

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

Prospecção fitoquímica e atividades biológicas de extratos das folhas
da *Spiranthera odoratissima* A. St. -Hill (Rutaceae)

Autora: Amanda de Oliveira Souza
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira

Rio verde - GO
Fevereiro – 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

Prospecção fitoquímica e atividades biológicas de extratos das folhas
da *Spiranthera odoratissima* A. St. -Hill (Rutaceae)

Autora: Amanda de Oliveira Souza
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio
Pereira

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

Rio Verde - GO
Fevereiro – 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

S729p Souza, Amanda de Oliveira
PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS
DE EXTRATOS DAS POLHAS DE *Spiranthera odoratissima*
A. ST. - HILL (RUTACEAE) / Amanda de Oliveira
Souza; orientador Paulo Sérgio Pereira ; co-
orientadora Cassia Cristina Fernandes. -- Rio Verde,
2020.
52 p.

Dissertação (em Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2020.

1. planta medicinal. 2. *Spiranthera odoratissima*.
3. fitoquímica. 4. atividades biológicas. I. Sérgio
Pereira , Paulo , orient. II. Cristina Fernandes,
Cassia, co-orient. III. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

Tese
 Dissertação
 Monografia – Especialização
 TCC - Graduação
 Produto Técnico e Educacional - Tipo:

Artigo Científico
 Capítulo de Livro
 Livro
 Trabalho Apresentado em Evento

Nome Completo do Autor: **Amanda de Oliveira Souza**

Matrícula: **20181033103I0027**

Título do Trabalho: **PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Spiranthera odoratissima* A. ST. – HILL (RUTACEAE)**

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 05/05/2020

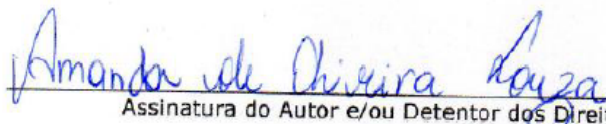
O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não
 O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 27/04/2020.
Local Data



Ciente e de acordo:

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais



Assinatura do (a) orientador(a)

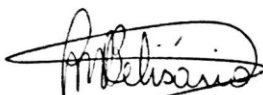
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Spiranthera
odoratissima* A. ST.- HILL (RUTACEAE)**

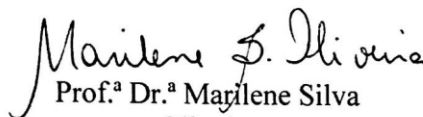
Autora: Amanda de Oliveira Souza
Orientador: Paulo Sérgio Pereira

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2020.



Prof. Dr. Celso Martins Belisário
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde



Prof.^a Dr.^a Marilene Silva
Oliveira
Avaliadora externa
IF Goiano / Rio Verde



Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus entes queridos:

Dedico este trabalho a minha madrinha, Maria Estevam, que mesmo não estando nesse plano espiritual e sim, no outro, me guiou e me confortou. A senhora com o seu magistério profissional, me promoveu todos os sonhos de seguir seus passos, e assim, na história repentina da vida, Deus, trajou situações diferentes, mas com sua postura e ensinamentos, consegui, mesmo diante das dificuldades encontradas, concluir essa etapa.

Ao meu eterno amor, Vitor Marques, que além de um primo, um irmão, um companheiro de vida, onde sempre me fortaleceu e me apoiou nos meus sonhos.

Ao, Rogério Estevam, que ao longo desses dez anos sem tê-lo ao meu lado, me confortou e me conduziu nesta longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele eu nada seria.

À minha mãe, Gleisa Andreia Estevam de Oliveira Souza, e ao meu pai Sandro César Souza, por me apoiarem nessa longa jornada, me fortalecendo, sendo minha fortaleza e sempre me apoiando nos meus sonhos. Aos meus irmãos, Lorena de Oliveira Souza e Sandro Cezar de Souza Filho, por serem à base da minha vida e por nunca desistirem de mim. Aos meus amigos Cássio Tomé de Lima Guedes e Gioavanna Vitor Mafei de Paula Nazaré, por me acompanharem nesses longos dois anos de estudos e sempre fazendo jus ao nome de família. A todos os meus familiares que se orgulham de mim e me motivaram quando necessário. Minha família, vós amos!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira, por todo conhecimento e experiências a mim ensinados. A minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Alves, por ter sido muito mais que uma profissional acadêmica, uma grande amiga, que me apoio nos meus momentos difíceis e me ofereceu todo suporte necessário para que esse meu itinerário pudesse ser concluído com tanto instrução, sabedoria, amor, respeito e dedicação. “*Nunca reclamar, sempre agradecer!*”. Ao meu coorientador externo, Prof. Dr. Mayker Lázaro Dantas Miranda, que em pouco menos de seis meses fez um excelente papel como docente, me ensinando que se vive um dia de cada vez e sempre buscando ser um ótimo profissional, fazendo-me acreditar que nunca devemos nos espelhar naqueles que não nos contribuem.

As minhas amigas: Mariana Chaves Santos e Dâmaris Hadassa Hangel Fonseca Bessa que foram muito mais que colega de mestrado e sim irmãs para vida toda. Cada uma com seu diferencial, fortalecendo e apoiando sempre que necessário umas às outras. A mim todo respeito, amor e cumplicidade pela nossa amizade. Ao meu grande amigo, irmão, e companheiro de vida Fernando Campos Pimentel, que dividiu os piores e melhores momentos comigo e sempre esteve ao meu lado.

A estas pessoas que contribuíram para meu fortalecimento profissional e pessoal, meu muito obrigada, meu respeito e a minha cumplicidade.

Além do mais, agradeço a equipe do Instituto Federal Goiano – Campos Rio Verde, a CAPES/FAPEG pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Amanda de Oliveira Souza, natural de Jussara – Goiás, filha de Gleisa Andrea Estevam de Oliveira Souza e Sandro César de Souza, nascida no dia 06 de abril de 1996.

Em 2018, ingressou no curso de graduação em Licenciatura em Química pelo Instituto Federal Goiano – Campus Iporá – Goiás, atuou como bolsista no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Docência (PIBID).

Em 2018 inicializou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação do Professor Dr. ° Paulo Sérgio Pereira, atuando na linha de pesquisa I- Agroquímica Orgânica, no estudo das atividades biológicas da espécie *Spiranthera odoratissima*, A. ST.-Hil.

Introduziu em 2019 a especialização em Fitoterapia pelo Instituto Sejam Martins.

ÍNDICE GERAL

	Página
1. INTRODUÇÃO	17
Referências bibliográficas	20
2. Objetivos.....	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos.....	23
3.CAPÍTULO I.....	24
Estudo morfológico foliar da <i>Spiranthera odoratissima</i> A. St. Hillaire (manacá)	24
Resumo	24
ABSTRACT	25
3.1 Introdução.....	26
3.2 Materiais e métodos.....	27
3.2.1 Coleta do táxon.....	27
3.2.2 Processo de diafanização.	27
3.2.3 Obtenção das imagens por scanner e fotomicrografias	28
3.3 Resultados.....	28
3.4 Discussão	29
3.5 Conclusão	30
3.6 Agradecimentos	31
3.7 Referências	31
4. CAPÍTULO II.....	34
Abordagem fitoquímica de extratos vegetais das folhas de <i>Spiranthera</i> <i>odoratissima</i> A. St. - Hil. (Rutaceae) e suas atividades antioxidantes e anti- <i>Listeria monocytogenes in vitro</i>	34
Resumo	34
Abstract.....	35
4.1 Introdução.....	36
4.2 Material e métodos	37
4.2.1 Material biológico.....	37
4.2.2 Solventes.....	38
4.2.3 Preparação dos extratos	38
4.2.4 Extração com solventes	38
4.2.5 Triagem fitoquímica	38
4.2.6 Ácidos orgânicos	39
4.2.7 Açúcares redutores	39
4.2.8 Açúcares não redutores	39
4.2.9 Alcaloides	39
4.2.10 Flavonoides	40
4.2.11 Compostos saponínicos	40
4.2.12 Compostos cumarínicos	40
4.2.13 Glicosídeos cardíacos.....	40
4.2.14 Fenólicos	41
4.2.15 Proteínas e aminoácidos	41
4.2.16 Purinas	41
4.2.17 Taninos	41

4.2.18 Polissacarídeos	41
4.2.19 Catequinas	42
4.2.20 Benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas	42
4.2.21 Flavanois, Flavanonas, Flavanonois e Xantonas.....	42
4.2.22 Antraquinonas	42
4.2.23 Sesquiterpenolactonas e outras lactonas	42
4.2.24 Atividade antioxidante	42
4.2.25 Atividade antibacteriana.....	43
4.3 Resultados e discussão.....	43
4.3.1 Triagem fitoquímica	43
4.3.2 Atividades antioxidante e anti-Listeria monocytogenes.....	46
4.4 Conclusão	48
4.5 Agradecimentos	48
4.6 Referências	48
5. Conclusão geral	53

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO

II

Página

Tabela 1. Triagem fitoquímica dos extratos das folhas de <i>S. odoratissima</i> (Rutaceae).....	34
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Página

- Figura 1-** *Spiranthera odoratissima* A. St.- Hil. (Rutaceae). Fonte: <https://www.flickrriver.com/photos/mercadanteweb/15906526012/>.....12
- Figura 2-** Flores da *Spiranthera odoratissima* A. St- Hil. (Rutaceae). Fonte: <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/15881371876>.....12

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Pranchas A e B, faces adaxial e abaxial foliar de *Spiranthera odoratissima* corada com fucsina básica fenólica.....28
- Figura 2.** Morfologia foliar de *Spiranthera odoratissima*, face abaxial. np = nervura primária, ns = nervura secundária, nsb = nervura secundária subsecundária, seta tricoma tector pluricelular com ápice afilado, círculo células modificadas do tricoma.28
- Figura 3.** Morfologia foliar de *Spiranthera odoratissima*, face abaxial. vf = veia fimbrial, mf = margem foliar, ns = nervura secundária, * tricoma tector pluricelular. Seta estômato anomocítico.29
- Figura 4.** Morfologia foliar de *Spiranthera odoratissima*, face adaxial. Prancha **A**, visão geral da epiderme apresentando células epidérmicas sinuosas. Prancha **B**, vf = veia fimbrial, mf = margem foliar e seta tricoma glandular, Prancha **C**, nt = nervura terciária seta células epidérmicas alongadas, com paredes anticlinais retas a levemente sinuosas, retas (vermelho) estruturas das nervuras terciárias individualizadas fundidas (confluente).29

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Figura 1. Folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.- Hil. (Rutaceae). Fonte: Próprio autor/2019.....30

ÍNDICE DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACIONES E UNIDADES

DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	2,2-azinobis-3-ethybenzothiazoline-6-sulfonate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
F.E.V.S	freely ending veinlets
HRV	Herbário de Rio Verde
mL	mililitros
NaOH	Hidróxido de Sódio
p/v	peso/volume
v/v	volume/volume
P. A	Para análise
MIC	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g/m ²	gramas/metro ²
g	gramas
HCl	Ácido Clorídrico
m/v	massa/volume
µL	microlitros
UV	Ultravioleta
FeCl ₃	Cloreto de ferro III
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
cm	centímetro
IC _{50%}	Concentração inibitória
CHF	Congestive eart failure
BHT	Butil-hidroxi-tolueno

RESUMO

SOUZA, A.O. **Prospecção fitoquímica e atividades biológicas de extratos vegetais das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. -Hill (Rutaceae).** Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira. Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Alves. Coorientador Externo: Prof. Dr. Mayker Lázaro Dantas Miranda.

