

Parte III  
Biologia



## ***Diospyros burchellii*: estudo químico e avaliação biológica**

Romário Pereira da Costa<sup>1</sup>

Evelise Costa Mesquita<sup>2</sup>

Hélder Nagai Consolaro<sup>3</sup>

Richele Priscila Severino<sup>4</sup>

**Resumo:** Este trabalho apresenta o estudo químico e a avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico (EEF) das folhas de *Diospyros burchellii* Hier (Ebenaceae), uma árvore nativa do Cerrado, conhecida popularmente como olho-de-boi. O perfil químico do EEF foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando extração em fase sólida (SPE) para o preparo das amostras. O fracionamento do extrato foi feito por extração líquido-líquido e cromatografia de exclusão (Sephadex LH-20). As análises dos dados obtidos por CLAE-DAD, RMN de <sup>1</sup>H e CG-EM mostrou a presença das principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato, sendo estes terpenoides, esteroides e flavonoides. O potencial antioxidante do extrato foi determinado pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), mostrando resultados promissores e motivando o isolamento das substâncias que desempenham esta atividade.

**Palavras-chave:** *Diospyros burchellii*, Ebenaceae, metabólitos secundários, antioxidante.

---

1 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química. Contato: romariop@live.com. Bolsista PIBIC - CNPq.

2 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química. Contato: e\_v\_elise@hotmail.com. Bolsista Pós-graduação - CAPES.

3 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia. Contato: helderconsolaro@gmail.com

4 Universidade Federal de Goiás – UFG. Regional Catalão, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química. Contato: richeleps@yahoo.com.br

# 1 Introdução

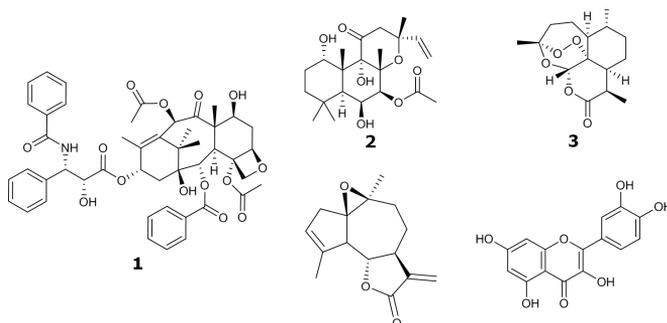
## 1.1 A importância do Cerrado e dos produtos naturais

O Brasil possui uma rica biodiversidade, sendo a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com o registro de mais de 55.000 espécies de um total 550.000 já conhecidas mundialmente. A biodiversidade abriga também uma grande diversidade química, representada por milhares de metabólitos secundário de diversas classes que por sua vez podem apresentar atividades biológicas e serem utilizados como protótipos para novos fármacos (DIAS, 1996; BARREIRO et al, 2009).

O cerrado brasileiro constitui o segundo maior bioma do Brasil e abriga mais de 11.000 espécies de plantas, dentre essas 4.400 são endêmicas. O Cerrado vem constantemente sendo degradado por ações antrópicas do homem, fazendo com que algumas espécies corram risco de extinção sem serem exploradas do ponto de vista químico e biológico (MYERES et al, 2000; BARREIRO, et al 2009).

Desde os primórdios a civilização humana utiliza produtos naturais como fonte terapêutica. O interesse por produtos naturais ficou maior principalmente devido às populações acreditarem que estes são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, o que nem sempre é real. Quando analisamos os percentuais das entidades químicas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2014, verifica-se que os produtos naturais contribuíram com 61,0% das descobertas, sendo 6,7% oriundos de produtos naturais, 32,0% derivados semisintéticos de produtos naturais, derivados de produtos naturais e produtos sintetizados com grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais e 22,3% realizados por síntese total, considerando produtos naturais como protótipos (CALIXTO, 2000 ; CARVALHO et al, 2008 ; NEWMAN et al, 2016 ; PENNA et al, 2005).

Inúmeros fármacos foram derivados de metabólitos secundários de plantas, entre eles podemos citar taxol (1) (antitumoral), forskolina (2) (bronco e vasodilatador), artemisinina (3) (antimalárico), arglabina (4) (antitumoral) e quercetina (5) (antioxidante) (Figura 1) (GENESAN, 2008).



