

## Atividade antibacteriana e antioxidante do extrato e frações das partes aéreas de *Richardia brasiliensis*

### *Antibacterial and antioxidant activity of the extract and fractions of the aerial parts of Richardia brasiliensis*

Fernanda Sollberger Canale<sup>1</sup>, Rosemary Matias<sup>2</sup>, Silvia Cristina Heredia Vieira<sup>3</sup>, Larissa Tinoco Barbosa<sup>4</sup>, Ademir Kleber Morbeck de Oliveira<sup>5</sup>, Higo José Dalmagro<sup>6</sup>

**RESUMO:** A espécie *Richardia brasiliensis* é uma planta invasora com uso na medicina popular e devidos suas características químicas, estudos foram desenvolvidos objetivando determinar sua atividade antibacteriana e antioxidante, utilizando extrato e frações das partes aéreas (folhas e caules). O extrato etanólico (EX<sub>EtOH</sub>) e as frações hexânica (F<sub>Hex</sub>), acetato de etila (F<sub>Acet</sub>) e hidrometanólica (F<sub>H/MeOH</sub>) foram submetidas a análise química e a determinação do potencial antioxidante e antibacteriano. Os fitoquímicos com maior frequência (100%) foram os flavonoides (EX<sub>EtOH</sub>, F<sub>Hex</sub>, F<sub>Acet</sub> e F<sub>H/MeOH</sub>), compostos fenólicos (EX<sub>EtOH</sub>, F<sub>Acet</sub> e F<sub>H/MeOH</sub>), taninos (F<sub>H/MeOH</sub>), triterpenos (EX<sub>EtOH</sub> e F<sub>Acet</sub>) e esteroides (EX<sub>EtOH</sub> e F<sub>Hex</sub>). O conteúdo de compostos fenólicos (C.F.) e flavonoides totais (F.T.) foram superiores para F<sub>Acet</sub> (C.F.= 798,5 µg/g e F.T.= 253,4 µg/g), seguido por EX<sub>EtOH</sub> (C.F.= 685,3 µg/g; F.T.= 195,7 µg/g), F<sub>H/MeOH</sub> (C.F.= 347,5 µg/g; F.T.= 23,1 µg/g) e F<sub>Hex</sub> (C.F.= 124,0 µg/g; F.T.= 63,1 µg/g). F<sub>Acet</sub> e a F<sub>Hex</sub> apresentaram maior atividade antioxidante e o extrato EX<sub>EtOH</sub> (14,5 mm) e fração F<sub>Hex</sub> (15,3 mm), halo de inibição moderada frente a *Staphylococcus aureus* nas concentrações mais baixas, sendo que apenas as frações F<sub>Hex</sub> e F<sub>Acet</sub> demonstraram efeito frente *S. aureus* com valores de microdiluição em caldo de 6,25 a 12,5 mg/mL. No ensaio de bioautografia demonstra a atividade da fração F<sub>Hex</sub> atribuída ao β-sitosterol. Os resultados demonstram a presença de fitoquímicos com potencial antimicrobiano nestas duas frações, indicando uma possível fonte de obtenção de medicamentos fitoterápicos para tratar infecções, justificando assim os usos étnicos de *R. brasiliensis* para diversas doenças infecciosas.

**Palavras-chave:** DPPH; Flavonoides; Rubiaceae; *Staphylococcus aureus*; β-sitosterol.

**ABSTRACT:** The *Richardia brasiliensis* species is an invasive plant used in folk medicine and due to its chemical characteristics, studies were carried out to determine its antibacterial and antioxidant activity, using extract and fractions of the aerial parts (leaves and stems). The ethanolic extract (EX<sub>EtOH</sub>) and the hexane (F<sub>Hex</sub>), ethyl acetate (F<sub>Acet</sub>) and hydromethanolic (F<sub>H/MeOH</sub>) fractions were subjected to chemical analysis and determination of their antioxidant and antibacterial potential. The phytochemicals with the highest frequency (100%) were flavonoids

<sup>1</sup> Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional pela Universidade Anhanguera - UNIDERP. Docente da Universidade Anhanguera – UNIDERP, Campo Grande (MS), Brasil.

<sup>2</sup> Doutora em Química pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Docente no Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade de Cuiabá (UNIC), e da Universidade Anhanguera - UNIDERP em cursos de graduação e no Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Campo Grande (MS), Brasil.

<sup>3</sup> Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Docente da Universidade Anhanguera - UNIDERP em cursos de graduação e no Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Campo Grande (MS), Brasil.

<sup>4</sup> Doutora em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional pela Universidade Anhanguera-UNIDERP. Docente do Programa de Pós - Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional pela Universidade Anhanguera - UNIDERP, e Pesquisadora associada pelo Instituto Arara Azul, Campo Grande (MS), Brasil.

<sup>5</sup> Doutor em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). Docente da Universidade de Cuiabá (UNIC) no Programa em Ciências Ambientais, e da Universidade Anhanguera - UNIDERP no Programa em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional e Programa em Agronegócio Sustentável, Campo Grande (MS), Brasil.

<sup>6</sup> Doutor em Física Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Docente da Universidade de Cuiabá (UNIC) e Coordenador do Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional da Universidade Anhanguera - UNIDERP, Campo Grande (MS), Brasil.

