

Avaliação fitoquímica, físico-química e atividades antioxidante, hemotóxica e antibacteriana do extrato de *Protium spruceanum* (Benth.) Engl

Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho^{a*}, Mariana Chaves Santos^a,
 Carlos Frederico de Souza Castro^a

^aInstituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brasil

* Autor correspondente (astronomoamadorgoias@gmail.com)

INFO

Keywords

Protium spruceanum
 Screening phytochemical
Escherichia coli;
Staphylococcus aureus

Palavras-chaves

Protium spruceanum
 Prospecção fotoquímica
Escherichia coli
Staphylococcus aureus

ABSTRACT

*Phytochemical, physicochemical evaluation and antioxidant, hemotoxic and antibacterial activities of the extract from Protium spruceanum (Benth.) Engl. Protium spruceanum is one 146 species in the genus Protium. It's considered medicinal plant by the field and scientific population. The objective this study was evaluates the phytochemistry, physicochemical and antioxidant, hemotoxic and antibacterial activities of the hydroethanolic extract from P. spruceanum resin. It's noteworthy the results presented this study, showed numerous phytochemicals class with positive results, soluble solids with 1.15%, refractive index of 1.584, pH of 5.63, relative density of 0.9517 g mL⁻¹ 20 °C, IC₅₀ of 275.14 µg mL⁻¹ of DPPH, total phenolics of 9.96 mg GAE 100 g⁻¹, and yield of 6.61%. Positive hemolytic activity, and in particular, efficiency in antibacterial activity with inhibition halos from 19.13 mm *Staphylococcus aureus*, 14.07 mm *Salmonella typhimurium*, and 17.51 mm *Salmonella enteritidis*, and low inhibition *Escherichia coli* 9.18 mm. The hydroethanolic extract of *Protium spruceanum* resin showed exceptional results as an antioxidant and antibacterial agent.*

RESUMO

*Protium spruceanum é uma das 146 espécies do gênero Protium, considerada como medicinal pela população do campo e no meio científico. O objetivo deste estudo foi avaliar a fitoquímica, físico-química e as atividades antioxidantes, hemotóxica e antibacteriana do extrato hidroetanólico da resina de P. spruceanum. Destaca-se que os resultados apresentados neste estudo apresentaram inúmeras classes fitoquímicas com resultados positivos, sólidos solúveis com 1,15%, índice de refração de 1,584, pH de 5,63, densidade relativa de 0,9517 g mL⁻¹ 20 °C, CI₅₀ de 275,14 µg mL⁻¹ de DPPH, fenólicos totais de 9,96 mg EAG 100 g⁻¹, e rendimento de 6,61%. Atividade hemolítica positiva, em especial, eficiência na atividade antibacteriana com halos de inibição de 19,13 mm para *Staphylococcus aureus*, de 14,07 mm para *Salmonella typhimurium*, e de 17,51 mm para *Salmonella enteritidis*, e baixa inibição para *Escherichia coli* de 9,18 mm. O extrato hidroetanólico da resina de *Protium spruceanum* demonstrou resultados excepcionais como agente antioxidante e antibacteriano.*

Received 09 September 2020; Received in revised from 11 November 2020; Accepted 24 January 2021

INTRODUÇÃO

A família *Burseraceae* é formada exclusivamente por espécies arborícolas e arbustos em áreas tropicais da América do Sul, Malásia e África. O gênero *Protium* Burm. f. apresenta aproximadamente cerca de 146 espécies, deste total, nove são neotropicais. A grande maioria das espécies habita áreas de sub-bosque na floresta úmida primária e em terra firme (Machado et al., 2003; Vieira et al., 2010).

O principal centro de diversidade está no bioma Amazônico onde são identificadas 73 espécies, sendo 42 endêmicas dessa região. A espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler, apresenta porte arbóreo com dossel, ou arbórea secundária, seletiva higrófila e com síndromes de entomofilia e ornitocoria, onde alguns indivíduos foram registrados em estudo apresentando altura de 20 metros. Entre a população, a espécie é conhecida por “breu-branco, amescla, almecegueira ou resina mesca”. O auge das inflorescências são nos meses de setembro a novembro com frutificação entre outubro a março; os frutos são do tipo baga subglobosa, de superfície lisa e brilhante, com coloração avermelhada, contendo de 1 a 2 sementes cinzentas envoltas por arilo fino, carnudo e adocicado. Pode ocorrer deposição de resina na área externa do fruto. Naturalmente, os frutos servem de alimento para pássaros, que promovem a dispersão (zoocórica) (Vieira et al., 2010). De acordo com Vieira e Carvalho (2008), a espécie é utilizada em áreas de reflorestamento heterogêneo destinado a recuperação da vegetação de áreas ciliares degradadas.

P. spruceanum é encontrado além do bioma Amazônico, na Mata Atlântica e no domínio Cerrado principalmente no estado de Goiás. Alguns estudos apresentam diversidade ecológica nos estados de Minas Gerais, algumas áreas dos estados da Bahia, Mato Grosso do Sul e São Paulo, em áreas de florestas tropicais, de matas ciliares, em ambientes ripários e em áreas de brejo (Oliveira Filho; Ratter, 1995; Fajardo et al., 2009). A espécie é aromática, com resina oleosa, que quando encontra o oxigênio do ambiente, cristaliza no tronco apresentando coloração esbranquiçada. A resina apresenta uso fitoterápico no tratamento dos sintomas da gripe, na analgesia, como cicatrizante e expectorante, bem como é utilizada na indústria de vernizes, na calafetagem, e como flavorizante na indústria de perfumaria (Machado et al., 2003).

Os vegetais produzem naturalmente compostos pertencentes aos metabólitos secundários, apresentando inúmeras ações biológicas, sendo amplamente estudados pelas indústrias

farmacêutica, agrícola e de biotecnologia. Os metabólitos secundários apresentam em inúmeros estudos, importantes atividades com valor comercial. O estudo fitoquímico preliminar tem um grande papel para o conhecimento das classes constituintes nas espécies vegetais, onde após a identificação, inicia o processo de extração de determinadas classes de maior interesse (Simões; De Almeida, 2015). A resina é um dos compostos desse metabolismo, apresentando em sua constituição a α - e β -amirinas (Rodrigues et al., 2013), sabineno e β -cariofileno como compostos majoritários nos óleos essenciais das folhas, resina e galhos (Machado et al., 2003). O extrato etanólico dos galhos apresenta importante ação antimicrobiana, testada em 19 isolados de bactérias patogênicas (Amparo et al., 2018).