**Figura 1** Fármacos derivados de metabólitos secundários de plantas.

## 1.2 O gênero *Diospyros* e a espécie *Diospyros burchellii* Hiern

O gênero *Diospyros* pertence à família das Ebenaceae, que é composta por 5 gêneros espalhados pelos trópicos e subtropicais. Este gênero possui 400 espécies e destas apenas 35 compreende a flora brasileira (GANESAN, 2008; CRONQUIST, 1981).

Muitas espécies desse gênero são descritas por possuírem atividades biológicas interessantes. Na medicina tradicional indiana, africana e chinesa, o gênero *Diospyros* é usado para o tratamento de coqueluche, irregularidade no ciclo menstrual, dores intestinais, úlceras gástricas, hanseníase, picada de cobra, asma, erupção cutânea, disenteria, infecções oculares, dores torácicas e gonorreia (BARROSO et al, 1978).

Em relação aos metabólitos secundários, este gênero é rico em naftoquinonas (simples, monoméricas e diméricas), além de triperpenos, flavonoides e glicosídeos antraquinônicos (WATT, 2014; HEGNAUER, 1966; GANAPATY, 2006).

Devido à importância medicinal do gênero *Diospyros*, realizou-se o estudo químico e a avaliação da atividade biológica da espécie *Diospyros burchellii* Hiern, que é conhecida popularmente como olho-de-boi, caqui-bravo e caqui-do-mato. Do ponto de vista químico não há relato de estudos desta espécie, tornando-a promissora para investigação química e biológica.

## 2 Metodologia

### 2.1 Obtenção do extrato das folhas *D. burchellii*

A espécie folhas *D. burchellii* foi coletada no Cerrado do centro-oeste, na região do Distrito Federal (Gama/DF 2011 Autorização n° 010698/2013-2 CNPq) e as folhas e o caule foram secos, triturados e submetidos à maceração com etanol, a temperatura ambiente. Após três dias de extração o material foi filtrado e o solvente evaporado, obtendo-se o extrato etanólico das folhas (EEF) e do caule (EEC).

### 2.2 Extração em fase sólida (SPE)

Primeiramente foram preparadas 4 amostras contendo cada uma 50 mg do extrato etanólico das folhas (EEF), diluídas em 1 mL de metanol/água (MeOH/H<sub>2</sub>O) na proporção de 2:8. Posteriormente o cartucho (SILICYCLE, C<sub>18</sub>, 500 mg/6 mL) foi condicionado com 30 mL da solução MeOH/H<sub>2</sub>O (2:8) e logo em seguida as amostras foram introduzidas e submetidas a diferentes sistemas de eluição. Cada uma das

amostras foi submetida a um processo diferente de *clean up*, obtendo quatro frações para cada amostra (Tabela 1). Ao todo coletou-se 16 amostras que foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) e por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ). Em alguns casos foi possível analisar as amostras utilizando Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).

**Tabela 1** Sistemas de eluição utilizados no *clean up*

Sistema	Eluição (v/v)*
1	ACN/H <sub>2</sub> O (25:75); ACN/H <sub>2</sub> O (50:50); ACN/H <sub>2</sub> O (75:25); ACN
2**	ACN/H <sub>2</sub> O (25:75); ACN/H <sub>2</sub> O (50:50); ACN/H <sub>2</sub> O (75:25); ACN
3	MeOH/H <sub>2</sub> O (25:75); MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50); MeOH/H <sub>2</sub> O (75:25); MeOH
4**	MeOH/H <sub>2</sub> O (25:75); MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50); MeOH/H <sub>2</sub> O (75:25); MeOH

(\*) Volume de 10 mL para cada mistura de solvente grau ultrapuro. (\*\*) Os sistemas de eluição foram acidificados com 0,1% de HCO<sub>2</sub>H. Legenda: ACN = acetonitrila; H<sub>2</sub>O = água; MeOH = metanol.

### 2.3 Condições cromatográfica nas análises por CLAE

Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência as amostras foram preparadas utilizando filtro de membrana 0,22  $\mu\text{m}$  PFE (Millex). As amostras foram analisadas em HPLC *Agilent Technologies* equipado com coluna de C18 (*Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18* 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm). A fase móvel usada foi gradiente acetonitrila/água de 0-100% (0,1% de ácido fórmico) em fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, por um tempo de 30 minutos e monitorada por UV/DAD 217, 220, 240, 254 e 365 nm.

### 2.4 Condições cromatográficas nas análises por CG-MS

O equipamento de cromatografia a gás utilizado foi o *Agilent Technology Inc* CG/MS, equipado com um analisador tipo quadrupolo. Utilizou-se uma coluna capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme e fase estacionária contendo 5% de difenil, 95% dimetilpolisiloxana (HP-5MS) da *Agilent Technology*.