(EX<sub>EtOH</sub>, F<sub>hex</sub>, F<sub>Acoc</sub> and F<sub>H/MeOH</sub>), phenolic compounds (EX<sub>EtOH</sub>, F<sub>Acoc</sub> and F<sub>H/MeOH</sub>), tannins (F<sub>H/MeOH</sub>), triterpenes (EX<sub>EtOH</sub> and F<sub>Acoc</sub>) and steroids (EX<sub>EtOH</sub> and F<sub>hex</sub>). The content of phenolic compounds (C.F.) and total flavonoids (F.T.) were higher for F<sub>Acoc</sub> (C.F. = 798.5 µg/g and F.T. = 253.4 µg/g), followed by EX<sub>EtOH</sub> (C.F. = 685.3 µg/g; F.T. = 195.7 µg/g), F<sub>H/MeOH</sub> (C.F. = 347.5 µg/g; F.T. = 23.1 µg/g) and F<sub>hex</sub> (C.F. = 124.0 µg/g; F.T. = 63.1 µg/g). F<sub>Acoc</sub> and F<sub>hex</sub> showed greater antioxidant activity and the EX<sub>EtOH</sub> extract (14.5 mm) and F<sub>hex</sub> fraction (15.3 mm), showed a halo of moderate inhibition against *Staphylococcus aureus* at the lowest concentrations, with only the F<sub>hex</sub> and F<sub>Acoc</sub> fractions demonstrating effect against *S. aureus* with broth microdilution values of 6.25 to 12.5 mg/mL. The results indicated the presence of phytochemicals with antimicrobial potential in these two fractions, indicating a possible source of obtaining herbal medicines to treat infections, thus justifying the ethnic uses of *R. brasiliensis* for various infectious diseases.

**Keywords:** DPPH; Flavonoids; Rubiaceae; *Staphylococcus aureus*; β-sitosterol.

**Autor correspondente:** Larissa Tinoco Barbosa  
E-mail: larissatinocobarbosa@gmail.com

Recebido em: 18/04/2024  
Aceito em: 10/09/2024

## 1 INTRODUÇÃO

*Rubiaceae* é uma família composta com cerca 13.765 espécies, distribuídas em 611 gêneros que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais (Fonseca *et al.*, 2020). No Brasil são mais de 126 gêneros e 1.400 espécies, das quais se destacam 15 espécies do gênero *Richardia*, são relatadas como plantas daninhas (Monquero *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2020).

Neste grupo está *Richardia brasiliensis* Gomes, conhecida popularmente como falsa poaia ou mata-pasto, entre outros nomes, uma espécie nativa da América do Sul que ocorre desde a região dos Andes, onde pode ser encontrada até a 2.500 m de altitude, até a costa oriental, junto ao oceano Atlântico (Kissmann; Groth, 2000; Fonseca *et al.*, 2020).

A planta possui uso na medicina popular, com atividade emética, hipoglicemiante, expectorante, diaforética, vermífuga e tratamento de hemorroidas (Grandi *et al.*, 1989; Agra *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2008; Matias *et al.*, 2018).

No Brasil, seus extratos polares e apolares das folhas e caules vem sendo investigados quanto ao potencial antimicrobiano frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas (Correa *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2013) e fitopatógenos (Matias *et al.*, 2018). Seu potencial antimicrobiano é associado a diversidade de fitoconstituintes presentes nas folhas e caules, em especial polifenóis, esteroides e triterpenos (Pinto *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2013; Matias *et al.*, 2018).

Apesar dos estudos já desenvolvidos com a espécie, ainda há uma lacuna em relação aos dados antimicrobianos utilizando, por exemplo, as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* e sua relação com os fitoconstituintes e potencial antioxidante.

Além disso, devido a ampla dispersão geográfica de *R. brasiliensis* pode existir uma variabilidade de seus constituintes, sendo necessário o doseamento dos polifenóis e a determinação do potencial antioxidante, variáveis importantes que podem influenciar no potencial terapêutico da planta, o que justifica este estudo.

Outro ponto importante é a busca por antimicrobianos eficazes de origem vegetal, resultado da capacidade das plantas elaborarem mecanismos químicos de defesa para evitar pragas e doenças, por meio dos metabólitos secundários (Tiku, 2018). Assim sua

diversidade de grupos químicos pode ser uma alternativa de pesquisa na busca por novos agentes terapêuticos, uma fonte promissora no combate as doenças infecciosas, com potencial para a obtenção de fitoterápicos e uma importante alternativa no tratamento de determinadas doenças (Barreiros; David, 2006; Bessa; Laranjeira, 2020).

Considerando-se a lacuna de informações do potencial antimicrobiano de *Richardia brasiliensis*, objetivou-se avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante do extrato e frações da espécie, além de determinar seu conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO

As partes aéreas (folhas e caules) de *Richardia brasiliensis* foram coletadas próximas a Horta de Plantas Medicinais e Aromáticas no *Campus* da Universidade, Campo Grande, Mato Grosso do Sul (20°26'20.64''S; 54°32'26.78''O), com uma exsiccata depositada no Herbário da instituição sob o número de registro 05052. O acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado encontra-se cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), número de registro AEA632B.

As folhas e caules foram limpos, secas em estufa de ventilação de ar à 45 °C (MARCON®, MA35) por 3 dias, pesadas, pulverizadas em conjunto em moinho elétrico (Marconi®, MA048), na proporção de 391 g (51,5%) de caule e 368 g de folhas (48,5%) e tamisadas (malha n° 60). Do material processado, 760,5 g do pó de folhas e caules foram submetidos a extração com etanol (99,5 %), que ocorreu em banho de ultrassom por 60 minutos (Unique®, 1450), seguido de maceração estática à temperatura ambiente (26 ± 5 °C), repetindo-se este procedimento por 15 dias até esgotamento da droga vegetal (Matias *et al.*, 2020). O solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo (Tecnal®, MA120), obtendo-se 19,8 g de extrato bruto etanólico (EX<sub>EtOH</sub>).

### 2.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Em relação aos ensaios de detecção das classes de metabólitos secundários, 15,5 g de EX<sub>EtOH</sub> foram suspensos em solução hidrometanólica (340 mL de metanol/água 1:1), submetido à partição sucessivamente com solventes de polaridade crescente, hexano (4 x 550 mL) e acetato de etila (4 x 750 mL). As fases orgânicas foram concentradas para produzir as frações hexânica (F<sub>Hex</sub> = 4,1 g), acetato de etila (F<sub>Acet</sub> = 3,2 g) e hidrometanólica (F<sub>H/MeOH</sub> = 7,1 g). As interfases da fração hexânica e acetato de etila correspondem a 1,1 g, as quais foram analisadas por cromatografia de camada delgada e observou-se tratar-se de uma mistura de fases, logo optou-se em não utilizar o material.