Inúmeros extratos vegetais apresentam atividade antioxidante na redução de radicais livres como o oxigênio singlete. Pessuto et al. (2009) apresentam que, extratos vegetais ricos em compostos fenólicos demonstram importante atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres e como quelantes de metais. Vários agentes oxidantes agem na depleção de biomoléculas, principalmente no DNA, podendo desencadear vários tipos de cânceres, bem como estão envolvidos nas doenças de Parkinson e Alzheimer (Conde et al., 2017; Lemes et al., 2017; Zimmermann; Kirsten, 2008). Conforme Conde et al. (2017) os agentes antioxidantes podem atuar em múltiplos mecanismos biológicos, em dependência do sistema de reação ou fonte de radicais ou oxidante avaliado.

Outros usos de importância sobre o estudo de extratos vegetais é na ação promotora da inibição do crescimento de fungos, bactérias e vírus que causam sérios problemas tanto nos estudos de espécies vegetais de uso agrícola, como na produção de fitofármacos no tratamento de doenças fúngicas, bacterianas e virais em humanos e animais. Visto que, várias bactérias ao longo dos anos vêm apresentando resistência aos antibióticos comerciais, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (García et al., 2019).

Na busca por novos fitofármacos ativos, vem sendo constantemente estudados como proposta de substituição aos fármacos sintéticos de referência que já não estão apresentando efetiva atividade de inibição. O estudo das espécies vegetais no Brasil, em especial no domínio Cerrado vem como proposta, auxiliar no estudo fitoterápico com alto potencial fitomedicinal encontrado nas inúmeras fitofisionomias desse ambiente natural.

O trabalho teve por objetivo avaliar à

fitoquímica, físico-química e as atividades antioxidantes, hemotóxica e antibacteriana do extrato hidroetanólico da resina de *Protium spruceanum*.

MATERIAL E MÉTODOS

A resina foi coletada nas cascas dos troncos e de raízes descobertas em indivíduos de *P. spruceanum*, com auxílio de uma faca inox. O material foi mantido em frasco plástico hermético resfriado em uma embalagem com isolamento térmico. A coleta foi realizada no mês de abril de 2020 em uma área de mata ciliar localizada no município de Rio Verde – GO, Brasil, nas seguintes coordenadas geográficas: 17°42'59.5''S 50°53'27.3''W. A área de coleta apresenta fitofisionomia de mata ciliar e brejo. A espécie foi identificada pelo MSc^o Biólogo Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho. Uma exsicata foi herborizada e depositada no Herbário do laboratório de Sistemática Vegetal do IF Goiano, Campus Rio Verde, com o seguinte Voucher HRV 1015.

A resina foi triturada em um processador de alimentos, obtendo-se assim um pó fino e homogêneo. O extrato bruto hidroetanólico foi obtido via turbólise na proporção de 40 g do pó para 200 mL de uma solução hidroetanólica 70% (v/v).

O extrato permaneceu em um frasco âmbar em repouso na geladeira por 24 horas a 4 °C, sem presença de luz. Após este período, o extrato foi transferido para um frasco *Erlenmeyer* e submetido a ondas de ultrassom, em banho de ultrassom (Eco-Sonics, Mod. Q3,0/40A), por 30 minutos em local ao abrigo da luz. O extrato foi novamente transferido para o frasco âmbar e armazenado na geladeira a 4 °C por 72 horas. Em seguida, o extrato bruto foi filtrado em papel de filtro. O sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador rotativo à pressão negativa (Fisatom, Mod. 801), até completa eliminação do álcool etílico. Em seguida, foi congelado a -10 °C e posteriormente liofilizado. O extrato em pó foi armazenado em frasco de vidro cor âmbar, identificado e mantido em geladeira a 4 °C até análises conforme descrito por Oliveira et al. (2014).

Foram realizadas análises colorimétricas e de precipitação para as classes de compostos fenólicos, açúcares redutores, não redutores, taninos, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, ácidos orgânicos, catequinas, esteróides e triterpenos, saponinas espumígena e hemolítica, glicosídeos cardiotônicos, duplas olefínicas, benzaquinonas, naftaquinonas e fenantraquinonas,

alcaloides e depsídeos e depsídonas conforme descrito por Menezes Filho e Castro (2019), glicosídeos cianogênicos, conforme descrito por Rodrigues et al. (2009), polissacarídeos, purinas, resinas e sesquiterpenolactonas conforme descrito por Simões e De Almeida (2015).

Os reagentes utilizados para os testes fitoquímicos foram de grau (P.A – ACS) das marcas (Synth, Anidrol, Dinâmica, Sigma-Aldrich, Alphatec, Vetec, Inlab, Cromoline, Neon, Isofar, Proquímicos, Êxodo Científica, Qhemis, Quimex, Impex, LS Chemicals).

Os resultados foram comparados com o grupo controle (branco). Para a intensidade da reação foi utilizado teste de cruzes (+) fraco positivo, (++) moderado positivo e (+++) fortemente positivo, e (-) negativo (Oliveira et al., 2014). A determinação da atividade hemolítica seguiu conforme descrito por Ramos et al. (2020). Em três tubos Falcon cônicos (Sarstedt) de 50 mL, foram acrescidos com 5 mL de solução fisiológica NaCl concentração 0,9% (Arboreto) e três tubos Falcon cônicos como controle positivo contendo água destilada e sangue. O ensaio foi realizado nas seguintes concentrações 50; 100; 150; 250; 500; 750; 1000 µg mL⁻¹ de extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum*. As amostras foram incubadas em temperatura de 25 °C em banho ultratermostatizado (Solab, Mod. SL 152-I) por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Solab, Mod. SL-700) a 3.000 RPM durante 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de ondas em 540 nm em absorbância, utilizando cubeta de quartzo com campo óptico de 1 cm. O percentual hemolítico foi determinado com o Abs do controle positivo como 100%. O porcentual hemolítico foi determinado conforme equação 3, proposta por Dacie et al. (1975).

$$\% \text{Hem} = (\text{Abs}_{\text{amostra}}) * 100 / (\text{Abs}_{\text{controle}})$$

Após o ensaio hemolítico, foram realizadas imagens microscópicas, utilizando microscópio óptico (Global Optics, Mod. NO215B) com objetivas planacromática 4, 10 e 40 X, e câmera acoplada ao microscópio (GX) Full HD 30 FPS. Uma alíquota de 20 µL mL⁻¹ foi adicionado a 150 µL mL⁻¹ do concentrado de hemácias a 5%. O tempo foi avaliado em 5 e 10 minutos. Como controle negativo foi utilizado solução de hemácias a 5% e solução hidroetanólica 70%.