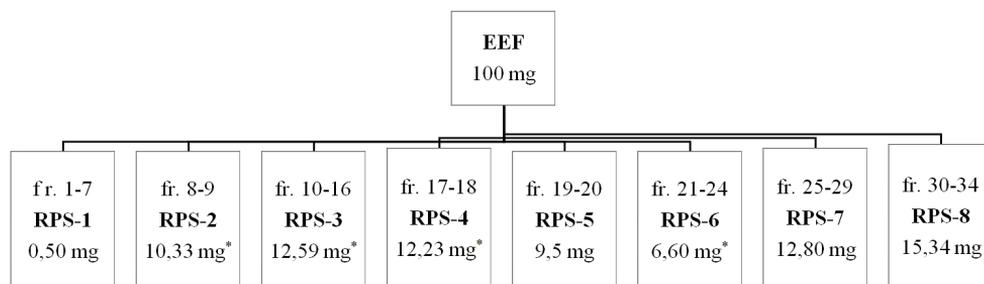
Programação de temperatura: 75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 240 °C (2 min). O gás de arraste utilizado foi o hélio a um fluxo de 1,0 mL/min. O injetor operou a 250 °C no modo *splitless* e o espectrômetro de massas no modo positivo por impacto eletrônico (IE) com energia de 70 eV.

## 2.5 Análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  foram realizados em colaboração com o Luciano Morais Lião do Instituto de química da UFG – Regional Goiânia.

## 2.6 Fracionamento do EEF em coluna de exclusão

Submeteu 100 mg do extrato etanólico das folhas de *D. burchellii* (EEF) a uma coluna de Sephadex LH-20 de 1,0 m x 0,06 m, eluída com metanol grau HPLC (Merck millipore). Originou 34 frações que foram analisadas em CCD de fase reversa e reunidas em 8 frações, sendo algumas analisadas por RMN  $^1\text{H}$  e CG-EM (Fluxograma 1).

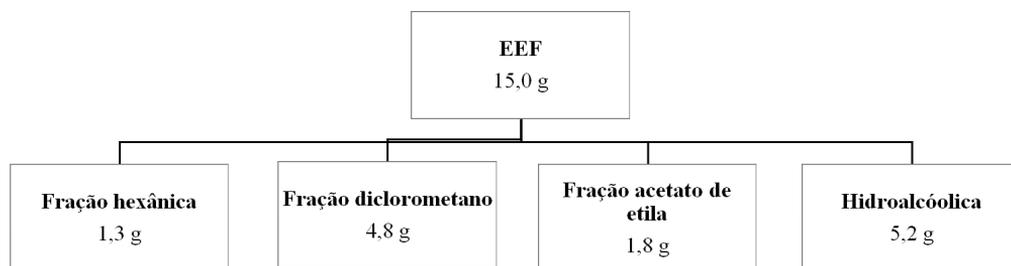


**Fluxograma 1** Fracionamento do EEF por cromatografia de exclusão.

\* Amostras que foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$  e CG-EM.

## 2.7 Partição líquido-líquido do EEF

Pesou 15,0 g do extrato etanólico das folhas de *D. burchellii* (EEF), solubilizou em 300 mL de uma mistura de metanol/água (2:8) e transferiu para um funil de separação. Submeteu-se o extrato a extração líquido-líquido com hexano (200 mL), diclorometano (200 mL) e acetato de etila (200 mL), todos em triplicata (Fluxograma 2).



**Fluxograma 2** Fracionamento do EEF por partição líquido-líquido.

## 2.8 Avaliação da atividade antioxidante

Este ensaio baseia-se na redução do radical DPPH•, de coloração violeta e máximo de absorbância a 517 nm, que ao aceitar um elétron ou um H• torna-se uma molécula estável de coloração amarela consequentemente diminuindo a absorbância. Para a determinação da atividade antioxidante, as amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 1 mg/mL e a partir da solução inicial foram realizadas sucessivas diluições de concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 e 7,81 µg/mL). Como controle positivo foi utilizada solução de ácido ascórbico padrão nas mesmas concentrações. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio, onde adicionou-se 150 µL da solução de amostra em diferentes concentrações e 2850 µL da solução metanólica 0,1 mM de DPPH. Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados em agitador vórtex para homogeneização e incubados ao abrigo de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, foram realizadas leituras em espectrofotômetro de UV-Vis a 517 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas da leitura do controle negativo. A porcentagem de redução do radical DPPH• foi calculada segundo a Equação 1, onde:  $Abs_{amostra}$  = absorbância da amostra com a solução de DPPH;  $Abs_{controle}$  = absorbância da solução metanólica de DPPH (controle negativo) (LU et al, 2011).