EX<sub>EtOH</sub> e frações foram submetidas a análise fitoquímica via úmida, por meio de reações de precipitação e/ou mudança de cor, com base no método descrito por Matos (2009), com iridoides determinados com base em Harborne (1998) e Dinda (2019). As

análises foram executadas em triplicatas e os resultados foram comparados e contrastados observando a alteração de cor e precipitação, considerando-se: fortemente positivo como alta intensidade (+++), positiva acentuada (++±), positiva (++) , medianamente positiva (+±), positiva discreta (+), parcial (±) e negativa (-), com escore classificado em 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5% e zero (0), respectivamente, com metodologia adaptada de Fontoura *et al.* (2015).

A confirmação das classes de metabólitos secundários e o sistema de eluição foram realizados por meio de cromatografia de camada delgada (CCD: Sílica-gel 60F<sub>254</sub>), empregando reagentes específicos para compostos fenólicos, flavonoides terpenos, alcaloides, compostos fenólicos e flavonoides (Bladt, 2009).

### 2.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

O teor de fenólicos totais do extrato e frações foi determinado pelo Método Folin-Ciocalteu's, utilizando-se 100 mg de cada uma das amostras, com ensaios realizados em espectrofotômetro na região de 750 nm (Femto<sup>®</sup>, modelo 800XI), em cubetas de quartzo, tendo como padrão o ácido gálico (10 a 300 µg/mL) para a construção da curva padrão ( $y = 0,0077 x - 0,0228$ ;  $R^2 = 0,9985$ ) (Sousa *et al.*, 2007).

Para quantificação dos flavonoides, foi utilizado o método adaptado de Sobrinho *et al.* (2008), com análises realizadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm, em cubetas de quartzo, tendo como padrão a quercetina (0,5 mg/mL) para construir a curva de calibração, concentrações de 0,04; 0,2; 0,4; 2; 4; 8; 12; 16; e, 20 µg/mL ( $y = 0,0637 x - 0,0067$   $R^2 = 0,9991$ ).

### 2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Determinada com base na atividade sequestradora de radical livre do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), extrato e frações, sendo preparada uma solução de DPPH a 0,004% em metanol e para cada 100 µL das amostras, adicionados 3000 µL da solução de DPPH (Kumaran; Karunakaran, 2006). As análises foram realizadas em triplicatas e as leituras foram feitas em espectrofotômetro (Femto<sup>®</sup>, modelo 800XI) a 517 nm após 30 min de reação, com resultados apresentados em Concentração Inibitória Mínima – CIM (CI<sub>50</sub> - concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH).

### 2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Foi aplicado o teste de difusão em disco, a bioatografia e determinação da CIM, realizados com base nas técnicas do Clinical Laboratory Standards Institute (Clis, 2012), utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

A padronização da suspensão bacteriana foi obtida de acordo com o seguinte procedimento: Para cada amostra foi preparada uma suspensão padronizada a partir da cultura de 24 horas em ágar Müeller-Hinton (CMH) (Difco®), em tubo contendo solução salina estéril (NaCl – 0,85 %), com densidade ajustada por comparação ao tubo n° 0,5 da escala McFarland (suspensão de BaSO<sub>4</sub> correspondendo a aproximadamente 1,5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL) (Nccls, 2003). As medidas foram realizadas por meio de um aparelho fotométrico (Femto®, 432) em absorbância de 625 nm.

Método de difusão em disco: o extrato e frações foram dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®) a fim de obter o extrato e frações em duas concentrações (2000 µg/disco e 500 µg/disco). O teste de difusão em ágar foi realizado utilizando discos de papel (Whatman n° 1) com 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL das amostras (extratos e frações). Como controle positivo, cloranfenicol (30 µg) e gentamicina (50 µg) para as bactérias e fluconazol (25 µg), leveduras, O controle negativo utilizou DMSO diluído em cada um dos solventes (etanol, hexano, acetato de etila e solução hidrometanólica).

Os discos foram secos à temperatura ambiente em câmara de fluxo laminar (Fanem®, 002CB) e em seguida transferidos para meio contendo os inóculos. As placas foram incubadas a 35° ± 2 °C e após 18 h para as bactérias e 24 h para *Candida* spp., com zonas de inibição observadas, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados em milímetros, considerando a área sem crescimento detectável a olho nu, com testes realizados em triplicata.

O extrato e as frações que apresentaram zonas de inibição iguais ou maiores a 8 mm de diâmetro foram considerados ativos (Bhalodia; Shukla, 2011; Panda *et al.*, 2016; Saquib *et al.*, 2019) e selecionados para as próximas etapa.

A confirmação dos resultados de difusão foi feita por bioautografia, com placas de cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica gel 60 F254 com espessura de 0,25 mm (Kieselgel 60 F254, Merck, Alemanha) e tamanho 20 x 20 cm.

Diferentes sistemas de solventes foram utilizados para a obtenção de uma separação adequada e após a escolha do solvente, as placas foram eluidas separadamente e secas para remoção completa dos solventes, sendo pulverizadas com a suspensão com *Staphylococcus aureus*, que apresentou o melhor resultado nos ensaios de difusão em disco, o mesmo ocorrendo com o controle positivo (clorofenicol).

As placas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C e depois pulverizadas com uma solução aquosa 2 mg/mL de 2, 3, 5-cloreto de trifeniltetrazólio, com a inibição de formação de halo comparada com o padrão e o fator de retenção (RF) dos pontos relacionados na placa CCD sendo calculados.

O teste de atividade antimicrobiana foi determinado por ensaio de microdiluição em caldo (MIC), com as suspensões bacterianas preparadas em solução salina (0,85%), ajustadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland e diluídas em caldo Mueller Hinton cátion-ajustado (CAMHB) (Clsi, 2012).

Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho do extrato e frações utilizando de 80 mg das amostras solubilizadas em 10 mL de água destilada estéril e agitada em vórtex até completa homogeneização, obtendo uma concentração igual a 8.000 µg/mL. Em seguida, as placas de microtitulação de 96 poços, contendo diluições seriadas do extrato e frações, nas concentrações de 2000 a 3,91 µg/mL, receberam 100 µL

de suspensão microbiana, sendo incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 20h, com a CIM definida como a menor concentração de extrato e frações capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano.

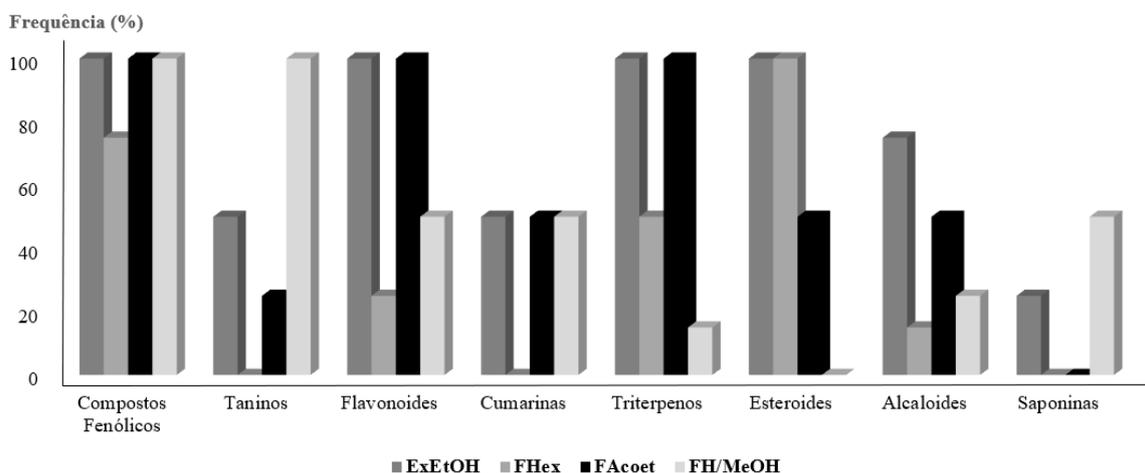
Embora ainda não exista uma padronização da CIM para extratos vegetais e frações quando comparados aos antimicrobianos padrões, seguiu-se os valores de CIM  $\leq 100$   $\mu\text{g/mL}$  como atividade antimicrobiana potencialmente promissora, CIM de 100 a 500  $\mu\text{g/mL}$  como atividade antimicrobiana moderada, CIM de 501 a 1.000  $\mu\text{g/mL}$  como atividade antimicrobiana leve e CIM  $>1,000$   $\mu\text{g/mL}$ , inativo (Boguszewska-Czubara *et al.*, 2015; Holetz *et al.*, 2002; Silva e Oliveira, 2013; Cerveira *et al.*, 2021).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos pelo teste F, avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica do extrato e frações das folhas e caules de *R. brasiliensis* revelou as mesmas classes de metabólitos secundários (compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos e alcaloides), com diferença ocorrendo nas frequências (Figura 1). Os esteroides foram majoritários para o extrato e FHex, com taninos sendo majoritários para FH/MeOH e com menor frequência, cumarinas presentes no extrato e frações (Facoet e FH/MeOH), enquanto as saponinas seguiram o mesmo perfil, com menor frequência para o extrato e FH/MeOH (Figura 1).



**Figura 1.** Triagem fitoquímica do extrato etanólico (EX<sub>EtOH</sub>) e frações (hexânica = F<sub>Hex</sub>, acetato de etila = F<sub>Acet</sub> e hidrometanólica = F<sub>H/MeOH</sub>) folhas e caules de *Richardia brasiliensis*, Campo Grande, Mato Grosso do Sul

O *screening* fitoquímico traz os resultados do perfil químico qualitativo do  $Ex_{EtOH}$  e das frações,  $F_{Hex}$ ,  $F_{Aco}$ , e  $F_{H/MeOH}$ , como análise clássica os procedimentos analíticos empregados, com base em Fontoura *et al.* (2015), para detectar os ingredientes ativos de plantas medicinais são conhecidos e validados nas monografias nacionais e internacionais, por serem métodos rápidos, com resultados representativos e de baixo custo (Silva *et al.*, 2017). Por outro, os ensaios para o doseamento dos fenóis totais e flavonoides (Tabela 1) confirmam e validam os obtidos nas análises clássicas (Figura 1).

As espécies de Rubiaceae são conhecidas devido a biossíntese de diferentes tipos de metabólitos secundários e cada uma das subfamílias apresenta um perfil específico e típico, sendo os marcadores quimiotaxonômicos citados com maior frequência os alcaloides indólicos, iridoides e antraquinonas (Martins *et al.*, 2014). Contudo, por ser uma das famílias com grande diversidade de espécies, além das três classes citadas são encontrados com frequência os terpenoides, flavonoides e taninos (Matias *et al.*, 2018).

No caso de *R. brasiliense* existem diversos trabalhos relatando os constituintes detectados e/ou isolados das folhas, como por exemplo Adekunle (2000) demonstrando que seu extrato aquoso, de exemplares obtidos em Lagos, Nigéria, contém tanino, enquanto o extrato etanólico, antraquinonas, flavonoides, saponinas e esteroides.

