos, catequinas, depsídeos e depsidonas.

Os resultados obtidos demonstram que as duas espécies possuem em comum os metabólitos secundários açúcares redutores nas cascas, esteroides, triterpenoides, depsídeos e depsidonas nas folhas. Todavia divergem na ocorrência das saponinas, flavanonas, fenóis, taninos e esteróis. Assim, pode-se observar que *P. emarginatus* Vogel e *B. virgilioides* Kunth possuem semelhança morfológica e divergência quanto a sua composição química.

A ocorrência dos metabólitos secundários são influenciados diretamente por fatores que interferem nos níveis totais ou parciais de suas substâncias. Podem apresentar pequenas ou maiores concentrações do princípio ativo nas diferentes estações do ano. A época

em que a coleta é realizada é um fator relevante devido a alterações na natureza e quantidade dos constituintes ativos durante o ano. Entre esses fatores estão: índice pluviométrico, disponibilidade de micronutrientes e macronutrientes presentes no solo, temperatura, sazonalidade, altitude, radiação ultravioleta, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO E LOPES, 2007). Desta forma, infere-se que os princípios ativos encontrados em estudos anteriores que não foram identificados nessa pesquisa podem estar relacionados a esses fatores.

Os metabólitos secundários possuem uma vasta importância farmacológica. Os terpenos apresentam ação antimicrobiana contra várias bactérias, tais como: *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e menor atividade contra *Candida albicans*, dependendo do terpeno. Assim estes compostos podem estar envolvidos, isoladamente ou em associação, na atividade antimicrobiana (BUSTAMANTE, 2010). Os triterpenoides identificados nas folhas das duas espécies e alcaloides presente na casca de *P. emarginatus* Vogel pode justificar o uso das mesmas como analgésica, anti-inflamatória. Os fenóis possuem também atividades antioxidantes.

As saponinas encontradas no extrato de *B. virgilioides* Kunth apresentam atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (SIMÕES et al., 2004). Vieira et al, (2014), sugere um efeito ansiolítico ao uso do extrato aquoso das cascas de *B. virgilioides* Kunth mediados por uma ação sinérgica das saponinas, alcaloides e flavonoides. No entanto, não houve a constatação da presença de alcaloides e flavonoides nos extratos das cascas dessa espécie. O extrato aquoso mostrou atividade antinociceptivas, anti-inflamatórias, antialérgicas e imunomoduladora (SILVA, 2009), além de auxiliar na diminuição da glicemia em ratos adultos.

6. CONCLUSÕES

O extrato obtido das cascas do caule da espécie *P. emarginatus* Vogel se mostrou ativo frente ao microcrustáceo *A. salina* Leach já que apresentaram $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (120,7643). Sendo assim, é possível inferir que a mesma possui atividades biológicas, sendo portanto necessário a realização de estudos mais aprofundados.

Os extratos da casca do caule da espécie *P. emarginatus* Vogel e da casca do caule e folhas de *B. virgilioides* Kunth não apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* Leach, pois de acordo com a classificação de Meyer e seus colaboradores (1982) amostras com valores de DL_{50} acima de $1000 \mu\text{g/mL}$ são considerados atóxicas.

Os metabólitos secundários identificados no extrato das cascas da espécie *P. emarginatus* Vogel foram fenóis e taninos, açúcares redutores, alcaloides, depsídeos e depsidonas. Nos extratos das folhas da espécie *P. emarginatus* Vogel foi possível identificar a presença de esteroides e triterpenoides, fenóis e taninos, depsídeos e depsidonas.

Foram identificados no extrato das cascas do caule da espécie *B. virgilioides* Kunth a presença de saponina, açúcares redutores, antraquinonas, catequinas e esteróis. Os extratos das folhas de *B. virgilioides* Kunth apontaram resultados positivos para depsídeos e depsidonas, flavanonas, catequinas, esteroides e triterpenoides.

Os metabólitos secundários encontrados nas duas espécies foram identificados pela formação de precipitado, formação de espuma e mudança na coloração. Entretanto a cor indicativa de um metabólito pode mascarar a presença de outro.

As análises fitoquímicas apresentam dados importantes quanto a identificação dos metabólitos secundários presentes nos vegetais. Entretanto para respaldar o uso popular torna-se necessário um aprofundamento em relação as propriedades fitoterápicas dos mesmos.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.E.L.; GOTTLIEB, O.R. **The chemistry of Brazilian Leguminosae, further isoflavones from *Pterodon appariciolli***. Phytochemistry, v. 14, n. 12, 1975.

