

This file has been cleaned of potential threats.

If you confirm that the file is coming from a trusted source, you can send the following SHA-256 hash value to your admin for the original file.

4b826cb9859de311d1f942a9b9db26140e4ec22eb2f5a606e4d5a0878e2a0e1b

To view the reconstructed contents, please SCROLL DOWN to next page.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BOTÂNICA)

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Swartzia polyphylla*, *S. tessmannii* E *S. ulei* E ESTUDO  
QUÍMICO DO EXTRATO ATIVO

ALLANA ATAIDE NEGREIROS

Manaus, Amazonas

Fevereiro de 2024

ALLANA ATAIDE NEGREIROS

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Swartzia polyphylla*, *S. tessmannii* E *S. ulei* E ESTUDO  
QUÍMICO DO EXTRATO ATIVO

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas (Botânica), como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de doutora em Ciências  
Biológicas (Botânica).

Manaus, Amazonas

Fevereiro de 2024

## Ficha catalográfica

---

N385a    Negreiros, Allana Ataide

Avaliação biológica de *Swartzia polyphylla*, *S. tessmannii* e *S. ulei* e estudo químico do extrato ativo. / Allana Ataide Negreiros; orientadora Cecilia Veronica Nunez. - Manaus : [s.l.], 2025.

2,87 mb

73 p. : il. color.

DOI: <https://doi.org/10.61818/ted25013>

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Botânica) -  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2024.

1. Perfil químico. 2. Metabolismo secundário. 3. antimicrobiano. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Título.

CDD 583.74

---

### Sinopse

Avaliou-se o potencial biológico dos extratos de folhas e galhos de três espécies de *Swartzia* contra algumas cepas de bactérias patogênicas, contra espécies oxidantes e contra o microcrustáceo *Artemia salina*. Também foram isoladas duas substâncias do extrato mais ativo.

**Palavras-chave:** perfil químico, metabolismo secundário, antimicrobiano, antioxidante.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora por todo o suporte oferecido para a realização do trabalho, tanto na construção intelectual quanto no fornecimento de equipamentos e local.

Agradeço à FAPEAM pela bolsa concedida de forma a permitir a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer imensamente aos meus queridos pais por acreditarem em mim até mesmo quando eu não acreditava além de me oferecerem suporte emocional e financeiro para que eu pudesse concluir esta pesquisa.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório que me ensinaram e me ajudaram ao longo de todo o desenvolvimento do meu trabalho, além de todas as risadas que fizeram nosso caminho um pouco mais leve.

Também quero agradecer aos técnicos da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) pela atenção, paciência e prontidão nas análises de RMN.

Quero agradecer também meu querido namorado Viktor Judah por depositar tanta fé em mim e por ser meu acalento sempre que precisei. Sua parceria torna minha jornada mais leve.

## RESUMO

As espécies da família Fabaceae têm sido frequentemente estudadas ao longo dos anos devido ao seu potencial econômico e medicinal principalmente. Diversas substâncias já foram isoladas e mostraram-se ativas em avaliações biológicas que testam o potencial antioxidante, citotóxico e antimicrobiano dos extratos vegetais. No gênero *Swartzia*, 21 espécies já foram analisadas quanto ao seu perfil químico e potencial biológico e se mostraram fontes de substâncias das classes de terpenos e flavonoides, classes estas que costumam apresentar alto potencial biológico. Com o objetivo de contribuir com novas informações químicas aos estudos relacionados ao gênero *Swartzia*, foram analisados os extratos hexânicos e metanólicos dos galhos e folhas de *S. polyphylla*, *S. tessmannii* e *S. ulei*. Os extratos foram testados quanto à sua toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e apenas o extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii* mostrou-se ativo. Os extratos também foram testados frente a algumas cepas de micro-organismos patogênicos e obteve-se que: o extrato metanólico de folhas de *S. polyphylla* inibiu o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em 95%; o extrato hexânico de folhas de *S. ulei* inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila* em 51%; o extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii* inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila* em 53% e *Salmonella enterica* em 54%. Também foi avaliado o potencial antioxidante dos extratos contra o radical livre DPPH• e contra o íon férrico em complexo com a fenantrolina e em ambos os ensaios os extratos não apresentaram potencial antioxidante em mistura. Porém, ao serem eluídos em placa cromatográfica e incubados com DPPH•, os extratos exibiram rastros amarelados semelhantes à quercetina (substância antioxidante conhecida). O extrato que se mostrou mais ativo sobre *Artemia salina* foi o extrato hexânico dos galhos de *S. tessmannii*, o qual foi escolhido para ser fracionado. O fracionamento cromatográfico permitiu o isolamento das substâncias lichexantona e a mistura de sitosterol e estigmasterol esterificados com ácidos graxos. Este é o primeiro relato do isolamento dessas substâncias a partir de galhos de *S. tessmannii* e também o primeiro relato da presença de atividade antibacteriana.

## ABSTRACT

Species from Fabaceae family have been frequently studied over the years mainly due to their economic and medicinal potential. Several substances have already been isolated and shown to be active in biological evaluations that test the antioxidant, cytotoxic and antimicrobial potential of plant extracts. In the genera *Swartzia*, 21 species have already been analyzed for their chemical profile and biological potential, and showed to be sources of substances from the terpene and flavonoid classes, which usually have high biological potential. With the aim of contributing new chemical information to studies related to the genus *Swartzia*, hexane and methanolic extracts from the branches and leaves of *S. polyphylla*, *S. tessmannii* and *S. ulei* were analyzed. The extracts were tested for their toxicity against the microcrustacean *Artemia salina*, and only the hexane extracts from the twigs of *S. tessmannii* showed to be active. The extracts also were tested against some strains of pathogenic microorganisms, and it was obtained that: the methanolic extract from leaves of *S. polyphylla* inhibited the growth of *Klebsiella pneumoniae* in 95%; the hexane extract from leaves of *S. ulei* inhibited the growth of *Aeromonas hydrophila* in 51%; the hexane extract from twigs of *S. tessmannii* inhibited the growth of *Aeromonas hydrophila* in 53% and *Salmonella enterica* in 54%. It was also evaluated the antioxidant potential of the extracts against the free radical DPPH• and against the iron (III) in complex with phenanthroline and in both assays the extracts didn't show antioxidant potential in mixture. Although, when the extracts were eluted first in chromatographic plates and incubated with DPPH•, they showed yellow spots similar to the quercetin (a well-known antioxidant substance). The extract that proved to be most active was the hexane extract from the twigs of *S. tessmannii*, which was chosen to be fractionated. Chromatographic fractionation allowed the isolation of the substances lichexanthone and the mixture of sitosterol and stigmasterol esterified with fatty acids. This is the first report of the isolation of these substances from twigs of *S. tessmannii* and also the first report of the presence of antibacterial activity.

