

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

PÂMELA SAVI MONDO

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO
EXTRATO
BRUTO E VOLÁTIL DAS FOLHAS DE *Echinodorus
macrophyllus***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2021**

PÂMELA SAVI MONDO

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO E VOLÁTIL DAS
FOLHAS DE *Echinodorus*
*macrophyllus***

**ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE
CRUDE AND VOLATILE EXTRACT OF *Echinodorus macrophyllus*
LEAVES**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

**Pato Branco
2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE
TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



BACHARELADO

TERMO DE APROVAÇÃO

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO E VOLÁTIL DAS FOLHAS DE *Echinodorus macrophyllus*

POR

PÂMELA SAVI MONDO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 29/11/2021 às 15:00 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof . Dr . Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Orientadora

Cleidiane Da Silva

Membro da banca

Marina Daltoé

Membro da banca

Dedico aos meus pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aos meus pais, sem eles nada disso teria se concretizado. Eles que sonharam comigo e hoje vibram a minha conquista que também é deles. Enfrentamos muitos obstáculos durante essa trajetória mas nunca faltou amor e compreensão.

Ao meu querido Gustavo, o qual me manteve de pé principalmente nesta reta final onde a vontade de desistir era enorme. Enxugou minhas lágrimas, me abraçou quando precisei, me ajudou em muitos momentos e principalmente vibrou comigo a conquista. Essa conquista também é sua.

Aos meus amigos(as) Bruno Henrique Fontoura, Renata Patrini Lava DalPiva, Thais Giroto Maffessoni que me fortaleceram, estenderam a mão em situações que eu precisei. Meu imenso agradecimento a cada palavra de esforço que veio de vocês e a cada abraço, contem sempre comigo.

A minha orientadora professora Tatiane, que em primeiro lugar confiou em mim a realização do trabalho, foi a calma quando tudo parecia desandar, e soube com muita maestria repassar um pouco do seu conhecimento sobre esse mundo das plantas. Também agradecer a Cleidiane, pois esteve presente desde a coleta das folhas, realização das análises e por fim como banca, podendo contribuir muito com o trabalho.

A equipe da Central de análises, Ana Paula Bilck e Anna Paula Simon pelo apoio na realização dos ensaios e paciência que tiveram comigo e também a equipe da Universidade Unochapecó, professora Michelli Zanetti e Thais Karoline Carniel, pela dedicação na realização dos ensaios propostos.

Por fim, meu agradecimento a toda equipe de professores da UTFPR que tive o prazer de ter contato durante esses anos, aos orientadores de IC que agregaram em meu currículo e meu entendimento sobre algumas coisas tanto no âmbito pessoal como profissional.

RESUMO

MONDO, Pâmela Savi. Atividade antioxidante e caracterização química do extrato bruto e volátil das folhas de *Echinodorus macrophyllus*. 2021. 48 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2021.

O Brasil é detentor de uma vasta biodiversidade, onde muitas plantas nativas são usadas empiricamente sem amparo científico na medicina popular. Dentre estas plantas, destaca-se a *Echinodorus macrophyllus*, conhecida popularmente como chapéu-de-couro, sendo esta, muito utilizada para tratamentos de doenças renais e estomacais. Com o objetivo de aprofundar estudos sobre esta planta pouco relatada na literatura e confirmar suas profilaxias, neste estudo foram realizados os ensaios para determinar a composição química dos extratos fixo e volátil das folhas de *E. macrophyllus* utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa. Ainda, o extrato fixo foi avaliado quanto ao seu potencial antioxidante, por meio de métodos de sequestro de radicais sintéticos e métodos de redução, e potencial antimicrobiano frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos demonstraram um bom potencial antioxidante, destacando-se o ensaio de redução do ferro (FRAP), que apresentou um teor de $382,53\text{mg FeSO}_4\text{ g}^{-1}$ de folhas enquanto que para o método ABTS obteve-se um valor de $159,30\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de folhas. Até o presente momento não há relatos sobre o ensaio ABTS em nenhuma planta do gênero *Echinodorus*, destacando desta forma a importância e relevância deste trabalho. A análise por CLAE confirmou a presença do ácido clorogênico e, por comparação dos perfis de absorção e tempo de retenção com trabalhos da literatura, a presença dos compostos isoorientina, swertiajaponin e vitexina-2-O-raminosideo. No extrato volátil foram identificados os compostos fitol e sphenatulenol, que são reconhecidos por suas atividades biológicas. A análise da atividade antimicrobiana do extrato bruto não apresentou potencial inibitório frente aos microrganismos testados.

Palavras chave: Atividade antimicrobiana. Ácido clorogênico. Fitol. Sphenatulenol.

ABSTRACT

MONDO, Pâmela Savi. Antioxidant activity and chemical characterization of the crude and volatile extract of *Echinodorus macrophyllus* leaves. 2021. 48 f. Course completion work (Bachelor of Chemistry) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2021.

Brazil holds a vast biodiversity, where many native plants are used empirically without scientific support in popular medicine. Among these plants, *Echinodorus macrophyllus* stands out, popularly known as leather hat, which is widely used to treat kidney and stomach diseases. In order to deepen studies on this plant little reported in the literature and confirm its prophylaxis, in this study, tests were carried out to determine the chemical composition of the fixed and volatile extracts of *E. macrophyllus* leaves using the techniques of high-performance liquid chromatography and gas chromatography coupled with mass spectroscopy. Still, the fixed extract was evaluated for its antioxidant potential, through synthetic radical scavenging methods and reduction methods, and antimicrobial potential against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* microorganisms. The results obtained showed a good antioxidant potential, highlighting the iron reduction assay (FRAP), which presented a content of 382.53mg FeSO₄ g⁻¹ of leaves, while the ABTS method obtained a value of 159, 30µmol ET g⁻¹ of leaves. So far there are no reports on the ABTS test in any plant of the genus *Echinodorus*, thus highlighting the importance and relevance of this work. HPLC analysis confirmed the presence of chlorogenic acid and, by comparing the absorption profiles and retention time with studies in the literature, the presence of the compounds isoorientin, swertiajaponin and vitexin-2-O-rhamnoside. In the volatile extract, the compounds phytol and spathulenol were identified, which are recognized for their biological activities. The analysis of the antimicrobial activity of the crude extract did not show inhibitory potential against the tested microorganisms.

Keywords: Antimicrobial activity. Chlorogenic acid. Phytol. Spathulenol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Echinodorus macrophyllus</i> a) hábito; b) folha; c) flor; d) fruto	18
Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i>	19
Figura 3 - Estrutura química do estigmasterol e β -sistoterol.	20
Figura 4 - Estrutura química das chapecoderinas A, B e C	21
Figura 5 - Estrutura química da echinodolina A.	21
Figura 6 - Estrutura química das echinofilinas A e B.	22
Figura 7 - Reação entre o radical estável (DPPH•) e um agente antioxidante	24
Figura 8 - Formação do radical ABTS na presença de persulfato de potássio e redução por um agente antirradicalar.	24
Figura 9 - Redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um agente antioxidante (AOH).	25
Figura 10 - Reação do ácido gálico reduzindo o Molibdênio (Mo) em meio alcalino.	26
Figura 11 - Amostra de <i>Echinodorus macrophyllus</i> a) frutos b) flores secas c) flores d) folha.	27
Figura 12 - Procedimento para atividade antibacteriana por difusão em meio sólido a partir de orifício	31
Figura 13 - Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o extrato bruto com inóculo 10^8 UFC·mL ⁻¹ : (a) <i>Escherichia coli</i> (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figura 14 - Cromatograma do óleo essencial da <i>Echinodorus macrophyllus</i>	38
Figura 15 - Comparação dos espectros de massa da biblioteca (vermelho) com espectros de massa obtidos da amostra (azul) a) fitol e b) spathulenol.	40
Figura 16 - Estrutura química do fitol	41
Figura 17 - Estrutura química do spathulenol	41
Figura 18 - Cromatograma dos padrões na concentração de 50 mg L ⁻¹ .	43
Figura 19 - Cromatograma da amostra na concentração de 5 ppm e perfil de absorção do ácido clorogênico.	44
Figura 20 - Cromatograma e perfis de absorção dos picos não identificados	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação dos constituintes do óleo essencial de *E. macrophyllum* por CG-EM. 39

Tabela 2 - Dados comparativa sobre a identificação de compostos fenólicos em extratos de *E. scaber* e *E. grandiflorus* referenciais com dados sobre *E. macrophyllum* 45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 GERAL	15
2.2 ESPECÍFICOS	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	16
3.2 <i>Echinodorus macrophyllus</i>	16
3.2.1. Aspectos Morfológicos	17
3.2.2. Distribuição Geográfica	18
3.2.3. Propriedades Medicinais	19
3.2.4. Composição Química Da Espécie	20
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 MATERIAL VEGETAL	27
4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO	28
4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	28
4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	28
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS ^{•+}	29
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH [•]	29
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)	30
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO	30
4.9 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS	32
4.10 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO	36

5.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	38
5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS	42
6. CONCLUSÃO	47
REFERENCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A história da evolução do homem foi marcada pela luta de sua sobrevivência, tanto quanto indivíduo como espécie. A busca por suprir suas necessidades básicas e assim garantir uma maior qualidade de vida para si e para sua prole, foi fundamental para sobrevivência da espécie, como certamente contribuiu para a construção do conhecimento sobre a natureza que o cercava. Tal conhecimento originou-se por meio da casualidade, tentativas e observações, métricas pertencentes ao empirismo. A origem do conhecimento do homem sobre as qualidades das plantas e seu uso confunde-se com sua própria história (ALMEIDA, 2011).

A utilização das plantas como base da dieta dos seres humanos é datada desde o início da espécie, porém aos poucos, designamos funções além de nutritivas para elas, como matéria prima para roupas, ferramentas, objetos para rituais, instrumentos musicais, moeda de troca e entre outros. A observação empírica dos aspectos inerente de cada planta, como modificação morfológica e pigmentar ao longo das estações do ano, crescimento, resistência a condições climáticas, ingestão por outros animais, poder de regeneração e outros podem ter contribuído, de forma decisiva, para utilização das mesmas em rituais de cura. Em função disso, praticamente toda a história da cura encontra-se intimamente ligada às plantas e seus efeitos no corpo humano.

No Brasil, o uso de plantas com intuito de cura era comum para os índios, porém seu uso foi intensificado com os conhecimentos adquiridos com a vinda dos europeus colonizadores, permitindo desta forma o desenvolvimento da fitoterapia. Inicialmente a utilização das plantas se dava de forma artesanal e rudimentar, com o passar do tempo e com conhecimentos adquiridos, foi possível o aprimoramento de métodos para melhor aproveitamento das plantas (BRAGA, 2011).

A maior parte das plantas nativas brasileiras ainda são usadas empiricamente sem amparo científico quanto à eficácia e segurança, por falta de estudos mais aprofundados. Isso demonstra uma lacuna entre a oferta de plantas e poucas pesquisas desenvolvidas no Brasil, já que o mesmo possui uma enorme biodiversidade (FOGLIO et al., 2006).