Spiranthera odoratissima A. St. Hill. (Rutaceae), conhecida popularmente como “manacá do cerrado” é uma planta nativa do Cerrado central encontrada na forma de arbusto. Utilizada na medicina popular em forma de chá, como terapia complementar para tratamentos medicinais e fins fitoterápicos. Perante o exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar o estudo morfo-anatômico, que, permitiu verificar que a *S. odoratissima* possui hábito subarborescente apresentando entre 1,2 a 1,5 m de altura, as folhas são alternas, compostas, trifoliadas, cartáceas e concolores, além de demonstrar que o limbo foliar apresenta apenas uma nervura primária, em média de dez a quinze nervuras secundárias, unilobulada, coriácea, do tipo convexa, organização foliar do tipo simples, pecíolo com base inchada. Além do mais, o extrato aquoso, metanólico, hidroetanólico, acetato de etila e hexânico das folhas da *S. odoratissima* destacou-se pela presença dos seguintes metabólitos secundários: ácidos orgânicos, açúcares redutores e não redutores, flavonoides, compostos cardíacos, taninos, antraquinonas, sesquiterpenlactonas, flavonóis, e compostos purínicos. Para os testes de atividade antioxidante foram utilizadas as metodologias clássicas: ácidoetilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), o extrato que apresentou menor atividade foi exibida pelo extrato hexânico com $IC_{50} = 1550,80 \mu\text{g/ mL}$ por DPPH e $IC_{50} = 890,42 \mu\text{g/ mL}$ por ABTS. A maior atividade antioxidante foi atribuída ao extrato aquoso ($IC_{50} = 3,18 \mu\text{g/ mL}$ por DPPH e $IC_{50} = 23,81 \mu\text{g/ mL}$ por ABTS). Para o teste de atividades antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, os extratos mais polares apresentaram alta atividades, com a concentração inibitória mínima (MIC) variando entre 12,5 e 62,5 $\mu\text{g/ mL}$. Assim, firma-se que os dados obtidos nesta dissertação constituem informações rigorosas que enriquecem a pesquisa permitindo a utilização dos resultados em trabalhos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: planta medicinal, *Spiranthera odoratissima*, fitoquímica, atividades biológicas.

ABSTRACT

SOUZA, A.O. **Phytochemical prospecting and biological activities of *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hill (Rutaceae) leaves plants extracts.** Advisor: Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira. Co-advisor: Prof. ^a Dr.^a Cássia Cristina Alves. External Co-advisor: Prof. Dr. Mayker Lázaro Dantas Miranda.

Spiranthera odoratissima A. St. Hill. (Rutaceae), popularly known as “manacá do cerrado” is a native plant from central Cerrado found in the form of shrub. Used in popular medicine in the form of tea as a complementary therapy for medicinal treatments and herbal purposes. In view of the above, the objective of this work was to carry out the morpho-anatomical study, which allowed us to verify that *S. odoratissima* has a subshrub habit presenting between 1.2 to 1.5 m in height, the leaves are alternate, composed, trifoliated, cardiac and concolor, in addition to demonstrating that the leaf blade has only one primary vein, on average from ten to fifteen secondary veins, unilobulated, coriaceous, of the convex type, simple leaf organization, petiole with swollen base. In addition, the aqueous, methanolic, hydroethanolic extract, ethyl acetate and hexagon of *S. odoratissima* leaves stand out for the presence of the following metabolic secondary metabolites: sesquiterpenlactones, flavonols and purine compounds. For the tests of antioxidant activity, the classic methodologies were used: ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH), the extract that showed less activity was exhibited by the hexane extract with IC₅₀ = 1550.80 µg / mL by DPPH and IC₅₀ = 890.42 µg / mL by ABTS. The highest antioxidant activity was attributed to the aqueous extract (IC₅₀ = 3.18 µg / mL by DPPH and IC₅₀ = 23.81 µg / mL by ABTS). For testing antimicrobial activities against *Listeria monocytogenes*, the most polar extracts showed high activity, with the minimum inhibitory concentration (MIC) varying between 12.5 and 62.5 µg / mL. Thus, it is confirmed that the data obtained in this dissertation constitute rigorous information that enriches the research allowing the use of the results in future works.

KEYWORDS: medicinal plant, *Spiranthera odoratissima*, phytochemistry, biological activities.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, contemplando mais de 60 mil espécies, sendo um depósito de biomoléculas bioativas. Mesmo sendo favorecido por possuir uma rica diversidade, não se desenvolvem estudos científicos suficientes voltados para a área da saúde visando analisar o grau de toxicidade e as vantagens das plantas medicinais e seus efeitos fitoterápicos, fitofármacos, farmacológicos, biológicos e químicos¹.

Assim sendo, as pesquisas desenvolvidas são necessárias para acrescer a percepção científica das plantas nativas do bioma Cerrado, considerando uma vez, o seu grande potencial econômico e terapêutico².

Neste caso, é de suma relevância ressaltar que as plantas, além de serem usadas na medicina popular, são fontes enormes de obtenção de compostos bioativos cujos princípios ativos são amplamente utilizados nas indústrias de cosmética, agricultura, agropecuária e alimentícia^{3,4}.

Por ser um bioma bastante complexo pela sua biodiversidade, e as classes vegetais descobertas serem usadas para tratamento de inúmeras doenças, destaca-se no Cerrado a espécie vegetal conhecida popularmente como “manacá do cerrado” (*Spiranthera odoratissima* A. St. - Hil), utilizada para tratamentos medicinais e fins fitoterápicos^{5,6}.

Na medicina popular, com a finalidade terapêutica o “manacá do cerrado” é consumido em forma de chá, garrafadas, e/ou extratos para os tratamentos de dores de estômago, infecções nos rins, estimulante de apetite, gota, dores de cabeça, inflamações em geral, dores musculares, reumatismo, tratamento de acne, depurativo do sangue, atuando também, como ação diurética, analgésico e anti-inflamatório^{6,7}.

Além do mais, Terezan (2010)⁸ evidencia os efeitos de extratos vegetais da *S.odoratissima* em forma de ação inseticida contra formigas e ação fungicida contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. Os extratos das folhas e raízes possuem atividades inibitórias contra os parasitas *Leishmania amazonensis* e *chagasi*⁵ fungo *Cryptococcus gattii*⁵ protozoários *Plasmodium falciparum*⁵ e *Trypanosoma cruzi*⁵ e contra fungos do gênero *Candida*, *Candida krusei* e *parapsilosis*^{5,8,9,10}.

Esta espécie vegetal pertence à família Rutaceae, contendo aproximadamente 170 gêneros e 1.800 espécies, localizada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Sendo identificada por ser uma família de arbustos aromáticos e árvores^{6,11}.

A *Spiranthera Odoratissima* (figura 1) é um arbusto de aproximadamente 1,5 metros de altura, com caule ereto e os ramos que apresentam características de folhas alternadas

compostas, trifoliadas, cartáceas e concolores, já as flores são brancas (figura 2) e possuem odores perfumados ^{12,13}.



Figura 1. *Spiranthera odoratissima* A. St.- Hil. (Rutaceae). Fonte: <https://www.flickrriver.com/photos/mercadanteweb/15906526012/>



Figura 2. Flores da *Spiranthera odoratissima* A. St.- Hil. (Rutaceae). Fonte: <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/15881371876>

Estudos fitoquímicos realizados de diferentes partes da *S. odoratissima* evidenciam nas folhas as classes de compostos: taninos, fenóis, antocianinas, açúcares redutores, açúcares

não redutores, flavonoides, cumarinas, antraquinonas e triterpenos/esteróis, já em suas raízes os compostos cumarinas, saponinas, triterpenos, açúcares redutores e amido^{6,12,14}.

As pesquisas realizadas por meio de patogênia microbianas, na maioria das vezes, são executadas por meio de cepas como forma de referências. Esses microrganismos têm sido implicados como agente causador de várias doenças no mundo todo, ocasionando inúmeros surtos e sendo associados com a alta taxa de mortalidade¹⁵.

A intoxicação alimentar Listeriose, causada pela bactéria gram-positiva *Listeria monocytogenes*, decorrente do consumo de alimentos contaminados, é uma designação de uma série de desordens que provocam febre e dores musculares, às vezes, acompanhadas da presença de diarreias, fadiga, dores de cabeça, perda de equilíbrio e convulsões^{16 17 18}.

Além do mais, pode-se ocasionar meningite, septicemia nos consumidores e infecções fetais e/ou abortos em mulheres grávidas contaminadas, já em pessoas idosas pode apresentar pneumonias, doenças crônicas, doenças metabólicas e doenças renais^{19 16}.

O agente patogênico *L. monocytogenes* é um gram-positivo intracelular onipresente ocasionador de inúmeros surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, podendo sobreviver em ambientes de baixa refrigeração e até mesmo congelados^{20 16}.

Assim sendo, a bactéria é encontrada em muitas categorias de alimentos, uma vez que ocorram com maior incidência, em produtos de carnes e à base de carne, aves e frutos do mar, leite contaminado, peixes (defumados) e vegetais crus^{20 18}.

Relacionando-se o interesse pela procura de substâncias vigentes com alto potencial antioxidante, métodos que combinam alta resolução, detecção rápida e comunicação eficiente são utilizados para a avaliação da atividade antioxidante de espécies vegetais^{21 22}.

Dentre os métodos de avaliação para medição da inibição da atividade oxidativa destacam-se o método da captura do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), responsável pelo decréscimo da absorvância a 515 nm. O processo de redução do reagente (DPPH) ocasiona a mudança de coloração da mistura de roxo para amarelo^{21 22 23}.

Embora seja o método DPPH• seja eficaz não se deve embasar em apenas uma metodologia para verificação da atividade antioxidante, deste modo, o método ABTS•+(2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) é utilizado de forma secundária. Resultante da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) e tendo decréscimo na absorvância de 414 nm, este método pode ser gerado por reações enzimáticas ou químicas, e os antioxidantes capturam o cátion ABTS•+ ocorrendo a mudança da coloração verde-escuro para verde-claro^{23 24 25}.

Por ser tratar de uma pesquisa que este estudo busca acrescentar valor a espécie

vegetal que vem sendo utilizado pelo homem de forma inadequada, por meio da conversação entre o conhecimento popular e o técnico, o mesmo, tem por finalidade, disponibilizar os elementos oferecidos por este trabalho para toda a sociedade que faz uso da espécie trabalhada.

Deste modo, o trabalho exposto investigou as atividades do extrato vegetal da parte aérea, folhas, da *S.odoratissima*, planta nativa do Cerrado, além de contribuir com o estudo morfológico da arquitetura foliar da espécie, visando comparar com dados sobre a abordagem fitoquímica preliminar e suas atividades antibacteriana contra *L. monocytogenes* e antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS.