## SUMÁRIO

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO</b>                                       | <b>iv</b> |
| <b>ABSTRACT</b>                                     | <b>v</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>                             | <b>ix</b> |
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>                         | <b>x</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                | <b>1</b>  |
| 1.1. TERPENOIDES                                    | 3         |
| 1.2. SAPONINAS                                      | 5         |
| 1.3. FITOESTEROIS                                   | 6         |
| 1.4. COMPOSTOS FENÓLICOS                            | 7         |
| 1.4.1. FLAVONOIDES                                  | 8         |
| 1.4.2. PTEROCARPANOS                                | 9         |
| 1.4.3. XANTONAS                                     | 10        |
| 1.4.4. ESTILBENOS                                   | 10        |
| 1.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE                         | 11        |
| 1.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA                       | 12        |
| 1.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA COM <i>Artemia salina</i> | 13        |
| 1.8. FAMÍLIA FABACEAE                               | 14        |
| 1.9. <i>Swartzia</i> spp.                           | 16        |
| 1.10. FITOQUÍMICA DE <i>Swartzia</i> spp.           | 17        |
| 1.10.1. <i>S. apetala</i>                           | 17        |
| 1.10.2. <i>S. arborescens</i> (Aubl.) Pittier       | 19        |
| 1.10.3. <i>S. argentea</i> Spruce ex. Benth         | 19        |
| 1.10.4. <i>S. brachyrachis</i> Harms                | 20        |
| 1.10.5. <i>S. flaemingii</i> Raddi                  | 20        |
| 1.10.6. <i>S. laevicarpa</i> Amshoff                | 21        |
| 1.10.7. <i>S. langsdorfii</i> Raddi                 | 22        |
| 1.10.8. <i>S. leiocalycyna</i> Benth                | 23        |
| 1.10.9. <i>S. leptopetala</i> Benth                 | 24        |
| 1.10.10. <i>S. longistipitata</i> Ducke             | 24        |
| 1.10.11. <i>S. macrocarpa</i> Spruce ex. Benth      | 25        |
| 1.10.12. <i>S. oblata</i> R.S. Cowan                | 25        |
| 1.10.13. <i>S. panacoco</i> (Aubl.) R.S. Cowan      | 25        |
| 1.10.14. <i>S. pendula</i> Spruce ex Benth          | 26        |
| 1.10.15. <i>S. polyphylla</i> DC.                   | 26        |
| 1.10.16. <i>S. psilonema</i>                        | 27        |
| 1.10.17. <i>S. recurva</i> Poepp                    | 28        |
| 1.10.18. <i>S. schomburgkii</i> Benth               | 28        |
| 1.10.19. <i>S. sericea</i> Vogel                    | 29        |
| 1.10.20. <i>S. simplex</i> (Sw.) Spreng             | 29        |
| 1.10.21. <i>S. ulei</i> Harms                       | 30        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                 | <b>32</b> |

|          |                                                                       |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.     | OBJETIVO GERAL                                                        | 32 |
| 2.2.     | OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                 | 32 |
| 3.       | MATERIAL E MÉTODOS                                                    | 33 |
| 3.1.     | REVISÃO                                                               | 33 |
| 3.2.     | COLETA DAS PARTES VEGETAIS                                            | 33 |
| 3.3.     | PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS                                               | 33 |
| 3.4.     | ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i>   | 34 |
| 3.5.     | ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO                 | 35 |
| 3.6.     | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE                                                | 37 |
| 3.6.1.   | ENSAIO COM O RADICAL LIVRE DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)      | 37 |
| 3.6.2.   | ENSAIO COM O Fe <sup>3+</sup> EM COMPLEXO COM A FENANTROLINA          | 38 |
| 3.7.     | ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS BRUTOS                            | 38 |
| 3.8.     | FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DE GALHOS DE <i>S. tessmannii</i>   | 39 |
| 3.8.1.   | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 16                                            | 40 |
| 3.8.2.   | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 76                                            | 42 |
| 3.8.3.   | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 79                                            | 42 |
| 3.8.4.   | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 83                                            | 43 |
| 3.9.     | FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DE GALHOS DE <i>S. tessmannii</i> | 43 |
| 3.9.1.   | PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO                                              | 43 |
| 3.9.2.   | FRACIONAMENTO DA FASE ACETATO DE ETILA                                | 44 |
| 3.9.2.1. | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO V-73                                          | 45 |
| 3.9.2.2. | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO V-82                                          | 45 |
| 3.9.2.3. | FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO V-85                                          | 46 |
| 3.9.3.   | FRACIONAMENTO DA FASE DCM                                             | 46 |
| 3.9.4.   | FRACIONAMENTO DA FASE HIDROMETANÓLICA                                 | 47 |
| 4.       | RESULTADOS E DISCUSSÃO                                                | 48 |
| 4.1.     | ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i>   | 48 |
| 4.2.     | ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO                 | 52 |
| 4.3.     | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE                                                | 52 |
| 4.4.     | ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS BRUTOS                            | 53 |
| 4.4.1.   | CCD EXTRATOS HEXÂNICOS                                                | 53 |
| 4.4.2.   | CCD EXTRATOS METANÓLICOS                                              | 54 |
| 4.5.     | RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR                                         | 55 |
| 4.5.1.   | EXTRATOS HEXÂNICOS                                                    | 55 |
| 4.5.2.   | EXTRATOS METANÓLICOS                                                  | 57 |
| 4.6.     | FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DE GALHOS DE <i>S. tessmannii</i>   | 59 |

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.6.1. SUBSTÂNCIAS 1 E 2: SITOSTEROL E ESTIGMASTEROL STERIFICADO COM ÁCIDO GRAXO</b> | <b>59</b> |
| <b>4.6.2. SUBSTÂNCIA 3: LINCHEXANTONA</b>                                               | <b>61</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>                                                                     | <b>63</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                    | <b>65</b> |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Usos terapêuticos de *Swartzia* spp. *in natura*, 20
- Tabela 2: Extratos brutos de *Swartzia* spp. e atividades biológicas, 21
- Tabela 3: Substâncias isoladas e atividades biológicas de *Swartzia* spp., 31
- Tabela 4: Massas dos extratos obtidos de *Swartzia* spp., 34
- Tabela 5: Micro-organismos utilizados no ensaio antimicrobiano, 36
- Tabela 6: Sistemas de solventes, frações e suas respectivas massas do fracionamento do extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii*, 39
- Tabela 7: Fases móveis e frações da Fração 16, 41
- Tabela 8: Massa das fases obtidas em partição líquido-líquido, 44
- Tabela 9: Fases móveis e frações da fase acetato, 44
- Tabela 10: Fases móveis e frações da Fase DCM, 46
- Tabela 11: Fases móveis e frações da Fase H<sub>2</sub>O/MeOH, 47
- Tabela 12: Absorbâncias pré-incubação, 49
- Tabela 13: Absorbâncias pós-incubação, 50
- Tabela 14: Porcentagem de crescimento microbiano na concentração de 1000 µg/mL, 50
- Tabela 16 – Dados de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H (ppm) das substâncias 1 e 2 comparados com a literatura, ambos em CDCl<sub>3</sub>, 60
- Tabela 17 - Dados de RMN de <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C (ppm) da substância 3 (linchexantona) comparados com a literatura em CD<sub>3</sub>OD (<sup>1</sup>H (500 MHz) e <sup>13</sup>C (125 MHz)., 63