Os parâmetros organolépticos e físico-químicos para sólidos totais e índice de refração (Hanna Instruments, Mod. HI96800), foram avaliados conforme descrito por Domínguez et al. (2019), e López et al. (2019). O pH foi determinado através de um pHmetro digital de

bancada (Lucadena, Mod. 210-P), com uma alíquota de 50 mL de extrato bruto. A densidade relativa foi determinada utilizando um picnômetro de 1 mL, conforme descrito por Alarcón et al. (2019). O resultado foi expresso em g mL^{-1} a 20 °C. Uma varredura foi realizada entre os comprimentos de ondas 200 a 800 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Bel Photonics, Mod. M-51) por absorvância utilizando cubeta de quartzo a partir do extrato bruto 1 mL, afim de descrever as possíveis classes metabólicas presentes conforme descrito por García et al. (2019). O rendimento de extrato seco bruto foi calculado conforme descrito por Alves et al. (2011). Calculado a partir da relação da massa de extrato seco por massa da droga vegetal expresso em porcentagem conforme equação 1 (Balança analítica, Marte, Mod. AW 220).

$$\text{Rend. (\%)} = \left(\frac{\text{g Ext Sec}}{\text{Drog Veg}} \right) * 100 \text{ Eq. [1]}$$

Onde:

g Ext Sec = (g) do extrato seco, g Drog Veg = (g) droga vegetal.

A atividade redutora do radical livre, foi determinada utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH – P.A - ACS) (Sigma-Aldrich), através do método descrito por Conde et al. (2019). Em placa de 96 poços, uma alíquota de 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de amostra do extrato, foi adicionada com 150 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de uma solução etanólica de DPPH (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, foi incubado a 25 °C por 60 minutos. Logo após, a placa foi levada para um espectrofotômetro UV-Vis leitor de microplacas (Polaris, Mod. EE) no comprimento de ondas em 517 nm. Foi utilizada uma solução etanólica de ácido ascórbico (P.A – ACS) (Synth, pureza de 99-100%) como controle positivo para redução do radical DPPH (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A concentração de inibição (CI_{50}) foi determinada através de sucessivas concentrações seriadas da amostra (5 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) através de uma análise de regressão linear. Os resultados foram expressos em porcentagem de redução do radical livre DPPH pelo extrato bruto da resina de *P. spruceanum*, conforme equação 2.

$$\% \text{ Red.} = \frac{A_0 - AE}{A_0} * 100 \text{ Eq. [2]}$$

Onde:

A_0 é a solução etanólica de DPPH; e AE solução hidrotanólica do extrato resinoso + solução de DPPH.

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de *Folin-Ciocalteu* (P.A – ACS) (Sigma-Aldrich, pureza de 98%)

conforme descrito por Fernández et al. (2017). A solução de *Folin-Ciocalteu* foi preparada a partir de 10 mL do reativo, diluído em 100 mL de água destilada. Em seguida, foi preparada uma solução aquosa de carbonado de sódio anidro (P.A – ACS) (Dinâmica, pureza 98-100%) na concentração 7,5% (m/v).

Uma curva padrão foi preparada com 500 mg de ácido gálico (P.A – ACS) (Dinâmica, pureza de 98-100%). Em seguida, foi dissolvido em 20 mL de água destilada. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, completado com água destilada. A partir da solução estoque, em balão volumétrico de 100 mL, alíquotas entre 1 a 5 mL foram transferidas, e em seguida, acrescidas com água destilada. As diluições correspondem as seguintes concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 mg 100 mL^{-1} expresso em equivalente ao ácido gálico (EAG).

Em tubos de ensaios, foram adicionados 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do extrato, com 10 mL da solução aquosa de *Folin-Ciocalteu* e 1,8 mL de água destilada. A solução foi agitada por 10 segundos em *Vortex* (Prolab), e deixada em descanso por 5 minutos em local protegido da luz. Logo após, foi adicionado 8 mL da solução aquosa de carbonado de sódio 7,5%, e em seguida, agitado em *Vortex* por 1 minuto. As amostras foram mantidas em local escuro por 1 hora. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Bel Photonics, Mod. M-51) no comprimento de ondas em 765 nm. O mesmo foi realizado para as soluções da curva padrão.

A atividade antibacteriana foi realizada conforme descrito por Fernández et al. (2017). Foram utilizadas culturas de bactérias dos gêneros *Staphylococcus aureus* ATCC 9891, *Salmonella sorovar Typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella sorovar Enteritidis* ATCC 13076 e *Escherichia coli* ATCC 8739. As bactérias foram doadas pelo banco genético de microorganismos da Universidade Federal de Goiás – UFG, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil. Inicialmente colônias foram suspensas em 50 mL de uma solução aquosa de caldo peptona bacteriológica (PB – Kasvi) em frasco *Erlenmeyer* 125 mL esterilizado. E logo em seguida, incubado a 36 °C, por 48 horas (SolidSteel, Mod. SSD). Após fase de crescimento, alíquotas de 5 mL foram coletadas e distribuídas em placas de *Petri* contendo meio Ágar Contagem de Placas (ACP - Kasvi) esterilizado, e homogeneizadas com auxílio de uma alça de *Drigalski* após flambagem. As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas.

Foram selecionadas cinco colônias coletadas com uma alça de platina flambada, e transferiu-se para *Erlenmeyers* de 125 mL contendo 50 mL de

caldo peptona bacteriológica, em seguida foram incubados entre 35 a 37 °C por 24 a 36 horas em incubadora com agitação orbital a 100 rpm, até obter turbidez adequada conforme a escala 0.5 de McFarland. Após determinação da turbidez ideal, entre 1 a 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹ uma alíquota de 5 mL foi coletada e transferida para placas de *Petri* contendo meio ACP. Em seguida, a solução foi homogeneizada com alça de *Drigalski* após flambagem.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em poços. Na placa de *Petri* foram realizados pequenos poços com 9 mm de diâmetro na superfície do meio. Em cada placa foram realizados 4 poços, onde foi aplicado 100 µL mL⁻¹ para o 1º poço: Ciprofloxacina 500 mg (La Santé), como controle positivo, no 2º poço: Azitromicina 500 mg (Eurofarma), como controle positivo, no 3º poço: água destilada estéril como controle negativo, e no 4º poço: extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum* na concentração de 20% (m/v). Os controles positivos foram diluídos em 50 mL de água destilada estéril na seguinte concentração (500 mg 100 mL⁻¹).