ALVES, H.M. **A diversidade química das plantas como fonte de fitoterápicos**. Caderno Temático de Química Nova na Escola. n° 3. 2005.

AMARAL, E.A.; SILVA, M.R.G.; **Avaliação da Toxicidade Aguda de Angico (*Anadenanthera Falcata*), Pau-Santo (*Kilmeyera Coreacea*), Aroeira (*Myracrodruon Urundeuva*) e Cipó-de-São-João (*Pyrostegia Venusta*), Por Meio do Bioensaio com *Artemia Salina***. Perquirêre- Revista Eletrônica da Pesquisa – ISSN 1806-6399 - (UNIPAM). 2008.

ARRIAGA, A.M.C.; CASTRO, M.A.B.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. **J. Braz Chem Soc**, v. 11, p. 187-190, 2000.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.62, 55-61, 2003.

BALDIN, T.; MARCHIOR, J.N.C. **Anatomia da madeira de *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W. Grimes (Fabaceae)**. Revista do núcleo dos estudo botânicos. N.46. 2014.

BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, J.R.G.S.; COSTA, V.C.O.; DA-CUNHA, E.V. L.; SILVA, M.S.; BRAZ-FILHO, R.; Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **J. Asian Nat Prod**. Res 6: 11 - 17. 2004.

_____.; MEDEIROS, C.P.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. **Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase**. Rev Bras Farmacogn 16: 258 - 285. 2006.

_____.; VASCONCELOS, T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev Bras Farmacogn** 15: 392 - 413. 2005.

BARBOSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. SOUSA, I. **Teste de toxicidade do ião cobre para *Artemia salina***. Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e de Ambiente. 2003.

BARBOSA, W.L.R. et al. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais**. Revista científica da UFPA, v. 4, 2001. Disponível <<http://www.ufpa.br/rcientifica>> acesso em 02 mai 2016.

BARREIRO, E.J.; MANSSOUR, C.A.M. **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos.** Art Med. Editora Ltda. Porto Alegre, 161-178. (2008).

BARREIRO, J.E.; BOLZANI, V.S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** Quimica Nova. Vol. 32, No. 3, 679-688, 2009.

BARROS, D.A. **Análise da composição química do óleo essencial dos frutos de *pterodon emarginatus vogel.* (fabaceae) obtido por hidrodestilação assistida por irradiação de micro-ondas.** 2014. 93 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás. Anápolis-GO. 2014.

BATISTA, A.B.; VASCONCELOS, I.M. **Potentials insecticidal and fungicidal of seeds of *Dioclea megacarpa Rolfe.*** Repositório institucional UFC. Disponível em <http://www.repositório.ufc.br/handle/riufc/4056> acesso em 25 agosto de 2015. 14:00 hs.

BIANCHI, M.L.; ANTUNES, L.M.G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Revista de Nutrição. v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BORBA, A.M.; MACEDO, M. **Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil.** Acta bot. bras. 20(4): 771-782. 2006.

BOTINI, N.; ANTONIAZZI, C.A.; SOUZA, K.A.; AÑEZ, R.B.; **Estudo etnobotânico das espécies *Bowdichia virgilioides* e *Pterodon pubescens* na comunidade salobra grande município de porto estrela, MT.** Biodiversidade - V.14, N2, 2015 - pág. 19.

BRAGA R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** Coleção Mossoroense, 1953.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. **Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian. Official Pharmacopoeia.** Rev Bras Farmacogn 16: 408 - 420. 2006.

BRAZ, F.R.; GOTTLIEB, O.R. **Chemistry of Brazilian Leguminosae. XXXIV Isoflavones of *Pterodon pubescens.*** Phytochemistry 10: 2835-283. 1971.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. **Forty yeras of Brazilian medicinal plant research.** Journal of Ethnopharmacology. 39: 53-67. 1993.

BURMAN, A.; 1991. **Saving Brazil's savannas.** New Scientist 1758: 30-34.

BUSTAMANTE, K.G.L.; LIMA, A.D.F.; SOARES, M.L.; FIUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; BARA, M.T.F.; PIMENTA, F.C.; PAULA, J.R. **Avaliação da atividade microbriana do extrato etanólico bruto da casca de sucupira branca (*Pterodon emarginatus Vogel*) - Fabaceae.** Revista Brasileira de Plantas Medicinai, v. 12, n. 3, p. 341-345, 2010.