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação da formação dos terpenos, 4
- Figura 2: Estrutura básica e numeração dos núcleos dos flavonoides, 9
- Figura 3: Substâncias isoladas de *S. apetala*, 19
- Figura 4: Substâncias isoladas de *S. arborescens*, 19
- Figura 5: Substâncias isoladas de *S. brachyrachis*, 20
- Figura 6: Isoflavonoides isolados de *S. laevicarpa*, 22
- Figura 7: Substâncias isoladas de *S. langsdorfii*, 23
- Figura 8: Substâncias isoladas de *S. leiocalycyna*, 24
- Figura 9: Substâncias isoladas de *S. oblata*, 25
- Figura 10: Substâncias isoladas de *S. polyphylla*, 27
- Figura 11: Substâncias isoladas de *S. schomburgkii*, 29
- Figura 12: Substâncias isoladas de *S. simplex*, 30
- Figura 13: Substância isolada de *S. ulei*, 30
- Figura 14: Etapas de extração do material vegetal de *Swartzia* spp., 34
- Figura 15: Cálculo de crescimento microbiano e inibição dos extratos., 37
- Figura 16: Cromatoplasas de CCDC da fração 9-11., 40
- Figura 17: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii*, 40
- Figura 18: Cromatoplasas de CCDC da fração 16-4., 41
- Figura 19: Fluxograma do fracionamento da Fração 16, 42
- Figura 20: Fluxograma do fracionamento da fase acetato do extrato metanólico de *S. tessmannii*., 45
- Figura 21: Fluxograma do fracionamento da fase DCM, 47
- Figura 22: Fluxograma do fracionamento da fase H<sub>2</sub>O/MeOH, 47
- Figura 23: Placa teste onde houve inibição do crescimento microbiano dos extratos hexânicos, indicada pela ausência de coloração rosa nos poços destacados., 49
- Figura 24: Extratos brutos eluídos em AcOEt/MeOH 9:1 com aplicação de solução de DPPH<sup>•</sup>., 53
- Figura 25: CCD dos extratos brutos hexânicos., 54
- Figura 26: CCD dos extratos brutos metanólicos., 55
- Figura 27: Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos extratos hexânicos solubilizados em clorofórmio-d., 56
- Figura 28: RMN de <sup>1</sup>H – Ampliação da região entre 6,2 e 7,7 ppm para *S. tessmannii*., 56
- Figura 29: RMN de <sup>1</sup>H – Ampliação da região entre 3,5 e 5,5 ppm para *S. tessmannii*., 57
- Figura 30: Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos extratos metanólicos solubilizados em DMSO-d., 58
- Figura 31: RMN de <sup>1</sup>H – Ampliação da região entre 3,5 e 8,0 ppm para *S. tessmannii*., 58
- Figura 32: Estrutura geral das substâncias 1 e 2, 59
- Figura 33 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H das substâncias 1 e 2 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)., 60
- Figura 34 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C das substâncias 1 e 2 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)., 60
- Figura 35. Estrutura da substância 3, 62
- Figura 36 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 3 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)., 62
- Figura 37 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 3 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)., 63

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas obtêm a energia necessária para realizar os seus processos metabólicos através da fotossíntese. Nesse processo, os órgãos vegetais clorofilados absorvem energia luminosa para energizar elétrons fornecidos pela fotólise da água, o que impulsiona a produção de ATP e redução de moléculas transportadoras de elétrons, que por sua vez fornecem energia para que a célula vegetal sintetize carboidratos a partir das moléculas de dióxido de carbono proveniente da atmosfera. Os carboidratos produzidos nesse processo são distribuídos através dos feixes vasculares para as demais células vegetais, os quais serão oxidados continuamente e completamente até restar somente dióxido de carbono e água, em um processo chamado respiração celular. Esse processo metabólico gera ATP e permite que as células realizem todas as demais atividades metabólicas (Rodrigues, 2018).

Existem diversas vias metabólicas de biossíntese (anabolismo) e degradação (catabolismo) nas plantas das quais se obtêm produtos ou blocos de construção fundamentais para seu funcionamento basal, o que abrange processos destinados ao seu crescimento e desenvolvimento. A fotossíntese e a respiração são exemplos de vias metabólicas basais de biossíntese e degradação. Outros exemplos de vias metabólicas classificadas como basais ou primárias são o complexo ácido graxo-sintase na síntese de lipídios, o processo de tradução na síntese de aminoácidos e o ciclo de Krebs na degradação de produtos intermediários para reduzir moléculas de NAD<sup>+</sup> e FAD (Kreis *et al.*, 2017, p. 148-149).

O metabolismo basal, por ser destinado principalmente à manutenção e reprodução dos organismos, possui muitas semelhanças entre todos os organismos vivos, desde os procariotos até o ser humano. Por exemplo, todas as vias metabólicas do metabolismo basal utilizam os grupamentos fosfatos, principalmente por meio de moléculas de ATP, para o armazenamento e transferência de energia. Outra semelhança geral é a síntese e armazenamento de substâncias similares pelas células tais como carboidratos, gorduras, proteínas e ácidos nucleicos, os quais são classificados como metabólitos primários (Kreis *et al.*, 2017, p. 149).; Borges e Amorim, 2020). Em contrapartida, a partir dos metabólitos primários, alguns organismos produzem também metabólitos secundários, os quais não possuem ampla distribuição e não estão diretamente associados às atividades essenciais dos organismos (Kreis *et al.*, 2017, p. 150; Rodrigues, 2018).

O metabolismo secundário das plantas não ocorre de maneira sequencial e direcionada como o metabolismo primário. Os precursores dos metabólitos secundários se originam de

intermediários das rotas metabólicas basais como, por exemplo, o difosfato de isopentenila, precursor de uma importante classe de metabólitos especiais chamados de terpenoides, é originado a partir do piruvato na glicólise (respiração celular). Outra classe importante de metabólitos secundários, os compostos fenólicos, é originada a partir da via biossintética do ácido chiquímico, a qual se baseia na rota dos açúcares, tendo como principal precursor a L-fenilalanina. Uma terceira classe bastante conhecida e relevante são os alcaloides, porém esta possui alta variabilidade de rotas biossintéticas, o que torna inviável o estabelecimento de uma única origem. No entanto, a grande maioria possui como precursores aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano, e muitos participam de vias comuns a outras classes de metabólitos (Kreis *et al.*, 2017, p. 154; Rodrigues, 2018).