$$\% \text{ redução do DPPH}\bullet = [(Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle}] \times 100 \quad (1)$$

A atividade sequestrante do radical DPPH• foi expressa em termos de  $EC_{50}$  (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH), sendo esta determinada através do cálculo da atividade antioxidante em diferentes concentrações de forma a traçar uma curva entre a capacidade antioxidante da amostra e sua concentração (MISHRA et al, 2011).

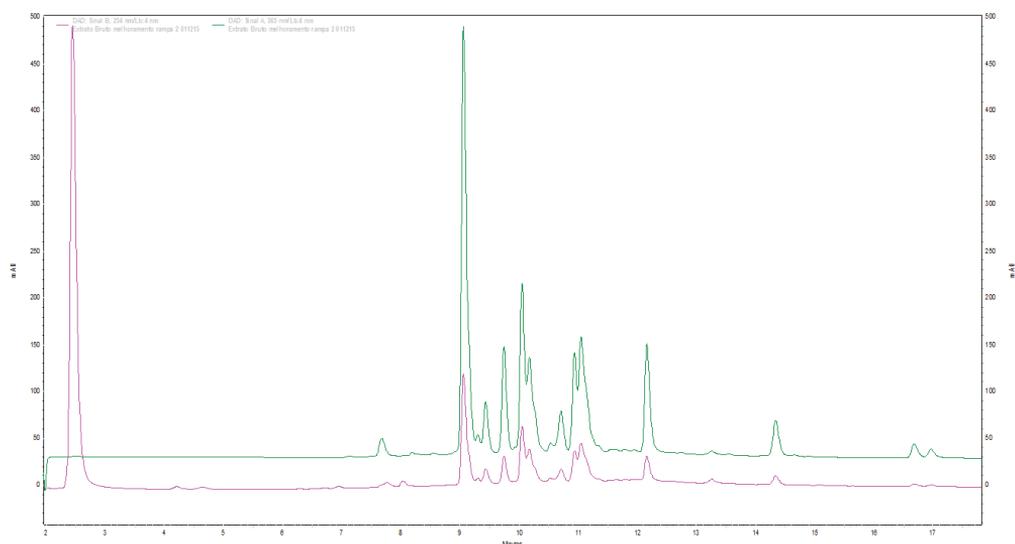
## 3 Discussão e resultados

A análise do extrato etanólico das folhas de *D. burchellii* (EEF) por CLAE-DAD permitiu a separação de constituintes químicos com alta absorção na região do ultravioleta-visível, sendo detectado majoritariamente a presença de flavonas e flavonóis, uma vez que essas substâncias apresentam duas bandas de maior absorção na região de 240-400 nm (Figura 2). Essas absorções são ocasionadas a partir da presença dos cromóforos do anel benzênico, podendo ocorrer deslocamentos batocrômico e hipso-crômico que depende do substituinte ligado a anel (MABRY et al, 2012).

Os espectros de UV-Vis das flavonas (I) e flavonóis (II) apresentam duas bandas características comumente chamadas de banda II que varia entre 240-280 nm e a banda I de 300-380 nm, sendo que a banda I está associada com a absorção do

anel B, e a banda II com a absorção do anel A (Figura 3). Entretanto os flavonóis com o grupo 3-hidroxil substituído (metilado ou glicosilado) possuem a banda I em 328-357 nm (ASSIMOS, 2014).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica que permite a separação dos compostos utilizando como suporte uma fase estacionária e um eluente chamado de fase móvel. O detector utilizado neste trabalho foi DAD que permite detectar compostos com absorção na região da luz ultravioleta-visível, detectando em diferentes comprimentos de ondas. Além disso, é possível analisar o *scan* de absorção de cada banda cromatográfica separada no cromatograma, permitindo então sugerir a identidade das amostras analisadas sendo que para a confirmação devem ser utilizadas outras técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Neste intuito de conhecer o extrato em estudo foi analisado previamente o *scan* de cada banda cromatográfica (Tabela 2) que em comparação com os comprimentos de ondas já citados na literatura sugeriu-se a presença de flavonoides com diferentes substituintes, que atualmente encontra-se em etapa de separação, purificação e identificação (VIHAKAS et al, 2014).