Dentre as plantas utilizadas empiricamente, destaca-se a *Echinodorus macrophyllus*, conhecida popularmente como chapéu-de-couro, indicada para o

tratamento de infecções urinárias, rins, problemas estomacais entre outras afecções (VEIGA; RO; VEIGA, 2012). Além disso, suas folhas são tradicionalmente utilizadas devido suas propriedades hipotensivas e hiperlipidêmicas (SANTOS et al., 2017).

O gênero *Echinodorus* é constituído por plantas aquáticas e pantaneiras, sendo encontradas em áreas alagadas da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. O autor SILVA (2014) cita que poucos estudos fitoquímicos sobre a espécie foram realizados até o presente, entretanto já foram identificados alcaloides, glicídeos, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos. Comprovou-se a atividade diurética, anti-inflamatória e antinecrótica tumoral de extratos das folhas de *E. grandiflorus* (PRANDO et al., 2016). Assim como confirmou-se a atividade anti-inflamatória no extratos das folhas de *E. macrophyllus* (DA SILVA et al., 2016). Estas informações revelam evidencias científicas essenciais para o apoio do uso destas plantas.

Devido as suas propriedades medicinais, a *Echinodorus macrophyllus* tornou-se matéria prima para desenvolvimento de refrigerante, possuindo um sabor único extraído de uma erva tipicamente brasileira. A empresa ainda afirma que seu produto possui baixíssimo teor de sódio, o que torna seu produto ainda mais atraente.

Outra propriedade interessante de estudo atualmente tem sido a atividade antioxidante de plantas, onde são utilizados tanto na prevenção quanto tratamento de doenças. Os antioxidantes podem ser definidos como moléculas capazes de diminuir ou até mesmo prevenir a oxidação de outras moléculas e podem atuar em alimentos ou em sistemas biológicos (BOROSKI et al, 2015). Existem diferentes métodos para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, onde o método mais utilizado consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH (SOUSA et al., 2007). O método DPPH, juntamente com as metodologias de FRAP, ABTS e ORAC auxiliam na determinação da capacidade antioxidante *in vitro*. Até o presente momento não se tem estudos sobre a atividade antioxidante na espécie *E. macrophyllus*.

É de suma importância obter informações sobre a composição química da *Echinodorus macrophyllus* para aprimorar sua utilização e melhor compreender sua ação terapêutica. Para isso, é necessária a realização de uma caracterização completa, a fim de determinar quais são os marcadores químicos da planta, para

assim, estabelecer os padrões encontrados na *E. macrophyllus*.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é determinar a composição química do extrato fixo e volátil das folhas de *E. macrophyllus* utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa, além de avaliar a atividade antioxidante por meio de métodos de sequestro de radicais sintéticos e métodos de redução e a atividade antibacteriana.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinação da composição química do extrato hidroalcoólico e volátil das folhas de *E. macrophyllus* utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa, além de avaliar a atividade antioxidante por meio de métodos de sequestro de radicais sintéticos, métodos de redução e teor de compostos fenólicos, bem como, avaliar a atividade antimicrobiana do extrato.

2.2 ESPECÍFICOS

Para atender ao objetivo central desta pesquisa são estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Determinação do teor de compostos fenólicos totais e individuais do extrato hidroalcoólico por meio das técnicas de espectroscopia de absorção molecular e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) respectivamente;
- Determinação de composição química volátil por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada espectroscopia de massas (CG-EM);
- Determinação do potencial antioxidante pelo método de sequestro do 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH•) e redução do cátion radical 2,2'-azo-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS•+);
- Determinação do potencial de redução de Fe^{+3} a Fe^{+2} pelo método de redução do ferro (FRAP);
- Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em meio sólido a partir de orifício com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O homem buscou, desde os tempos primórdios, recursos oriundos da natureza com a finalidade de aumentar suas chances de sobrevivência, assim fez uso de plantas como alimento, matéria-prima para confecção de roupas e ferramentas (LORENZI, 2008). Atualmente, utiliza plantas com fins medicinais tanto para tratamento, cura ou ainda a prevenção de doenças, sendo essa prática considerada uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade (VEIGA,2005).

Os primeiros registros de uso de plantas com princípio de cura em seu mais amplo significado datam do período 2838 à 2698 da era cristã. Foi quando o imperador chinês Shen Nung catalogou cerca de 365 ervas medicinais e venenosas que eram usados sob inspiração taoísta de Pan Ki, entre elas a Efedra (*Ephedra sinica*), que só entrou na terapêutica dos povos de cultura ocidental já no final do século XIX. Outros registros foram encontrados nos manuscritos Egípcios, de 1500 antes da era cristã, no qual foram relatadas informações sobre 811 prescrições e 700 drogas sendo algumas delas ainda utilizadas, como Ginseng (*Panax spp.*), *Ephedra spp.*, *Cassia spp.* e *Rheum palmatum* L. (FIRMO et al., 1986).

Ao chegar ao Brasil, os europeus observaram uma ampla variedade de plantas medicinais utilizadas pelas inúmeras tribos que aqui viviam. Os conhecimentos foram repassados pelos pajés e seus usos foram transmitidos e aprimorados com o passar das gerações (LORENZI, 2008). Além dos europeus, os africanos também contribuíram para essa gama de conhecimentos, já que utilizavam as ervas para a cura de doenças e em seus rituais religiosos (BRAGA, 2011).

A busca por hábitos mais saudáveis associado com as dificuldades encontradas para o tratamento de doenças específicas faz com que a utilização de plantas medicinais se torne ainda mais popular (SOUZA-MOREIRA, 2010). O crescimento na área provocou um aumento na taxa de publicações para o desenvolvimento de novas drogas por parte de instituições privadas ou governamentais (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

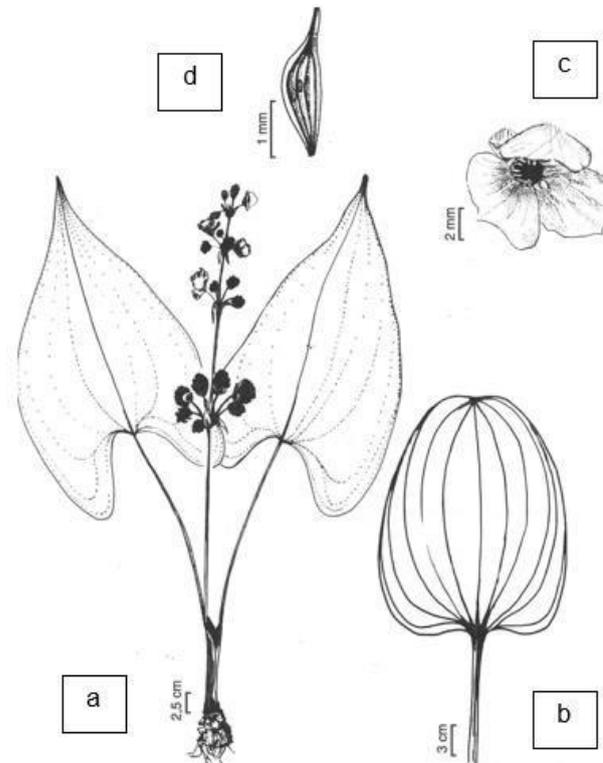
3.2 *Echinodorus macrophyllus*

3.2.1. Aspectos Morfológicos

A *Echinodorus macrophyllus* é uma espécie nativa brasileira, a qual pertence à família das Alismataceae, que possui aproximadamente 14 gêneros e 60 espécies. Uma característica sobre a família Alismataceae é a ocorrência em áreas alagadas, pantanosas e sombreadas. Como suas folhas são largas e lisas, passam a sensação de folhas artificiais e são utilizadas como plantas ornamentais (LEITE et al., 2007). Fazem parte do gênero *Echinodorus* plantas aquáticas e pantaneiras que crescem submergidas, mas as folhas são sempre emersas, denominadas como halófitas (SILVA, 2010).

As folhas dessa espécie (Figura 1b) são classificadas como pecioladas, oval, de coloração verde-escura, medem aproximadamente entre 20 a 40 cm de comprimento e largura possuem entre 15 a 35 cm na região próxima da base. Devido ao formato da folha lembrar os chapéus que eram utilizados no nordeste brasileiro, a planta recebeu o nome popular de “chapéu-de-couro” (BEVILAQUA, 2003). A espécie possui flores brancas (Figura 1c), as quais são reunidas em inflorescências paniculadas amplas, ficando dispostas acima da folhagem (LORENZI, 2008).

Figura 1 - *Echinodorus macrophyllus* a) hábito; b) folha; c) flor; d) fruto



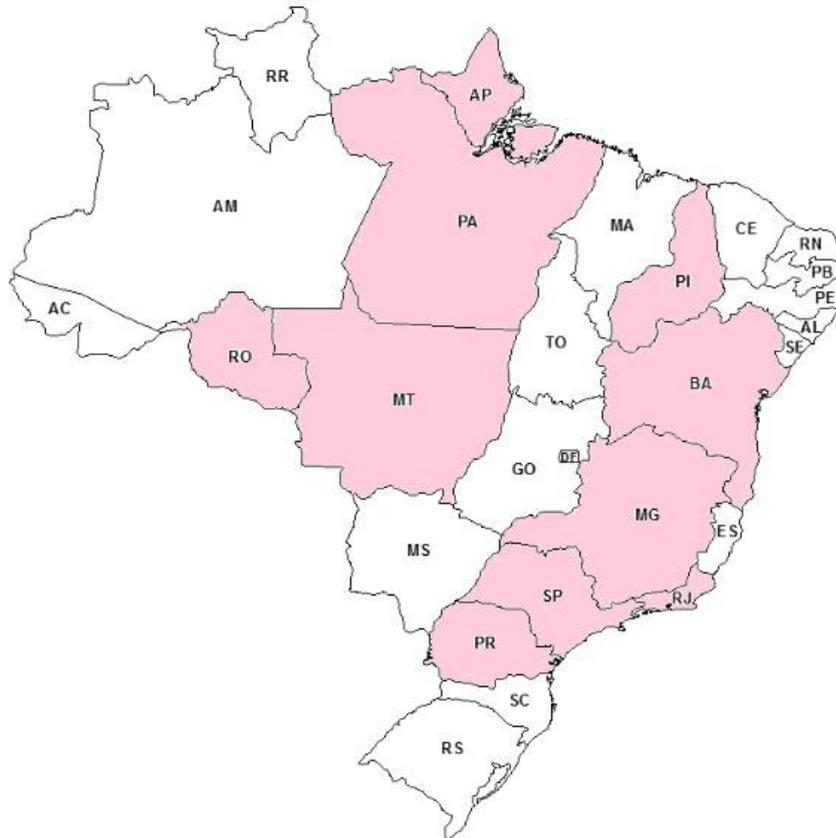
Fonte: MATIAS (2007).

3.2.2. Distribuição Geográfica

A planta é encontrada na América do Sul, principalmente no Brasil, em áreas alagadas da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Além dos estados na região norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do país como, Roraima, Amapá, Pará, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Figura 2) (SILVA, 2010).

Na cidade de Ubá em Minas Gerais, em 1940, surgiu o refrigerante Mineirinho, que possui como ingrediente o chapéu-de-couro, ele é responsável pelo sabor agradável e totalmente diferente dos demais encontrados no mercado (SOBRINHO, 2007).

Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie *Echinodorus macrophyllus*



Fonte: A autora (2021).

3.2.3. Propriedades Medicinais

A planta ganha destaque na medicina popular devido as propriedades diuréticas, hipotensivas, anti-inflamatórias e analgésica (SANTOS et al., 2017). O efeito analgésico da *E. macrophyllus* foi comprovado por FERNANDES, MARTINS, et al., (2021), onde resultou em atividade antinociceptiva maior do que analgésicos tradicionais como morfina.

Estudos sobre a segurança e ausência de riscos ao consumo da *E. macrophyllus* demonstraram ausência de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, sugerindo que seu uso terapêutico não causa danos à saúde (MACHADO et al., 2021). Já que esta planta apresenta propriedades medicinais eficazes contra uma variedade de doenças na forma empírica pois poucos estudos comprovam sua real eficiência.

3.2.4. Composição Química Da Espécie

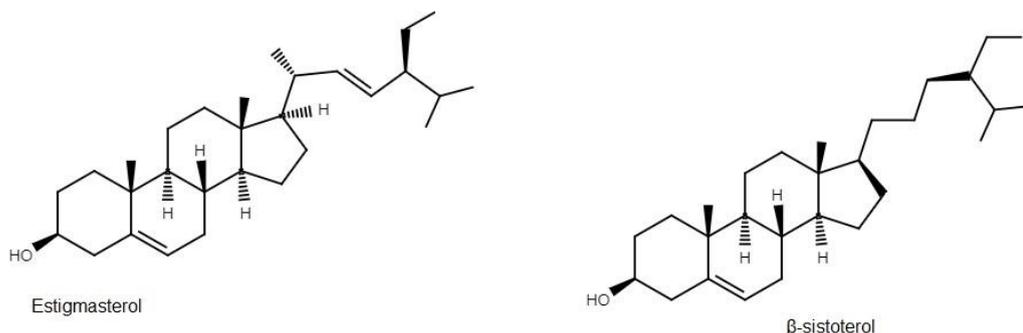
Os autores Kobayashi et al (2000) citam em seu trabalho a presença das classes de flavonoides e diterpenos nos extratos das folhas da *Echinodorus macrophyllus*, além da presença de taninos (SHIGEMORI et al, 2002).

Os flavonoides apresentam em sua estrutura 15 carbonos dispostos em dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de três carbonos e, são responsáveis pela defesa e pigmentação da planta (GARCÍA; CARRIL, 2009). Possuem ações biológicas e farmacológicas, além de apresentar um potencial antioxidante que auxilia na inibição dos sistemas enzimáticos, os quais são responsáveis pela geração de radicais livres (BARROS, 2014).

Em estudo com a *E. macrophyllus* o autor BARROS (2014) afirma que, devido à presença dos flavonoides comprova-se sua ação na profilaxia da gota e também da hiperuricemia. Na planta *in natura*, determinou-se a presença de 2,90% de flavonoides (FLOR; CAMPOS; R, 2011).

Por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas foi possível isolar e identificar os tripenos estigmasterol e β -sistoterol presentes na *Echinodorus macrophyllus* (Figura 3) (SILVA, 2014).

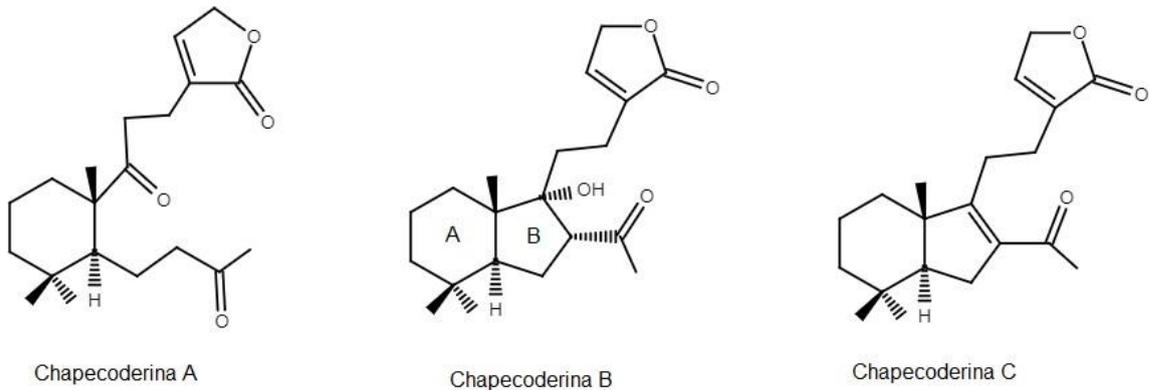
Figura 3 - Estrutura química do estigmasterol e β -sistoterol.



Fonte: A autora (2021).

O autor Freitas (2010) relata em seu trabalho o isolamento de um novo diterpenoide lábdano, chapecoderina A e dois novos diterpenos do tipo lábdano reorganizados, chapecoderina B e chapecoderina C (Figura 4) na busca por compostos bioativos de plantas medicinais brasileiras.

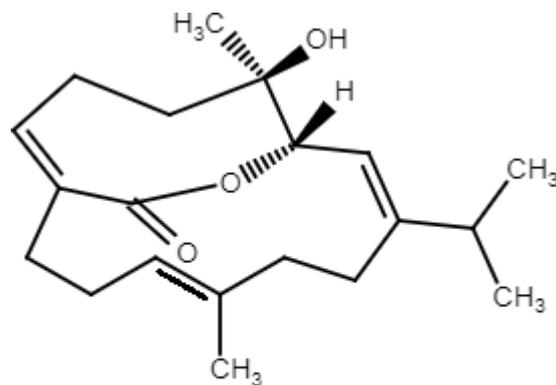
Figura 4 - Estrutura química das chapecoderinas A, B e C



Fonte: A autora (2021).

Com uma investigação mais aprofundada nos extratos das folhas da *Echinodorus macrophyllus* foi possível o isolamento de dois novos diterpenos de membrana com um anel de lactona de oito membros, os echinodolides A e B (Figura 5) (SHIGEMORI et al., 2002).

Figura 5 - Estrutura química da echinodolina A.

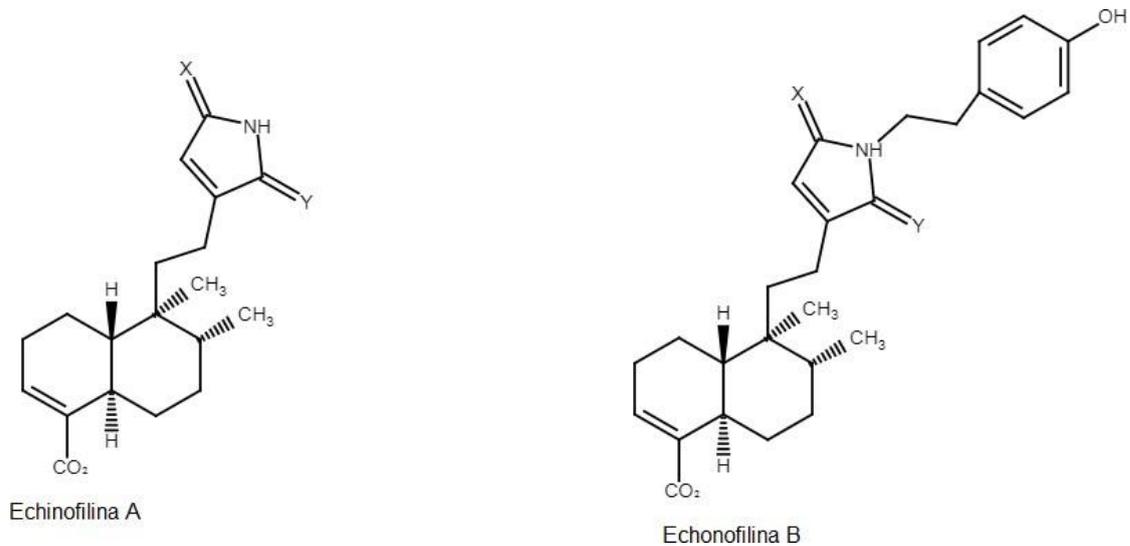


Echinodolina A

Fonte: A autora (2021).

A fim de continuar a investigação sobre os componentes da planta, os autores KOBAYASHI et al., (2000) realizaram o isolamento de echinofilinas A e B, com um R, Alfa-beta-insaturados e gama-lactâmicos com um anel composto por um clerodano esqueleto e uma molécula de amina (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura química das echinofilinas A e B.



Fonte: A autora (2021).

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes podem ser definidos como moléculas capazes de diminuir ou até mesmo prevenir a oxidação de outras moléculas e podem atuar em alimentos ou em sistemas biológicos (BOROSKI et al, 2015).

Os átomos ou moléculas que possuem elétrons não pareados em sua camada externa são denominados radicais livres, são instáveis e são interceptados de duas maneiras: pela ação dos agentes antioxidantes endógenos ou exógenos, ou pelo mecanismo de oxirredução, quando dois radicais se ligam (PEREIRA; CARDOSO, 2012). A presença desses radicais é de suma importância para a manutenção de muitas funções fisiológicas e podem ser gerados no citoplasma, mitocôndrias ou na membrana. O seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os estudos nos últimos anos indicam o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como responsáveis por doenças autoimunes, ou seja, doenças tanto infecciosas quanto inflamatórias, ou ainda por doenças degenerativas tais como, câncer, catarata e disfunções cerebrais e, além disso, são responsáveis pelo envelhecimento (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Denominam-se antioxidantes o conjunto heterogêneo de substâncias que são formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais que bloqueiam o efeito

que os radicais livres causam ao organismo (OU et al., 2002).

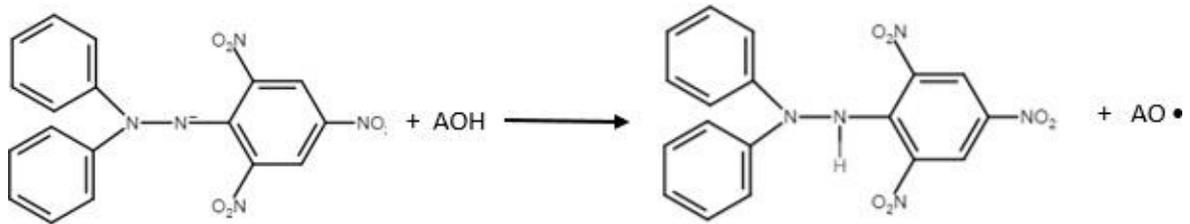
Os antioxidantes podem ser endógenos, que são produzidos pelo próprio organismo e levam uma subclassificação em enzimáticos (superóxido dismutases citoplasmática e mitocondrial) e não enzimáticos (glutathione, ácido lipóico, albumina). Existe ainda os antioxidantes exógenos os quais são adquiridos através da ingestão alimentar como, ácido ascórbico, carotenóides e compostos fenólicos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Existem diferentes métodos para determinar a atividade antioxidante de compostos. O método de sequestro do radical livre surgiu em meados da década de 50 a fim de descobrir doadores de hidrogênio em produtos naturais, posteriormente fez-se o uso dessa técnica para determinação de potencial antioxidante em fenólicos individuais e alimentos (ROGINSKY; LISSI, 2005).

O sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) consiste na medida da capacidade de eliminação de oxidantes em relação ao radical. Quando o radical DPPH reage com doadores de hidrogênio ele é reduzido à hidrazina (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Na reação de oxidação e redução entre DPPH• e a espécie antioxidante, o elétron desemparelhado de nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio derivado do composto antioxidante (Figura 7) (BOROSKI et al, 2015).

O DPPH é estável e de coloração púrpura, ele possui uma banda de absorção máxima em 515 nm, quando acontece à redução à hidrazina sua coloração é alterada para amarela e ocasiona a extinção da banda de absorção característica (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Figura 7 - Reação entre o radical estável (DPPH•) e um agente antioxidante



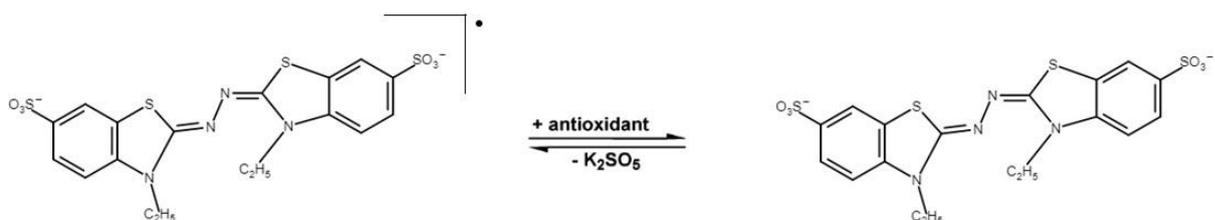
Fonte: A autora (2021).

Outro método descrito na literatura consiste no monitoramento do decaimento do cátion radical ABTS produzido pela oxidação do 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato) (ABTS) causado pela adição de uma amostra contendo fenólicos (ROGINSKY; LISSI, 2005).

O ABTS•+ apresenta uma absorvância no intervalo de 600 a 750 nm, podendo ser determinado espectrofotometricamente, pois é um radical estável na ausência de antioxidantes. Os resultados das análises são expressos em função do Trolox, que é um padrão antioxidante no qual é submetido às mesmas condições da análise (TIVERON, 2010).

Essa é uma das técnicas mais usuais e tem como finalidade avaliar a atividade antioxidante em matrizes naturais. O cátion ABTS é solúvel tanto em água quanto em ácidos orgânicos, essa propriedade confere a metodologia uma diferença frente às demais devido a sua capacidade em avaliar amostras de natureza hidrofílicas e lipofílicas (DARONCHO, 2012). A Figura 8 demonstra a reação.

Figura 8 - Formação do radical ABTS na presença de persulfato de potássio e redução por um agente antirradicalar.

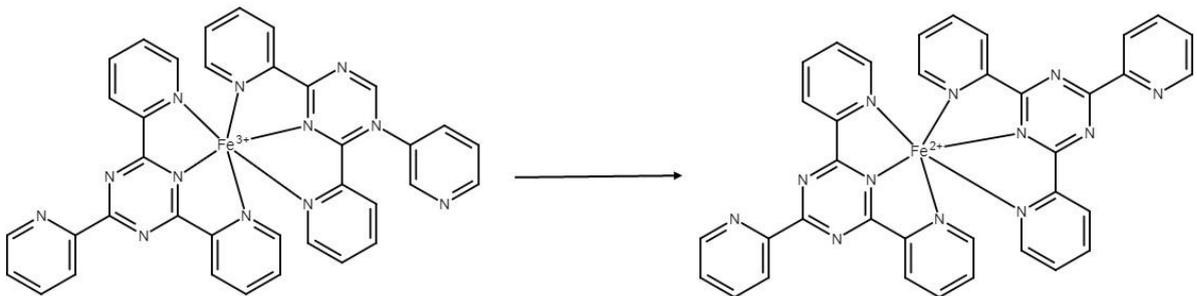


Fonte: A autora (2021).

Enquanto que o método do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) tem a finalidade de determinar a redução de um complexo férrico-tripiridiltriazina à sua forma ferrosa colorida quando na presença de antioxidantes plasmáticos (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

A reação é ocasionada devido a formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe(III) tendo uma coloração amarelada. Na presença de um antioxidante, o ferro é reduzido e origina o $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$ de cor azul escura, essa reação acontece em pH 3,6 com uma absorvância máxima de 593 nm (TIVERON, 2010). Essa reação é demonstrada na Figura 9.

Figura 9 - Redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença de um agente antioxidante (AOH).



Fonte: A autora (2021).

Os compostos fenólicos originam-se do metabolismo secundário das plantas, e são de suma importância para crescimento e reprodução. Para a determinação desses compostos, os métodos são classificados como determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos (MILENE ANGELO; JORGE, 2007).

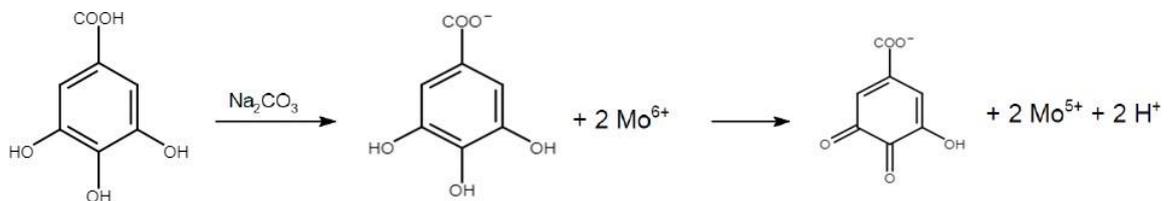
O método Folin-Ciocalteu é um dos mais antigos utilizados para a determinação do conteúdo total de fenólicos e são conhecidos como fenóis totais (SINGLETON et al., 1999).

O teste consiste na mistura de Tungstato e Molibdato em meio altamente básico, onde os fenólicos são oxidados e resultam na formação de O^{2-} que então reagem com o molibdato e tem-se a formação de óxido de molibdênio (MoO_4^{4-}) com uma absorvância muito intensa próxima de 750 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Com a adição do carbonato de cálcio em meio alcalino ocorre uma reação

de oxirredução. A reação acontece entre os ânions que são gerados a partir da desprotonação dos compostos fenólicos e o reagente de Folin-Ciocalteu, ocasionando uma redução do molibdênio, que é demonstrado na Figura 10. A coloração do meio é alterada de amarelo para azul, e é possível detectar esse sinal por espectrofotometria e realizar a determinação da concentração de compostos fenólicos presentes no meio (OLIVEIRA, 2011).

Figura 10 - Reação do ácido gálico reduzindo o Molibdênio (Mo) em meio alcalino.



Fonte: A autora (2021).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras de *E. macrophyllus* foram coletadas na cidade de Enéas Marques – PR, na comunidade Rio Gamela. Logo após a colheita, as folhas foram desidratadas em estufa de secagem a 35°C durante o período de 7 dias, em seguida trituradas em moinho de facas tipo *Willye*.

Após a coleta da planta, com uma amostra seca contendo partes da raiz, folhas, flores e frutos (Figura 11) foi preparada a exsicata utilizada na identificação botânica que será realizada no departamento de agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Figura 11 - Amostra de *Echinodorus macrophyllus* a) frutos b) flores secas c) flores d) folha.



Fonte: A autora (2021).

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Para a preparação do extrato hidroalcoólico (EBH), seguiu-se o método pré definido pelo grupo de pesquisa após a realização de estudo a respeito da otimização da extração onde utilizou-se 2g das folhas secas e trituradas e 25 mL de solução etanol/água 30/70 (v/v). Essa mistura foi levada ao banho ultrassom a 60°C durante o período de 15 minutos e em seguida realizada filtração (AYRES, 2019). Os extratos foram obtidos em triplicata e armazenados em geladeira a 35°C até o momento das análises. Todos os ensaios de atividade antioxidante e caracterização química por CLAE foram realizados em triplicata.

4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial foi realizada utilizando 50 g de folhas secas, reduzidas a pequenos fragmentos e submetidas à hidrodestilação, por duas horas, em aparelho de Clevenger. A fração volátil foi extraída da água por partição líquido-líquido com hexano, sendo a fração orgânica submetida à secagem com sulfato de sódio anidro.

4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação do teor de compostos fenólicos totais presente no extrato bruto da planta foi realizado utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por SINGLETON et al (1999), com modificações.

Este método consiste na mistura de 0,5 mL do extrato na concentração de 1000 ppm com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10 e 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) na concentração de 4%. Os tubos contendo esta mistura foram deixados incubados em local sob proteção da luz por um período de 120 minutos à temperatura ambiente. Na sequência, foi realizada as leituras de absorbância em espectrofotômetro a 740 nm (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

Para quantificar o conteúdo de fenólicos totais, foi construída uma curva analítica, onde se utilizou o ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalente ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO CÁTION RADICAL ABTS⁺

A metodologia utilizada para a captura do cátion radical ABTS⁺ foi descrita por Re et al (1999), com algumas modificações. O cátion radical ABTS⁺ foi formado pela reação de 5 mL de ABTS 7 mmol.L⁻¹ com 88 µL de persulfato de potássio 140 mmol.L⁻¹, incubados em temperatura ambiente por 16 horas na ausência de luz. Após o processo de incubação, a solução foi diluída em etanol P.A até absorvância de aproximadamente 0,700 ± 0,200 à 734 nm.

O método consistiu na adição de 30 µL do extrato de *Echinodorus macrophyllus* na concentração de 1750 ppm juntamente com 3 mL do radical formado, tendo como branco etanol P.A. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 734 nm após 6 minutos de reação. Para a quantificação foi construída uma curva analítica utilizando o antioxidante trolox como padrão, o resultado foi expresso em µmol de trolox por grama de amostra (µmol g⁻¹) (RE et al., 1999).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•

A determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH foi realizada seguindo a proposta descrita por Brand-Willians et al (1995).

Esta técnica de avaliação consiste na adição de 500 µL do EBH na concentração de 1000 ppm, juntamente com 3 mL de etanol P.A e 300 µL da solução do radical DPPH 0,5 mmol L⁻¹. Na sequência, a mistura em reação foi deixada e repouso por um período de 60 minutos para posteriormente realizar a leitura em espectrofotômetro à 517 nm, utilizando etanol P.A como branco analítico. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica utilizando trolox padrão e

o resultado foi expresso em μmol de trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

A metodologia para avaliação da capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) utilizada foi proposta por Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi obtido através da mistura de 25 mL de tampão acetato $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, 2,5 mL da solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM e 2,5 mL de cloreto de ferro em solução aquosa 20 mM. É necessário preparar apenas na hora da utilização para que o mesmo não sofra degradação.

O método de avaliação consiste na mistura de 100 μL do EBH na concentração igual a 1750 ppm com 3 mL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada em vortex e mantida em banho-maria à 37°C por um período de 30 minutos na ausência de luz, na sequência foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Para a quantificação foi construída uma curva analítica utilizando sulfato ferroso como padrão, o resultado foi expresso em μmol de sulfato ferroso por grama de amostra ($\mu\text{mol FeSO}_4\cdot\text{g}^{-1}$) (BENZIE; STRAIN, 1996).