Após a aplicação, as placas foram mantidas por 30 minutos em câmara de fluxo laminar a 25 °C, e em seguida incubadas a 37 °C por 24 a 36 horas. Após este período, a leitura foi realizada utilizando paquímetro digital (Digimess, Mod. 100.174NL, resolução de 0,01 mm/.0005” com erro de 0,001 mm), e o diâmetro do halo da zona de inibição determinado, considerando o diâmetro do orifício.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, seguido de ± desvio padrão. O software estatístico utilizado foi o PAST 3 (versão livre, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resina de *P. spruceanum* foi coletada em 10 indivíduos, apresentando coloração natural branca, sendo produzida nas raízes, tronco e galhos,

exalando aroma natural no ambiente circundante aos indivíduos na área de mata de galeria natural, sendo esta, característica da presença desta espécie. Os indivíduos de *P. spruceanum* coletados neste estudo no mês de abril, coincidiram com o período de frutificação para este ambiente de Cerrado goiano. Já Vieira e Carvalho (2008) descrevem o período de frutificação entre outubro a março para *P. spruceanum*. No estudo de Vieira et al. (2010) os pesquisadores discutem sobre o pico de frutificação ser no mês de novembro coincidindo com o período chuvoso, que aumenta a taxa de germinação.

Na figura 1, está apresentado um indivíduo de *P. spruceanum*, com produção do exsudato (resina) em uma raiz descoberta em ambiente de Cerrado natural.



Figura 1 - (A) Raiz descoberta naturalmente de *P. spruceanum* com exsudato (resina) em cor branca.

A partir do período chuvoso foram obtidas quantidades significativas de resina cerca de 35 g através do processo de escarificação, sendo coletada a partir das raízes descobertas (Figura 1), e dos troncos. Entretanto, a resina pode ser coletada em qualquer período do ano, principalmente na época de chuva, onde o vegetal produz maior conteúdo de exsudato (Figura 1).

Na tabela 1, estão apresentados os parâmetros físico-químicos e bioativos a partir do extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum*.

Tabela 1 - Características físico-químicas e bioativas do extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum*.

Parâmetros	EHR*
Características organolépticas	Líquido marrom cristalino, aromático resinoso, límpido, não oleoso ao tato.
Sólidos solúveis (%)	1,15 ± 0,06
Índice de refração	1,584 ± 0,08
pH	5,63 ± 0,01
Densidade relativa (g mL ⁻¹) 20 °C	0,9517 ± 0,01
DPPH CI ₅₀ (µg mL ⁻¹)	275,14 ± 0,13
Compostos fenólicos totais (mg EAG 100 g ⁻¹)	9,96 ± 0,13
Rendimento de extrato seco (%)	6,61 ± 0,19

*EHR = Extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum*.

As características organolépticas para o extrato bruto hidroetanólico apresentou-se como um líquido marrom cristalino, aromático resinoso, límpido, não oleoso ao tato. O conteúdo de sólidos solúveis totais foi de 1,15% (Tabela 1). Os sólidos solúveis totais representam o conteúdo de material orgânico volátil e inorgânico da solução de extrato. Outros estudos avaliando extratos, em diversas espécies vegetais, como no estudo de López et al. (2019) os pesquisadores encontraram resultado para sólidos totais de 1,03% para 100 mL do extrato aquoso da semente de *Swietenia humilis*.

O extrato de *P. spruceanum* demonstrou ser fracamente ácido com pH de 5,63 (Tabela 1). O pH varia conforme o extrato vegetal de inúmeras plantas. Domínguez et al. (2019) encontraram pH de 6,19 para o extrato etanólico das folhas, e de 6,33 para o extrato dos bulbos de *Allium schoenoprasum*. O pH levemente ácido em extratos, pode estar relacionado a classe de compostos de natureza fenólica (Domínguez et al., 2019). O extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum* apresentou densidade relativa de 0,9517 g mL⁻¹ conforme observa-se na (Tabela 1). O extrato apresentou efetiva e especial atividade antioxidante na redução do radical livre DPPH, com CI₅₀ de 275,14 µg mL⁻¹ (Tabela 1).

Em vários estudos, é possível verificar que extratos vegetais apresentam bons resultados antioxidantes na redução do radical livre, inclusive através do modelo DPPH amplamente avaliado. Comparando com outros extratos vegetais, Conde et al. (2019), avaliaram o extrato etanólico de pimentão (*Capsicum annum*), onde os pesquisadores obtiveram atividade antioxidante com CI₅₀ de 343,00 µg mL⁻¹ na redução do radical DPPH. Os compostos fenólicos totais foram de 9,96 mg EAG 100 g⁻¹ de resina (Tabela 1). O conteúdo de fenólicos totais na resina é considerado baixo, em comparação com os extratos das folhas e galhos como avaliado por Amparo (2016), onde o pesquisador encontrou para os extratos etanólicos das folhas e galhos de *P. spruceanum* resultados de 74,31 e de 103,06 mg EAG 100 g⁻¹.

O rendimento encontrado para o extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum* foi de 6,61% para a resina dos galhos e das raízes descobertas (Tabela 1). Amparo (2016) encontrou rendimento de 16,03% para o extrato bruto etanólico das folhas e para os galhos de 9,60% para *P. spruceanum*. Conforme Sultana et al. (2009), a diferença de rendimento entre os diversos órgãos de um vegetal se deve a sua disponibilidade resultante da variedade da composição química no vegetal, bem como a época de coleta do material biológico.

Na tabela 2, estão apresentados os resultados para fitoquímica a partir do extrato hidroetanólico

da resina de *P. spruceanum*.

Foi observada uma grande quantidade de compostos do metabolismo secundário a partir do extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum*, com resultados positivos.