Em outro estudo, também com amostras obtidas na Nigéria, Edeoga *et al.* (2005) detectaram nas folhas e caules alcaloides, taninos, saponinas, esteroides, terpenos, flavonoides e heterosídeos cardiotônicos. Já Pinto *et al.* (2008) isolaram e identificaram o flavonoide isorametina-3-Orutinosídeo, o triterpeno ácido oleanólico, a cumarina escopoletina e dois ácidos fenólicos, *p*-hidroxibenzóico e *m*-metoxi-*p*-hidroxibenzóico, no extrato etanólico obtidos de plantas coletadas em Santa Rita, Paraíba. Figueredo *et al.* (2009), ao realizarem um *screening* fitoquímico do extrato etanólico de folhas e caules detectaram a presença de alcaloides, flavonoides, esteroides, cumarinas e resina, enquanto nas raízes, cumarinas, resinas, esteroides e triterpenos, com plantas obtidas em Goiânia, Goiás.

Dornelles *et al.* (2022) também avaliaram as folhas de plantas coletadas em Santa Maria, Rio Grande do Sul, encontrando no extrato aquoso antocianinas, taninos, mucilagem, resina, taninos condensados e hidrolisáveis, classes de metabólitos secundários já relatadas por outros pesquisadores. Estes estudos demonstram que a espécie vem sendo objeto de estudo por vários grupos de pesquisa, com a finalidade de investigar seus constituintes majoritários.

O grupo de pesquisa de Matias *et al.* (2018) também detectaram no extrato etanólico de folhas e caules, coletados em área de Cerrado em Campo Grande, as mesmas classes de metabólitos secundários deste estudo, exceto para os alcaloides e triterpenos nas frações, além de isolarem e identificarem o ácido ursólico, ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol e stigmaterol.

Posteriormente, Dilkin *et al.* (2022), ao analisarem amostras do extrato etanólico das folhas, coletados na mesma região, encontraram os mesmos fitoconstituintes, exceto para os heterosídeos cardiotônico, flavonas e açúcares redutores. Recentemente, Dilkin *et al.* (2024), apontou a presença de compostos fenólicos; taninos; flavonoides; chalconas; cumarinas; esteroides; triterpenos; saponinas; heterosídeos cardiotônicos e açúcares redutores no extrato hidroalcólico das folhas de *R. brasiliense* coletadas em Campo Grande – MS.

Com base nestas pesquisas e nos resultados apresentados (Figura 1), é possível constatar a diversidade de constituintes encontrados nas partes aéreas da planta ou apenas nas folhas de *R. brasiliense*, o que demonstra a influência da localização geográfica para os constituintes minoritários. Por outro lado, fica evidente a presença dos polifenóis, fenóis livres, cumarinas e alcaloides, com destaque para os esteroides e triterpenos (Figura 1), podendo-se inferir que estas classes são as mais frequentes nas partes aéreas da planta, independentemente da localização de coleta, por serem classes detectadas na planta de outras regiões do território brasileiro assim como na África (Adekunle, 2000; Pinto *et al.*, 2008; Figueredo *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2014; Matias *et al.*, 2018; Dilkin *et al.*, 2022; Dilkin *et al.*, 2024).

Em relação aos teores de fenóis totais (Tabela 1), os mesmos foram diferentes estatisticamente e superiores para  $F_{\text{Acoet}}$ , seguido do extrato e frações ( $F_{\text{H/MeOH}}$  e  $F_{\text{Hex}}$ ). Os flavonoides e o potencial antioxidante seguiram o mesmo perfil dos fenóis totais, demonstrando apenas o resultado para  $F_{\text{Acoet}}$ , seguido do extrato, enquanto  $F_{\text{Hex}}$  foi superior a  $F_{\text{H/MeOH}}$ , resultados indicando que o potencial antioxidante está relacionado com o conteúdo de flavonoides presentes no extrato e frações.

**Tabela 1.** Conteúdo de fenóis e flavonoides totais e concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH ( $CI_{50}$ ) do extrato etanólico ( $EX_{\text{EtOH}}$ ) e frações (hexânica =  $F_{\text{Hex}}$ , acetato de etila =  $F_{\text{Acoet}}$  e hidrometanólica =  $F_{\text{H/MeOH}}$ ) das folhas e caule de *Richardia brasiliensis*, Campo Grande, Mato Grosso do Sul

Extrato/Frações	Fenóis ( $\mu\text{g/g}$ de Ácido Gálico)	Flavonoides ( $\mu\text{g/g}$ de Quercetina)	DPPH (mg/mL)
$EX_{\text{EtOH}}$	685,35 $\pm$ 0,4a	195,70 $\pm$ 1,9a	0,53 $\pm$ 1,2a
$F_{\text{Hex}}$	124,00 $\pm$ 1,1b	63,10 $\pm$ 0,9b	1,18 $\pm$ 1,4b
$F_{\text{Acoet}}$	798,50 $\pm$ 0,6c	253,42 $\pm$ 0,9c	0,43 $\pm$ 1,1c
$F_{\text{H/MeOH}}$	347,55 $\pm$ 1,2d	23,06 $\pm$ 1,0d	4,28 $\pm$ 1,5d

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rosa *et al.* (2010) ao avaliarem o teor de compostos fenólicos para o extrato e frações polares de uma espécie da mesma família também encontrada no bioma Cerrado, *Palicourea rígida* HBK, com a fração acetato de etila apresentando 933,25  $\mu\text{g/mL}$ , seguido do extrato etanólico (469,8  $\mu\text{g/mL}$ ) e fração metanólica (159,4  $\mu\text{g/mL}$ ).

Os compostos fenólicos e flavonoides totais também foram encontrados por Rosa *et al.* (2010) para a espécie *Richardia grandiflora* Steud (Tomaz *et al.*, 2008), indicando que estes compostos podem ser comuns no gênero e responsáveis pelo potencial antioxidante do gênero *Richardia*.

Comparando os resultados da atividade antioxidante com o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais (Tabela 1), pode-se inferir que estas duas classes de metabólitos secundários possuem atividades sequestradoras de radicais, principalmente os flavonoides, os quais vêm sendo amplamente discutidos na literatura, correlacionado a fatores mesoméricos que conferem a esse grupo funcional uma alta reatividade como doadores de elétrons (Rice-Evans *et al.*, 1996; Munoz *et al.*, 2007).