Referências bibliográficas

1. Castro MR, Figueiredo FF. Saberes tradicionais , biodiversidade , práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. Hegeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. 2019;15(31):56–70.
2. Neto LAG, Gomes FT. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população do município de Oliveira Fortes - MG. Perspectivas Online: Biológicas & Saúde. 2018, 8(27):1-17.
3. Carvalho LS, Pereira KF, Araújo EG. Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*). Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR. 2015;19(2):147–157.
4. Pinto-Zevallos DM, Zarbin PHG. A química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. Química Nova. 2013;36(10):1509–1513.
5. Albernaz LC, Paula JE, Romero GAS, Silva MDR, Grellier P, Mambu L, Espindola LS. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. Journal Ethnopharmacol. 2010;131(1):116–121.
6. Cabral FD *et al.* Chemical Constituents of Essential Oils Extracted from the Leaves and Flowers of *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil.(Rutaceae). Records of Natural Products. 2018;13(2):172-175.
7. Matos LG, Pontes IS, Tresvenzol LMF, Paula JR, Costa EA. Analgesic and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (Manacá) roots. Phytotherapy Research, 2004;18(12):963–966.
8. Terezan AP, Rossi RA, Almeida RN, Freitas TG, Fernandes JB, Silva MFGF *et al.* Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. Journal of the Brazilian

- Chemical Society. 2010;21(5):882–886
9. Cornelio VE, Maluf FV, Fernandes JB, Silva MF, Olivia G, Guido RV, Vierira PC. Isolation of Tiliroside from *Spiranthera odoratissima* as Inhibitor of *Trypanosoma cruzi* Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase by Using Bioactivity-Guided Fractionation. *J. Braz. Chem. Soc.* 2017;28(3):512–519.
 10. Mesquita ML, Desrivot J, Fournet A *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2005; 100(7); 783-787.
 11. Freitas CMJ, Guedes MLS, Velozo ES. Extração com solvente e fluido supercrítico dos constituintes do caule subterrâneo de *Spiranthera odoratissima* St.-Hil. (Rutaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2002;12:19–21.
 12. Matos LG, Fiuza TS, Tresvenzol LMF, Rezende MH, Bara MTF, Silveira EN, *et al.* Estudo farmacognóstico de folhas e raízes da *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais,* 2014;16(3):574–584.
 13. Silva C, Santos ML. Comportamento fenológico no evento pós-queima e biologia reprodutiva de *Spiranthera odoratissima* A. St. -Hil. (Rutaceae). *Biotemas.* 2008;21(1):29–39.
 14. Soares NP, Santos PL, Vieira VS, Pimenta VSC, Araújo E. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. *Centro Científico Conhecer.* 2016;13(24):530–543.
 15. Maury MM, *et al.* Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature genetics.* 2016;48(3):308.
 16. Becattini S, *et al.* Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Experimental Medicine.* 2017;214(7):1973-1989.
 17. Paduro C, *et al.* Ten years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008–2017. *Food microbiology.* 2020;85:103280.
 18. Moura A, *et al.* Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature microbiology.* 2017;2(2):16185.
 19. Pagliano P, *et al.* *Listeria monocytogenes* meningitis in the elderly: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Infezioni in Medicina.* 2016;24(2):105-111.
 20. Schlech WF. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Gram-Positive Pathogens.* 2019:793-802.
 21. Rodrigues LS *et al.* Noni (*Morinda citrifolia* Linn.): Determinação Fitoquímica e Potencial Antioxidante pelo Método DPPH. *Conexões-Ciência e Tecnologia.* 2017; 11(4):47-54.

22. García IMG *et al.* Comparación cuantitativa de la actividad antioxidante en tomate chonto y ahuyama por los métodos ABTS, DPPH y voltamperometría cíclica/quantitative comparison of antioxidant activity in chonto tomate and pumpkin by ABTS, DPPH and cyclic voltammetry methods. *Vitae*. 2016; 23:576.
23. Oliveira GLS. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2015; 17:36-44.
24. Tushar D, Sonal S, Gajbhiye NA, Satyanshu K. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10(1):1193-S1199.
25. Kandi S, Albert LC. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*. 2019; 275:41-49.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade biológica do extrato hexânico das folhas da *Spiranthera odoratissima* contra fungos patogênicos. Ademais, estabelecer a constituição química preliminar dos extratos: aquoso, metanólico, hidroetanólico, acetato de etila, e hexânico. Posterior, investigar as atividades: química, antioxidante e biológicas da espécie trabalhada.

2.2 Específicos

- Averiguar o estudo morfológico da arquitetura foliar como ângulo foliar, comprimento, diâmetro e o pecíolo;
- Caracterizar os constituintes químicos dos extratos por meio de análise fitoquímica preliminar;
- Investigar a análise contra a *Listeria monocytogenes* dos extratos: aquoso, hidroetanólico, metanólico, acetato de etila e hexânico do manacá do cerrado.
- Avaliar a atividade antioxidante pelos métodos clássicos 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e azino-bis (ácido etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS) dos extratos: aquoso, hidroetanólico, metanólico, acetato de etila e hexânico do manacá do cerrado.

3. CAPÍTULO I

Estudo morfológico foliar da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá)

RESUMO

O manacá (*Spiranthera odoratissima*) é uma espécie arbustiva encontrada na vegetação do Cerrado, especificamente, nas variações ralo, rupestre e de transição para cerradão. Ainda é uma espécie pouco estudada tanto morfológicamente quanto aos seus constituintes fitoquímicos. As folhas de *Spiranthera odoratissima* foram coletadas na área do Cerrado central no município de Iporá/GO, Brasil. As partes aéreas, folhas, sadias e sem ataque de insetos e herbívoros, foram inicialmente tratadas para a retirada dos pigmentos clorofilianos e ceras, em seguida foram clarificadas e diafanizadas utilizando os corantes azul de toluidina, safranina e fucsina básica fenólica. Após a diafanização, as folhas foram escaneadas e em seguida micrografadas para observação da morfologia foliar. Os corantes avaliados na diafanização apresentaram bons resultados para diferenciação e nitidez das estruturas morfológicas. O limbo foliar é do tipo cartáceo, concolor e apresenta apenas uma nervura 1ª, entre 12-16 nervuras 2ª, nervuras 3ª e 4ª ordem, o padrão de nervuras é broquidódroma, aréolas completas, tricomas tectores, tipo de estômato anomocítico, observados apenas na face abaxial foliar, F.E.V.S (veias de terminação livres) com 2-3 bifurcações, células epidérmicas em ambas as faces com paredes anticliniais sinuosas. As características morfológicas descritas neste estudo para *S. odoratissima* estabelecem importantes dados taxonômicos para a correta identificação desta espécie, que apresenta atividades fitoquímicas distintas, além de garantir a preservação do táxon, na concepção ecológica, genética e fenologia, além do mais oferece para a área farmacêutica trabalhos relevantes com os dados obtidos nesta proposta.

Palavras-chave: aréolas; nervuras; diafanização foliar; arquitetura foliar.

ABSTRACT

Leaf morphological study of *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá)

The manacá (*Spiranthera odoratissima*) is a shrub species found in Cerrado vegetation, specifically in the thin, rocky and transition to cerradão variations. It is still a poorly studied species, both morphologically and its phytochemical constituents. *Spiranthera odoratissima* leaves were collected in the central Cerrado area in the municipality of Iporá / GO, Brazil. The aerial parts, leaves, healthy and without attack by insects and herbivores, were initially treated for chlorophyllian pigments and waxes removal, then they were clarified and cleared using the dyes toluidine blue, safranin and basic phenolic fuchsin. After clearing, the leaves were scanned and then micrographed to observe leaf morphology. The dyes evaluated in the clearing showed good results for differentiation and sharpness of the morphological structures. The leaf blade is of the cardiac type, concolor and presents only one 1st rib, between 12-16 2nd ribs, 3rd and 4th order ribs, the rib pattern is brachidodrome, complete areolas, trichomes, type of anomocytic stoma, observed only in the abaxial leaf face, F.E.V.S (freely ending veinlets) with 2-3 bifurcations, epidermal cells on both sides with sinuous anticline walls. The morphological characteristics described in this study for *S. odoratissima* constitute important taxonomic data for the correct identification of this species that presents distinct phytochemical activities, in addition to guaranteeing the taxon preservation, in the ecological, genetic and phenological conception, in addition to offering for the pharmaceutical area relevant work with the data obtained in this proposal.

Keywords: areolas; ribs; leaf clearing; leaf architecture.

3.1 Introdução

O manacá (*Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire) pertence à família Rutaceae, sendo uma espécie arbustiva que se desenvolve no bioma Cerrado ralo, rupestre e de transição para o cerradão, apresentando altura de aproximadamente 1,5 metros^{1,5}. Suas inflorescências são paniculadas apresentando cor esbranquiçada, os frutos são encapsulados (esquizocárpicas), incompletos, apresentando deiscência possuindo apenas uma única semente e as raízes apresentam coloração amarelo-dourado⁵.

A espécie é considerada fitoterápica, e partes da planta são utilizadas no tratamento de patologias, o chá da raiz é utilizado para problemas estomacais, o extrato etanólico das raízes apresenta ação analgésica e anti-inflamatória^{2,6,7}, as folhas são usadas como purgativo e em problemas renais e hepáticos^{3,4}.

Em estudos anteriores, referentes às análises fitoquímicas, é possível comprovar a presenças dos compostos monoterpênicos, sesquiterpenoides, alcaloides e cumarinas, além do mais, estudos recentes constam que a espécie possui atividades como inseticida natural e atividades anti-inflamatórias^{8,9}.

Atualmente a *S. odoratissima* está incluída na lista de espécies vegetais ameaçadas de extinção por causa do extrativismo e perda de área do domínio Cerrado ocasionadas pela ação antrópica⁵. A espécie analisada em questão é pouco estudada quanto a sua morfologia foliar, biologia floral, reprodutiva e ao seu comportamento fenológico.

O desenvolvimento de pesquisas voltadas para a morfologia foliar é de fundamental importância para o conhecimento do táxon, servindo não apenas para a taxonomia vegetal, mas também para a ecologia, genética e compreensão da biodiversidade do bioma Cerrado. Deste modo, a morfologia tem por objetivo, avaliar os padrões de nervuras, forma da base e ápice foliar, bem como a presença de tricomas totores ou glandulares, morfologia dos estômatos, F.E.V.S., aréolas dentre outras estruturas¹⁰.

Segundo Corrêa *et al.*, (2014) e Hefler & Longhi-Wagner (2010)^{11,12} a morfoanatomia apresenta parâmetros de diferenciação entre os táxons de um mesmo gênero. Estas características também são utilizadas na área farmacêutica que se avaliam a qualidade das matérias-primas de origem vegetal que muitas das vezes se apresentam contaminadas.

Conforme Port & Dutra (2013)¹³, a descrição da arquitetura foliar apresenta como suporte taxonômico vegetal para o desenvolvimento de novas chaves dicotômicas que incluam as características morfológicas foliares tanto para a flora moderna quanto para flora pretérita.

Este trabalho tem por objetivo contribuir com o estudo morfológico da arquitetura

foliar da *Spiranthera odoratissima* (manacá) em uma área do domínio Cerrado variação Cerrado ralo a cerradão.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Coleta do táxon

As folhas de *Spiranthera odoratissima* foram coletadas em uma área de domínio Cerrado, variante ralo a cerradão, no ano de 2019, localizada no município de Iporá/GO, Brasil, com a seguinte localização geográfica da coleta 16°56'15.1''S 51°48'48.5''W. Foram coletadas em 10 indivíduos, 10 folhas sadias de cada planta, sem ataque por microrganismos, insetos ou herbívoros. Uma exsicata foi produzida e depositada no Herbário do Laboratório de Sistemática Vegetal do IF Goiano – Campus Rio Verde/GO, Brasil com a seguinte numeração HRV: #1039.

3.2.2 Processo de diafanização.

A diafanização seguiu conforme proposto por Amede *et al.*, (2015) e Shobe & Lersten (1967)^{14,15} com adaptações. As folhas foram imersas em 150 mL de uma solução de álcool etílico 95% e sabão líquido (detergente) na proporção (10:9) (v/v), o material foi armazenado em frasco hermético por 35 dias até remoção parcial dos pigmentos. Logo em seguida, as folhas foram lavadas em água corrente e transferidas para o mesmo frasco contendo 200 ml de uma solução de NaOH 5% (p/v) por 24 horas. Após este período, as folhas foram lavadas com em água destilada. Em seguida foram colocadas no frasco contendo 200 ml de uma solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) lavando novamente em água destilada a cada 3 dias, até brancura.