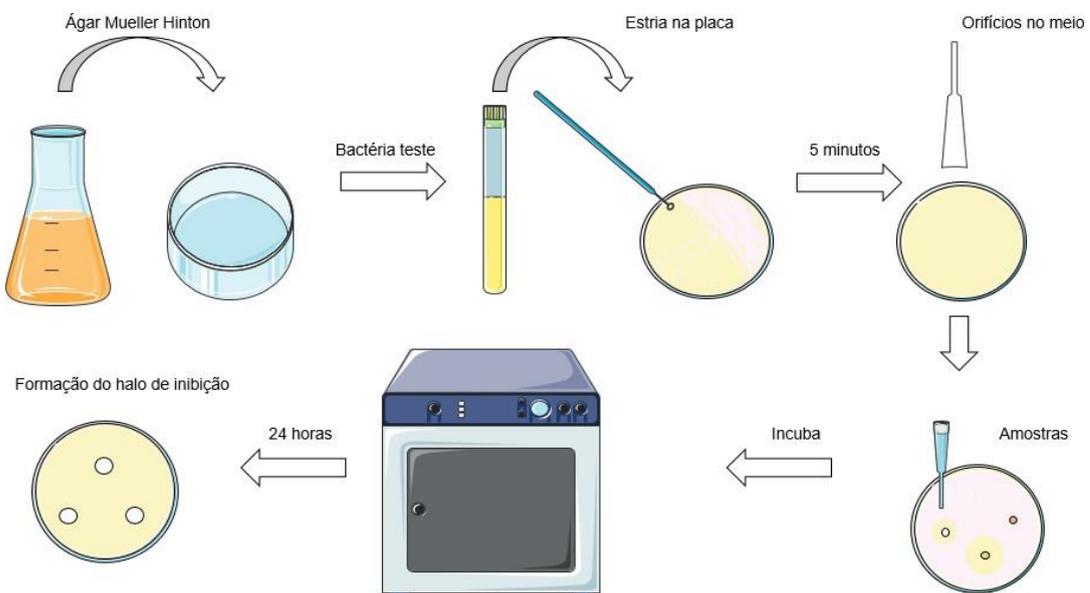
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO

Para a avaliação da atividade antibacteriana do EBH foi utilizada a técnica de Difusão em Meio Sólido a partir de Orifício, seguindo as orientações do Clinical and Laboratory Standards Institute – M60 e M100 (CLSI, 2017; 2019). As avaliações foram realizadas com as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram negativa).

Foram utilizadas cepas padronizadas pela American Type Culture Collection – ATCC. As suspensões bacterianas foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa bacteriológica e em seguida as colônias foram

isoladas e a sua concentração ajustada em solução salina estéril (85%) para 10^4 UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL). Como meio de cultura foi utilizado Mueller-Hinton para o preparo das placas de Petri. Em cada placa foram feitos 3 orifícios circulares equidistantes, com aproximadamente 8 mm de diâmetro, onde foram depositadas as amostras de *E. macrophyllus* com o mesmo valor de massa ou volume. As bactérias foram semeadas na superfície do meio de cultura nas placas com um swab estéril, estriadas em três direções distintas para garantir uma distribuição uniforme dos microrganismos no meio de cultura. As placas foram incubadas em estufas microbiológicas por 24 horas e temperatura de 35°C. Após esse processo os diâmetros dos halos de inibição presentes em cada placa foram mensurados e associados com a atividade antibacteriana da *E. macrophyllus*. O procedimento para avaliar a atividade antibacteriana por difusão em meio sólido, a partir de orifício, está esquematizado na Figura 12.

Figura 12 - Procedimento para atividade antibacteriana por difusão em meio sólido a partir de orifício



Fonte: A autora (2021).

4.9 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS

A análise por CLAE-DAD foi realizada conforme a metodologia explorada pelo grupo de pesquisa, tendo como base o método descrito por RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2015 com algumas modificações. Para realização da análise foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo LC-920 Varian®, onde preparou-se uma mistura de padrões os quais foram injetados em uma coluna Promosil C-18, (dimensões: 250mm x 4,6mm; tamanho de partícula: 5µm) Agela Technologies® com um fluxo contínuo de 1 mL min⁻¹ tendo como fase móvel, solvente A: água ultrapura MiliQ® acidificada (H₃PO₄ 0,1%; pH 2,74) e solvente B: acetonitrila, operando em modo gradiente iniciando com 5% de B para 30% de B em 10 min; 38% de B em 25 min; 50% de B em 28 min; 95% de B em 32 min; como condição de limpeza da coluna retornando para 5% de B dos 34 aos 42 min, finalizando a corrida ambientando a coluna para as posteriores injeções. A temperatura da coluna manteve-se constante em 30°C.

Os padrões utilizados para a realização da análise foram: ácido gálico, ácido clorogênico, astragalina, caferol, isoquercetina, miricetina, miricitrina, quercetina e rutina. O extrato da amostra foi preparado conforme o item 4.2 e em seguida realizado diluição a 10%, a solução pronta passou pelo processo de filtração em filtros PTFE 0,45 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro, em seguida armazenada em vial com capacidade de 2 mL e levada ao refrigerador a uma temperatura de 0°C aproximadamente até a data de injeção.

4.10 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA VOLÁTIL POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

A análise cromatográfica do óleo essencial foi realizada usando um sistema de cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massa utilizando uma coluna capilar Factor Four-VF-5ms (30 m × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura de filme), com programação de temperatura de 60 °C a 300 °C (3 °C min⁻¹), temperatura do injetor e do detector foram fixadas em 270 e 300°C respectivamente, fonte de íons a 220°C e energia de impacto de 70 eV. O gás carreador hélio com vazão de 2 mL min⁻¹, razão de split 1:30 e 1,0 µL de óleo

essencial injetado. Os fragmentos foram analisados na faixa de varredura de 40-600 u.m.a.

Buscou-se encontrar ésteres carboxílicos, derivados de carotenoides e terpenos como indicava a literatura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Todas as plantas possuem compostos fenólicos que tem por finalidade desempenhar diferentes funções como proteção contra patógenos e contribuem para a pigmentação (MARCUCCI et al., 2021). Esses compostos agem como antioxidantes devido a sua habilidade em doar hidrogênios ou elétrons, além de seus radicais impedirem a oxidação dos lipídios (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A análise de compostos fenólicos totais realizada neste trabalho apresentou um resultado de $21,00 \pm 0,30$ mg EAG g^{-1} de folhas. Segundo os autores RODRIGUES SANTOS et al., (2021) para as espécies de *Echinodorus floribundus* o conteúdo total de fenóis foi de 5,30 mg de ácido tânico/g de folhas enquanto para a *E. grandiflorus* o teor medido foi de 7,08 mg de catequina/g de folhas. No mesmo estudo, foi avaliado apenas o teor de flavonoides totais para a espécie *E. macrophyllus*, com teor igual a 33,50 mg de quercetina/g de folhas. Nota-se que as plantas do gênero *Echinodorus* de maneira geral, apresentam baixos teores de compostos fenólicos, exceto a *E. scaber*, a qual demonstrou um resultado de 222,20 mg de ácido gálico/g de folha.

A espécie *E. macrophyllus* e a *E. grandiflorus* são as mais conhecidas e utilizadas no país, e as mesmas possuem propriedades medicinais semelhantes, levando o nome popular de “chapéu-de-couro” (CARVALHO, 2018). Entretanto não se pode realizar uma comparação precisa com os resultados dos autores RODRIGUES SANTOS et al., (2021) pois os mesmos utilizaram catequina e ácido tânico como padrões para os ensaios, enquanto neste trabalho utilizou-se o ácido gálico como composto fenólico padrão.

Já a técnica de ABTS é conhecida também como método de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Este método de captura do cátion radical ABTS é empregado na determinação da capacidade antioxidante tanto em matrizes hidrofílicas quanto lipofílicas (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Uma vantagem de utilizar este método é a sua simplicidade de operação, pois permite, dessa forma, a aplicação na rotina de qualquer laboratório (BARBOSA, 2018).

A capacidade antioxidante determinada por meio de radical ABTS apresentou um resultado de $159,30 \pm 7,70 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ de folhas. Não foram encontrados relatos na literatura utilizando esta técnica para nenhuma planta da espécie *Echinodorus*, por conseguinte, o resultado obtido tem grande valia pois é a primeira vez que se concretiza a aplicação deste método em amostras de *Echinodorus*.

O potencial antioxidante também foi avaliado pelo método de captura do radical livre DPPH, que é determinação *in vitro* do potencial antioxidante, sendo utilizado em diferentes amostras tais como, frutas, leguminosas, chás e plantas medicinais devido à alta sensibilidade e também por ser de fácil aplicação (BOROSKI et al, 2015).

Para a quantificação da medida da atividade sequestrante do radical DPPH a amostra apresentou um resultado de $54,68 \pm 1,52 \mu\text{mol ET g}^{-1}$. A autora SILVA, L., (2015) analisou as folhas da espécie *E. scaber* obtendo teor de $12,36 \mu\text{g/mL}$, onde o resultado foi expresso como a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, não sendo considerado um resultado favorável frente as outras espécies analisadas.

No método FRAP existem algumas limitações, pois nem toda substancia que é capaz de reduzir o ferro (III) é um antioxidante, e nem todo antioxidante possui o potencial de redução (BENZIE; STRAIN, 1996).

Para esta análise detectou-se um valor de $382,53 \pm 6,34 \text{ mg FeSO}_4/\text{g}$ de folhas. Os estudos realizados pelos autores Franco et al., (2018) mostram que a espécie *E. grandiflorus* apresentou um valor de $22,4 \mu\text{mol Trolox/g}$ em um extrato obtido utilizando 500g das folhas para cada 2,5L de etanol 98% ou hexano (1:5 m/v) onde com o extrato de etanol obteve-se uma melhor eficiência de $90,3 \mu\text{mol Trolox/g}$.

Enquanto isso, no trabalho desenvolvido pelos autores Cordeiro et al., (2013) o extrato de chapéu-de-couro apresentou um resultado de $12,52 \mu\text{mol FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ de

extrato. Demonstrando que os resultados obtidos na realização deste trabalho apresentaram maiores teores antioxidantes pela metodologia FRAP.