Os produtos do metabolismo secundário, embora não estejam diretamente relacionados ao crescimento e manutenção do organismo isoladamente, são indispensáveis para sua sobrevivência, pois atuam principalmente na interação do organismo com o meio em que vive (Kreis *et al.*, 2017, p. 163, Rodrigues, 2018). Diversas funções ecológicas são mediadas por meio de metabólitos secundários, como por exemplo, a proteção contra herbívoros, bactérias e fungos, atração de polinizadores por odores, sabores e cores, além de proteção UV e antioxidante (Wink, 2013; Rodrigues, 2018). Muitas dessas propriedades protetivas, antioxidantes e antipatogênicas também apresentam uso farmacêutico efetivo para a saúde humana (Rodrigues, 2018, Jain *et al.*, 2019).

Muitos agentes terapêuticos utilizados nos dias de hoje são derivados de produtos naturais, como por exemplo, os alcaloides bioativos cafeína (estimulante), atropina (vasodilatador), codeína (analgésico) e colchicina (anti-inflamatório), o agente anticancerígeno paclitaxel, derivado de plantas do gênero *Taxus*, o antimalárico e anticancerígeno artemisina, derivado da erva chinesa *Artemisia annua* L., os óleos essenciais de lavanda (*Lavandula angustifolia* L.) e melissa (*Melissa officinalis* L.) os quais possuem efeito tranquilizante, e também a vitexina e quercetina, antioxidantes amplamente distribuídos no reino vegetal (Atanasov *et al.*, 2015; Bernardes *et al.*, 2017, p. 112). Acredita-se que o fato de que metabólitos secundários de origem vegetal apresentam potencial terapêutico em humanos justifica-se pela alta proporção de arquitetura bioquímica comum a todos os organismos, portanto passíveis de interagir com as macromoléculas do corpo humano (Atanasov *et al.*, 2015).

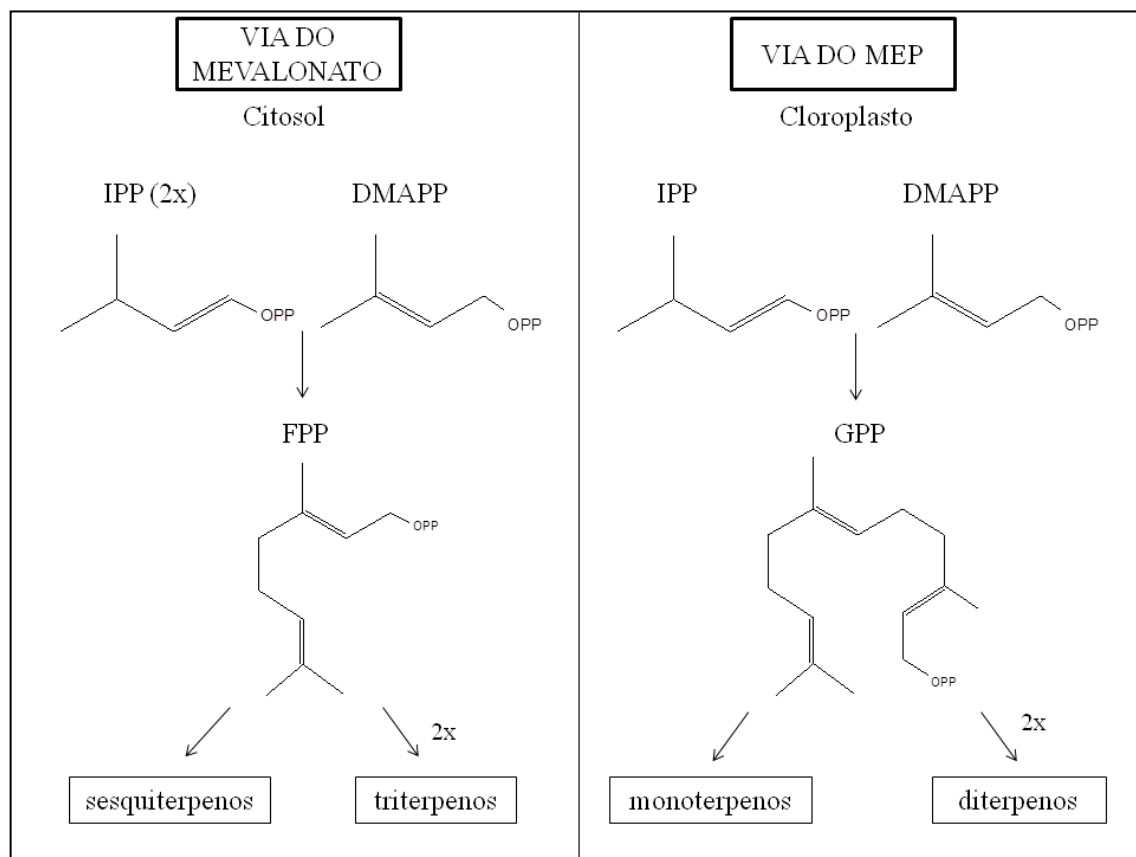
### 1.1. TERPENOIDES

Duas rotas principais originam a estrutura dos terpenoides, a via do ácido mevalônico (MVA) e a via do metileritritol fosfato (MEP). Na via do ácido mevalônico, que ocorre no citoplasma, sua estrutura é derivada a partir da condensação de três moléculas de acetil-CoA, a partir da qual se forma o ácido mevalônico. Esta molécula então é pirofosforilada, descarboxilada e desidratada até formar o difosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), as duas unidades básicas de cinco carbonos que formam os terpenoides. Na via do metileritritol fosfato, que ocorre nos plastídeos, o IPP e DMAPP são formados a partir de intermediários originados da união do piruvato com o gliceraldeído-3-fosfato. O primeiro intermediário, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) é reduzido a 2-metileritriol fosfato (MEP), o qual por sua vez é ciclizado, reduzido e desidratado até formar IPP e DMAPP (Kreis *et al.*, 2017, p. 155; Borges e Amorim, 2020).

Os terpenoides são formados a partir da união de duas ou mais moléculas de cinco carbonos produzidas nas vias MVA e MEP e são classificados de acordo com o número de blocos C-5 unidos. Moléculas de 10 carbonos, chamadas de monoterpenos, são formadas a partir do difosfato de geranila (GPP), molécula formada pela união de um IPP e um DMAPP. Ao ligar o GPP a outra molécula de IPP, forma-se o difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos, terpenos de 15 carbonos. Ligando o FPP a mais uma molécula de IPP, forma-se o difosfato de geranilgeranila (GGPP), molécula de 20 carbonos precursora dos diterpenos. As moléculas FPP e GGPP por sua vez, podem dimerizar e formar triterpenos (30 carbonos) ou tetraterpenos (40 carbonos) (Kumari *et al.*, 2013; Borges e Amorim, 2020). As unidades de isopreno podem condensar-se em uma configuração “cabeça-cauda” para formar cadeias lineares ou se organizarem em forma de anéis (Kumari *et al.*, 2013; Heinzmann, Spitzer e Simões, 2017, p. 168) (Figura 1).