As provas de reação para os ensaios fitoquímicos realizados no extrato hidroetanólico de *P. spruceanum*, apresentaram resultados positivos para compostos fenólicos, corroborando com o ensaio de compostos fenólicos totais por reativo de *Folin-Ciocalteu* realizado conforme descrito na (Tabela 1), além deste, foram observados resultados positivos para açúcares redutores, taninos, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, ácidos orgânicos, catequinas, esteróides e triterpenos, saponinas hemolíticas, esta, corroborando com o ensaio hemolítico em suspensão de hemácias (Figura 2), para glicosídeos cardíacos e cianogênicos, duplas olefínicas, benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas, alcaloides, depsídeos e depsidonas, purinas, resinas e sesquiterpenolactonas conforme apresentado na (Tabela 2). A triagem fitoquímica demonstrou que o extrato hidroetanólico da resina apresenta inúmeros compostos, em especial, e de grande importância principalmente para a farmacologia.

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum* coletados em área de Cerrado em Rio Verde – Goiás, Brasil.

Metabólitos	Resultados
Compostos fenólicos	+++
Açúcares redutores	++
Açúcares não redutores	-
Taninos	Vd
Flavonoides	+++
Antraquinonas	++
Cumarinas	+
Ácidos orgânicos	+++
Catequinas	++
Esteroides e triterpenos	+++
Saponins espumídica	-
Saponina hemolítica	+++
Glicosídeos cardíacos	+++
Glicosídeos cianogênicos	++
Duplas olefinas	+++
Benzaquinonas, naftaquinonas e fenantraquinonas	++
Alcaloides	+++
Depsídeos e depsidonas	+++
Polissacarídeos	-
Purinas	+++
Resinas	+++
Sesquiterpenolactonas	++

(+++) fortemente positivo, (++) moderadamente positivo, (+) fracamente positivo, (-) negativo. (Vd) taninos catéquicos e (Az) taninos condensados.

Amparo (2016) encontrou para o extrato bruto das folhas e galhos de *P. spruceanum* as seguintes classes de compostos secundários: cumarinas, flavonoides, taninos, terpenóides e ácidos graxos. Estudos fitoquímicos preliminares para o gênero *Protium*, já demonstraram a presença de compostos esteroidais, terpenos (mono- e triterpenos), cumarinas, ligninas, fenilpropanoides e flavonoides (Magalhães et al., 2006; Adfa et al., 2013). Para a espécie de *P. spruceanum* através das análises

em CG-EM e HPLC a partir da análise do extrato dos galhos, foram observados alguns ésteres de ácidos graxos, terpenos, flavonoides e taninos no estudo realizado por Amparo et al. (2018), corroborando com os resultados apresentados neste estudo.

Na figura 2, está apresentada a porcentagem hemolítica do extrato hidroetanólico 70% da resina extraída das cascas do tronco e raiz de *P. spruceanum*.

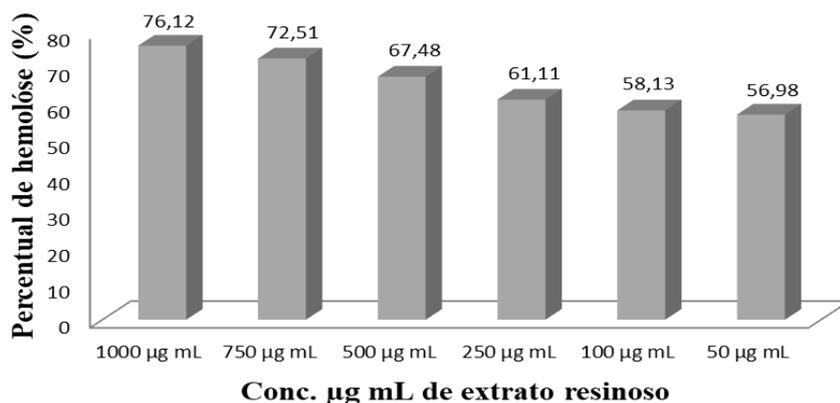
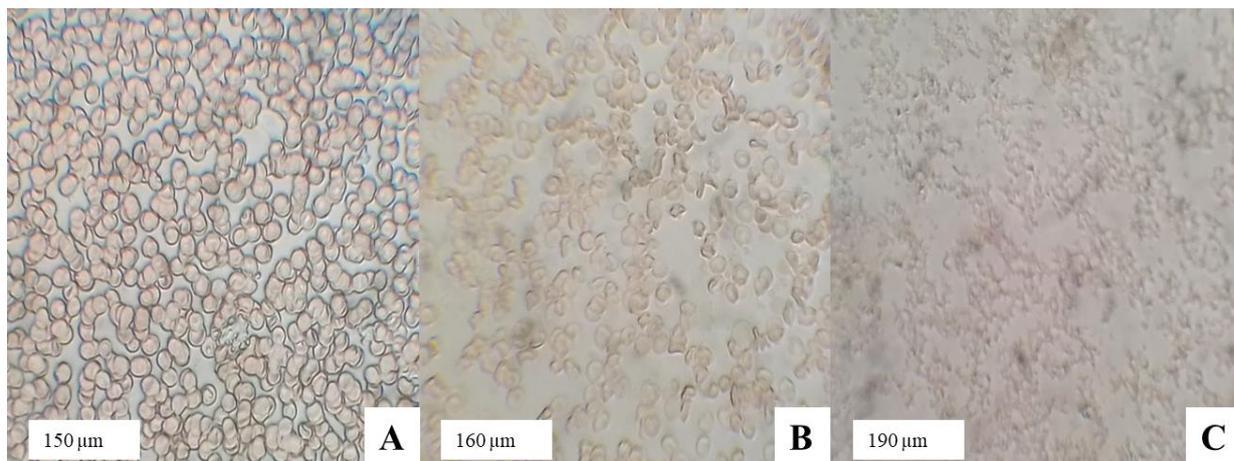


Figura 2 - Percentual hemolítico do extrato resinoso hidroetanólico 70% de *P. spruceanum* em diferentes concentrações expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Conforme se observa na figura 2, o extrato resinoso de *P. spruceanum* apresenta atividade hemolítica considerada alta em todas as concentrações entre 76 a 56%. Devido a falta de dados para cunho comparativo no gênero *Protium*, os resultados deste estudo, foi comparado com outros extratos, como nos estudos de Sousa et al. (2018), onde os pesquisadores observaram atividade hemolítica de 63,88% na maior concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato hidroetanólico 70% das cascas do

caule de *Ziziphus joazeiro*. Conforme Nofiani et al. (2011), e Ramos et al. (2020), processos hemolíticos acima de 40% são considerados altos e inferior a esse valor, considerado baixo.

Na figura 3, estão apresentadas micrografias ópticas do processo de hemólise do tecido hematopoiético em suspenção de eritrócitos humanos a 5% após o período de 5 e 10 minutos da administração do extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum*.