CALIXTO JB, SANTOS AR, CECHINEL-FILHO V, YUNES RA. **A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential.** Med Res Rev. 18: 225-258, 1998

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** 1^oed. Tecmedd. 2004.

CASTELLANI, D. C. **Crescimento, anatomia e produção de ácido erúico em *Tropaeolum majus* L.** 1997. 108 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

CAVALCANTE, G.S.; ALVES, D.f.; SILVA, A.A.S.; MARTINS, C.G; NOBRE, S.M.T.; ALVES, D.R.; MORAIS, S.M. **Prospecção fitoquímica e avaliação de atividades biológicas das folhas de sucupira branca - *Pterodon emarginatus* vogel (Fabaceae).** In: 54^o Congresso Brasileiro de química. Natal- RN. CBQ. 2014.

CORBY, H.D.L. **The systematic value of leguminous root nodules.** In: **Advances in Legume Systematics. Part 2.** POHLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. (Ed.) **Proceedings of the International Legume Conference.** Royal Botanical Gardens, London, 1981, p.657-670.

CRUZ, R.A.S.; OLIVEIRA, L.P.; FLAVIO, H.B. CALDEIRA, F.H.; MENDONCA, F. S.; BACHA, F.B.; POTT, A.; LEMOS, R.A.A.; COLODEL, E.M. **Intoxicação espontânea e experimental por *Pterodon emarginatus* (Fabaceae Faboideae) em bovinos e experimental em ovinos.** Pesq. Vet. Bras. 32(11):1087-1094, 2012.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia.** 2003. Disponível em http://www.ppmac.org/sites/default/files/aspectos_historicos.pdf. Acesso em 22 de Dezembro de 2015 as 14:00 hs.

CUNHA, E.V.L.; BARBOSA FILHO, J.M. **Alcalóides derivados do núcleo isoquinolinico.** In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia.** 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. p.281 - 319.

DEHARO, E. BOURDY, G.; QUENEVO, C. MUNOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M.; A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **J. Ethnopharmacol** 77: 91 - 98. 2001.

DELBONE, C.A.C.; **Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais.** X Congresso de Educação do Norte Pioneiro Novos direitos, Novas Práticas Sociais e a Educação. UENP. Campus Jacarezinho. Anais – 2010. ISSN – 1808-3579.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar.** São Paulo. SP: 1996. Pp. 9-86.

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. **Phytoalexins: enzymology and molecular biology.** Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol55: 1-69. 1983.

FASCIO, M.; MORS, W.B.; GILBERT, B.; MAHAJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B.; SANTOS, F.D.; WICHNEWSKY, W. **Diterpenoids furans from *Pterodon pubescens* species.** *Phytochemistry* 15: 201 – 203. 1976.

FERREIRA, S.B.; DANTAS, I.C.; CATÃO, R.M.R. **Evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil of *sucupira (Pterodon emarginatus)*.** Rev. bras. plantas med. vol.16 no.2 Botucatu abr./jun. 2014.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V..M.; PASSOS, C.E.C.?’; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G. **Historical context, popular use and scientific conception on medicinal plants.** Cad. Pesq., São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FORBES, V.E.; FORBES, T.L. **Ecotoxicology in theory and practice.** Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p.

FRANCO, E.A.P.; BARROS, R.F.M.; **Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D’água dos Pires, Esperantina, Piauí.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.3, p.78-88, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Química Nova*, v. 30, nº 2, p. 374-381, 2007.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R. J. **Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach.** *Phytochemistry*, 1993.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**– Série de textos da escola de verão em química, São carlos: EDUFSCAR, vol. 6, 152 p, 2003.

IBGE 2010. Mapa de biomas brasileiros. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm#MAPAS> Acesso em 03 Ago 2016.

IGNOATO, M. C. **Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico – Paraná.** 2012. 209 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2012.

JARDINE, J. G.; BARROS, T. D. **Árvore do conhecimento, agroenergia. Soja.**

EMBRAPA.2015.<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fb123vmz02wx5eo0sawqe3vtdl7vi.html>. Acesso em 25 de agosto de 2015.

LEITE, L.H.; TINTINO, S.R.; FIGUEREDO, F.G.; OLIVEIRA, C.D.M.; OLIVEIRA, L.; SIEBRA, A.L.A.; SAMPAIO, R.S.; BOLIGON, A.A.; SOUZA, D.O.; ATHAYDE, M.L.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R. **Study on the chemical composition and antibacterial activity of *Bowdichia virgilioides* kunth (Sucupira) - Fabaceae – Papilionoidae.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 13 (5): 477 - 487 ISSN 0717 7917. 2014.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** 2ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, vol. 1, p. 227, 2010.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. Rev. Bras. Farmacogn., v. 14, supl. 01, p. 45-47, 2004.