**Figura 2** Cromatograma EFF (rosa 254 nm; verde 365 nm).

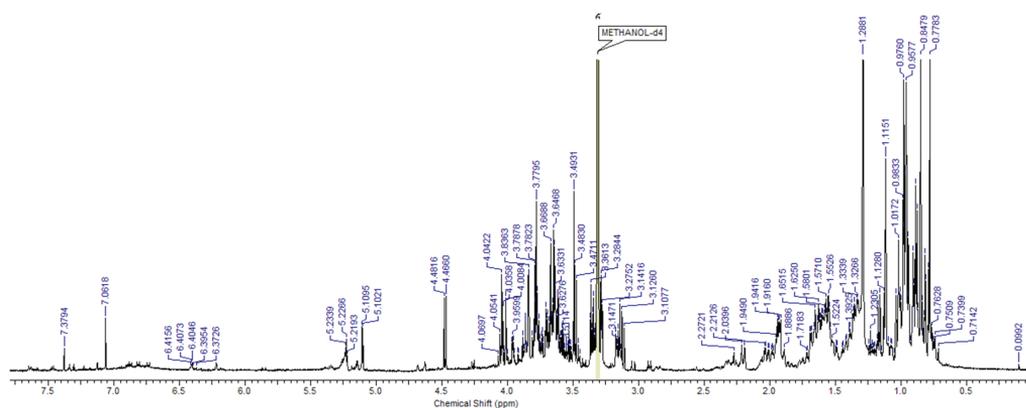


**Figura 3** Esqueleto básico de uma flavona (I) e um flavonol (II).

**Tabela 2** Bandas de absorção no ultravioleta dos picos observados no cromatograma do EEF

Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)
2,45	268	10,93	166; 318
9,06	258; 358	11,04	256; 351
9,43	264; 354	12,16	374
9,73	260; 356	14,34	366
10,04	256; 351	14,67	284
10,17	266; 356	16,67	362

Para auxiliar na identificação dos constituintes químicos presentes no EEF realizou-se também análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4) que mostrou a presença de diferentes deslocamentos químicos ( $\delta$ ). Na região de  $\delta$  0,6-2,5 ppm observou-se a presença de singletos intensos, característico de terpenoides. Sinais característicos de unidades glicosídicas foram observados em  $\delta$  3,0-4,0 ppm, sugerindo a possibilidade de compostos glicosilados. O espectro ainda apresentou sinais em  $\delta$  6,5-8,5 ppm correspondentes a compostos aromáticos, que corroboram com a hipótese da presença de flavonoides, uma vez que eles possuem hidrogênios aromáticos (DE PAIVA et al, 2013).

**Figura 4** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do EEF ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).