Na via do MEP (plastídeos), são originados os monoterpenoides, alguns sesquiterpenoides, diterpenos (dentre eles o fitol) e tetraterpenos (dentre eles os carotenoides). Na via do MVA (citosol) é formada a maior parte dos sesquiterpenos, além dos triterpenos (dentre eles os esteróis) (Humphrey e Beale, 2006). Os monoterpenos e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais responsáveis pelos sabores e fragrâncias originados de plantas, assim como importantes agentes de defesa natural e de comunicação entre plantas e seu ambiente. Tais classes de terpenoides podem ser obtidas por processos de destilação por serem voláteis (Kumari *et al.*, 2013; Heinzmann, Spitzer e Simões, 2017, p.

168-170). Esses são sintetizados e armazenados em estruturas especializadas das plantas, como ocorre nos tricomas das espécies de *Mentha* e *Salvia*, e em células localizadas nas lâminas foliares do capim-limão (Humphrey e Beale, 2006; Heinzmann, Spitzer e Simões, 2017, p. 170).



**Figura 1: Representação da formação dos terpenos**

Isoprenoides que contêm 20 carbonos ou mais, principalmente os oxigenados, não são voláteis e podem ser obtidos via extração com solventes (Heinzmann, Spitzer e Simões, 2017, p. 168; Borges e Amorim, 2020). O aumento da cadeia isoprenoide e das duplas ligações aumentam as possibilidades de reações, tornando esta classe bastante ampla. Nas plantas os diterpenos podem atuar como hormônios de crescimento (giberelinas) ou no sistema de defesa (fitoalexinas). Como fármacos, alguns diterpenos se destacam, como o Taxol, uma droga amplamente utilizada no tratamento contra o câncer, e os ginkgolídeos, utilizados no tratamento de doenças cardio e cerebrovasculares (Humphrey e Beale, 2006).

Os triterpenos formam os fitoesteróis, os quais podem atuar na rigidez e fluidez da membrana plasmática (ex.: sitosterol, campesterol e estigmasterol), crescimento, proliferação e permeabilidade celular, além de serem precursores dos hormônios brassinosteroides. Dentre

os triterpenos vegetais de uso humano estão os limonoides, terpenoides altamente oxigenados que atuam como agentes de defesa nas famílias Rutaceae (citros) e Meliaceae, os quais possuem potente ação repelente e inseticida. Os carotenoides por sua vez são tetraterpenos que atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese, pigmentos atrativos para polinizadores e precursores do ácido abscísico, hormônio regulador do crescimento vegetal e agente de respostas contra estresse hídrico. Além disso, suas propriedades antioxidantes têm sido apontadas como preventivas contra doenças cardíacas e câncer em humanos (Humphrey e Beale, 2006; Borges e Amorim, 2020).

## 1.2. SAPONINAS

As saponinas são um importante grupo de produtos naturais originado na rota do MEP e MVA a partir do intermediário esqualeno. São compostas por uma parte lipofílica, a qual pode ser um triterpeno ou um esteroide policíclico, e uma parte hidrofílica, composta por açúcares. Por esta razão as saponinas têm o caráter anfifílico e apresentam ação detergente e emulsificante, caracterizada pela formação de espuma abundante quando em solução aquosa (Athayde *et al.*, 2017, pg. 285; 287; Faizal e Geelen, 2013).

A classificação das saponinas pode ser feita de acordo com sua aglicona, sendo, portanto classificadas como saponinas triterpênicas ou saponinas esteroides, e também pelo número de açúcares ligados à aglicona, o que as classifica como monodesmosídicas (uma cadeia de açúcares), bidesmosídicas (duas cadeias de açúcares) e, raramente, tridesmosídicas (três cadeias de açúcares) (Athayde *et al.*, 2017, pg. 286.; Liao *et al.*, 2021).

A estrutura da aglicona nas saponinas esteroides é composta por 27 carbonos distribuídos em cinco ou seis anéis. A aglicona das saponinas triterpênicas, por sua vez, é composta por 30 carbonos na forma de triterpenos tetra ou pentacíclicos (Athayde *et al.*, 2017, pg. 287;290; Faizal e Geelen, 2013). Existem ainda saponinas esteroides que são classificadas no grupo de alcaloides esteroides devido a presença de nitrogênio no anel E e/ou F, o que confere a essas substâncias caráter básico, diferentemente das anteriores (Athayde *et al.*, 2017, pg. 288).

As ações antifúngica, citotóxica e hipocolesterolmiante das saponinas estão comumente associadas ao seu caráter anfifílico e capacidade de complexação com esteroides. Essas características alteram a permeabilidade de membranas biológicas e biofilmes, como demonstrado através da sua ação lítica sobre hematócitos e vários outros tipos celulares

(Faizal e Geelen, 2013; Athayde *et al.*, 2017, pg. 286; Liao *et al.*, 2021). Além disso, também possuem sabor amargo, o que fornece à planta uma barreira física contra herbivoria (Poser, 2017, p. 24).

### 1.3. FITOESTEROIS

Fitoesteróis são esteróides com uma hidroxila ligada ao carbono 3, razão pela qual são classificados como esteróis (Evert e Eichhorn, 2014, p. 24). O esqueleto principal dos fitosteróis contém quatro anéis hidrocarbônicos interconectados, nos quais podem ligar-se diversos grupos funcionais. São produtos originados na rota biossintética isoprenoide via esqualeno e são classificados como triterpenos devido sua função e estrutura (Marangoni e Poli, 2010; Shahzad *et al.*, 2017; Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2021). O esterol mais abundante em plantas e algas verdes é chamado de sitosterol, seguido pelo campesterol e estigmasterol (Marangoni e Poli, 2010; Evert e Eichhorn, 2014, p. 24; Shahzad *et al.*, 2017; Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2021).

A estrutura e função biológica dos fitoesteróis se assemelha a do colesterol (Shahzad *et al.*, 2017; Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2021;). A principal diferença entre a estrutura química do colesterol e fitoesteróis consiste na falta de um grupo alquil ligado ao C-24 na molécula de colesterol, enquanto no sitosterol e campesterol existe um grupo etil e metil adicionais ligados ao C-24, respectivamente. O estigmasterol por sua vez, além do grupo etil ligado ao C-24, possui também uma dupla ligação no C-22 (Marangoni e Poli, 2010; Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2021). Nas plantas essas moléculas desempenham função estrutural, regulando a permeabilidade e fluidez da membrana plasmática (Shahzad *et al.*, 2017; Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2021). Podem ser encontrados em forma livre como componentes da parede celular, onde desempenham importante função estrutural. Já os fitoesteróis esterificados são encontrados como produtos de armazenamento intracelular (Marangoni e Poli, 2010).

Devido ao grande número de centros quirais e forma de ligação dos anéis, os esteróides são moléculas altamente complexas para que seja viável sua síntese total industrialmente. Por este motivo, a obtenção de fármacos hormonais se dá a partir de esteróides isolados de plantas, os quais serão ativados e/ou biotransformados em hormônios. São exemplos de esteróides amplamente utilizados nesse processo a solasodina, a hecogenina e o estigmasterol (Bernardes *et al.*, 2017, pg. 111; 112).