MACHADO, H.; **Farmacologia Molecular.** Ciências da Saúde. 2013.

MARINHO, L.C.; CUNHA, M.T.M.C.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Constituents of *Bowdichia virgilioides*.** Fitoterapia 65: 475. 1994.

MARQUES, D.D.; MACHADO, M.I.L; CARVALHO, M.G.; MELEIRA, L.A.C.; BRAZ-FILHO, F. **Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*.** J Braz Chem Soc 9: 205 – 301. 1998.

MARQUEZ, M C.S.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, F.R.; TIEPPO, C.; GARCEZ, W.S. **In vitro biological screening and evaluation of free radical scavenging activities of medicinal plants from the Brazilian Cerrado.** Journal of medicinal plants research. 2013.

MATSUNO, Y.; DEGUCHI, J.; HOSOYA, T.; HIRASAWA, Y.; HIROBE, C.; SHIRO, M.; MORITA, H. **Sucutiniranes C-F, Cassane-Type Diterpenes from *Bowdichia nítida*.** J Nat Prod. 10: xx-xx, 2009.

MELO, N.; NAVARRO, V.R; SILVA, M.S; CUNHA, E.V.L.; BARBOSA-FILHO, J. M; BRAZ-FILHO, R.. **Bowdenol, a 2, 3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*.** Nat Prod Lett 15: 261 - 266. 2001.

MEYER, J.Y. **Observations on the reproductive biology of *Miconia calvescens* DC (Melastomataceae), an alien invasive tree on the Island of Tahiti (South Pacific Ocean).** Biotropica, 30: 609-624, 1998.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Proposta de Política Nacional de Plantas Mediciniais e Medicamentos Fitoterápicos.** 2009.

MORAES, W.F.; **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato etanólico, frações e substância isolada da casca do caule de *Pterodon emarginatus* VOG. (Sucupira).** 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em farmácia). Universidade Federal de Goiás. 2007.

OLORIS, S.C.S.; ALVES, M.S.D.; MARINHO, M.J.M.; MEDEIROS, M.L.S. **ANÁLISE CITOTÓXICA E FITOQUÍMICA DE *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith.** Revista saúde e ciência *On line*, 2014; 3(3):53-63, set-dez, 2014.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G; MURCIA, M.A.; JIMÉNEZ, A.M.; CODINA, C. **Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity.** Life Science, v.73, p.1667-1681, 2003.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G.; **Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits.** Journal of Biotechnology and Biodiversity. Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, November. 2012. ISSN: 2179-4804.

PEREIRA, P.S.; DRUMOND, M.A.; BARROS, L.M.; MAIA, A.J. **O estudo etnobotânico de *Pterodon emarginatus* Vogel na área rural do município de Jardim – CE.** VIII Simpósio Brasileiro de Pós Graduação em Ciências Florestais: Paradigmas na formação de Recursos Humanos em Ciências Florestais. Recife –Pernambuco. 2014.

PIZZOLOTTO, G. **Avaliação da atividade tóxica e antimicrobiana in vitro dos extratos metanólicos de *calendula officinalis* L. (asteraceae) visitadas e protegidas de insetos.** 2010. 52 f. Dissertação (mestrado em Farmácia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2010.

RATES, S.M.K. **Plants as source of drugs.** Official Journal of the International Society on Toxinology, Amsterdam, v.39, p.603-613, 2001.

RODRIGUES, M.O.; ALVES P.B.; NOGUEIRA, P.C.L.; MACHADO, S.M.F.; MORAES, V.R.S.; RIBEIRO, A.S.; FEITOSA, J.G.R.; **Os constituintes voláteis e atividade antibacteriana de sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunt.** J. Essent. Res Oil. 21 (3): 286-288. 2009.

SANTOS, A. P. **Estudo farmacognóstico, avaliação da atividade antioxidante e da toxicidade aguda dos extratos etanólicos brutos das cascas do caule e folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae).** 2008. 146 f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás. 2008.

_____.; BOZINES, M.C.V.; MENDES, P.L.; LIMA, E.M.; PAULA, J.R.O.; **Avaliação Comparativa do Efeito Citotóxico de Lupeol e Lipossomas Contendo Lupeol em Células K-562 e Curva de Sobrevida.** VIII Seminário de Pós-Graduação da UFG - DOUTORADO. 2011.