Fonte: Pesquisa, (2020).

Figura 3 – Micrografia óptica da suspensão de eritrócitos humanos a 5% (v/v) em solução salina a 0,85% (m/v). Em (A) concentrado de eritrócitos normocíticos. Em (B) tempo de 5 minutos após adição de 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de extrato resinoso de *P. spruceanum*. Em (C) tempo de 10 minutos após adição de 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de extrato resinoso de *P. spruceanum*.

Como observado na tabela 2, não foram observados a presença de saponinas espumídicas, entretanto, foram observadas também a presença de saponinas hemolíticas conforme se observa na (Figura 3). A ação eritrocitária ocorreu entre 5 a 10 minutos, onde com 10 minutos houve completa hemólise com liberação de hemoglobina no meio extracelular dos eritrócitos. A concentração empregada neste estudo demonstrou apresentar toxicidade no tecido hematopoiético. Conforme Souza et al. (2018), a interação das moléculas com características hemolíticas do extrato, que ocorre com os esteróis constituintes da membrana do eritrócito, leva a formação de poros na membrana, causando a hemólise figura 3 (B) 5 minutos e em (C) 10 minutos.

Posteriormente foi realizada uma varredura por espectrofotometria no UV-Vis para o extrato bruto hidroetanólico da resina de *P. spruceanum* entre os comprimentos de ondas de 300 a 800 nm, como pode ser observado no (Figura 1).

Observam-se no Gráfico 1, bandas nas faixas entre 365 a 424 nm características de absorção de fenóis e cumarinas, em 434 a 462 nm, e entre 467 a 503 nm características da absorção para compostos flavonólicos.

A partir dos resultados anteriores de fitoquímica observados na tabela 2, é possível sugerir através do espectro de varredura entre 800 a 300 nm por absorbância, a presença de compostos do tipo fenólicos, cumarínicos e flavonólicos (Figura 1). Inúmeros trabalhos avaliam por espectroscopia no UV-Vis a través de varreduras sendo possível presumir a presença de determinadas classes fitoquímicas. Outros trabalhos aplicando esta técnica foram descritas por García et al. (2019) onde também encontraram bandas entre 200 a 300 nm correspondente a classe de compostos fenólicos e entre 400 a 500 nm para compostos flavonólicos, avaliando as frações e o extrato aquoso de *Anacardium occidentale*.

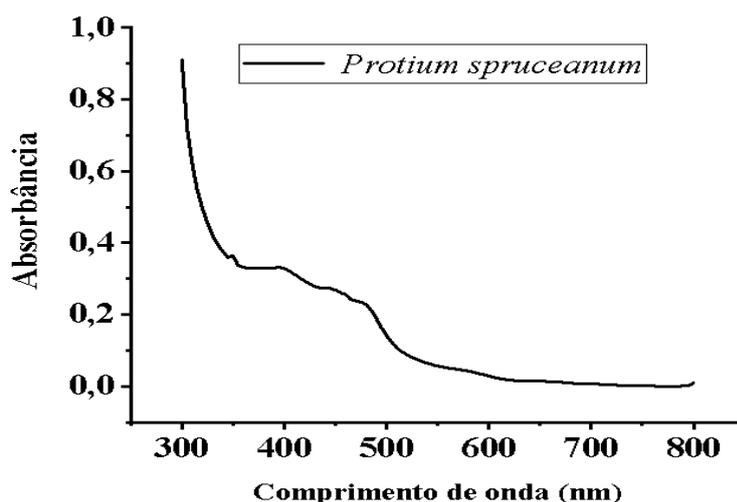


Figura 1 - Espectro de varredura do extrato bruto hidroetanólico de *P. spruceanum*. Fonte: Própria (2020).

Souza et al. (2018) avaliaram o fruto de *Bactris gasipaes* (pupunha) onde encontraram compostos flavonólicos no extrato etanólico da casca com duas bandas entre 260 e 290 nm e em 400 e 490 nm. Já Fuentes et al. (2017), os pesquisadores analisaram por espectroscopia UV-Vis para os extratos da folha, galhos e raízes de *Macroptilium lathyroides* onde encontraram bandas em 375, 384, 386, 390 e 392 nm que evidenciam a presença de compostos cumarínicos, e em 207 nm para

alcalóides. Conforme Bobin et al. (1994), os flavonoides apresentam duas bandas no espectro de absorção UV-Vis em 240 a 280 e 300 a 550 nm

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da atividade de inibição observados pela formação de halo de antibiose para *S. aureus*, *S. sorovar Typhimurium*, *S. sorovar Enteritidis* e *E. coli* sobre o extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum* e comparados aos controles positivos e negativo.

Tabela 3 - Atividade antibacteriana avaliada pela formação de halo de antibiose expresso em (mm) para o extrato de *P. spruceanum* 20% (m/v) frente a *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *E. coli*.

Microrganismos	Diâmetro do halo (mm)
<i>S. aureus</i>	19,13 ± 0,06 mm
<i>S. Typhimurium</i>	14,07 ± 0,12 mm
<i>S. Enteritidis</i>	17,51 ± 0,04 mm
<i>E. coli</i>	9,18 ± 0,08 mm
*Ciprofloxacina	29 ± 0,03 / 27 ± 0,08 / 30 ± 0,09 / 29 ± 0,12 mm
*Azitromicina	27 ± 0,12 / 31 ± 0,06 / 29 ± 0,09 / 28 ± 0,11 mm
Água	+

*Antibióticos de referência na dosagem de 500 mg mL⁻¹, como controles positivos. Os respectivos resultados são apresentados em médias a partir de três repetições expressos em (mm) seguidos de (±) desvio padrão. Cada (/) representa a média do halo de antibiose para cada cepa bacteriana referente ao extrato de *P. spruceanum* e respectivos controles positivos (antibióticos de referência). Controle negativo água (+) para crescimento de todos os isolados bacterianos.

Fonte: Pesquisa (2020).

Conforme se observa na tabela 3, o extrato hidroetanólico da resina de *P. spruceanum* apresentou boa e especial eficiência de inibição através do ensaio de antibiose para *S. aureus*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* com halos superiores a 10 mm. Já para *E. coli*, o isolado bacteriano apresentou baixa sensibilidade ao extrato, apresentando resultado inferior a 10 mm. Possivelmente os compostos agindo por sinergismo não possuem eficiência com alta eficácia para inibir o crescimento desta cepa resistente.