A adição de fitosteróis na dieta resulta em efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares e diabetes (Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2021). Tal efeito deve-se ao fato de que esses produtos naturais são muito eficientes na função de diminuir o colesterol de baixa densidade (LDL), cujo excesso está relacionado ao surgimento de doenças cardiovasculares. O mecanismo proposto para explicar a diminuição da concentração de LDL no plasma sanguíneo sugere que os fitoesteróis são capazes de reduzir em cerca de 30%-50% a absorção de colesterol no intestino devido à semelhança estrutural dessas moléculas. Muitos estudos recomendam o consumo diário de 2g dessas moléculas para melhorar as concentrações de lipídios no sangue. (Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2021). As principais fontes de fitosteróis são óleos vegetais, sementes, castanhas, cereais e legumes (Marangoni e *poli*, 2010; Shahzad *et al.*, 2017).

#### 1.4. COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são aqueles que contêm em sua estrutura um grupo fenol, isto é, um anel aromático ligado a uma hidroxila. A maioria dos compostos fenólicos é originada a partir da via biossintética do ácido chiquímico, cuja origem é baseada nos açúcares (Simões *et al.*, 2016, Borges e Amorim, 2020). No entanto, alguns compostos fenólicos também podem ser formados inteiramente ou em parte por meio da ciclização de vários grupos acetato, isto é, ácidos carboxílicos sob forma de ésteres de CoA, e, por esta razão são chamados de policetídeos. Os policetídeos possuem padrão de oxigenação meta de suas hidroxilas e incluem produtos naturais como flavonoides, estilbenos e xantonas (Kreis *et al.*, 2017, p. 153,154).

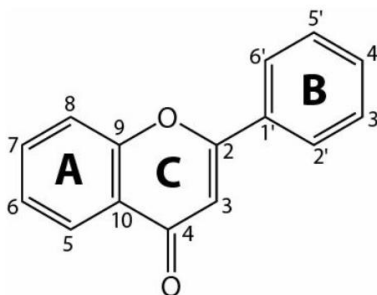
Na via do ácido chiquímico, o aminoácido L-fenilalanina (ou mais raramente o aminoácido L-tirosina) sofre desaminação oxidativa na biossíntese do ácido cinâmico e a partir desta reação em diante são formadas moléculas arranjadas no modelo C6-C3, arranjo característico que classifica os compostos fenólicos originados nesta via como fenilpropanoides (um grupo fenila, que é um anel aromático, unido a um grupo propila, que é uma cadeia lateral de três carbonos). Este arranjo básico, portanto, está presente na estrutura de compostos fenólicos complexos, os quais são classificados de acordo com a posição dos substituintes ligados à cadeia principal e grau de oxigenação e insaturação das moléculas, ou podem sofrer degradação oxidativa, formando ácidos fenólicos e fenóis simples (Crozier *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2016).

### 1.4.1. FLAVONOIDES

No primeiro passo da via do ácido chiquímico, a L-fenilalanina é convertida em ácido cinâmico, a partir do qual se forma a classe de fenilpropanoides chamados de cumarinas. Seguindo a rota, o ácido cinâmico é convertido em 4-cumaril-CoA, o qual neste ponto pode se tornar o precursor de fenilpropanoides como ligninas e lignanas, ácidos benzoicos e polifenóis (e até mesmo alguns alcaloides) ou seguir na rota para a formação de outras classes de fenilpropanoides. Caso siga a rota, o 4-cumaril-CoA, que é a molécula C6-C3 mencionada anteriormente, une-se a três unidades de malonil-CoA originadas da via biossintética do malonato (as quais formam uma molécula de seis carbonos), formando uma estrutura C6-C3-C6, a partir da qual é formada a classe dos flavonoides, iniciando pelas chalconas, flavonoides de cadeia aberta que também são bioprecursores de diversos outros flavonoides (Crozier *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2016).

Cada unidade básica que constitui os flavonoides é classificada por letras, sendo a primeira fenila o núcleo A (advinda da via do malonato), a molécula de três carbonos no centro o núcleo C e a segunda fenila o núcleo B (ambas advindas da via do ácido chiquímico). Os carbonos dos núcleos A e C são numerados com números ordinários, enquanto os carbonos do núcleo B são números seguidos por uma linha (') (Figura 2) (Simões *et al.*, 2016; Crozier *et al.*, 2006). Os flavonoides naturais costumam ter oxigênio em sua estrutura e muitos também estão unidos a açúcares. Quando estão unidos a açúcares, forma esta chamada de conjugada, estes são nomeados como heterosídeos, sendo os O-heterosídeos aqueles ligados por uma hidroxila e C-heterosídeos aqueles ligados por um carbono (Simões *et al.*, 2016).

As formas dos flavonoides não conjugadas com açúcares são chamadas de agliconas. As agliconas normalmente são obtidas na forma de cristais amarelos e costumam ser solúveis em solventes orgânicos apolares ou soluções aquosas alcalinas. Os respectivos heterosídeos por sua vez, devido à presença de açúcares e de grupos hidroxila, normalmente são solúveis em água e álcoois diluídos. A presença de substituintes como grupos metila e unidades isopentenila tornam os flavonoides mais lipofílicos. A classificação dos flavonoides se dá pelo estado de oxigenação e grau de insaturação do anel heterocíclico C (Crozier *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2016).



**Figura 2: Estrutura básica e numeração dos núcleos dos flavonoides (Fonte: Simões *et al.*, 2016)**

Os flavonoides são o maior grupo de compostos fenólicos, os quais se encontram em altas concentrações na epiderme das folhas e casca dos frutos. Atuam nas plantas principalmente como agentes protetores contra a radiação UV e patógenos, também como pigmentos atrativos para polinizadores e estimuladores de nódulos fixadores de nitrogênio. Os flavonoides podem ser divididos em suas principais subclasses: flavonas, flavonóis (o grupo mais distribuído no reino vegetal), antocianos, chalconas, auronas, di-hidroflavonóis, flavanonas, di-hidrochalconas, flavanas e isoflavonoides (Crozier *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2016).

#### **1.4.2. PTEROCARPANOS**

Os isoflavonoides são os flavonoides mais frequentes na família Fabaceae. É uma classe muito diversa estruturalmente e possui como maiores representantes as isoflavonas e pterocarpanos (Jiménez-González *et al.*, 2008; Goel, Kumar e Raghuvanshi, 2013; Zuanazzi *et al.*, 2017, p. 218, 219). Os pterocarpanos possuem um núcleo tetracíclico e numeração diferente das isoflavonas (Z Zuanazzi *et al.*, 2017, p. 219). Sua estrutura principal baseia-se em um sistema tetracíclico de anéis benzofurano e benzopirano com dois centros quirais na posição 6a e 11a (Jiménez-González *et al.*, 2008). A principal função conhecida dos pterocarpanos (e da maioria dos isoflavonoides) nas plantas é a de fitoalexina – substâncias defensivas produzidas pela planta em resposta a algum elicitor biótico, tais como fungos e bactérias, e também fatores abióticos, como radiação UV e sais metálicos (Jiménez-González *et al.*, 2008; Zuanazzi *et al.*, 2017, p. 220).