SANTOS, A.P.; ZATTA, D.T.; MORAES, W.F.; BARA, M.T.F.; FERRI, H.F.; SILVA, M.R.R.; PAULA, J.R. **Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteroides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae.** Brazilian Journal of Pharmacognosy. Braz. J. Pharmacogn. ISSN 0102-695X. 2010.

SANTOS, U.; RAMOS, C. O.; SANCHES, N. M.; SOUSA, F. F. Propriedade antibacteriana dos frutos de Sucupira branca (*Pterodon pubescens*). Revista Eletrônica de Biologia, v. 3, n. 4, 2010b.

SILVA, B.A.; FERRERA, S.F.; MALVA, J.O.; DIAS, A.C.P. **Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts.** Food Chemistry, v.90, n.1-2, p.157-167, 2005.

SILVA, I.D.; TAKATSUKA, F.S.ROCHA, M.R. e CUNHA, M.G.; **Efeito do extrato de sucupira (*pterodon emarginatus* vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos.** Pesquisa Agropecuária Tropical, 35 (2): 109-115, 2005 – 109. 2005.

SILVA, J. P.; **Avaliação da atividade antinoceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* Kunth.** 2009. xiv, 64 f. : il. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.

SILVA, L.E.; ELIAS, L.C.P.; JUNIOR, P.T.S.; DALL’OGLIO, E.L.; STEINDEL, M.; RIBEIRO, T.A.N.; PACHECO, L.K.; NUNES, R.K. **Avaliação da Atividade Tripanocida e Leishmanicida da *Bowdichia virgilioides*.** Química Nova, 2005, 28, 224.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.; CONCEICAO, G.M. **Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão.** SCIENTIA PLENA VOL. 6, NUM. 2 2010.

SILVA, R.L.; SOUZA, L.A.G.; **Levantamento de fabaceae com potencial forrageiro encontrada no município de Codajás.** In: 63ª Reunião Anual da SBPC. Cerrado: água, alimentação e energia. UFG. Goiânia – Goiás. 2011.

SILVAL, R.C.; FERNANDES, P.R.D.; MORAES, A.R.; AYL M.C. BIZERRA, A.M.C. **Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Aspidosperma pyrifolium* (pereiro).** In: PROPI – IN: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação, IX Congresso de Iniciação Científica do IFRN. 2013.

SOUZA, E.M.; CHAVES, L.M; MUNIZ, J.A.; **Avaliação dos métodos: Probit, Probit Isotonizado E Up And Down em dados de sensibilidade.** Disponível em: <<http://www.ime.unicamp.br/sinape/sites/default/files/Lucas%20Monteiro.pdf>>, Acesso em: 03 de Julho de 2016 às 20:13.

SOUZA, G.A.L.; **Levantamento da habilidade nodulífera e fixação simbiótica de N₂ nas Fabaceae da região Amazônica.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.10, 2010. 1p.

THOMAZZI, S.M.; SILVA, C.B.; SILVEIRA, D.C.R.; VASCONCELLOS, C.L.C.; LIRA, A.F.; CAMBUI, E.V.F.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **J Ethnopharmacol** 127: 451-456. 2010.

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

VELOZO, L.S.M.; SILVA, B.P.; BERNARDO, R.R.; PARENTE, J.P.; **Odoratin-7-O- β -D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*.** *Phytochemistry*. 52: 1473 - 1477. 1999a.

VELOZO, L.S.M.; SILVA, B.P.; SILVA, B.E.M.; PARENTE, J.P. **Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*.** *Fitoterapia* 70: 532-535. 1999b.

VEIGA, L.F. VITAL, N. **Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp.** In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), *Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil.* Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122. 2002.

APÊNDICE 1. PREPARAÇÃO DOS REATIVOS

Reativo de BOUCHARDAT: dissolveu-se 2 g de iodeto de potássio e 1 g de iodo ressublimado em 50 mL de água destilada.

Reativo de DRAGENDORFF:

Solução A: dissolveu-se 8 g de subnitrato de bismuto ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 20 mL de ácido acético.

Solução B: dissolveu-se 27,2 g de iodeto de potássio (KI) em 50 mL de água destilada. Adicionou-se aos poucos a solução A sobre a solução B.

Reativo de MAYER:

Solução A: dissolveu-se 1,36 g de cloreto mercúrico (HgCl_2) em 60 mL de água destilada.