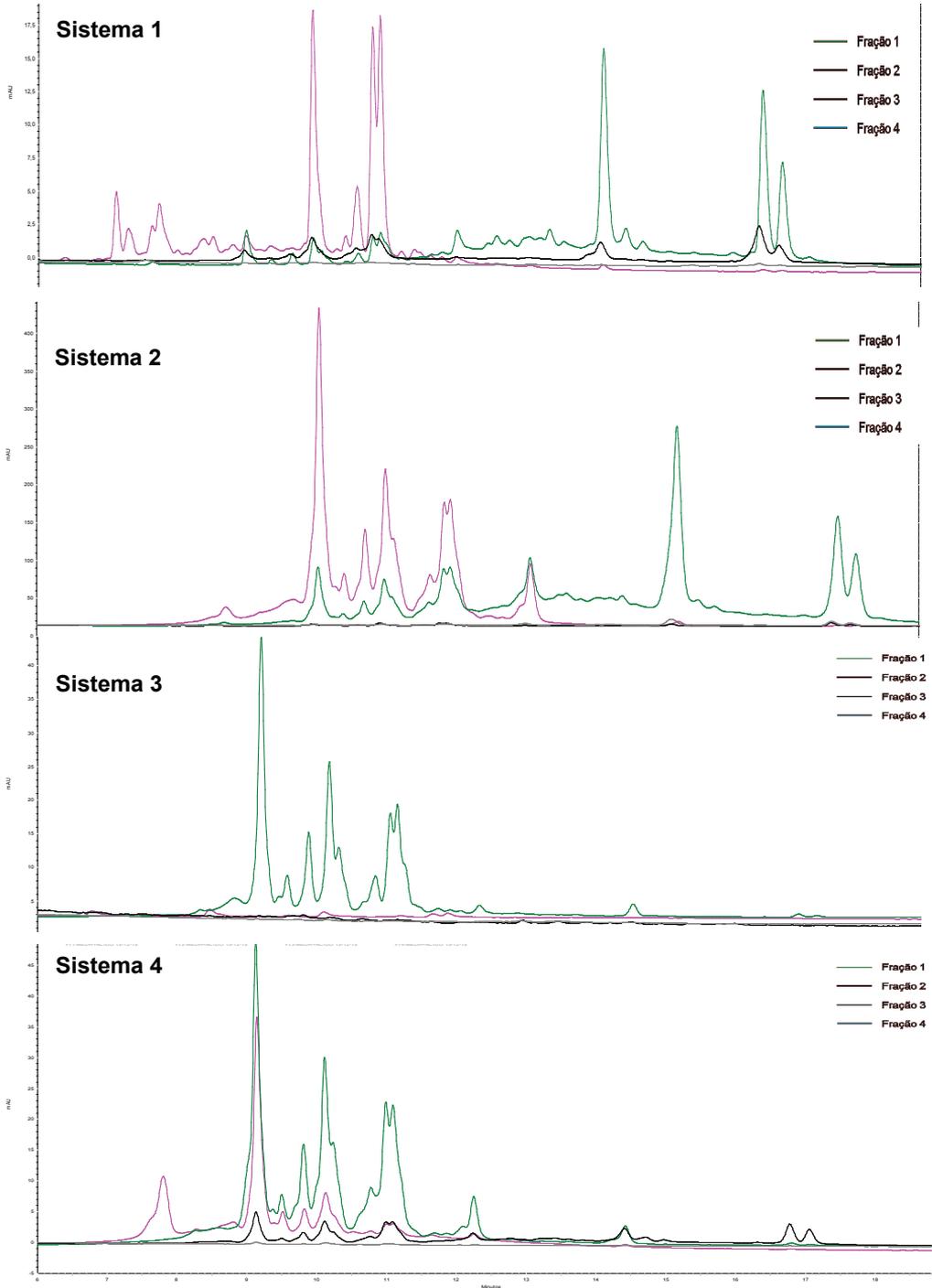
Segundo a literatura, o gênero *Diospyros* é rico em naftois, naftoquinonas, cumarinas e derivados de naftaleno. Estudos realizados recentemente relatam a presença de glicosídeos antraquinônicos, o que pode justificar um pouco dos sinais presentes no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , tanto dos açúcares como das substâncias aromáticas (GANAPATY et al, 2006).

A extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas mais utilizadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que os analitos em concentrações muito baixas sejam detectados por métodos espectroscópicos e eletroforéticos (JARDIM, 2010).

Para realizar o perfil químico e cromatográfico do EEF, alíquotas do extrato foram submetidas inicialmente à extração em Fase Sólida (SPE) utilizando quatro sistemas diferentes de eluição, objetivando realizar um *clean-up*. Posteriormente as 16 frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD, revelando perfis diferentes para cada sistema utilizado no *clean-up* (Figura 5). Através desses resultados foi possível determinar que os sistemas de eluição que continham acetonitrila/água (sistemas 1 e 2) apresentaram melhor separação dos compostos, no entanto optou-se em trabalhar com o sistema não acidificado (sistema 1) em função da dificuldade de eliminar o ácido fórmico quando em escala preparativa.

As análises realizadas por CG-EM levaram a cromatogramas e espectros de massas bastante complexos, mostrando a necessidade de purificações das frações estudadas.

No caso do sistema 1, onde houve a melhor separação cromatográfica, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  confirmaram a separação dos constituintes de acordo com a polaridade da fase móvel (Figura 6). Observa-se que o espectro da fração 1 (sistema de eluição de maior polaridade) apresenta majoritariamente sinais característicos de açúcares livres ( $\delta$  3,0-4,0 ppm), ou seja, não ligados a metabólitos secundários. Observa-se ainda alguns sinais de baixa intensidade na região do campo baixo do espectro, o que corresponde a hidrogênios desblindados. Já o espectro da fração 2 mostrou a presença de sinais correspondentes a hidrogênios metilênicos. As frações 3 e 4 apresentaram espectros bastante parecidos, havendo sinais  $\delta$  0,6-2,5 ppm característicos de grupos metínicos, metilênicos e metílicos dos esqueletos esteroídicos ou triterpenoídicos, correspondendo provavelmente a esteroides ou triterpenos. Na fração 3 observa-se ainda alguns sinais em menor proporção, que podem ser característicos de flavonoides di e trissubstituídos.