Para a fração hexânica a atividade antioxidante pode estar ligada, além dos flavonoides, aos triterpenos pentacíclicos, especialmente os triterpenos ácidos (Liu, 1995)

isolados e identificados por Pinto *et al.* (2008) das partes aéreas de *R. brasiliensis*, tais como o ácido oleanólico, triterpeno e o esteroide  $\beta$ -sitosterol, além de uma mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

Os antioxidantes são compostos que combatem os processos oxidativos, diminuindo danos ao DNA e macromoléculas, atuando na diminuição ou inibição dos efeitos desencadeados por radicais livres e na quebra da cadeia de reações de oxidação tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Maia *et al.*, 2007). Quando apresentado aos substratos oxidativos nas concentrações ideais, inibem ou proporcionam um atraso significativo no processo oxidativo, sendo este dividido em enzimático, solúvel, nutricional e sequestrador de metais de transição (Vaya; Aviram, 2001).

A natureza dos antioxidantes vegetais é representada de maneira muito variada, devido à ampla capacidade oxidativa dos compostos fenólicos, tais como taninos condensados, flavonoides, e xantonas, responsáveis por diminuir os efeitos nocivos dos radicais livres (Razavi *et al.*, 2008) e dependendo do arranjo dos grupos funcionais em torno da estrutura da molécula, tanto o número quanto a configuração dos grupos hidroxila doadores de H, são as principais características estruturais que influenciam a capacidade antioxidante dos fenólicos (Zeb, 2020).

Logo, os polifenóis pelo sistema de aromaticidade e a presença de hidroxilas e carbonilas, possuem elétrons livres desemparelhados, tornando-os altamente instáveis e com capacidade extrair elétrons de outras moléculas para atingir a estabilidade, causando-lhes danos e neste caso o uso do DPPH para avaliar as propriedades antioxidantes de extratos vegetais e derivados é uma opção para apontar a presença de fitoquímicos doadores de átomos de H (ou mais em geral “redutores”) presentes no conteúdo das amostras (Foti, 2015).

Em relação a inibição de crescimento das bactérias, apenas o extrato etanólico ( $14,5 \pm 0,5$  mm) e a fração hexânica ( $15,3 \pm 1,1$  mm) apresentam halos de inibição de crescimento para *S. aureus*, sendo os demais (extrato e frações  $F_{Hex}$ ,  $F_{Acoet}$  e  $F_{H/MeOH}$ ) inativos para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*.

Os extratos de plantas são considerados ativos quando os halos de inibição são superiores a 12 mm de diâmetro (Silva *et al.*, 2008), tal como ocorreu para  $EX_{EtOH}$  e  $F_{Hex}$ . A confirmação destes resultados está embasada nos ensaios realizados com o grupo controle negativo (DMSO) e positivo (gentamicina), pois o primeiro não apresentou halo de inibição e, portanto, o solvente (DMSO) não interferiu no resultado.

A fração hexânica foi submetida ao ensaio de bioautografia e com apresentação das imagens das cromatoplacas, antes e após o ensaio com *S. aureus* e o padrão gentamicina (Figura 2), é possível observar a sensibilidade e localização da zona de inibição em um dos sete componentes da fração.

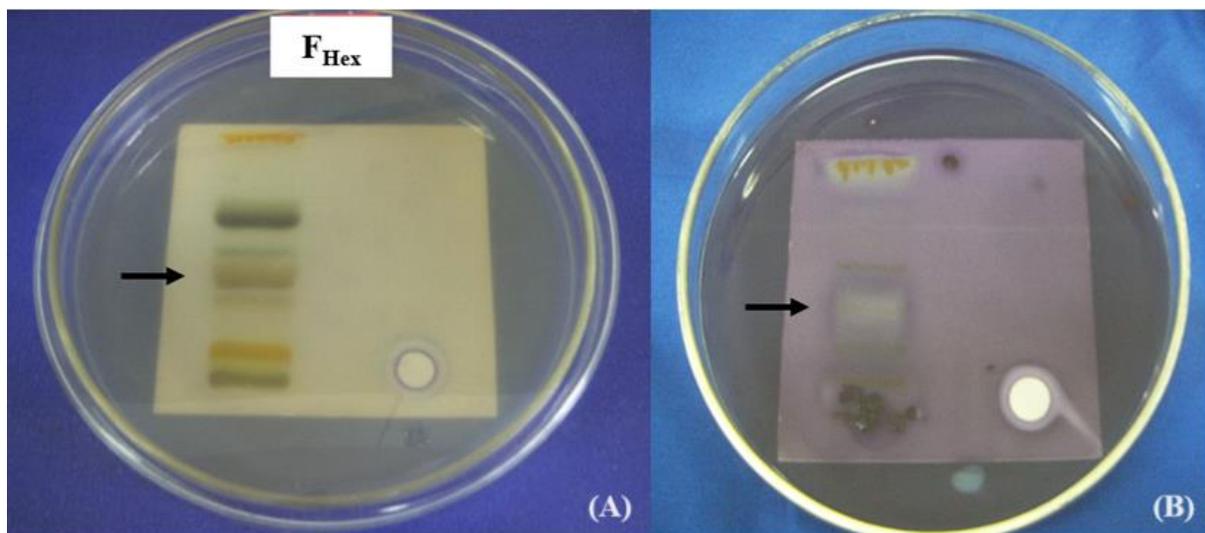
Ao relacionar-se estas imagens com a fitoquímica (Figura 1) e ao valor de  $R_f$  de 0,59 da fração hexânica, semelhante ao  $R_f$  do padrão do  $\beta$ -sitosterol ( $R_f$  0,60), é possível atribuir a presença do esteroide na fração hexânica a capacidade de suprimir o crescimento bacteriano. Tal suposição é baseada na informação da presença deste esteroide detectado no extrato etanólico das partes aéreas de *R. brasiliensis* (Matias *et al.*, 2018; Dilkin *et al.*, 2022; Dilkin *et al.*, 2024) com efeito similar ao observado neste experimento, indicando forte tendência desta ação estar relacionada a sua presença.