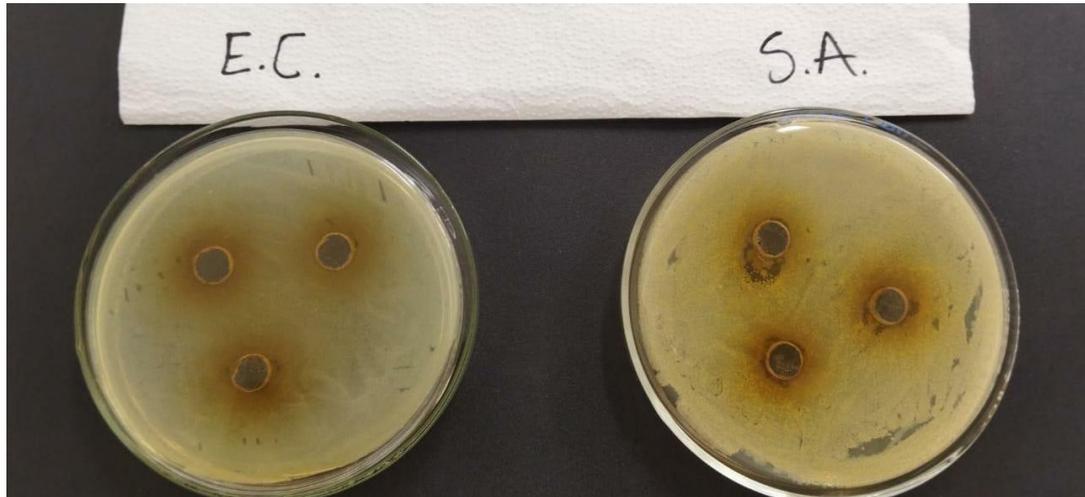
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO A PARTIR DE ORIFÍCIO

A atividade antimicrobiana das plantas medicinais tem despertado um grande interesse dos pesquisadores, pois essas espécies são tratadas como alternativas no tratamento de doenças, além do aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos disponíveis, necessitando desta forma, novos recursos com ação antibacteriana (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

Esta avaliação tem grande valia, já que o Brasil é detentor de uma rica biodiversidade e que as plantas medicinais são usadas em distintas áreas da saúde como uma forma não convencional de tratamento (DUARTE et al., 2004).

A planta chapéu de couro é conhecida empiricamente por suas ações antissépticas além de suas atividades contra fungos e bactérias, em função disso, surgiu o interesse em investigar sua atividade antibacteriana. Entretanto, nas placas avaliadas, o extrato hidroalcoólico não apresentou atividade inibitória contra os microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Figura 13).

Figura 13 - Testes de difusão em meio sólido a partir de orifício para o extrato bruto com inóculo 108 UFC·mL⁻¹: (a) *Escherichia coli* (b) *Staphylococcus aureus*



Fonte: A autora (2021).

Em estudo utilizando extratos brutos a partir dos solventes metanol e acetona realizado pelos autores BABICZ, RICHETTI, *et al.*, (2002) concluiu-se que o extrato metanólico de *E. macrophyllus* não apresentou inibição contra duas cepas gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* e duas cepas gram-negativas: *Proteus vulgaris* e *Xanthomonas*, enquanto o extrato acetônico foi mais eficiente em inibir o crescimento dos microrganismos.

Já os autores Franco *et al.*, (2015) realizaram a análise utilizando folhas da espécie comercializadas em lojas especializadas de plantas, na forma desidratada. A amostra foi misturada com água destilada, fervida a 100°C e acondicionada em frasco âmbar até a utilização. Foram testadas em cepas de *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* onde não se teve atividade inibitória para nenhum microrganismo. O mesmo ocorreu para o hidrolato, que também foi testado.

Um fato importante a respeito da análise antibacteriana a ser considerado é a escolha do solvente. O etanol é o solvente mais indicado para a quantificação de compostos fenólicos, mostrando ser inadequado para a extração de compostos com atividade antimicrobiana por possuir uma baixa seletividade. Quando analisado dados obtidos em estudos realizado anteriormente detectou-se que o mais indicado seria a utilização de um solvente distinto do etanol, o que será realizado em trabalhos futuros, para que possa auxiliar na atividade inibitória contra

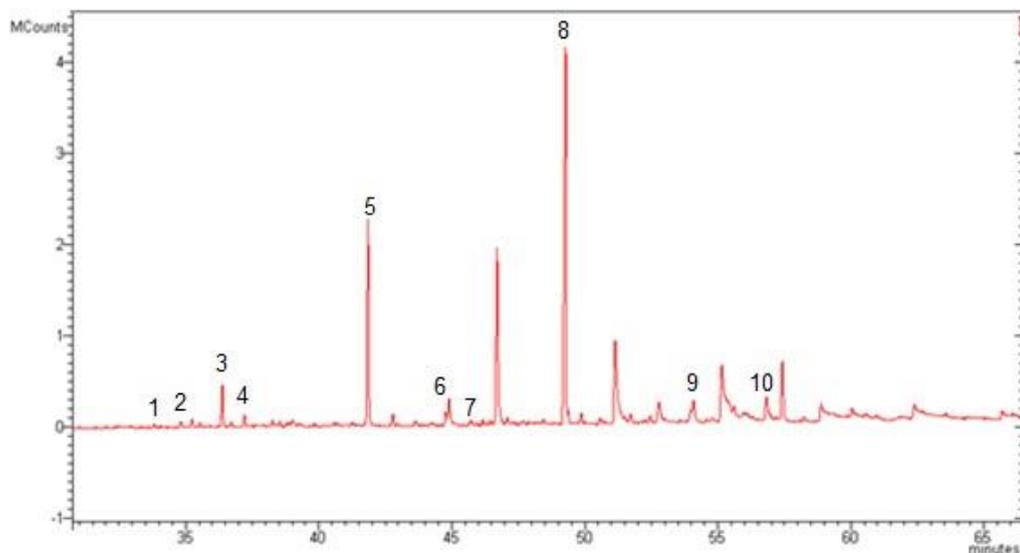
microrganismos. Deve-se ressaltar também que existem diferenças entre as composições químicas das plantas em decorrência dos locais, épocas do ano da coleta e metodologias empregadas. Esses parâmetros implicam nos resultados finais obtidos.

5.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Devido ao baixo rendimento do óleo essencial obtido da extração foi necessário realizar a partição líquido-líquido afim de recuperar o volume adequado para a injeção no equipamento.

Por meio da análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi possível identificar 10 compostos presentes no óleo essencial da *E. macrophyllus* (Tabela 1). Onde apenas o diterpeno fitol já foi relatado em estudos anteriores realizados por SILVA et al. (2013), e o terpeno spathulenol já foi identificado em amostras comerciais do gênero *Echinodorus* (PEREIRA et al., 2020).

Figura 14 - Cromatograma do óleo essencial da *Echinodorus macrophyllus*



Fonte: Dados da pesquisa (2021).

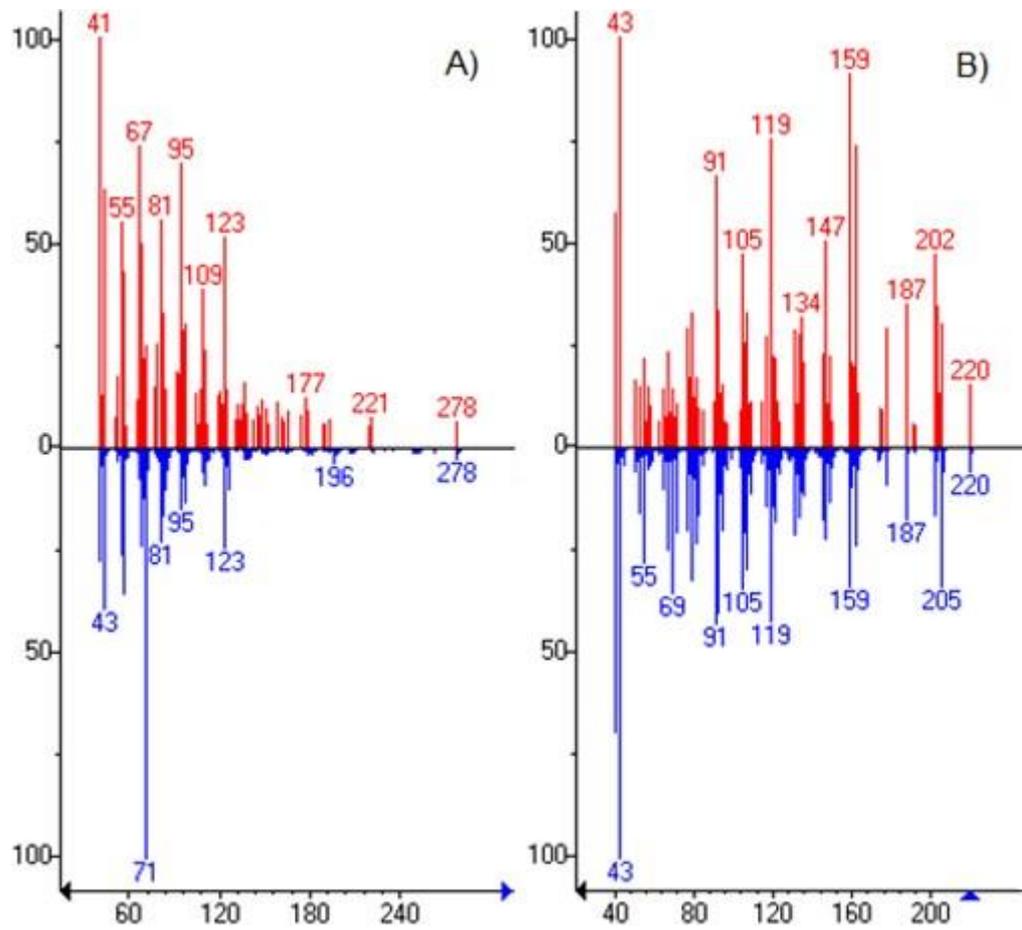
Tabela 1 - Identificação dos constituintes do óleo essencial de *E. macrophyllus* por CG-EM.

Componente	Tempo (minutos)	Similaridade (%)	Área (%)
Spathulenol	31,03	26,8	11,0
Phenol,2-5-bis(1,1-dimethyl)	32,45	34,8	6,0
Epizonareno	37,20	16,0	26,0
Fitol	38,27	11,2	3,0
2-Hexyl-1-decanol	42,81	20,2	3,0
Ácido fitálico	44,90	14,9	10,0
Sclareoloxide	45,71	41,6	4,0
Óxido de epimanool	49,15	58,3	4,0
Androstane-3-11diol	54,00	26,6	3,0
Pimaral	57,40	20,1	12,0

Fonte: dados da pesquisa (2021).

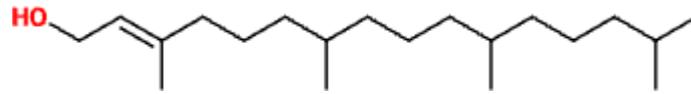
A análise comparativa realizada com a biblioteca do equipamento revelou que o sinal com tempo de retenção foi de 38,27 minutos, apresentou 11,2% de similaridade com o espectro do fitol e ocupando uma área de 3,0% (Figura 15a). Enquanto que o spathulenol apresentou um tempo de retenção igual a 31,04 minutos, com 26,8% de similaridade e 11% de área (Figura 15b). As estruturas químicas do fitol e do spathulenol são apresentadas nas figuras 16 e 17 respectivamente.

Figura 15 - Comparação dos espectros de massa da biblioteca (vermelho) com espectros de massa obtidos da amostra (azul) a) fitol e b) spathulenol.



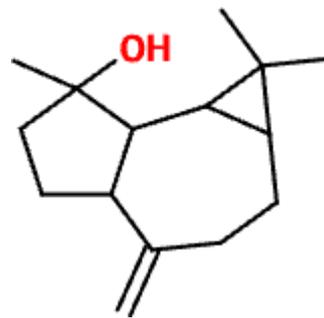
Fonte: A autora (2021).