**Figura 5** Perfil cromatográfico das frações oriundas do EEF, obtidas por SPE utilizando os sistemas 1 a 4.



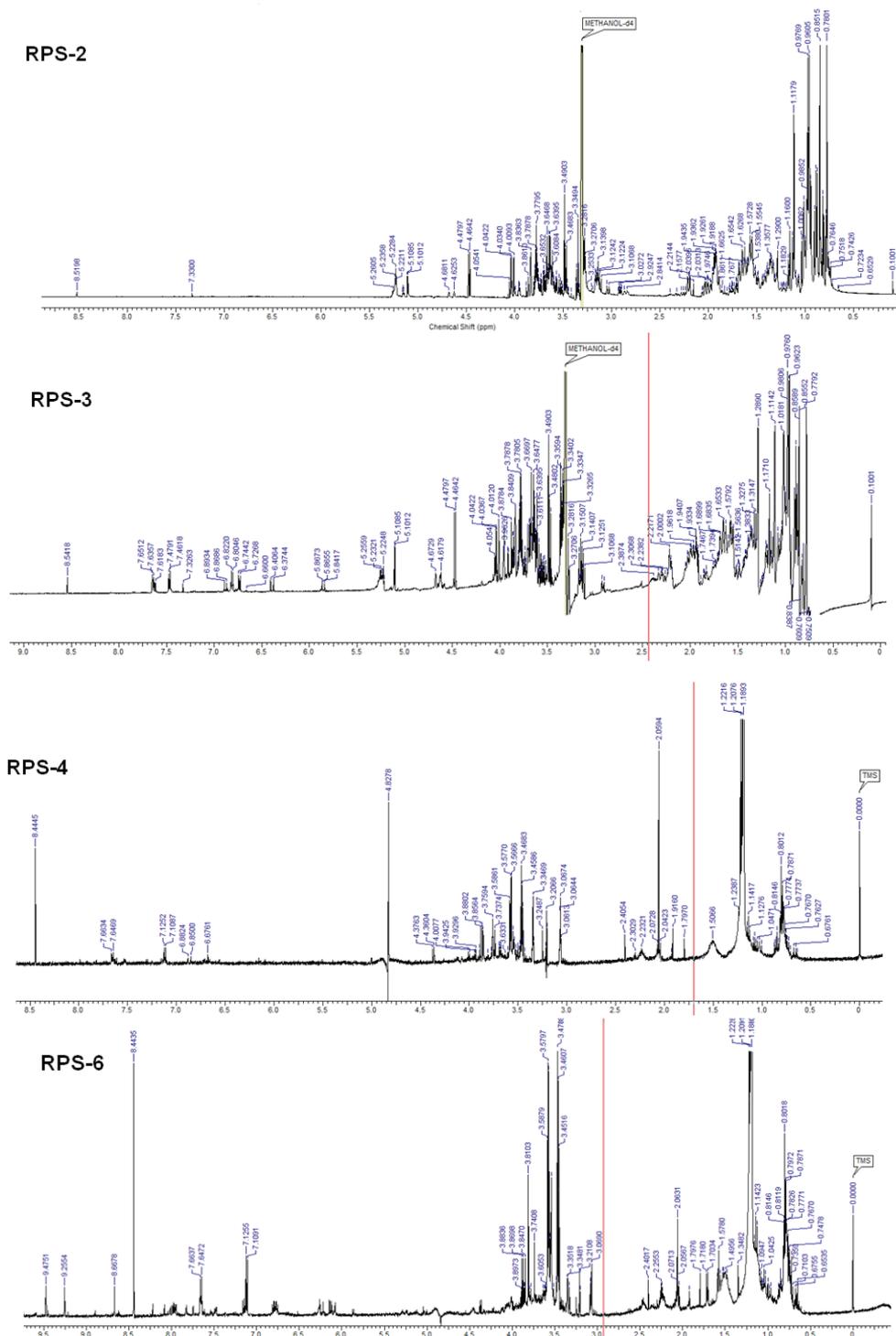
Foi realizado um fracionamento do EEF por cromatografia de exclusão utilizando uma coluna de filtração gel de Sephadex LH-20, obtendo então 34 frações que foram reunidas de acordo com suas similaridades em 8 novas frações. As frações RPS-7 e RPS-8 foram descartadas, por não apresentarem um perfil promissor por cromatografia de camada delgada (CCD). As frações RPS-2, 3, 4 e 6 foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$  (Figura 6) e observou que as frações RPS-2 e 3 apresentavam baixa complexidade, dando então seguimentos para purificação das mesmas.