Devido seu importante papel na resistência das plantas, substâncias que atuam como fitoalexinas são promissoras no desenvolvimento de agroquímicos seguros e naturais, além do seu potencial farmacológico contra patógenos humanos como demonstrado *in vitro* por meio

da atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* (Jiménez-González *et al.*, 2008). Outra atividade biológica atribuída aos pterocarpanos inclui sua propriedade osteogênica, bastante promissora na promoção da saúde óssea e prevenção da osteoporose, além da propriedade antiproliferativa observada *in vitro* contra várias linhagens humanas de células cancerígenas (Goel, Kumar e Raghuvanshi, 2013).

#### 1.4.3. XANTONAS

Xantonas são produtos naturais polifenólicos de origem biossintética mista assim como os flavonoides e consistem de dois anéis benzenos estruturados em uma conformação C6-C1-C6. Cada anel benzênico é derivado rotas biossintéticas distintas e, portanto recebem numeração distinta. O anel A é derivado do acetato e seus carbonos recebem numeração de 1 a 4, enquanto o anel B, proveniente da via do chiquimato, recebe numeração de 5 a 8. Ambos os anéis são fundidos a uma benzo-y-pirona (Lizazman, Karunakaran e Jong, 2022; Remali, Sahidin e Aizat, 2022).

Os diversos substituintes ligados aos anéis benzênicos na estrutura geral das xantonas permite que moléculas dessa classe tenham um amplo espectro de interação com alvos farmacológicos e por esta razão essa classe apresenta numerosos potenciais biológicos (Lizazman, Karunakaran e Jong, 2022) incluindo atividade antileishmania (Silva *et al.*, 2013), antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Remali, Sahidin e Aizat, 2022).

As xantonas são comumente encontradas em fungos, líquens e famílias vegetais superiores, não sendo amplamente distribuídas nestas. A ocorrência dessa classe de substâncias já foi documentada em 20 famílias e 122 espécies de vegetais superiores, sendo o maior número de registros nas famílias Clusiaceae (55 espécies) e Gentianaceae (28 espécies) (Vieira e Kijjoa, 2005; Huang *et al.*, 2021). Na família Fabaceae há registro dessa classe de polifenóis em cinco espécies do gênero *Cyclopia* Vent. (Vieira e Kijjoa, 2005; Schulze *et al.*, 2015), na espécie *Macrolobium acaviifolium* (Benth.) Benth. (Silva *et al.*, 2023) e no gênero *Baphia* Lodd (Kapingu e Magadula, 2008).

#### 1.4.4. ESTILBENOS

Estilbenos também são importantes substâncias fenólicas que não pertencem ao grupo dos flavonoides. Sua estrutura básica consiste de dois anéis benzênicos conectados por um etileno, totalizando um esqueleto de 14 carbonos (Valletta; Iozia e Leonelli, 2021). São

biossintetizados na via fenilpropanoide, a mesma via de formação dos flavonoides, cumarinas e taninos, onde o aminoácido L-fenilalanina é a molécula inicial. Substâncias dessa classe já foram identificadas em cerca de 72 espécies de plantas de 12 famílias pouco relacionadas entre si, dentre elas a família Fabaceae (*Arachis hypogaea* L.; *Robinia pseudoacacia* L. e *Swartzia apetala* Raddi) (Araujo *et al.*, 2009; Valletta; Iozia e Leonelli, 2021).

Os estilbenos estão envolvidos na defesa constitutiva e induzida das plantas, contra fatores bióticos como microorganismos patogênicos e herbívoros, e contra fatores abióticos, como radiação UV (Dubrovina e Kiselev, 2017; Valletta; Iozia e Leonelli, 2021). Podem agir diretamente contra o organismo agressor causando toxicidade ou atuar como agentes antioxidantes na proteção das células contra o estresse oxidativo causado durante o ataque (Valletta; Iozia e Leonelli, 2021). Diversas atividades biológicas já foram associadas aos estilbenos, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória, anticancer (De Filippis *et al.*, 2017) e antimicrobiana (Dubrovina e Kiselev, 2017).

### 1.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres presentes no corpo humano, resultantes do próprio metabolismo ou de agentes externos como o ar, são átomos ou moléculas que apresentam elétrons desemparelhados que, quando em maior quantidade que os mecanismos antioxidantes, podem levar ao estresse oxidativo e danificar estruturas celulares e tecidos, o que leva ao desenvolvimento de várias doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e Alzheimer. Os antioxidantes, portanto, são substâncias capazes de inibir ou reduzir esses radicais livres, tornando-os estáveis e prevenindo doenças, por esta razão estas substâncias são muito relevantes para a saúde humana (Roesler *et al.*, 2007; Charles, 2013). Os principais meios pelos quais moléculas antioxidantes estabilizam radicais livres consistem na formação de pontes de hidrogênio entre suas hidroxilas livres e os radicais contendo hidroxila ou oxigênio, na doação de hidrogênio e na quelação de metais. As principais classes de metabólitos secundários que apresentam atividade antioxidante são os fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados e flavonoides (Roesler *et al.*, 2007; Harb *et al.*, 2016).

Os ensaios de atividade antioxidante com o radical livre DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e com Fe<sup>3+</sup> em complexo com a fenantrolina tem sido amplamente utilizados para analisar o potencial antioxidante de extratos vegetais. O primeiro se baseia na utilização do radical livre DPPH<sup>•</sup> que ao ser reduzido pelas substâncias antioxidantes presentes nos

extratos vegetais, muda sua cor de roxo para amarelo pálido e a diminuição da sua absorbância (inicialmente medido a 517 nm) informa a concentração de antioxidantes, a qual é comparada frente ao ácido ascórbico como antioxidante padrão (Brand-Williams *et al.*, 1995). O segundo método utiliza o  $\text{Fe}^{3+}$  como o radical a ser reduzido em complexo com a *o*-fenantrolina (Fen), e uma vez reduzido o meio muda a cor de vermelho-alaranjado a transparente levemente azulado (Novais, 2007).

## 1.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O crescente desenvolvimento de resistência de fungos e bactérias a muitos antifúngicos e antibióticos disponíveis atualmente tem sido um tópico alarmante para a ciência. Portanto, a demanda para desenvolver novos agentes antimicrobianos tem direcionado pesquisadores a isolar e identificar novas substâncias químicas bioativas a partir das plantas para atuar no combate à resistência de microorganismos. Produtos naturais antimicrobianos originados das plantas podem inibir o crescimento de diversos microorganismos patogênicos como bactérias, fungos, vírus e protozoários por meio de mecanismos diferentes das medicações utilizadas atualmente (Sharifzadeh *et al.*, 2018; Vaou *et al.*, 2021).