No estudo desenvolvido por Amparo et al. (2018), onde avaliaram o extrato etanólico dos galhos de *P. spruceanum*, os pesquisadores obtiveram importante atividade antibacteriana para *S. aureus* e *S. aureus* MRSA, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* e *S. Enteritidis*. Em outro estudo realizado também por Amparo (2016), o pesquisador encontrou atividade de inibição para o extrato bruto das folhas e galhos de *P. spruceanum*, avaliando isolados de *S. aureus* com halo de inibição igual a 18,52 e 18,89; 18,52 e 18,89; e de 21,03 e 21,65 mm e para *E. coli* de 10,52; 10,17 e de 10,08 mm respectivamente, superiores aos resultados deste estudo. Já para a cepa de *S. Typhimurium* com inibição de 10,12 e de 10,67 mm, e para *S. Enteritidis* de 11,11 e de 13,50 mm, os resultados foram inferiores ao teste de antibiograma deste estudo, que demonstraram maior sensibilidade pelo extrato hidroetanólico da resina dos galhos e raízes.

Outra espécie do gênero *Protium*, o *Protium heptaphyllum* apresentou em estudo, atividade antimicrobiana para fungos dos gêneros *Candida*, isolado *C. krusei* e para *Cryptococcus*, isolado *C. neoformans* e para a bactéria do gênero *Staphylococcus*, isolado de *S. aureus* através do extrato etanólico da casca da mesma espécie vegetal (Violante et al., 2012). Já no estudo de Suárez et al. (2007), os investigadores avaliaram a espécie *Protium neglectum* endêmica na Venezuela, onde o

óleo essencial extraído da resina apresentou atividade bactericida para cepas de *Bacillus subtilis* e *S. aureus*.

De acordo com Matikainen et al. (2015), Wang et al. (2015), Alves et al. (2014), Aderogba et al. (2013) e Johann et al. (2007), a excepcional atividade antimicrobiana apresentada para *P. spruceanum*, está relacionada aos compostos linoleato de metila, amirina, catequina, procianidina e quercetina.

Comparando com outros extratos vegetais na literatura, Fuentes et al. (2017) encontraram excepcional atividade antibacteriana em extratos a 20% das folhas, galhos e raízes de *M. lathyroides*. Os pesquisadores observaram halos de inibição de 8 e 11 mm *S. aureus* e de 8 e 14 mm para *E. coli* nos extratos das folhas (tintura e seca), e de 8 a 10 *S. aureus* e de 9 e 11 mm para *E. coli* mm nos extratos dos galhos (tintura e seca), e de 8 a 11mm *S. aureus* e de 8 e 15 mm *E. coli* para os extratos das raízes (tintura e seca). Não foi observada inibição para o isolado de *Pseudomonas aeruginosa* em nenhum dos extratos avaliados pelos pesquisadores. Como controle positivo foi utilizado ciprofloxacina e gentamicina com inibição de 24, 27 e 14 mm para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

CONCLUSÕES

O extrato hidroetanólico da resina extraída das raízes descobertas e do tronco de indivíduos de *Protium spruceanum* apresentam importantes resultados, tanto para as avaliações fitoquímicas, físico-químicas em especial para atividade antioxidante na redução do modelo de radical livre DPPH, bem como, no ensaio de antibiograma realizado para as quatro estirpes bacterianas resistentes a antibióticos.

Trabalhos futuros deverão ser realizados avaliando as mesmas características, bem como determinar a capacidade de inibição mínima

(CIM) das bactérias, e testar sobre alguns isolados fúngicos que causam sérios problemas de saúde pública como o gênero *Candida*, bem como, cepas fitopatológicas que causam perdas agrícolas anualmente em plantações pelo mundo.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde; aos laboratórios de Química Tecnológica, Águas e Efluentes, Bioensaios e Biomoléculas, Sistemática Vegetal, Materiais e Eletroanalítica, e de Fisiologia Vegetal; ao Herbário do IF Goiano; a Central Analítica Multi-Usuário – CEMA; aos órgãos de fomento em pesquisa, CAPES, CNPq e FINEP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aderogba MA, Ndhala AR, Rengasamy KRR, Van Staden J. Antimicrobial and selected *in vitro* enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthi*. *Molecules*, v. 18, n. 10, p. 12633-12644, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules181012633>
- Adfa M, Hattori Y, Ninomiya M, Funahashi Y, Yoshimura T, Koketsu M. Chemical constituents of Indonesian plant *Protium javanicum* Burm. f. and their antifeedant activities against *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Journal Natural Product Research*, v. 27, n. 3, 270-273, 2013. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.665917>
- Alarcón MET, Conde CG, Méndez GL. Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill. *Revista Cubana de Farmacia*, 52(1), p. e266, 2019. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenL.cgi?IDARTICULO=93927>
- Alves MM, Pereira AMS, Pereira PS, França SC, Bertoni BW. Caracterização química de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada. *Scientia Plena*, v. 7, n. 12, p. 9901, 2011. <https://scientiaplenu.emnuvens.com.br/sp/article/view/159>
- Alves CT, Ferreira ICFR, Barros L, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future Microbiology*, v. 9, p. 139-146, 2014. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.147>
- Amparo TR. Análise fitoquímica e Bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler. 2016. 151 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.
- Amparo TR, Rodrigues IV, Seibert JB, Souza RHZ, De Oliveira AR, Cabral VAR, Vieira PMA, Brandão GC, Okuma AA, Filho SAV, Teixeira LFM, De Souza GHB. Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. *Natural Product Research*, v. 32, n. 16, p. 1951-1954, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1354182>
- Bobin MF, Raymond M, Martini MC. UVA/UVB absorption properties of natural products. *Cosmetic and Toiletries*, v. 109, n. 11, p. 63-70, 1994.
- Conde CG, Alarcón MET, Parajo NP, Llamas EG, Méndez GL. Caracterización química y determinación de la actividad antioxidante de la pulpa de *Tamarindus indica* L. (tamarindo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 22, n. 2, 2017. <http://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/509>
- Conde CG, Pajaro NP, Méndez GL. Actividad antioxidante y contenido fenólico del extracto etanólico de *Capsicum annum* L. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 52, n. 2, p. e78, 2019. <http://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/78>
- Conde CG, Guardo KPT, Llamas EG, Pájaro-Castro NP, Milano YG. Caracterización química y evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa de *Passiflora edulis* Sims. (gulupa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 22, n. 2, 2017. <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/513>
- Dacie JV, Lewis SM, Catovsky D. Blood cell cytochemistry and supplementary techniques. *Practical Hematology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 120-148 p. 1975.
- Domínguez OGP, Pesantes KEB, Martínez MM, Gaitén YG. Estudio químico y evaluación biológica del extracto etanólico de *Allium schoenoprasum* L. Regel & Tiling (Cebollín). *Revista Cubana de Farmacia*, v. 52, n.1, p. e98, 2019. <http://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/98>
- Farjado CG, Vieira FA, Morais FM, Maracajá PB, De Carvalho D. Polimorfismo de isoenzimas em *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (Burseraceae) com base para estudos de diversidade genética. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 4 n. 4, p. 27-32, 2009. <https://editoraverde.org/gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/viewFile/213/213>
- Fernández MC, Fárez DLA, Roblez NCC, Hernández IM, Galván DSM, Rubio OC. Composición química y actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las partes aéreas de *Minthostachys mollis* Griseb. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 51, n. 2, 2017. <http://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/221>
- Flores López ZY, Díaz APC, Santos EHQ, Gaitén YG, Olivet ES, Cuellar AC. Características fitoquímicas y toxicológicas de la semilla *Swietenia humilis* Zuccarini y su efecto hipoglucemiante. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 52, n. 1, p. e129, 2019. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=93929>
- Fuentes JTL, Fuentes DP, Herrera GC. Actividad antibacteriana in vitro de los extractos y de las tinturas al 20% de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urban (maribari). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 22, n. 4, 2017. <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/627>
- García, J. H. G., Naranjo, B. D. C., Salazar, M. T. J., & Serna, D. M. O. (2019). Actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de diferente polaridad de *Anacardium occidentale*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 24(2), e677.