Figura 16 - Estrutura química do fitol



Fonte: A autora (2021).

Figura 17 - Estrutura química do spathulenol



Fonte: A autora (2021).

Vale ressaltar que os espectros de massa da biblioteca compõem uma base de informações adquiridas do NIST (National Institute of Standards and Technology). Onde esses espectros são gerados em condições padrões, utilizando concentrações bem definidas.

O fitol é um composto detectado abundantemente na natureza, já que o mesmo faz parte da molécula de clorofila e assim, sendo produzida por quase todos os organismos fotossintéticos (ISLAM et al., 2018). Este diterpeno pertencente ao grupo de álcoois de cadeia insaturada e é conhecido pela capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* (SANTOS et al., 2013). Além disso, o fitol possui propriedades preventivas e terapêuticas contra a artrite, consequentemente sendo um fármaco promissor para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas (RAJESWARI; MURUGAN; MOHAN, 2012).

Muitas pesquisas já foram realizadas com o objetivo de comprovar que a atividade antimicrobiana observada em óleos essenciais de plantas está ligada a presença do fitol (ISLAM et al., 2018). A atividade anti-reumática, antioxidante e anti-

inflamatória do óleo essencial da espécie *E. macrophyllus* pode estar relacionada à presença deste composto.

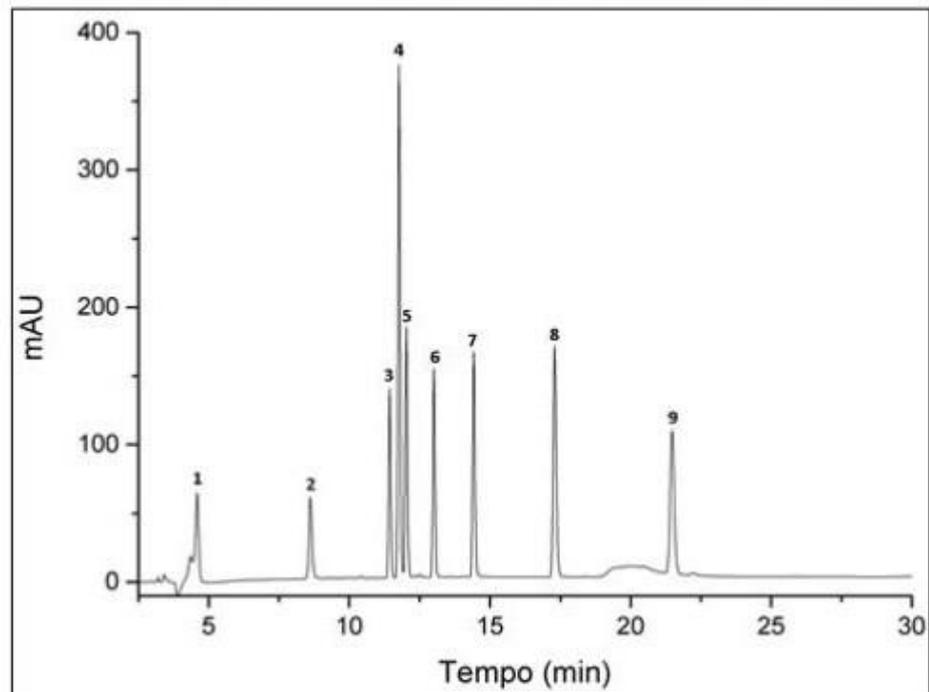
Em estudos realizados com a espécie *E. macrophyllus*, o autor COELHO, VELOZO, *et al.*, (2012) identificou em sua amostra o composto fitol, assim como PIMENTA, FIGUEIREDO, *et al.*, (2006) descreve o acompanhamento durante um período de quatorze meses através de análise de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa de óleos essenciais obtidos das folhas de *E. grandiflorus* de duas populações diferentes (folhas grandes e folhas pequenas), onde foi identificada a presença do fitol em todo o período analisado. Podendo ser caracterizado como um marcador quimiotaxonômico para a espécie vegetal do estudo.

O spathulenol é um sesquiterpeno, o qual é relatado como principal componente volátil de algumas espécies como *Eugenia calycina* Cambess. e *Psidium guajava* L. Os estudos em materiais que contem este composto relatam atividades biológicas como antiproliferativa, anti-inflamatória e antimicrobiana (DO NASCIMENTO *et al.*, 2018). Além de demonstrar significativa atividade repelente contra *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (CANTRELL *et al.*, 2005).

5.4 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS

Os cromatogramas da mistura de padrões injetadas na concentração de 50 mg L⁻¹ obtidos através da análise de compostos fenólicos por CLAE é apresentada na figura 18.

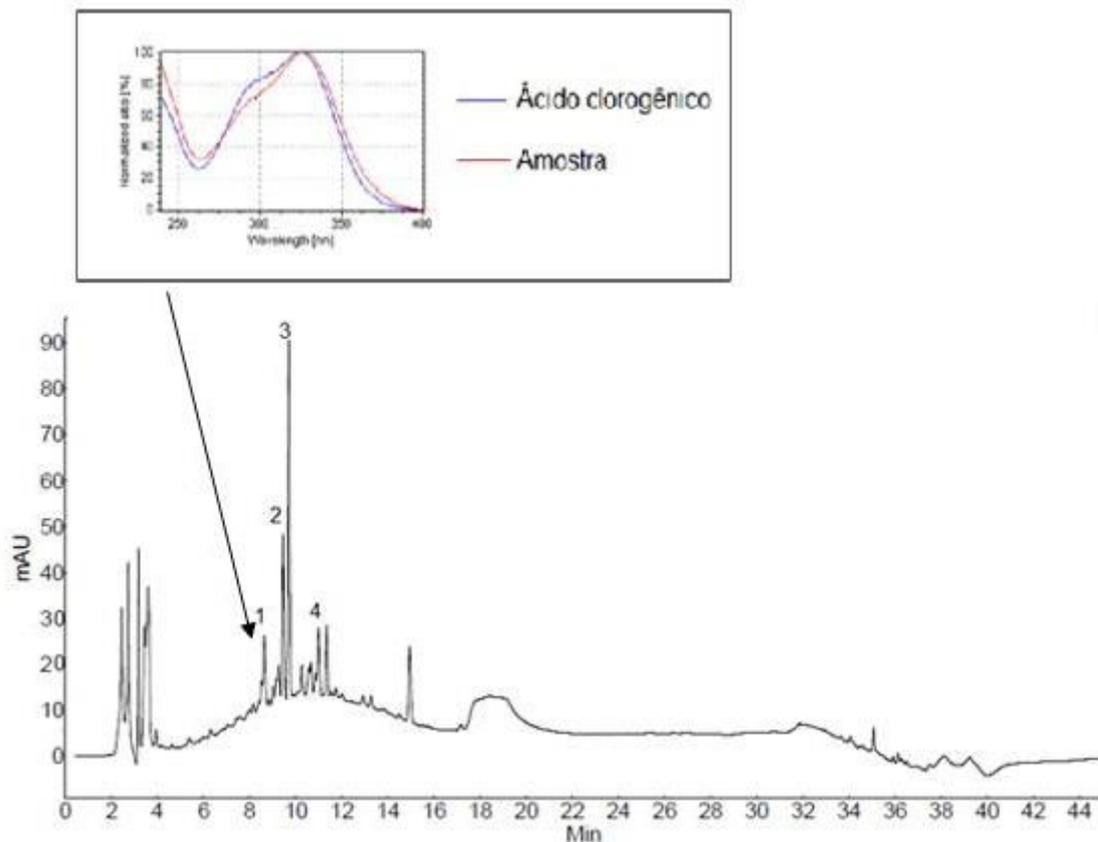
Figura 18 - Cromatograma dos padrões na concentração de 50 mg L⁻¹.



Fonte: dados da pesquisa (2021).

No cromatograma obtido da amostra de *E. macrophyllus* quando comparado com o cromatograma de padrões utilizados foi possível a identificação de um sinal (Pico 1), o qual foi identificado como ácido clorogênico. O perfil de absorção do padrão e da amostra é mostrado na figura 19.

Figura 19 - Cromatograma da amostra na concentração de 5 ppm e perfil de absorção do ácido clorogênico.



Fonte: dados da pesquisa (2021).

Mediante as equações de reta da curva de calibração analítica e outras informações a respeito dos padrões utilizados neste método foi possível realizar a quantificação do ácido clorogênico presente no extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus*.

O teor de ácido clorogênico detectado na amostra foi de 0,45 mg. g⁻¹. Há relatos de identificação e quantificação deste componente em amostras de *Echinodorus longiscapus* Arech onde os valores variam de 0,25 a 14,95 mg. g⁻¹ (COELHO et al., 2013).

De acordo com LOPES et al. (2012), até o presente momento a composição química das folhas das espécies de *Echinodorus* avaliadas sugerem a presença de ácido trans-aconítico, glicosilflavonas, ácido hidroxitartático, sesquiterpenos e

principalmente diterpenos, os quais possivelmente estejam ligados as atividades biológicas relatadas da espécie.

A identificação de compostos fenólicos por CLAE foi reportada pelos autores STRADA et al. (2017) em extratos hidroetanólicos de *Echinodorus scaber* e *Echinodorus grandiflorus* onde foram identificados picos de compostos característicos da espécie, como isoorientina, swertiajaponin e vitexina-2-O-raminosideo. Na ausência destes padrões exclusivos da espécie *Echinodorus*, realizou-se a comparação do tempo de retenção e perfil de absorção dos sinais cromatográficos obtidos neste estudo com os padrões analisados por STRADA et al. (2017) (Tabela 2).