As folhas após a clarificação passaram por desidratação em série etanólica crescente (30, 50, 70 e 95%) por 35 minutos para cada etapa; logo a seguir foram imersas em 200 ml de uma solução de Xilol e Etanol P.A (1:1) (v/v) por 2 horas. Para a diafanização foram utilizadas, solução aquosa de azul de toluidina 1% (p/v), solução aquosa de safranina 1% (p/v) e solução de fucsina básica fenólica. O material ficou imerso no corante por 60 minutos e em seguida o excesso de corante foi retirado com solução de álcool etílico 70% (v/v).

Após o processo de coloração as folhas foram imersas em solução de Xilol e Etanol P.A., por 24 horas armazenado em geladeira a 8°C. Em seguida a solução foi substituída por Xilol P.A., ficando em geladeira a 8°C por 12 horas. Logo em seguida, o material foi imerso em glicerol P.A. A determinação do padrão de venação foliar da rede maior, foi inicialmente realizada por escaneamento utilizando impressora *hp* Photosmart C4480, e para a rede menor de nervuras, foram realizadas em microscópio óptico e câmera acoplada. Para a classificação

dos padrões de nervação se utilizou os tipos básicos definidos por Hickey (1976) e Ash (1999) 16,17

3.2.3 Obtenção das imagens por scanner e fotomicrografias

As imagens adquiridas para esse trabalho foram obtidas utilizando o Software ImageJ (free version 2018). Após o tratamento necessário das fotos, como correção de: coloração, nitidez, calor, intensidade e entre outros, os resultados foram apresentados de modo que ficassem nítidas e claras as imagens.

3.3 Resultados



Figura 1. Pranchas A e B, faces adaxial e abaxial foliar de *Spiranthera odoratissima* corada com fucsina básica fenólica.

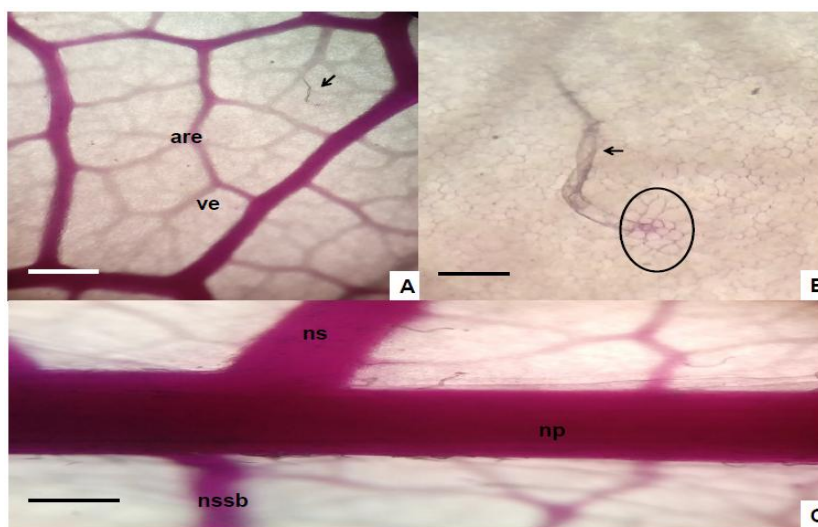


Figura 2. Morfologia foliar de *Spiranthera odoratissima*, face abaxial. np = nervura primária, ns = nervura secundária, nsb = nervura secundária subsecundária, seta tricoma tector pluricelular com ápice afilado, círculo células modificadas do tricoma.

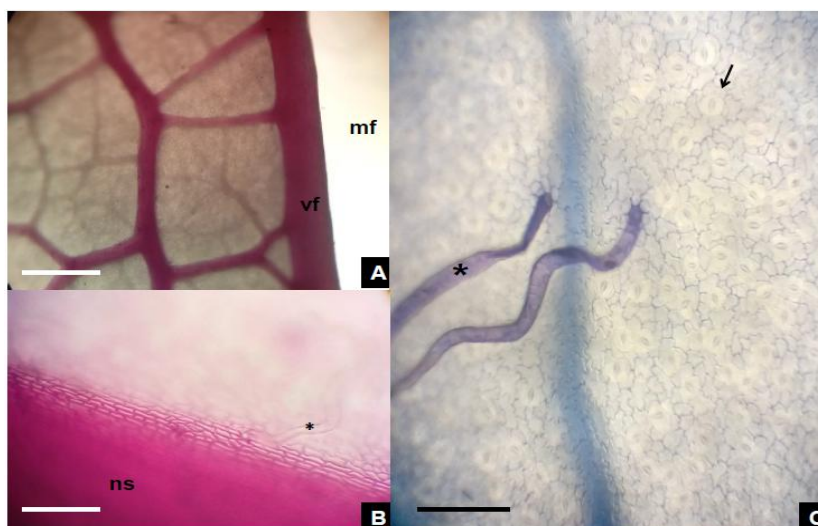


Figura 3. Morfologia foliar de *Spiranthera odoratissima*, face abaxial. vf = veia fimbrial, mf = margem foliar, ns = nervura secundária, * tricoma tector pluricelular. Seta estômato anomocítico.

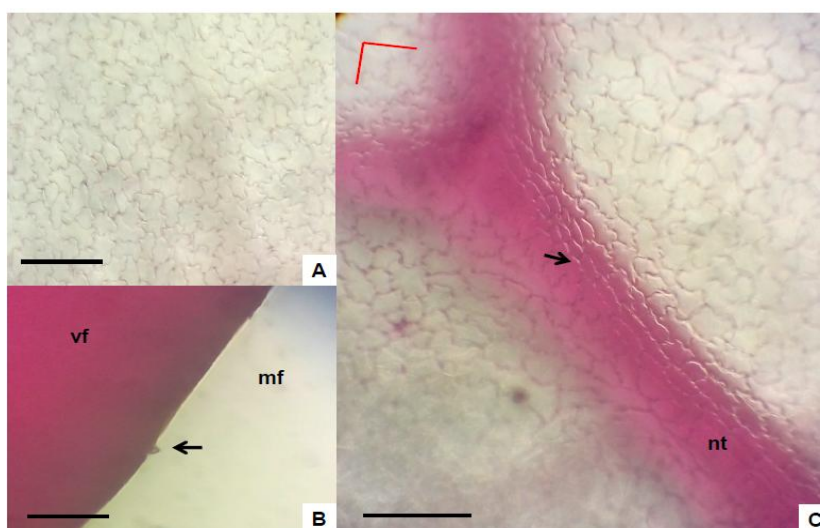


Figura 4. Morfologia foliar de *Spiranthera odoratissima*, face adaxial. Prancha A visão geral da epiderme apresentando células epidérmicas sinuosas. Prancha B, vf = veia fimbrial, mf = margem foliar e seta tricoma glandular, Prancha C, nt = nervura terciária seta células epidérmicas alongadas, com paredes anticlinais retas a levemente sinuosas, retas (vermelho) estruturas das nervuras terciárias individualizadas fundidas (confluente).

3.4 Discussão

O manacá (*Spiranthera odoratissima*) possui hábito subarborescente apresentando entre 1,2 a 1,5 m de altura, as folhas são alternas, compostas, trifoliadas, cartáceas e concolores. O mesmo foi observado por Silva & Santos (2008)⁵ verificando o comportamento fenológico de *S. odoratissima*.

Na Figura 2, pranchas (A e B) faces adaxial e abaxial respectivamente, demonstrando o limbo foliar de *S. odoratissima* apresentando apenas 1 nervura primária, média de 10 a 15 nervuras secundárias, unilobulada, coriácea, do tipo convexa, organização foliar do tipo

simples, pecíolo com base inchada. A base laminar apresenta forma oblonga, a simetria laminar é assimétrica, ângulo da base obtuso e ângulo do ápice obtuso.

A forma da base do limbo foliar é dorsiventral arredondada, posição do anexo foliar é do tipo marginal, forma do ápice convexo e tipo de margem foliar erosa. As nervuras 2ª apresentam média entre 12 a 16 nervuras por folha, possuem padrão broquidódroma, com espaçamento menor em direção à base, apresentando nervuras intersecundárias fracas, na margem foliar com fusão de nervuras (anastomosado) (Figura 2 pranchas A e B).

O padrão de venação é até de 4ª ordem, as nervuras secundárias são fundidas, as aréolas são completas apresentando entorno de 5 lados, os tricomas são pluricelulares do tipo tector de ápice afilado, apresentando maior densidade próxima às nervuras de 1ª e 2ª ordem e em menor quantidades na epiderme. A saliência das nervuras é mais acentuada na face abaxial. Os F.E.V.S, apresentam 2-3 ramificações, apresenta veia fimbrial na margem foliar sem loops e sem dentes.

A epiderme do limbo foliar em ambas as faces, apresentam células heterodimensionais com paredes anticlinais sinuosas, exceto nas regiões das nervuras, nas quais as células epidérmicas são alongadas, com paredes anticlinais retas a levemente sinuosas (Figuras 4-5 pranchas C).

Os estômatos são do tipo anomocítico com 5-6 células, apenas observados na face abaxial (hipoestomático), encontrados no mesmo nível das demais células epidérmicas. Estudo realizado por Matos *et al.*, (2014)¹⁸, com folhas de *Spiranthera odoratissima* em uma área de Cerrado goiano, encontrou padrões similares ao deste estudo, exceto no padrão das células epidérmicas da face adaxial apresentando formato poliédrico. Embora Metcalf & Chalk (1979)¹⁹ tenham relatado a presença de estômatos paracíticos como característico para a família Rutaceae, a presença de estômatos anomocíticos são também observados em *Raulinoa echinata* e *Pilocarpus microphyllus*, táxons pertencentes a mesma família conforme descrito por Arioli *et al.*, (2008) e Oliveira; Akisue & Akisue^{20,21}.

3.5 Conclusão

Neste estudo morfológico da arquitetura foliar de *Spiranthera odoratissima* foi possível avaliar três corantes que apresentaram bons resultados no processo de diafanização, sendo escolhido o corante de fucsina básica fenólica para os testes. Sendo assim, pode-se observar que as características morfológicas de *S. odoratissima* constituem importantes dados taxonômicos para a identificação correta desta espécie que apresenta inúmeras atividades fitoquímicas, bem como garantir a preservação do táxon, entendimento da ecologia, genética e

fenologia para futuros trabalhos.

3.6 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, campus Rio Verde, pela infraestrutura dos laboratórios que foram realizados as análises, sendo eles: Biomoléculas e Bioensaios, Microbiologia de Alimentos e ao Herbário. Além do mais, agradece a CAPES e FAPEG, pelo suporte financeiro dado aos discentes deste trabalho.

3.7 Referências

1. Matos LG, Santos LDAR, Vilela CF, Pontes IS, Tresvenzol LMF, Paula JR, Costa EA. Atividades analgésica e/ou anti-inflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). Revista Brasileira de Farmacognosia, 2003; v.13, p. 15-16.
2. Matos LG, Cruz RB, Pontes IS, Tresvenzol LMF, Paula JR, Nogueira DCF, Costa EA. Estudo das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato ETOH bruto da raiz da *S. odoratissima* (Manacá). XVI Simpósio de plantas Medicinais do Brasil. Livro de Resumos, Recife/PE., p. 252, 2000.
3. Galdino PM, Nascimento MVM, Florentino IF, Lino RC, Fajemiroye JO, Chaibub BA, Paula JR, Lima TCM, Costa EA. The anxiolytic-like effect of na essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. Leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. Progres in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2012; 38(2), p. 276-284.
4. Salles AH, Reis GMCI, Zurlo MA. Horto medicinal do Cerrado. Brasília: Jardim Botânico de Brasília: 1997.
5. Silva CSP, Santos ML. Comportamento fenológico no evento pós-queimada e biologia reprodutiva de *Spiranthera odoratissima* A. St. –Hil. (Rutaceae). Biotemas, 2008; 21(1), p. 29-39.
6. Albernaz LC, Deville A, Dubost L, Paula JE, Bodo B, Grellier P, Espindola LS, Mambu L. Spiranthenones A and B, Tetraprenylated Phloroglucionol derivatives from the leaves of *Spiranthera odoratissima*. Planta Medica, 2012; 78(5), p. 459-464.
7. Matos LG, Pontes IS, Tresvenzol LMF, Paula JR, Costa EA. Analgesic and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (Manacá) roots. Phytotherapy Research, 2004; 18(12), p. 963-966.
8. Freitas CMJ, Lucchese AM, Silva FS, Velozo ES. Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). Biochemical systematics and ecology,

2003; 31(7), p. 805-807.