Nos ensaios de CIM com o extrato etanólico e frações, apenas F<sub>Hex</sub> foi capaz de inibir a bactéria *S. aureus*, com valor de CIM de 6,25 mg/mL, sendo a menor concentração que inibiu completamente o crescimento da cepa testada. Na F<sub>Acet</sub> ocorreu a inibição do crescimento da cepa apenas na concentração de 12,5 mg/mL, indicando que são necessárias concentrações superiores para se obter o controle de *S. aureus*.

Em relação ao extrato etanólico e as demais frações que não apresentara inibição, é possível inferir que os componentes ativos estão presentes em baixas concentrações, ou existem alguns antagonistas, componentes presentes que servem como promotores de crescimento para as bactérias, necessitando assim de ensaios com concentrações superiores as utilizadas neste estudo para inibir o crescimento de *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana encontrada neste trabalho foi superior a reportada por Figueiredo *et al.* (2009), que avaliaram o extrato etanólico das partes aéreas *R. brasiliensis* coletadas em Goiás, cujo extrato apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas não esporuladas e esporuladas e Gram negativas, com CIM entre 0,37 mg/mL e 0,74 mg/mL.

Deste modo, os resultados encontrados são promissores e mostram que a fração hexânica foi ativa e capaz de inibir *S. aureus*. Uma observação interessante em relação a esta fração é a presença do  $\beta$ -sitosterol, sugerindo a presença de um esteroide antibacteriano capaz de atingir a parede bacteriana ou alvos intracelulares, tais como os ribossomos bacterianos, por exemplo, afetando a sobrevivência do organismo. O fato de os componentes ativos nesta fração provavelmente estarem em baixas concentrações indica uma possível atuação sinérgica na promoção da ação bactericida.



**Figura 2.** Ensaio com a fração hexânica (10 mg/mL): (A) eluição da fração hexânica e o padrão gentamicina; (B) cromatoplaça com a zona observada de inibição contra *Staphylococcus aureus* e a gentamicina como padrão

Os diferentes extratos, frações e substâncias puras obtidos de folhas e caules de *Richardia brasiliense* com potencial antimicrobiano já vem sendo reportado, em especial para fitopatógenos. Matias *et al.* (2018), apontam a ação fungicida, da fração hexânica e acetato de etila bem como a fração pura, obtidos das partes aéreas (folhas e caules) da planta, proporcionaram a redução do crescimento micelial de *Colletotrichum*

*gloeosporioides*, na concentração de 160 µg/100 mL e para *Lasiodiplodia theobromae*, apenas o extrato etanólico e a fração acetato de etila e a fração pura se destacaram nas concentrações de 80 e 160 µg/100 mL.

Recentemente, Dilkin *et al.* (2024), ao investigaram o extrato hidroalcolico das folhas de *R. brasiliensis*, coletados também em Campo Grande – MS, no controle de *Macrophomina phaseolina* inoculado na base do caule de feijão do cultivar carioca, o extrato na concentração de 1600 µg/100 mL controlou 24,7%.

Os resultados aqui apresentados (Figura 1 e 2 e Tabela 1) são fortes evidências da ação dos polifenóis detectados no extrato e nas frações contra as bactérias e ao relacionar com os dados da atividade antioxidante é possível inferir que da presença dos compostos fenólicos e flavonoides são fortes evidências da capacidade destas classes de metabólitos secundários em inibir o processo de síntese da membrana celular e/ou síntese da parede celular.

Em ressonância com polifenóis estão os esteroides sinalizados na fração hexânica, a qual foi ativa inibindo *S. aureus*. Uma observação interessante em relação a esta fração é a presença do  $\beta$ -sitosterol, sugerindo a presença de um esteroide antibacteriano capaz de atingir a parede bacteriana ou alvos intracelulares, tais como os ribossomos bacterianos, por exemplo, afetando a sobrevivência do organismo. O fato de os componentes ativos nesta fração provavelmente estarem em baixas concentrações indica uma possível atuação sinérgica na promoção da ação bactericida.

Com base nos resultados aqui apresentados as partes aéreas de *R. brasiliensis* pode ser uma opção para formulações fitoterápicas antibacterianas para uso dermatológicos, sendo que o uso oral passa por vários processos em modelos experimentais, uma opção de continuidades de pesquisas com uma planta cosmopolita no Brasil com potencial medicinal.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstraram que existe atividade antimicrobiana da parte aérea de *Richardia brasiliensis* frente a *Staphylococcus aureus*, um importante patógeno humano causador de infecções hospitalares, sendo que esta atividade pode estar ligada a presença de esteroides. A atividade antioxidante observada provavelmente deve estar ligada a presença dos compostos fenólicos e flavonoides no extrato e frações, com maior concentração na fração acetato de etila. No extrato e fração hexânica existe uma maior intensidade de esteroides, identificando-se o  $\beta$ -sitosterol, indicando sua provável ação antimicrobiana.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT), Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Instituto Nacional de Áreas Úmidas (INAU) e Universidade Anhanguera-UNIDERP. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de produtividade (PQ1C) e de estudos concedidas.

## REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, A. A. Antifungal Property of the Crude Extracts of *Brachystegia Eurycoma* and *Richardia brasiliensis*. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 70-72, 2000. <https://doi.org/10.4314/njnpm.v4i1.11743>.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100021>
- BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>
- BESSA, V. C.; LARANJEIRA, B. J. Mecanismos de resistência bacteriana em cocos gram positivos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 40-48, 2020.
- BHALODIA, N. R.; SHUKLA, V. J. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 104-109, 2011. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82956>.
- HILDEBERT, W.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. London: Springer Heidelberg, 2009.
- BOGUSZEWSKA-CZUBARA, A. *et al.* Novel synthesis scheme and in vitro antimicrobial evaluation of a panel of (E)-2-aryl-1-cyano-1-nitroethenes. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 31, n. 6, p. 900-907, 2016. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1070264>.
- CERVEIRA, M. M. *et al.* Bioprospection of novel synthetic monocurcuminoids: Antioxidant, antimicrobial, and in vitro cytotoxic activities. **Biomed. Pharmacother.**, v. 133, p. 111052, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111052>.
- CORREA, I.; CORREA, M. G. P.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **ARS Vet.**, v. 21, n. 1, p. 69-76, 2005. <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2005v21n1p69-76>.

**CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition.** CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.

DILKIN, E. R. S. *et al.* Potencial de uso de plantas daninhas de áreas agrícolas e de pastagens do Cerrado em Mato Grosso do Sul. **Braz. J. Dev.**, v. 88, n. 2, p. 31534-31539, 2022. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-572>.

DILKIN, E. R. s. *et al.* Efeito antifúngico de extratos etanólicos de *Commelina erecta* L. e *Richardia brasiliensis* Gomes. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 17, n. 2, p. e10975-e10975, 2024.

DINDA, B. *et al.* Therapeutic Potentials of Plant Iridoids in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: A Review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 1, n. 169, p. 185-199, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.009>.

DORNELLES, R. C. *et al.* Phytochemical characterisation, antioxidant capacity, and in vitro toxicity of *Richardia brasiliensis* gomes crude extracts. **Nat. Prod. Res.**, v. 37, p. 764-768, 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2081850>.

EDEOGA, H. O; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3127>.

FIGUEIREDO, A. D. L. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis* Gomez (Rubiaceae). **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 65-68, 2009.

FONSECA, W. O. *et al.* A família Rubiaceae no Parque Nacional de Boa Nova, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 47, e462019, 2020. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-46/2019>

FOTI, M. C. Use and Abuse of the DPPH• Radical. **J. Agric. Food Chem**, v. 63, n. 40, p. 8765-8776, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03839>

FONTOURA, F. M. *et al.* Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Amaz.**, v. 45, n. 3, p. 283-292, 2015. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201500011>

GRANDI, T. S. M. *et al.* Plantas medicinais de minas gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989. <https://doi.org/10.1590/S0102-33061989000300018>

HARBORNE, A. J. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.** London: Chapman & Hall, 1998.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas: plantas dicotiledôneas**, por ordem alfabética de famílias de Geraniaceae a Verbenaceae. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: BASF, 2000.

KUMARAN, A.; JOEL KARUNAKARAN, R. Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Cardiospermum halicacabum*. **Pharm. Biol.** v. 44, n. 2, p. 146-151, 2006. <https://doi.org/10.1080/13880200600596302>

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, n. 2, p.57-68, 1995. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)90032-2)

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. S.; LIMA, A. S. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Editora UFC, 2007.

MARTINS, G. *et al.* Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **J. Pharm. Pharmacogn. Res.** v. 2, n.6, p. 158-171, 2014.

MATIAS, R. *et al.* Chemical Constituents and Antifungal Potential of the *Richardia brasiliensis* (Gomes) Ethanolic Extract. **Trop. Subtrop. Agroecosystems**, v. 21, n. 3, p. 457-465, 2018. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.2500>

MATIAS, R. *et al.* Phytochemistry and antifungal potential of *Datura innoxia* Mill. on soil phytopathogen control. **Biosci. J.**, v. 36, n. 3, 2020. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n3a2020-47881>.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3<sup>a</sup> ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MONQUERO, P. A.; CURY, J. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Controle pelo glyphosate e caracterização geral da superfície foliar de *Commelina benghalensis*, *Ipomoea hederifolia*, *Richardia brasiliensis* e *Galinsoga parviflora*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 123-132, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582005000100015>

MORAIS, E. D. *et al.* Evaluation of Antimicrobial and Modulatory activity of the extract of *Richardia brasiliensis* Gomes. **Indian J. Trad. Knowl.**, v. 12, n. 4, p. 619-622, 2013.

MUNOZ, O. *et al.* Contenido de flavonoides y compuestos fenolicos de mieles chilenas e indice antioxidante. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 848-851, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400017>

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA. 2003.

PANDA, A. C.; MARTINDALE, J. L.; GOROSPE, M. Polysome fractionation to analyze mRNA distribution profiles. **Bio-protocol.**, v. 7, n. 3, p. e2126-e2126, 2017. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3176>.

PINTO, D. S. *et al.* Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300010>

RAZAVI, S. M. *et al.* Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

ROSA, E. A. *et al.* Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Res. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400004>

SAQUIB, S. A. *et al.* Knowledge and attitude about basic life support and emergency medical services amongst healthcare interns in university hospitals: a cross-sectional study. **Emerg. Med. Int.**, v. 2019, n.9342892, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9342892>

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, G. L. Conhecimento popular e atividade antimicrobiana de *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae). **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 15, n. 1, p. 98-103, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000100014>

SILVA, G. O. *et al.* Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants. **Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod.**, v. 5, n. 2, p. 29-32, 2017.

SILVA, M. S. A. *et al.* Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Ver. Bras. Farmacogn.**, n. 18, v. 2, p. 236-240, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200017>

SOBRINHO, T. J. S. *et al.* Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400015>

SOUSA, C. M. *et al.* H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>.

TIKU, A. R. **Antimicrobial Compounds and Their Role in Plant Defense**. In: Singh, A., Singh, I. (eds) *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Springer: Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_13).

TOMAZ, A. C. A. *et al.* Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, n. 1, p. 47-52, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100011>.

VAYA, J.; AVIRAM, M.; Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. **Curr. Med. Chem. Imm. Endoc. Metab. Agent.**, v. 1, n. 1, p. 99-117, 2001. <https://doi.org/10.2174/1568013013359168>.

ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. e13394. 2020. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>