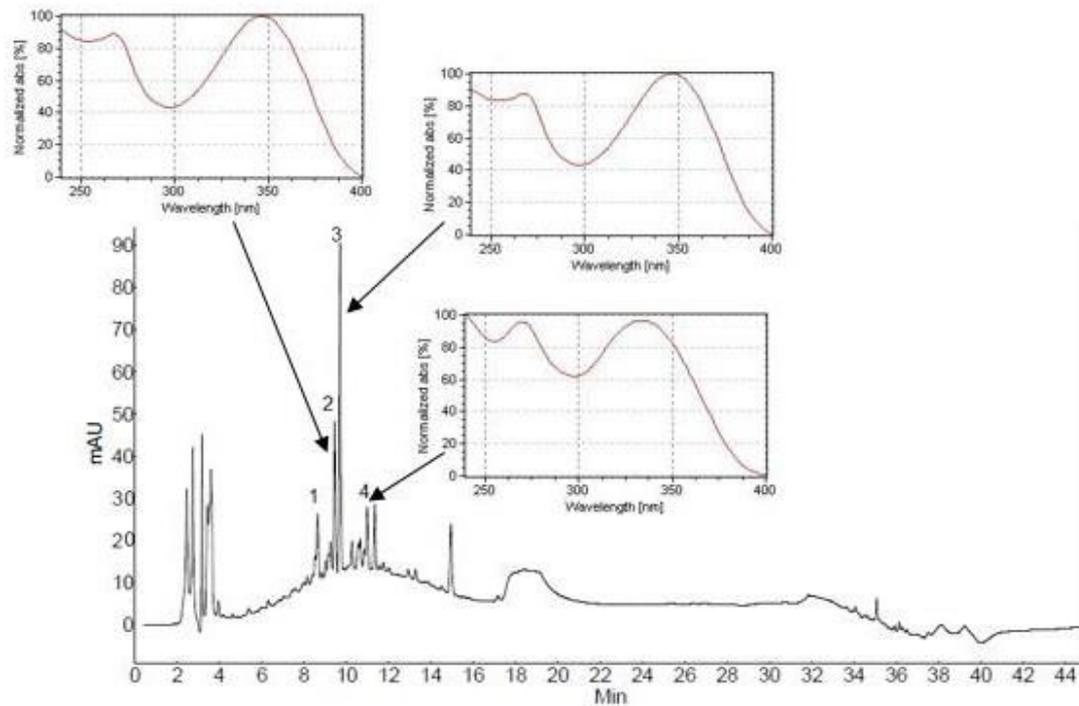
Tabela 2 - Dados comparativa sobre a identificação de compostos fenólicos em extratos de *E. scaber* e *E. grandiflorus* referenciais com dados sobre *E. macrophyllus*

Componente	Dados apresentados (STRADA et al., 2017)		Dados obtidos	
	Tempo de retenção (minutos)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Tempo de retenção (minutos)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Isoorientina	8,6	269, 348	9,4	267, 347
Swertiajaponin	9,2	269, 344	9,6	268, 347
Vitexina-2-O-raminosideo	11,2	269, 334	10,9	270, 334

Fonte: dados da pesquisa (2021).

Desta forma, sugere-se que os picos 2, 3 e 4 do cromatograma possivelmente sejam os compostos isoorientina, swertiajaponin e vitexina-2-O-raminosideo (FIGURA 21).

Figura 200 - Cromatograma e perfis de absorção dos picos não identificados



Fonte: dados da pesquisa (2021).

De acordo com a literatura, os flavonoides isoorientina, swertiajaponina e isoorientina 2^ª-O-ramnosídeo, foram isolados em folhas de *Cymbopogon citratos* e avaliados quanto a inibição da peroxidação de LDL humano induzida por Cu⁺². Os resultados relatados mostram que após cinco horas de incubação, os três compostos apresentaram efeito inibitório significativo. Entretanto, após seis horas, apenas o flavonoide isoorientina continuou efetivo, demonstrando assim, ser um potente inibidor da oxidação de LDL *in vitro* (ORREGO; LEIVA; CHEEL, 2009).

O composto isoorientina, ativo do extrato das folhas de *Passiflora edulis*, apresentou atividade anti-inflamatória por inibir a atividade da mieloperoxidase (MPO). A proteína MPO está envolvida na regulação da homeostase celular e pode desempenhar um papel central na iniciação de doenças inflamatórias agudas (ZUCOLOTTO et al., 2009).

Em estudo realizado por COSENZA (2010) foi identificado através do sistema cromatográfico os compostos isovitexina, vitexina e orientina em extrato de *E. macrophyllus*. Além deste trabalho, não há outros relatos na literatura sobre a composição química da espécie em estudo.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na realização deste trabalho foram de suma importância para a comunidade acadêmica já que existem poucas pesquisas com as folhas de *Echinodorus macrophyllus*, contribuindo desta forma com estudos sobre a composição química, capacidade antioxidante e atividade antibacteriana.

Em suma, quanto ao estudo da atividade antioxidante do extrato bruto, os resultados indicaram teor significativo de compostos fenólicos totais, os quais foram identificados pela análise de CLAE com a presença do ácido clorogênico e, por comparação dos perfis de absorção e tempo de retenção os compostos isoorientina, swertiajaponin e vitexina-2-O-raminosideo. Além disso, é importante salientar que até o presente momento não há relatos sobre a capacidade antioxidante pelo radical ABTS em nenhuma planta do gênero *Echinodorus*. Ressaltando a relevância desta pesquisa.

Na análise antimicrobiana podemos considerar que os resultados não inibitórios do extrato foram fortemente influenciados pelo solvente utilizado na extração, o qual não é o mais indicado para esta análise.

A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas revelou a presença de compostos importantes como fitol e spathulenol, os quais possuem ricas atividades biológicas podendo assim caracterizar os usos empíricos da planta.

De modo geral, o trabalho atendeu os objetivos propostos, obtendo resultados satisfatórios e de grande importância. No entanto, há necessidade de se aprofundar ainda mais em estudos utilizando a *Echinodorus macrophyllus* para que assim, seja possível evidenciar suas atividades biológicas possibilitando sua utilização em diversos seguimentos, principalmente medicinais.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, MZ. **Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: Plantas Medicinais.** 3rd ed. Salvador: EDUFBA, 2011, pp. 34-66.
- AYRES, B. R. B. Otimização da extração de compostos fenólicos em folhas de *Echinodorus* sp. empregando planejamento fatorial. 2019.
- BABICZ, I. et al. Estudo de composição química e avaliação de atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de *Echinodorus* Resultados e Discussão. v. 1, n. IC, p. 1-2, 2002.
- BARBOSA, E. F. UMA ABORDAGEM SOBRE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM PRODUTOS NATURAIS. n. November, 2018.
- BARROS, M. E. DE. Efeito do extrato de *Echinodorus macrophyllus* sobre a hiperuricemia induzida em ratos e seu efeito toxicológico. 2014.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. RADICAIS LIVRES E OS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES DA DIETA. **Eisei kagaku**, v. 35, n. 1, p. 123-130, 1999.
- BRAGA, C. DE M. Histórico da utilização de plantas medicinais. p. 24, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 194-202, 1995.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.
- CANTRELL, C. L. et al. Isolation and Identification of Mosquito Bite Deterrent Terpenoids from Leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) Beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5948-5953, 2005.
- CARVALHO, E. S. D. E. Estudo do mecanismo vasorrelaxante do extrato etanólico e frações , das folhas de *Echinodorus grandiflorus* (Cham . & Schltldl .) Micheli , em leitões mesentéricos isolados. 2018.
- COELHO, A. P. D. et al. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO DE *Echinodorus longiscapus* Arech. p. 2698-2709, 2013.
- COELHO, M. et al. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus*(Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos**, v. 7, p. 245-251, 2012.
- CORDEIRO, A. M. T. M. et al. Investigation of thermal behavior and antioxidant activity of plant extracts. **International Migration Review**, v. 47, n. 2, p. 330- 373.,

2013.

COSENZA, G. P. Efeito do extrato bruto das folhas de *Echinodorus macrophyllus* e de frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina. 2010.

DA SILVA, G. P. et al. Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits high in-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1584-1596, 2016.

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DO NASCIMENTO, K. F. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, n. May 2017, p. 351-358, 2018.

DUARTE, M. C. T.; et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. v. 14, p. 06-08, 2004.

FERNANDES, D. C. et al. *Echinodorus macrophyllus* fraction with a high level of flavonoid inhibits peripheral and central mechanisms of nociception. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, n. xxxx, p. 1-8, 2021.

FIRMO, W. DA C. A. et al. CONTEXTO HISTÓRICO, USO POPULAR E CONCEPÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS. **Nichidai koku kagaku = Nihon University journal of oral science**, v. 12, n. 2, p. 119-131, 1986.

FLOR, R. V; CAMPOS, M. A. A.; R, A. G. Claving and Lyophilization of the FI Uid-Extract: Effects on the Pharmacochemical Composition. v. 21, n. 3, p. 518-524, 2011.

FRANCO, R. M. et al. **AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PLANTA CHAPÉU-DE-COURO (*Echinodorus macrophyllus*)**. [s.l: s.n.]. v. 1

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P.-U. Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología). **REDUCA (Biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

ISLAM, M. T. et al. Phytol: A review of biomedical activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, n. August, p. 82-94, 2018.

KOBAYASHI, J. et al. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n. 16, p. 2939-2943, 2000.

LOPES, G. C. et al. Validação de metodologia analítica para a determinação de derivados do ácido o hidroxicinâmico de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 3, p. 500-505, 2012.

MACHADO, D. M. et al. In vitro evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic extracts of *Echinodorus macrophyllus*. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 12-21, 2021.

MARCUCCI, M. C. et al. Accessible methodologies for quantification of flavonoids

and total phenols in propolis. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 61-73, 2021.

MATIAS, L. Q. O gênero *Echinodorus* (Alismataceae) no domínio da caatinga brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 209-258, 2007.

MILENE ANGELO, P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ORREGO, R.; LEIVA, E.; CHEEL, J. Inhibitory effect of three C-glycosylflavonoids from *Cymbopogon citratus* (lemongrass) on human low density lipoprotein oxidation. **Molecules**, v. 14, n. 10, p. 3906-3913, 2009.

OU, B. et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

PEREIRA, H. V. et al. Characterization of the volatile compounds and anatomical features in commercial samples of *Echinodorus* plant species. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, v. 2020, p. 12-26, 2020.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários e hipertireodismo. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 146-152, 2012.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schlttdl.) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 623-628, 2006.

PRANDO, T. B. L. et al. Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schlttdl.) Micheli. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1249-1258, 2016.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RAJESWARI, G.; MURUGAN, M.; MOHAN, V. R. GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (Linaceae). **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 301-308, 2012.

RODRIGUES SANTOS, R. et al. Marcadores químicos em espécies de *Echinodorus* (Alismataceae) utilizadas como chapéu-de-couro. **Scientia Plena**, v. 17, n. 4, 2021.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTOS, C. C. DE M. P. et al. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models . **Neuroscience Journal**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SANTOS, R. R. et al. Fenologia e quimiodiversidade do 'Chapéu-de-couro' (*Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus*). **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, p. 115-118, 2017.

SHIGEMORI, H. et al. Echinodolides A and B, new cembrane diterpenoids with an eight-membered lactone ring from the leaves of *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 82-84, 2002.

SILVA, L. Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e análise fitoquímica preliminar de plantas medicinais utilizadas pelas populações da região do Vale do Juruena e microrregião no Norte Araguaia, Mato Grosso, Brasil. v. XVIII, p. 125, 2015.

SILVA, T. D. M. Estudos Fitoquímicos e dos Efeitos da Radiação Gama em *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu-de-couro) e em Óleos Essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (Eucalipto). *Phytochemical Studies and Gamma Radiation Effects in Echinodorus macrophyllus* (Chapéu. 2014.

SILVA, T. DE M. et al. Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodorus macrophyllus* exposed to γ -radiation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 600-607, 2013.

SILVA, T. M. . AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Echinodorus macrophyllus* (CHAPÉU-DE- COURO) TRATADA POR IRRADIAÇÃO GAMA. 2010.

SINGLETON, V. L. et al. 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene. v. 299, n. 1974, p. 152-178, 1999.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

STRADA, C. L. et al. Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the brazilian crude drug extracts of *echinodorus scaber* and *E. Grandiflorus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 5, p. 619-626, 2017.

TIVERON, A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. p. 103, 2010.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

ZUCOLOTTO, S. M. et al. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, n. 11, p. 1221-1226, 2009.