9. Terezan AP, Rossi RA, Almeida RNA, Freitas TG, Fernandes JB, Silva MFGF, Vieira PC, Bueno OC, Pagnocca FC, Pirani JR. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2010; 21(5), p. 882-886.

10. Guimarães PJF, Ranga NT, Martins AB. Morfologia dos tricomas em *Tibouchina* sect. Pleroma (D. Don) Cogn. (Melastomataceae). Brazilian Archives of Biology and Technology, 1999; 42(4), p. 0-0.

11. Corrêa MM, Araújo MGP, Scudeller VV, Viana MRS. Morfoanatomia foliar de *Couepia paraensis* (Mart. & Zucc.) Benth. subsp. *paraensis* (Chrysobalanaceae). Natureza on line, 2014; 12(4), p.164-169.

12. Hefler SM, Longhi-Wagner HM. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia das espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus* (Cyperaceae) ocorrentes no sul do Brasil. Acta Botânica Brasílica, 2010; 24(3), p. 708-717.

13. Port J, Dutra TL. Arquitetura foliar de *Ocotea pulchella* (Nees & Mart.) Mez (Lauraceae) em regiões de Floresta Ombrófila Mista, com vistas a sua aplicação em Paleobotânica. Pesquisas, Botânica (São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas), 2013; 64, p.115-126.

14. Amede SC, Graciano-ribeiro A, Rezende MH, Faria MT. Morfo-anatomia e histoquímica foliar de *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) (Meliaceae), cultivadas em Goiás. RENEFARA, 2015; 7(7), p. 65-89.

15. Shobe WR, Lersten NR. A techniques for clearing and staining Gymnosperm leaves. Botanical Gazette, 1967; 128(2), p.150-152.

16. Hickey LJ. A revised Classification of the Architecture of dicotyledonous leaves. Anatomy of the dicotyledons, 1(2), p.1979.

17. ASH, Amanda. Manual of leaf Architecture-morphological description and categorization of dicotyledonous and net veined monocotyledonous angiosperms. Smithsonian Institution, 1999.

18. Matos LG, Fiuza TS, Tresvenzol LMF, Rezende MH, Bara MTF, Silveira EM, Costa EA, Paula JR. Estudo farmacognóstico de folhas e raízes da *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. (Rutaceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2014; 16(3), p.574-584.

19. Baranova, M. Principles of comparative stomatographic studies of flowering plantas. The Botanical Review, 1992; 58(1), p. 49-99.

20. Arioli T, Voltolini CH, Santos M. Morfoanatomia foliar da reófito *Raulinoa echinata* R. S. Cowan – Rutaceae. Acta Botanica Brasílica, 2008; 22(3): 723-32.

21. Oliveira F, Akisue G, Akisue MK. Farmacognosia. 1ª Ed., São Paulo: Editora Atheneu, 1996, p. 412.

4. CAPÍTULO II

Abordagem fitoquímica de extratos vegetais das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. - Hil. (Rutaceae) e suas atividades antioxidantes e anti- *Listeria monocytogenes* *in vitro*

(Normas de acordo com a revista Acta Scientiarum. Biological Sciences)

RESUMO

Spiranthera odoratissima A. St.-Hil (Rutaceae), conhecida popularmente como manacá do Cerrado, é um arbusto de aproximadamente um metro de altura sendo empregada na medicina popular para o tratamento de dores de estômago, infecções renais e hepáticas, dores de cabeça, reumatismo e como depurativo do sangue. O objetivo deste trabalho foi preparar a partir das folhas de *S. odoratissima* os extratos hexânico, acetato de etila, metanólico, hidroetanólico e aquoso, realizar a abordagem fitoquímica preliminar e avaliar suas atividades antioxidantes e anti-*Listeria monocytogenes in vitro* destes extratos vegetais. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). A atividade antibacteriana foi investigada contra *L. monocytogenes* e os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais foram calculados pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 poços. Nos extratos aquosos, metanólicos, hidroetanólico, acetato de etila e hexânico das folhas da *S. odoratissima* foram identificadas as seguintes classes de compostos: a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, flavonoides, compostos saponínicos, compostos cumarínicos, fenólicos, taninos, compostos purínicos, catequinas, derivados de flavonois, sesquiterpenolactonas e antraquinonas. Os extratos vegetais, com exceção do hexânico, todos exibiram elevada atividade antioxidante. Em relação à atividade antibacteriana, os extratos mais polares revelaram alta atividade contra *L. monocytogenes* com valores de CIM entre 12,5 e 62,5 µg/mL, enquanto o extrato hexânico demonstrou fraca atividade (CIM = 1000 µg/mL). Em suma, sugere-se que os extratos obtidos das folhas de *S. odoratissima* podem ser considerados fontes de metabólitos secundários com promissoras atividades antioxidante e antibacteriana.

Palavras-chave: atividade antioxidante, manacá, planta medicinal, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Spiranthera odoratissima A. St. -Hil (Rutaceae), a shrub whose common name is *manacá do Cerrado* in Brazilian Portuguese, is about 1-m high and has been used by folk medicine to treat stomachache, kidney and liver infections, headache, rheumatism and as a blood purifier. This study aimed at preparing hexane, ethyl acetate, methanolic, hydroethanolic and aqueous extracts from *S. odoratissima* leaves, as well as to carry out preliminary phytochemical screening and to evaluate their *in vitro* antioxidant and anti-*Listeria monocytogenes* activities. Antioxidant activity was evaluated by both DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-azinobis- 3-ethybenzothiazoline-6-sulfonate) methods. Antibacterial activity was investigated against *L. monocytogenes* and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of plant extracts were calculated by the broth microdilution method with the use of 96-well plates. In aqueous, methanolic, hydroethanolic, ethyl acetate and hexane extract from *S. odoratissima* leaves, the following classes of compounds were identified: organic acids, reducing sugars, flavonoids, saponin compounds, coumarin compounds, phenolics, tannins, purine compounds, catechins, flavonol derivatives, sesquiterpene lactones and anthraquinones. All plant extracts, except the hexane one, exhibited high antioxidant activity. Regarding antibacterial activity, the most polar extracts showed high activity against *L. monocytogenes*; their MIC values ranged between 12.5 and 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, while the hexane one exhibited low activity (MIC = 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). In short, extracts from *S. odoratissima* leaves may be considered promising sources of secondary metabolites with relevant antioxidant and antibacterial activities.

Keywords: antioxidant activity, *manacá*, medicinal plant, antibacterial activity.

4.1 Introdução

O Cerrado brasileiro, o segundo maior bioma do país, possui alto potencial para o desenvolvimento de pesquisas sobre novos compostos vegetais (Oliveira, Moreira, Júnior e Pimenta, 2006). A biodiversidade encontrada no Cerrado é vasta e diversificada, pois suas espécies compreendem plantas herbáceas, arbustos, árvores e trepadeiras (Lima, Scariot, Medeiros, & Sevilha, 2012). Mediante a essa grande variação de vegetação há imenso potencial de uso e aplicações das propriedades funcionais, atribuídas a presença de substâncias bioativas (Morais *et al.*, 2019).

Diversos estudos têm sido realizados, com o intuito de quantificar e qualificar os constituintes químicos de extratos vegetais, cujos efeitos benéficos de algumas substâncias de determinadas espécies, atuam, como fator chave para o desenvolvimento de pesquisas bases para futuras aplicações desses bioativos (Morais *et al.*, 2019).

Dentre os métodos de investigação, destaca-se a investigação fitoquímica preliminar que atua para fazer o reconhecimento dos constituintes químicos e/ou avaliarem, a presença dos mesmos, na espécie que está sendo estudada. Quando ainda não existem estudos químicos sobre determinada espécie e seus metabólitos secundários, a abordagem fitoquímica preliminar age como método de identificação da presença de diversas classes de metabólitos primários e secundários. Este processo pode ser realizado por diferentes métodos e solventes, que consequentemente, resultam em grande diversidade de resultados (Costa & Hoscheid, 2018).

Especificamente, a triagem fitoquímica permite realizar testes preliminares para a identificação da presença de compostos químicos em determinadas espécies vegetais, dentre as classes desses compostos pode-se citar: os alcaloides, que atuam como antitumorais e antivirais, os flavonoides, que apresentam diversas atividades com caráter anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica e anticancerígena, os taninos que contribuem para tratamento da hipertensão arterial, fungicidas, bactericidas e queimaduras, as saponinas que são antivirais e agem sobre membranas celulares, os esteroides/triterpenos que são anti-inflamatórios naturais, além de outras classes como cumarinas, lignanas, terpenos, flavonoides e limonoides (Bessa *et al.*, 2013).

A espécie *Spiranthera odoratissima*, A. ST. -Hil. (Rutaceae), conhecida popularmente como “manacá do cerrado” possui enorme carência de estudos farmacobotânico em plataformas de buscas atuais, consequentemente, as revisões de literaturas redirecionadas ao extrato de “manacá” também são escassas. Esta espécie vegetal é bastante rica em metabólitos secundários, e as suas ações farmacológicas e biológicas são bastante promissoras

(Souza, Ferri, Fiuza, Borges, & Paula, 2018).

Os radicais livres e outros oxidantes têm sido considerados a causa de várias doenças, como cardiovasculares, câncer, catarata, deficiências imunológicas, disfunção cerebral e tipo 1 (diabetes *mellitus*). No entanto, seu excesso pode gerar estresse oxidativo, definido como circunstâncias que levam os radicais livres a causar danos em biomoléculas (Oliveira, Dors, Souza-Soares e Badiale-Furlong, 2007).

A produção de radicais livres ocorre naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, no metabolismo celular ou pela exposição aos fatores exógenos. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em pequenas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação. É notável a busca por produtos naturais que conseguem inibir não só a peroxidação dos lipídios, mas também, a oxidação de outras moléculas, como proteínas, DNA, entre outras (Cardoso, 2019).

Listeria monocytogenes é um agente patogênico veiculado por alimentos, capaz de sobreviver e proliferar em temperaturas de refrigeração. Como resultado, os produtos cárneos, prontos para consumo, têm sido associados a graves surtos mortais. É também o principal agente causador da listeriose, uma grave doença zoonótica que pode levar ao aborto, doenças neurológicas, distúrbios, sepse e desordens gastrointestinais (Pieri, José, Galvão, Nero e Moreira, 2010).