Solução B: dissolveu-se 5 g de iodeto de potássio (KI) em 20 mL de água destilada.

As soluções A e B foram misturadas e diluídas para 100mL de solução.

Reativo de PASCOVÁ:

Solução A: dissolveu-se em 100 mL de etanol 0,075 g de verde de bromocresol e 0,25 g de azul de bromofenol.

Solução B: dissolveu-se em 100 mL de água destilada, 0,25 g permanganato de potássio (KMnO_4) e 0,25 g de carbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Misturou-se 9 partes de A para 1 parte de B, no momento de usar.

Reativo de FEHLING:

Solução A: dissolveu-se 6,93 g de sulfato de cobre (CuSO_4) em água destilada e completar o volume para 100 mL.

Solução B: dissolveu-se 34,6 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 25g de hidróxido de potássio (KOH) em água destilada e diluiu para 100 mL. Utilizou-se na proporção de 2 mL de A, para 2 mL de B.

LUGOL:

Dissolveu-se 10 g de iodeto de potássio (KI) e 5 g de iodo em 50 mL de água destilada e completou-se o volume para 100 mL.

Papel reativo de picrato de sódio:

Dissolveu-se 1g de ácido pícrico ($C_6H_3N_3O_3$) em 100 mL de água destilada. Acrescentou-se 10 g de carbonato de sódio e secou-se o papel em temperatura ambiente.

1.1 Testes

Saponina espumídica: dissolveu-se 10 mg do extrato alcoólico seco em 5 mL de água destilada. Em seguida, diluiu-se para 15 mL e agitou-se vigorosamente durante 2 min em tubo fechado.

Ácidos orgânicos

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se e em seguida, transferiu-se 2 mL para um tubo de ensaio e adicionou-se gotas do reativo de Pascová.

Açúcares redutores

Técnica 1: dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se. Adicionou-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. Aqueceu-se em banho-maria em ebulição durante 5 min.

Polissacarídios

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se e adicionou-se duas gotas de lugol.

Fenois e taninos

Dissolveu-se 10 miligramas de extrato seco em 5 mL de água destilada, filtrou-se e adicionar 2 gotas de solução alcoólica de $FeCl_3$ a 1%.

Flavonoides

Geral: dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco, em 10mL de metanol. Adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio.

Flavonoides por classes

a. Antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavanonóis, xantonas, chalconas e auronas.

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato seco, em 10 mL de metanol. Adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio.

b. Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Em dois tubos foram adicionados 3 mL da solução preparada anteriormente, acidulou-se o primeiro com solução de HCl a pH 1-3 e o outro a pH 11 com solução de NaOH. Foram aquecidos com auxílio de uma manta aquecedora durante 2 – 3 minutos, cuidadosamente. Observou-se as modificações na coloração comparando com os tubos utilizados no teste anterior.

c. Flavonóis, Flavanonas, flavanonóis e xantonas

Transferiu-se para um tubo de ensaio, 3 mL da solução extrativa usada no teste anterior e acrescentou-se alguns miligramas de magnésio em raspas, e 0,5 mL de HCl concentrado. Após o término da efervescência observou-se por comparação a mudança na coloração em relação aos tubos acidificados dos testes anteriores.

Alcaloides

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de solução de HCl a 5%. Em seguida, separou-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionou-se gotas dos reativos de Bouchardat, de Dragendorff e de Mayer.

Esteroides e triterpenoides

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 10 mL de clorofórmio. Filtrou-se sobre carvão ativado. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de anidrido acético. Agitou-se e em seguida, adicionou-se 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se novamente.

Depsídios e depsidonas

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de éter etílico. Evaporou-se todo o éter em banho-maria juntou-se ao resíduo 3mL de metanol. Agitou-se e adicionou-se 3 gotas de solução de FeCl₃ a 1%.

Catequinas

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 3 mL de metanol. Acrescentou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado.

Derivados da cumarina

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de éter etílico, concentrou-se em banho-maria até 0,5 mL. Em papel filtro, aplicou-se gotas da solução etérea, de modo a formar duas manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro cada. A uma destas, juntou-se 1 gota de solução de NaOH a 1M. Cobriu-se a metade da mancha com papel escuro e expôs-se a outra metade a luz ultravioleta. Descobriu-se e comparou-se.

Antraquinonas

Dissolveu-se 10 miligramas do extrato seco em 5 mL de tolueno. Adicionou-se 2 mL de solução de NH_4OH a 10%, agitou-se suavemente.