A fração RPS-2 possui uma coloração amarelo claro e os dados de RMN  $^1\text{H}$  apresentam majoritariamente sinais característicos de triterpenos e esteroides ( $\delta$  0,6-1,2 ppm) que podem ser glicosilados ( $\delta$  3,0-4,0 ppm). Na região do campo baixo do espectro observam-se sinais de baixa intensidade correspondente a hidrogênios desblindados.

A fração RPS-3 apresenta uma coloração amarelo escuro e o espectro de RMN  $^1\text{H}$  é parecido com o espectro da fração RPS-2, mas adicionalmente com sinais intensos bastante característicos de hidrogênios aromáticos ( $\delta$  6,0-8,5 ppm), sugerindo uma maior concentração de substâncias aromáticas, podendo estas serem glicosiladas ( $\delta$  3,0-4,0 ppm).

As frações RPS-4 e 6 apresentaram perfis bem parecidos, não havendo mais sinais característicos de hidrogênios blindados de terpenóides. A fração RPS-6 apresenta uma maior concentração de compostos aromáticos quando comparado com a fração RPS-4 e também diversos sinais na região do campo baixo, sugerindo as substâncias citadas no gênero.

Para avaliação do potencial antioxidante dos EEF e EEC, foi utilizado o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), sendo este um dos métodos mais populares e frequentemente utilizados para testar a capacidade de compostos atuarem como captadores de radicais livres ou doadores de hidrogênio. Os ensaios antioxidante do EEF e EEC apresentaram  $\text{IC}_{50}$  de 269,40  $\mu\text{g/mL}$  e 409,92  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, quando avaliados frente ao radical livre DPPH. O resultado obtido com EEF é moderado quando comparado ao controle (ácido ascórbico -  $\text{IC}_{50}$  103,69  $\pm$  0,29  $\mu\text{g/mL}$ ), uma vez que se trata do extrato bruto. Esse resultado pode ser explicado graças a presença de compostos fenólicos, estes possuem estrutura química ideal para atuarem como redutores de radicais livres, por possuírem: (1) grupos hidroxila fenólicos que são propensos a doar um radical hidrogênio ou um elétron para um radical livre; (2) sistema aromático conjugado que permite a delocalização de um elétron não emparelhado (PYRZYNSKA et al, 2013).



**Figura 7** Espectros de RMN <sup>1</sup>H das frações RPS-2, RPS-3, RPS-4 e RPS-6 (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

## 4 Considerações finais

Os resultados obtidos até o momento não são conclusivos e ilustram claramente a necessidade de continuidade deste projeto buscando isolar e identificar substâncias com atividade antioxidante.

Através do estudo químico realizado até o momento foi possível identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das folhas de *D. burchellii*.

Os trabalhos realizados se mostram promissores, pois a espécie possui alta capacidade de produzir estruturas químicas com diversidade molecular, tornando-se foco atraente na busca de substâncias com atividade antioxidante. Esta etapa do trabalho faz parte de um estudo complexo que continuará sendo desenvolvido a fim de contribuir para o conhecimento químico desta espécie.

## Referências

- ASSIMOS, A. A. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis, utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. Dissertação (mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química nova*, p. 679-688, 2009.
- BARROSO, G. M. et al. Sistemática de angiospermas do Brasil. v. 1. 1978.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CARVALHO, A.C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, 1981.
- DE PAIVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Estudo fitoquímico de *Plumbago auriculata* Lam. *Revista Fitos Eletrônica*, v. 1, n. 02, p. 64-68, 2013.

- DIAS, B. F. S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. **Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**, 1996.
- GANAPATY, S. et al. Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1950-1956, 2006.
- GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 3, p. 306-317, 2008.
- HEGNAUER, R. Ebenaceae Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhäuser, 1966.
- JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
- LU, X. et al. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 637-644, 2011.
- MABRY, T.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer Science & Business Media, 2012.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- PENNA, G. O. et al. Talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico: revisão sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 5, p. 511-22, 2005.
- PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 17, p. 4288-4295, 2013.

VIHAKAS, M. et al. Flavonoids and other phenolic compounds: characterization and interactions with lepidopteran and sawfly larvae. 2014.

WATT, G. **A dictionary of the economic products of India**. Universidade de Cambridge Press, 2014.