Assim, este estudo objetivou preparar extratos de hexânico, acetato de etila, metanólico, hidroetanólico e aquoso das folhas de *S. odoratissima* e submetê-los a triagem fitoquímica preliminar, a fim de identificar classes de metabólitos secundários encontrados nesta espécie. Além disso, todos os extratos vegetais tiveram suas atividades antioxidantes (pelos métodos DPPH • e ABTS •+) e anti-*Listeria monocytogenes* avaliadas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Material biológico

As folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. - Hil. (Rutaceae) (Figura 1) foram coletadas em maio, no ano de 2019, quando a região do Cerrado, localizado no estado de Goiás (GO), passa por estação seca. A coleta foi realizada em Iporá, GO, (16 ° 24'11,2 "S 51 ° 06'41,4" W), cuja altitude é de 707 m, a latitude é de -16403117 e a longitude é de -51111486. As folhas de *Spiranthera odoratissima* foram armazenadas em sacos de papel, identificadas e preservadas. O material vegetal foi identificado pela botânica Erika Amaral e depositado no herbário pertencente ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO (n° 1039).

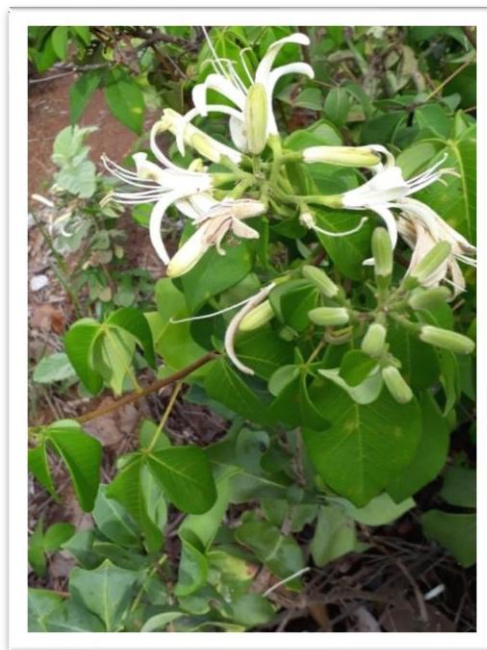


Figura 1. *Spiranthera odoratissima* A. St. - Hil. (Rutaceae) folhas. Fonte: próprio autor/2019.

4.2.2 Solventes

Os solventes utilizados nas experiências foram hexano (NEON), álcool etílico (Ls Chemicals), álcool metílico (Ls Chemicals) e acetato de etila (Dinâmica). A água deionizada foi produzida por um deionizador (LUCADEMA / LUCA-315).

4.2.3 Preparação dos extratos

A metodologia utilizada para a elaboração dos extratos foi descrita por Rodrigues, Souza Filho, & Ferreira, (2009), com modificações. O material foi seco por um forno de ar forçado a 50°C até massa constante por cerca de 24 horas. Em seguida, o material foi moído por um moinho de facas Willey Star FT 50 e passado por uma peneira de 5 mm até pó homogêneo.

4.2.4 Extração com solventes

Para produzir extratos brutos, foram adicionados 100 g de pó homogêneo (folhas moídas) a 1000 mL de solvente (hexano, acetato de etila, metanol, misturas de etanol e água (7:3) e água (100%). Todos os extratos foram armazenados em frascos fechado de vidro, nesta fase, os extratos foram mantidos em local escuro e, após 24 horas, as soluções foram filtradas em papel de filtro qualitativo (80 g / m²). Os líquidos resultantes foram submetidos a um rotaevaporador a 70°C, e foram obtidos os seguintes extratos: hexânico (7,60 g), acetato de etila (10,3 g), metanólico (5,80 g), hidroetanólico (12,2 g) e aquoso (3,30 g), sendo que no final todos os extratos apresentavam consistência de xarope.

4.2.5 Triagem fitoquímica

Na triagem fitoquímica preliminar, foram realizados procedimentos clássicos para

identificar as principais classes de metabólitos secundários. A identificação de compostos encontrados em extratos vegetais pode ser baseada em certos critérios, como cor, reações de precipitação e formação de espuma (Mariño *et al.*, 2019).

Foram analisadas as seguintes classes de metabólitos: ácidos orgânicos, açúcares redutores, alcaloides, flavonoides, compostos de saponina, compostos de cumarina, glicosídeos cardíacos, fenólicos, proteínas e aminoácidos, purinas, taninos, polissacarídeos, compostos de purinas, catequinas, benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas, flavanóis, flavanonas, flavonóis, xantonas, antraquinonas, lactonas de sesquiterpenos e outras lactonas.

4.2.6 Ácidos orgânicos

Foi aplicada a metodologia descrita por Henriques & Almeida (2013), com modificações. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de água destilada ao extrato de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 2 mL de reagente de Pascová. A reação é considerada positiva quando o reagente perde sua cor.

4.2.7 Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pela metodologia proposta por Silva, Souza, Silva, Marques, & Graebner, (2019), com modificações. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de água destilada ao extrato de 2 mL. Em seguida, 2 mL de reagente de Fehling e 2 mL de B de Fehling foram adicionados a ele. O tubo foi transferido para um agitador de vórtice para homogeneizar a solução e, em seguida, mantido em banho-maria por 5 minutos. Resultados positivos mostram precipitado vermelho tijolo.

4.2.8 Açúcares não redutores

Os açúcares não redutores também foram determinados pela metodologia proposta por Silva, Souza, Silva, Marques, & Graebner, (2019), com modificações. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de água destilada ao extrato de 2 mL. Posteriormente, a homogeneização foi realizada em um agitador de vórtice e 1 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) foi adicionado ao tubo de ensaio.

A solução foi aquecida em banho-maria por cerca de 5 minutos e depois resfriada. A neutralização foi realizada por solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 20% (m / v) e foram adicionados 2 mL de reagente de Fehling e 2 mL de B de Fehling. A solução foi novamente banhada em água por 5 minutos.

Após o resfriamento, a solução foi analisada. A reação é considerada positiva quando mostra precipitado vermelho.

4.2.9 Alcaloides

Utilizou-se a metodologia descrita por Henriques & Almeida (2013), com modificações. Em um tubo de ensaio, foi adicionado ácido clorídrico (HCl) a 5% (m / v) ao extrato de 4 mL.

Tubo de ensaio 1 - solução de extrato + ácido clorídrico a 5% (m / v) + 500 µL de reagente de Mayer. A reação é considerada positiva quando há precipitado branco ou uma solução branca levemente turva.

Tubo de ensaio 2 - solução do extrato + ácido clorídrico a 5% (m / v) + 500 µL de reagente de Wagner. Uma reação positiva mostra precipitado laranja.

Tubo de ensaio 3 - solução do extrato + ácido clorídrico a 5% (m / v) + 500 µL de reagente de Liebermann-Bouchard. Uma reação positiva mostra precipitado laranja ou avermelhado.

Tubo de ensaio 4 - solução do extrato + ácido clorídrico a 5% (m / v) + 500 µL de reagente de Bertrand. Uma reação positiva mostra precipitado branco.

4.2.10 Flavonoides

O teste de Shinoda (HCl concentrado e magnésio) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Henriques & Almeida (2013), com modificações. Em um tubo de ensaio, uma pequena fração de fita de magnésio (0,5 cm de diâmetro) e 1 mL de HCl concentrado foram adicionados ao extrato de 3 mL. A solução exibiu efervescência total no final da reação. Uma reação positiva mostra cores que variam do vermelho enegrecido ao vermelho.

4.2.11 Compostos saponínicos

O método utilizado para determinar os compostos de saponina foi descrito por Silva, Souza, Silva, Marques, & Graebner, (2019), com modificações. Num tubo de ensaio, foram adicionados 10 mL de água deionizada ao extrato de 5 mL. Foi agitado vigorosamente por um agitador de vórtice por 2 minutos para formar espuma. A reação é positiva se a espuma persistir nos tubos de ensaio após repouso por 15 minutos.

4.2.12 Compostos cumarínicos

A metodologia descrita por Henriques & Almeida (2013), com modificações, foi utilizada para determinar os compostos de cumarina. Um tubo de ensaio com 3 mL de extrato foi coberto com papel de filtro (80 g / m²) e 1 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 10% (m / v) foi aplicado na superfície do papel. O tubo foi aquecido em banho-maria por 10 minutos. Depois de ter esfriado em temperatura ambiente, o tubo de ensaio foi colocado em câmara ultravioleta e o papel foi avaliado sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. O resultado é considerado positivo quando a fluorescência no papel é verde ou amarela.

4.2.13 Glicosídeos cardíacos

A metodologia descrita por Alves *et al.*, (2019), com modificações, foi utilizada para a

realização deste ensaio. Em um tubo de ensaio, 3 mL de extrato foram misturados com 2 mL de reagente KEEDE B. A reação é considerada positiva quando o precipitado é formado e / ou sua cor se torna azul ou violeta.

4.2.14 Fenólicos

Os compostos fenólicos foram avaliados pela metodologia proposta por Henriques & Almeida (2013), com modificações. Num tubo de ensaio, foram adicionados 5 ml de água destilada ao extrato de 3 ml. Em seguida, também foi adicionada solução de 1 mL de cloreto férrico, FeCl₃, a 1% (m / v). A reação é considerada positiva quando as cores variam entre azul e vermelho, uma evidência de fenólicos simples.

4.2.15 Proteínas e aminoácidos

As proteínas e aminoácidos foram avaliados pela metodologia proposta por Henriques & Almeida (2013), com modificações. Em um tubo de ensaio, 3 mL de extrato foram misturados com 500 µL de solução aquosa de vanilina a 1%. Em seguida, foi mantido em banho-maria por 10 minutos, até a ebulição. Houve mudança de cor após a solução descansar. O resultado é positivo quando a solução se torna persistentemente violeta.

4.2.16 Purinas

Os compostos de purina foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Henriques & Almeida (2013), com modificações. Num tubo de ensaio, foram adicionados 500 µL de solução aquosa de ácido clorídrico a 32% e 500 µL de solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 35% ao extrato de 2 mL. A solução foi então aquecida em banho-maria por 10 minutos, até a total evaporação do líquido. Resíduo avermelhado formado no final do banho-maria. Em seguida, 500 µL de solução aquosa de hidróxido de amônio 6 N foram adicionados à solução no tubo de ensaio, que foi então homogeneizado por agitação por 1 minuto. A reação é considerada positiva quando se torna avermelhada e / ou violeta.

4.2.17 Taninos

Os taninos foram determinados pela metodologia proposta por Henriques & Almeida (2013), com modificações. Em um tubo de ensaio, 500 µL de solução de cloreto férrico, FeCl₃, a 10%, foram adicionados ao extrato de 2 mL e a atenção foi focada nas alterações de cor. O precipitado azul mostra que existem taninos hidrolisáveis, enquanto o verde mostra taninos condensados.

4.2.18 Polissacarídeos

A análise dos compostos polissacarídeos foi realizada de acordo com Henriques & Almeida (2013), com modificações. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de água destilada ao extrato de 2 mL. A solução foi homogeneizada manualmente por 30 segundos e, em seguida, 500 µL de iodo de Lugol foram adicionados a ela. Os resultados são considerados positivos

quando a solução é azul.

4.2.19 Catequinas

As catequinas foram avaliadas de acordo com a metodologia descrita por Silva, Souza, Silva, Marques, & Graebner, (2019), com modificações. Em um tubo de ensaio, 2 mL de solução de vanilina a 1% e 1 mL de ácido clorídrico concentrado a 32% (P.A. - ACS) foram adicionados ao extrato de 2 mL. O resultado é positivo quando a solução é avermelhada.

4.2.20 Benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas

Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas foram detectados pela metodologia descrita por Barbosa *et al.*, (2004), com modificações. No tubo de ensaio, 500 µL de solução aquosa de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) a 15%, 500 µL de solução de formaldeído a 4% e 500 µL de solução 3,5-dinitrobenzóica a 5% foram adicionados a cerca de 3 mL de extrato. A solução foi então aquecida em banho-maria por 5 minutos. A reação é considerada positiva quando fica vermelha.