- <http://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/677>
- Johann S, Soldi C, Lyon JP, Pizzolatti MG, Resende MA. Antifungal activity of the amyriin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 148-153, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02162.x>
- Lemes EO, Fernandes MMC, Rosa VP, Nascimento AH. Levantamento da utilização do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) como agente antioxidante na prevenção de doenças neurodegenerativas. *Uniciências*, v. 21, n. 2, p. 110-114, 2017. <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2017v21n2p110-114>
- Machado LB, Zoghbi MGB, Andrade EHA. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 18, n. 4, p. 339-341, 2003.
- Magalhães A, Zoghbi MDGB, Siani, AC. 5-Methoxypropacin, a novel coumarinolignoid from *Protium unifoliolatum*. *Journal Natural Product Research*, v. 20, n. 1, p. 43-46, 2006. <https://doi.org/10.1080/14786410500055555>
- Menezes Filho ACP, Castro CFS. Análise fitoquímica preliminar de extratos foliares de Orchidaceas (*Cattleya walkeriana* Gardner.), (*Encyclia linearifolioides* Kraenzl.) e (*Polystachya concreta* (Jacq.) Garay & H. R. Sweet). *Ensaios e Ciências*, v. 23, n. 1, p. 16-23, 2019. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2019v23n1p16-23>
- Matikainen J, Lehtinen M, Pelttari E, Elo H. Toxicity of fatty acid autoxidation products: highest anti-microbial toxicity in the initial oxidative phase. *Molecules*, v. 20, n. 1, p. 35-42, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20010035>
- Nofiani R, Kurniadi R, Ardiningsih P. Antimicrobial, antioxidant, hemolytic activities and toxicity of ethyl acetate extract from an unidentified coral-associated Fungus, *Aspergillus brevipes* RK06. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, v. 2, n. 2, p. 212-216, 2011. <http://dx.doi.org/10.14499/indonesianjancanchemprev2iss2p212-216>
- Oliveira AKM, Pereira KCL, Muller JAI, Matias R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. *Horticultura Brasileira*, v. 32, p. 41-47, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362014000100007>
- Oliveira Filho AT, Ratter JA. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of the plant species distribution. *Edinburgh Journal of Botany*, v. 52, n. 2, p. 141-194, 1995.
- Pessuto MB, Da Costa IC, De Souza AB, Nicoli FM, De Mello JCP, Petereit F, Luftmann H. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200027>
- Ramos RM, Feitosa JM, Lima VS, Santos RC, De Oliveira AM, Soares LAL, Da Silva GC. Estudo comparativo da composição fitoquímica, citotoxicidade e potências antioxidante e fotoprotetora da casca e folha de *Erythrina velutina*. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 6, p. 33140-33158, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-026>
- Rodrigues IMC, Souza Filho APS, Ferreira FA. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Revista Planta Daninha*, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000300011>
- Simões RC, De Almeida SSMS. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). *Biota Amazônia*, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n1p27-31>
- Souza BAS, Souza FBS, Prado AF, Almeida LD, Amarante CB. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais da Amazônia. *In: 58º Congresso Brasileiro de Química*, São Luís-MA, 6 a 9 de novembro de 2018, 2018.
- Sousa IJO, Silva MCP, Leopoldino GL, Agostinho LS. Estudo fitoquímico, avaliação da capacidade hemolítica e antimicrobiana de um extrato bruto da casca do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 14, n. 4, p. 208-225, 2018. <http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/view/3496>
- Suaréz AI, Compagnone RS, Acosta D, Vásquez L, Diaz B, Canelón DJ. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from oleoresins of *Protium neglectum*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 10, n. 1, p. 70-75, 2007. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2007.10643521>
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, v. 14, p. 2167-2180, 2009. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>
- Vieira FA, Appolinário V, Fajardo CG, De Carvalho D. Reproductive biology of *Protium spruceanum* (Burseraceae), a dominant dioecious tree in vegetation corridors in Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, v. 33, n. 4, p. 711-715, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000400018>
- Vieira FA, Carvalho D. Genetic structure of na insect-pollinated and Bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implication for conservation. *Biodiversity and Conservation*, v. 17, p. 2305-2321, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9367-7>
- Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, Garcez FR. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1302-1308, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400009>
- Zimmermann AM, Kirsten VR. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: Uma abordagem clínica. *Revista Eletrônica Disciplinarum Scientia, Ciências da Saúde*, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2008. <https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/view/934>
- Wang C-M, Hsu Y-M, Jhan Y-L, Tsai S-J, Lin S-X, Su C-H, Chou C-H. Structure elucidation of procyanidins isolated from *Rhododendron formosanum* and their anti-oxidative and anti-bacterial activities. *Molecules*, v. 20, n. 7, p.

12787-12803, 2015.
<https://doi.org/10.3390/molecules200712787>