4.2.21 Flavanois, Flavanonas, Flavanonois e Xantonas

Esses compostos foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Barbosa *et al.*, (2004), com modificações. Em um tubo de ensaio, uma pequena fração de fita de magnésio (0,5 cm de diâmetro) e 1 mL de HCl concentrado foram adicionados ao extrato de 3 mL. Após a efervescência total da fita de magnésio, as cores mudaram. A reação é considerada positiva quando fica avermelhada.

4.2.22 Antraquinonas

As antraquinonas foram avaliadas pela metodologia proposta por Barbosa *et al.*, (2004), com modificações. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 2 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio a 10% para 3 mL de extrato. A solução foi homogeneizada manualmente por 30 segundos. A reação positiva é rosada, vermelha ou violeta.

4.2.23 Sesquiterpenolactonas e outras lactonas

O grupo de lactonas sesquiterpênicas e lactonas foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Barbosa *et al.*, (2004), com modificações. Em um tubo de ensaio, 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina alcoólica a 10% e 500 µL de solução de KOH metanólico a 10% foram adicionados ao extrato de 2 mL. A solução foi mantida em banho-maria por 10 minutos e, após o resfriamento, foi acidificada por uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 1 N. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução aquosa de cloreto de ferro III (FeCl₃). A reação positiva é violeta.

4.2.24 Atividade antioxidante

As atividades de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e azino-bis (ácido etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) foram determinadas pelo método espectrofotométrico descrito por Lima *et al.*, (2019), com modificações. No ensaio DPPH •, diferentes concentrações de extratos em metanol (10–100 µg / mL) foram adicionadas a 2 mL de solução de DPPH• 0,1 mM, previamente preparada e incubada no escuro por 30 min. A absorvância foi registrada a 517 nm por um espectrofotômetro UV. No ensaio ABTS •+, 1980 µL de solução ABTS •+ diluída foram adicionados a 20 µL de extrato previamente diluído em etanol. A absorvância a 734 nm foi medida 6 minutos após a mistura inicial. O BHT foi utilizado como controle positivo. Os ensaios foram realizados em triplicado. A porcentagem de inibição foi calculada como $(I\%) = (A_0 - A / A_0) \times 100$, em que A_0 é a absorvância do controle e A é a absorvância das amostras. O valor de IC_{50} foi calculado como a concentração de uma amostra necessária para eliminar 50% de radicais livres, representando graficamente o I% versus o extrato da planta.

4.2.25 Atividade antibacteriana

Empregou-se *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) da American Type Culture Collection (ATCC). A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de uma amostra que pode inibir o crescimento bacteriano. A CIM foi determinada por microdiluição em microplacas de 96 poços, em triplicado. As amostras de extrato foram testadas em concentrações variando de 0,195 a 400 µg / mL. Os controles positivos foram penicilina (de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para bactérias Gram-positivas, na concentração de 5,9 µg / mL. O conteúdo final de dimetilsulfóxido (DMSO) na amostra foi de 5% (v / v); a mesma concentração foi empregada como controle negativo (sem extratos). Os poços inoculados contendo o microrganismo foram incluídos apenas para controlar o crescimento bacteriano. Poços não inoculados (sem micro-organismos) também foram empregados para garantir a esterilidade do caldo. A concentração de células de inóculo foi ajustada para 5×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) / mL com base na absorvância lida a 625 nm pelo espectrofotômetro Nanodrop da Thermo Scientific. A metodologia completa utilizada para avaliar a atividade antilisterial dos extratos foi a descrita por Fernández *et al.*, (2018).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Triagem fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica dos extratos das folhas de *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Triagem fitoquímica de extratos de folhas de *S. odoratissima* (Rutaceae)

Classe de compostos	Extrato aquoso	Extrato metanólico	Extrato hidroetanólico	Extrato acetato de etila	Extrato hexânico
Ácido orgânico	+	+	+	+	+
Açúcares redutores	-	+	+	+	+
Açúcares não redutores	+	-	-	-	-
Alcaloides:					
Reativo de Mayer	-	-	-	-	-
Reativo de Wagner	-	-	-	-	-
Libermann-	-	-	-	-	-
Burchardreagent					
Flavonoides	+	+	+	+	-
Compostos saponínicos	+	+	+	-	-
Compostos cumarínicos	+	+	-	-	-
Glicosídeos cardíacos	+	+	+	-	-
Fenólicos	+	+	+	+	-
Proteínas e Aminoácidos	-	-	-	-	-
Taninos	V+	V+	V+	V+	-
Polissacarídeos	-	+	+	-	-
Compostos purínicos	+	+	+	+	-
Catequinas	+	+	+	-	-
Benzoquinonas naftoquinonas e fenantraquinonas	-	-	-	-	-
Flavonois, flavanonas e xantonas	+	+	+	+	-
Antraquinonas	+	+	+	+	-
Sesquiterpenlactonas e outras lactonas	+	+	+	-	+

Resultados: (+) positivo e (-) negativo. V = verde para taninos condensados taninos

Na Tabela 1, pode-se observar a presença de ácidos orgânicos nos extratos aquoso, metanólico, hidroetanólico, acetato de etila e hexânico das folhas de *S. odoratissima*.

Os açúcares redutores foram identificados nos extratos metanólico, hidroetanólico, acetato de etila e hexânico, com exceção do extrato aquoso. Na triagem fitoquímica realizada por Soares *et al.*, (2016), ambos relatam a presença de açúcares redutores nos extratos das folhas do manacá. Já os açúcares não redutores se mostraram presentes apenas no extrato aquoso. Não se detectou a presença de alcaloides em nenhum dos extratos avaliados.

Os flavonoides são conhecidos por possuírem atividades antimicrobiana e antioxidante (Machado *et al.*, 2008). Nos extratos: aquoso, metanólico, hidroetanólico, acetato de etila e

hexânico das folhas da *S. odoratissima* a presença de flavonoides foi positiva. Soares *et al.*, (2016), reportaram a presença desta classe de compostos nas folhas da *S. odoratissima*.

Os compostos saponínicos foram observados apenas nos extratos aquoso, metanólico e hidroetanólico. Entre as diversas atividades biológicas relatadas para as saponinas, merecem destaque aquelas relacionadas ao aumento da resposta imune e a ruptura das membranas dos eritrócitos, como por exemplo, as atividades imunoadjuvante e hemolítica (Kaiser, Pavei, & Ortega, 2010). Soares *et al.*, (2016) identificaram a presença de grupos saponínicos no extrato aquoso das folhas de *S. odoratissima*.

De forma qualitativa os compostos cumarínicos foram identificados apenas nos extratos aquosos e metanólicos. Dentre as atividades biológicas das cumarinas se destacam suas atividades antiprotozoária, antimalárica, atividade estimulante da memória, antitumoral, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, dentre outras (Jalhan *et al.*, 2017). Terezan *et al.*, (2010), relata a presença deste grupo de compostos secundários no extrato bruto das folhas de *S. odoratissima*. Soares *et al.*, (2016), descreveram a presença deste tipo de composto nas folhas da espécie.

Houve confirmação da presença dos compostos glicosídeos cardíacos nos extratos aquoso, metanólico e hidroetanólico das folhas de *S. odoratissima*, não se observando para os extratos acetato de etila e hexânico. Estes compostos possuem a capacidade de aumentar o teor de contrações das fibras musculares cardíacas, sendo utilizados especialmente para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Palácios, Thompson, & Gorostiaga, 2019).

Os compostos fenólicos foram detectados nos extratos: aquoso, metanólico, hidroetanólico, acetato de etila e hexânico das folhas da *S. odoratissima*. Eles atuam como fonte principal de atividade antioxidante de frutos e vegetais protegendo a espécie das agressões do ambiente, além do mais contribuem na melhoria da saúde humana, atuando como agente redutor de teor de açúcar do sangue, diminuição de massa corporal e anticarcinogênico (Soares, 2002). Proteínas e aminoácidos não foram identificados em nenhum extrato das folhas de *S. odoratissima* sob investigação.

Em relação aos taninos, essa classe foi identificada em todos os extratos estudados, exceto no hexânico. Taninos condensados possuem estruturas bastante complexas e propriedades adstringentes, além de apresentar atributos antidiarreicos, antissépticos, antimicrobianos e antifúngicos. Eles também ajudam a curar queimaduras, feridas e inflamações, desenvolvendo uma camada protetora na qual os processos de cicatrização ocorrem naturalmente (Monteiro *et al.*, 2005).

Soares *et al.*, (2016) também encontraram esses compostos nas folhas de *S. odoratissima*.

Em relação aos taninos, essa classe foi identificada em todos os extratos estudados, exceto no hexânico. Taninos condensados possuem estruturas bastante complexas e propriedades adstringentes, além de apresentar atributos antidiarreicos, antissépticos, antimicrobianos e antifúngicos. Eles também ajudam a curar queimaduras, feridas e inflamações, desenvolvendo uma camada protetora na qual os processos de cicatrização ocorrem naturalmente (Monteiro *et al.*, 2005). Soares *et al.*, (2016), também encontraram esses compostos nas folhas de *S. odoratissima*.

Os compostos polissacarídeos foram identificados apenas nos extratos metanólico e hidrometanólico. A classe de compostos purínicos foi qualitativamente identificada nos extratos aquoso, metanólico, hidroetanólico e acetato de etila, exceto no extrato hexânico.

As catequinas foram encontradas apenas nos extratos aquoso, metanólico e hidroetanólico. Esse grupo de metabólitos secundários possui amplo número de atividades biológicas, como antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e quimioprotetoras. Também é considerado um agente contra o envelhecimento da pele (Isemura. 2019). Não foram encontrados derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas em nenhum extrato das folhas de *S. odoratissima* sob investigação.

Os flavonoides e seus derivados - flavonóis, flavanonas e xantonas - foram identificados qualitativamente nos extratos aquoso, metanólico, hidroetanólico e acetato de etila, mas não no hexânico, das folhas de *S. odoratissima*. Soares, Santos, Vieira, Pimenta e Araújo (2016) também encontraram essa classe de metabólitos nas folhas de *S. odoratissima*.

Embora as antraquinonas sejam quimicamente caracterizadas pelo fato de exibirem atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, elas podem levar a diarreia, vômito e náusea quando mal-empregados. Além disso, as overdoses podem provocar crises graves de nefrite aguda (Malik & Muller, 2016). Esses compostos foram encontrados nos extratos: aquoso, metanólico, hidroetanólico e acetato de etila das folhas de *S. odoratissima*. Classes de lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas foram encontradas nos extratos: aquoso, metanólico, hexânico e hidroetanólico, mas não no acetato de etila.

4.3.2 Atividades antioxidante e anti-*Listeria monocytogenes*

A atividade antioxidante dos extratos vegetais foi avaliada pelos métodos DPPH• e ABTS•+, que têm sido comumente usados para analisar a capacidade de eliminação de radicais livres em vários produtos naturais (Alves *et al.*, 2010b).

A Tabela 2 mostra os resultados dos extratos hexânico, acetato de etila, metanólico, hidroetanólico e aquoso em termos de valores de IC₅₀ (µg / mL). O controle positivo foi BHT

(IC₅₀ = 18,00 µg / mL). A menor atividade antioxidante foi exibida pelo extrato de hexânico (IC₅₀ = 1550,80 µg / mL por DPPH e IC₅₀ = 890,42 µg / mL por ABTS), enquanto a maior atividade antioxidante foi atribuída ao extrato aquoso (IC₅₀ = 3,18 µg / mL por DPPH e IC₅₀ = 23,81 µg/mL por ABTS). Alta atividade antioxidante também foi identificada nos extratos acetato de etila, metanólico e hidroetanólico, cujos valores de IC₅₀ foram próximos aos do controle positivo BHT.

Silva *et al.*, (2010), afirmaram que a alta atividade de eliminação de radicais livres pode ser explicada porque compostos fenólicos e flavonoides podem ser encontrados em concentrações mais altas, em comparação com o extrato de hexânico, que não apresentou classes de compostos com potencial antioxidante por triagem fitoquímica. Em geral, os compostos fenólicos impedem a ação dos radicais livres no corpo e, uma vez que protegem moléculas, como o DNA, podem interromper alguns processos carcinogênicos.

Segundo Sousa, Vieira e Lima (2011), metodologias que utilizam a eliminação de DPPH• e ABTS•+ do radical medem a atividade de compostos de natureza hidrofílica, i. e., compostos com alta polaridade. Portanto, as atividades antioxidantes observadas por este estudo podem estar diretamente conectadas aos flavonoides nos extratos investigados.

Em relação à atividade anti-*Listeria monocytogenes*, acetato de etila, extratos metanólico, hidroetanólico e aquoso exibiram alta atividade antibacteriana, cujos valores de CIM variaram entre 12,5 e 62,5 µg / mL (Tabela 2). No entanto, o extrato de hexânico foi o único que apresentou baixa atividade contra bactérias cujo valor de CIM foi de 1000 µg / mL (Tabela 2).

Lemes *et al.*, (2018) relataram recentemente valores de CIM inferiores a 100 µg / mL, entre 100 e 500 µg / mL e entre 500 e 1000 µg / mL, usando atividades promissoras, moderadas e fracassadas, respectivamente, enquanto valores de CIM acima de 1000 µg / mL denotam inatividade. Assim, confirme o potencial antibacteriano dos extratos mais polares das folhas de *S. odoratissima*.

Acredita-se que grande quantidade de efeitos antimicrobianos dos extratos vegetais é resultado, principalmente de flavonoides em sua composição (Andrade *et al.*, 2005). Durante todo o processo de extração, com base na polaridade de seus constituintes, ou extrato de hexânico mantido pobre em flavonoides e rico em terpenoides. Como resultado, ou extração de hexano das folhas exibidas fraca ou nenhuma atividade antimicrobiana.

Considerar alta suscetibilidade de microrganismos Gram-positivos, o mecanismo de atividade antimicrobiana do extrato pode causar sua interação com o peptidoglicano encontrado na parede celular bacteriana, que usa uma barreira mais frágil na parede celular de bactérias Gram-negativas (Oliveira *et al.*, 2012).

Tabela 2. Atividades antioxidantes ($IC_{50}=\mu\text{g/mL}$) e anti-*Listeria monocytogenes* ($MIC=\mu\text{g/mL}$) dos extratos vegetais das folhas de *S. odoratissima*.

Extratos	DPPH (IC_{50})	ABTS (IC_{50})	Bactéria (MIC)
Hexânico	1550.80	1358.50	1000
Acetato de etila	28.84	30.50	50
Metanólico	19.16	15.95	62.5
Hidroetanólico	21.52	27.55	62.5
Aquoso	3.18	3.81	12.5
BHT (controle positivo)	18.00	18.00	-
Penicilina (controle positivo)	-	-	5.9

4.4 Conclusão

Os resultados deste estudo com as folhas de *S. odoratissima* mostram que os extratos acetato de etila, metanólico, hidroetanólico e aquoso apresentam atividades antioxidantes e anti-*Listeria monocytogenes* promissoras, que podem estar relacionadas aos compostos fenólicos encontrados neles, principalmente flavonoides. Este estudo também revelou o potencial de extratos da espécie *S. odoratissima* como fontes de compostos naturais que podem ser utilizados na produção de embalagens ativas para o controle de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos. Além disso, ensaios antioxidantes mostraram que os extratos mais polares das folhas de *S. odoratissima* podem atuar como sequestradores ou redutores de radicais livres e como inibidores da peroxidação lipídica, fato que pode contribuir para prevenir e mitigar o desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo.

4.5 Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEG, CNPq, CAPES e IF GOIANO – Campus Rio Verde pelo suporte financeiro.

4.6 Referências

- Alves, M. S. M., Mendes, P. C., Vieira, J. G. P., Ozela, E. F., Barbosa, W. L. R., & Júnior, J. O. C. S. (2010). Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 215-221. Doi: 10.1590/S0102-695X2010000200013.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010b). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202-2210. doi: 10.1590/S0100-40422010001000033.
- Andrade, C. A., Peitz, C., Cúnico, M., Carvalho, J. L. S., Abrahão, W. M., Miguel, O. G.,

- Miguel, M. D., & Kerber, V. A. (2005). Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don Leguminosae-Mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(1), 13-15. doi: 10.1590/S0102-695X2005000100004.
- Assis, M. A., Morelli-Amaral, V. F., & Pimenta, F. (2015). Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Fitos*, 9(1), 1-72. doi: 10.5935/2446-4775.20150005.
- Bessa, N. G. F., Borges, J. C. M., Beserra, F. P., Carvalho, R. H. A., Pereira, M. A. B., Fagundes, R., Campos, S. L., & Alves, A. (2013). Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(4), 692-707. doi: 10.1590/S1516-05722013000500010.
- Cardoso, S. M. (2019). Special issue: the antioxidant capacities of natural products. *Molecules*, 24, 492. doi: 10.3390/molecules24030492.
- Costa, J. C. F., & Hoscheid, J. (2018). Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*. *Revista Fitos*, 12(2), 175-185. doi: 10.5935/2446-4775.20180016.
- Fernández, Y. A., Damasceno, J. L., Abrão, F., Silva, T. S., Cândido, A. L. P., Fregonezi, N. F., Resende, F. A., ... Martins, C. H. G. (2018). Antibacterial, preservative, and mutagenic potential of *Copaifera* spp. Oleoresins against causative agents of foodborne diseases. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(12), 790-797. doi: 10.1089/fpd.2018.2478.
- Henriques, S. V. C., & Almeida, S. S. M. S. (2013). Identificação do caráter medicinal da espécie *Curatella americana* por meio das folhas. *Estação Científica*, 3(2), 89-97.
- Isemura, M. (2019). Catechin in human health and disease. *Molecules*, 24, 528. Doi: 10.3390/molecules24030528.
- Jalhan, S., Singh, S., Saini, R., Sethi, N. S., & Jain, U. K. (2017). Various biological activities of coumarin and oxadiazole derivatives. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(7), 38-43. doi: 10.22159/ajpcr.2017.v10i7.18461.
- Kaiser, S., Pavei, C., & Ortega, G. G. (2010). Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(3), 300-309. doi: 10.1590/S0102-695X2010000300003.
- Lima, I. L. P., Scariot, A., Medeiros, M. B., & Sevilha, A. C. (2012). Diversidade e uso de

- plantas do Cerrado em comunidade de raizeiros no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 26(3), 675-684. Doi: 10.1590/S0102-33062012000300017.
- Lima, V. H. M., Almeida, K. C. R., Alves, C. C. F., Rodrigues, M. L., Crotti, A. E. M., Souza, J. M., Ribeiro, A. B., ... & Miranda, M. L. D. (2019). Biological properties of volatile oil from Brazilian brown propolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(2019), 807-810. Doi: 10.1016/j.bjp.2019.07.004.
- Machado, H., Nagem, T. J., Peters, V. M., Fonseca, C. S., & Oliveira, T. T. (2008). Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, 27(1), 33-39.
- Malik, E. M., & Muller, C. E. (2016). Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal Research Reviews*, 36(4), 705-748. doi: 10.1002/med.21391.
- Mariño, P. A., Maldaner, G., Menezes, A. P. S., Reis, R. O., Asta, A. P. D., & Vargas, J. O. (2019). Triagem fitoquímica e dosamento de polifenóis totais e flavonoides em diferentes amostras de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Brazilian Journal of Health Review*, 2(2), 1049-1062.
- Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P., Araújo, E. L., Amorim, E. L. C. (2005). Taninos: uma abordagem da química a biologia. *Química Nova*, 28(5), 892-896. Doi: 0.1590/S0100-40422005000500029.
- Morais, D. V., Moreira, M. M., Silva, F. L., Costa, M. A. P. C., Delerme-Mato, C., Carvalho, C. A. L., & Estevinho, M. L. M. (2019). *Dalbergia ecastaphyllum* leaf extracts: *in vitro* inhibitory potential against enzymes related to metabolic syndrome, inflammation and neurodegenerative diseases. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 41, e46622.
- Oliveira, D. A., Moreira, P. A., Júnior, A. F. M., & Pimenta, M. A. S. (2006). Potencial da biodiversidade da região norte do estado de Minas Gerais. *Unimontes Científica*, 8(1), 23-33.
- Oliveira, M. S., Dors, G. C., Souza-Soares, L. A., & Badiale-Furlong, E. (2007). Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. *Alimentos e Nutrição*, 18(3), 267-275.
- Oliveira, K. A. M., Oliveira, G. V., Batalini, C., Rosalem, J. A., & Ribeiro, L. S. (2012). Atividade antimicrobiana e quantificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de própolis. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 33(2), 211-222. doi: 10.5433/1679-0367.2012v33n2p211.
- Palacios, C. R. F., Thompson, A. M., & Gorostiaga, F. (2019). A past medical history of heart

- failure is associated with less fluid therapy in septic patients. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 31(3), 340-346. doi: 10.5935/0103-507x.20190049.
- Pieri, F. A., José, R. M., Galvão, N. N., Nero, L. A., & Moreira, M. A. S. (2010). Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaíba oil on *Listeria monocytogenes*. *Ciência Rural*, 40(8), 1797-1801. doi: 10.1590/S0103-84782010000800020.
- Rodrigues, I. M. C., Souza Filho, A. P. S., & Ferreira, F. A. (2009). Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha*, 27(3), 507-513. Doi: 10.1590/S0100-83582009000300011.
- Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., & Koblitz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669-682.
- Silva, A. A., Souza, R. R., Silva, K. L., Marques, D. D., & Graebner, I. B. (2019). Identificação dos metabólitos da espécie *Bauhinia acreana* (Fabaceae). *Scientia Naturalis*, 1(5), 83-91.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Alimentos e Nutrição*, 15(1), 71-81.
- Soares, N. P., Santos, P. L., Vieira, V. S., Pimenta, V. S. C., & Araújo, E. G. (2016). Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. *Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer*, 13(24), 991-1010. doi: 10.18677/EnciBio_2016B_094.
- Souza, S. J. O., Ferri, P. H., Fiuza, T. S., Borges, L. L., & Paula, J. R. (2018). Chemical composition and seasonality variability of the *Spiranthera odoratissima* volatile oils leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 28(2018), 16-20. doi: 10.1016/j.bjp.2017.10.010.
- Sousa, M. S. B., Vieira, L. M., & Lima, A. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(3), 202-210. doi: 10.4260/BJFT2011140300024.
- Terezan, A. P., Rossi, R. A., Almeida, R. N. A., Freitas, T. G., Fernandes, J. B., Silva, M. F. G. F., Vieira, P. C., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., & Pirani, J. R. (2010). Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(6), 882-886. doi: 10.1590/S0103-50532010000500016.

5. Conclusão geral

Os dados obtidos a partir dos extratos das folhas de *S. odoratissima* de diferentes polaridades confirmam grande potencial da eficácia terapêutica da planta medicinal trabalhada. Sendo assim este estudo visa o conhecimento científico do “manacá do cerrado”.

Deste modo, firma-se que os dados obtidos a partir da caracterização anatômica das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hill (*Rutaceae*), em conjunto com a prospecção fitoquímica preliminar constituem informações rigorosas que enriquecem a pesquisa permitindo a utilização dos dados em trabalhos futuros, além de promover o conhecimento de novas informações.