Compostos naturais podem, por si só, inibir o crescimento ou matar fungos e bactérias, além de serem capazes de inibir mecanismos de resistência microbiana. Eles também podem atuar em combinação com drogas sintéticas ajudando a transpor a resistência dos microorganismos, além de aumentar a efetividade de cada agente ao reduzir a dose, tempo de tratamento e toxicidade, o que pode evitar o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (Sharifzadeh *et al.*, 2018; Vaou *et al.*, 2021). Além dos efeitos antimicrobianos exibidos por substâncias ativas isoladas, também pode haver efeitos em decorrência da ação sinérgica dos compostos ativos presentes em extratos (Vaou *et al.*, 2021).

Diversos alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, monoterpênicos, sesquiterpenos, triterpenos, carotenoides e esteroides têm sido apontados como responsáveis pela atividade antimicrobiana de extratos vegetais (Kuate, 2010; Termentzi *et al.*, 2011; Vaou *et al.*, 2021). Os compostos fenólicos, por exemplo, podem inibir a capacidade de células bacterianas de bombear os agentes antibacterianos para fora do citoplasma, além de modificar a permeabilidade e integridade da membrana bacteriana (Vaou *et al.*, 2021). Flavonoides podem inibir a síntese de ácidos nucleicos, danificar o envelope, a parede celular e a

membrana bacteriana e inibir seu metabolismo energético (Cushnie e Lamb, 2005; Vaou *et al.*, 2021).

As propriedades antimicrobianas dos terpenos, por sua vez, parecem estar muito relacionadas às suas características lipofílicas, o que parece facilitar sua penetração na parede celular de fungos e bactérias. Embora ainda não seja completamente compreendido de que maneira os terpenos apresentam seus mecanismos de ação, acredita-se que estejam relacionados ao rompimento e disrupção do potencial elétrico da membrana, e coagulação dos componentes celulares (Sharifzadeh *et al.*, 2018; Vaou *et al.*, 2021). O monoterpreno timol também interferiu significativamente na aderência de biofilmes fúngicos à mucosa oral e vaginal humana (Sharifzadeh *et al.*, 2018).

Os métodos mais utilizados atualmente para determinar o potencial antimicrobiano de extratos vegetais são os métodos de difusão e diluição. O método de difusão é qualitativo e se baseia na presença ou ausência de substâncias antimicrobianas por meio da observação de halos de inibição, medidos em milímetros, ao redor dos extratos ou substâncias testados. Por ser um método de fácil aplicação, costuma ser amplamente empregado (Alves *et al.*, 2008). O método de diluição é quantitativo e permite determinar a concentração mínima de substância/extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano (Concentração Mínima Inibitória - CMI), sendo considerados promissores os valores de  $CMI \leq 100 \mu\text{g/mL}$  para extratos e  $CMI \leq 10 \mu\text{g/mL}$  para substâncias isoladas (Górniak *et al.*, 2018; Vaou *et al.*, 2021).

### **1.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA COM *Artemia salina***

A maioria dos princípios ativos obtidos de plantas é tóxica em doses altas. Uma abordagem rápida, de baixo custo e pouca complexidade que pode avaliar de maneira geral a toxicidade de uma amostra tem sido a realização do ensaio com o microcrustáceo *Artemia salina* Leach. Os ovos de *A. salina* se mantêm viáveis em estado seco por anos e são facilmente encontrados em pet shops como alimento para peixes. Estes ovos são incubados em água salina por 48 h até a eclosão das larvas, as quais são mantidas por mais 24 h em poços contendo os extratos a serem testados. Após o período de 24 h são contabilizados os indivíduos mortos e se houver mais de uma concentração dos extratos testados, é determinada a  $CL_{50}$ , que é a concentração letal capaz de causar a mortalidade de 50% dos indivíduos (Meyer *et al.*, 1982).

Embora este bioensaio não seja específico para atividade antitumoral ou qualquer atividade fisiológica específica, seus resultados podem ser úteis na condução do fracionamento de extratos bioativos, principalmente quando estes resultados podem ser relacionados a outros testes mais elaborados. Os compostos ativos, porém devem ser submetidos posteriormente a ensaios para atividades farmacológicas mais específicas (Meyer *et al.*, 1982).

### 1.8. FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae ou Leguminosae, cujas espécies são conhecidas comumente como leguminosas, é a terceira maior família de angiospermas do mundo, com cerca de 770 gêneros e 29.556 espécies (The Legume Phylogeny Working Group, 2017; Fabaceae in GBIF Secretariat, 2022). Está amplamente distribuída por quase todos os biomas, sendo bastante abundante e diversa nas florestas tropicais úmidas e secas da África, Ásia e América do Sul, incluindo árvores emergentes, arbustos, lianas lenhosas, trepadeiras e herbáceas perenes ou anuais (The Legume Phylogeny Working Group, 2017).

As flores das leguminosas podem ser tanto de simetria actinomorfa e zigomorfa quanto assimétricas, as quais são adaptadas a diversos polinizadores como insetos, aves e morcegos. Suas folhas são compostas e estipuladas, e tem um fruto característico em forma de vagem. A característica ecológica mais conhecida das leguminosas é a habilidade que a maioria das espécies tem em associar-se às bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico do gênero *Rhizobium*. Em sua mais recente classificação, encontra-se subdividida em seis subfamílias: Caesalpinioideae DC., Cercidoideae Legume Phylogeny Working Group (stat. nov.), Detarioideae Burmeist., Dialioideae Legume Phylogeny Working Group (stat. nov.), Duparquetioideae Legume Phylogeny Working Group (stat. nov.), and Papilionoideae DC. (The Legume Phylogeny Working Group, 2017).

A seleção de espécies vegetais para iniciar o processo de busca por substâncias bioativas para a obtenção de novos fitoterápicos ou fármacos pode ser norteados por critérios como o randômico, etnofarmacológico (basea-se em informações de uso tradicional), ecológico-bioquímico (parte da observação de interações ecológicas em campo) e quimiotaxonômico (basea-se em informações obtidas de espécies aparentadas) (Simões *et al.*, 2016). Dentre as 20 famílias dominantes em termos de plantas medicinais, a família Fabaceae possui mais de 25% de representação, na qual flavonoides, especialmente isoflavonoides, são

as classes predominantes de metabólitos secundários (Takemoto e Arita, 2009; Asfaw e Abebe, 2021).

As características das espécies dessa família e seus usos humanos são dos mais diversos. Economicamente, é a segunda família de maior importância, sendo bastante utilizada em plantações na obtenção de alimento e forragem, como adubo verde, e também como fonte de tintas, inseticidas, flavorizantes e aromatizantes (The Legume Phylogeny Working Group, 2017; Asfaw e Abebe, 2021). Além disso, o uso terapêutico de folhas, raízes, galhos, frutos e sementes das espécies por comunidades tradicionais tem sido amplamente documentado no tratamento de doenças e condições como mordida de serpentes, diarreia, malária, infecções na pele, no trato digestivo e nos olhos, dentre inúmeras outras condições clínicas (Rosado-Vallado *et al.*, 2000; Rahman e Parvin, 2014; Sharma *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018; Asfaw e Abebe, 2021; Maroyi, 2023).

Os inúmeros usos terapêuticos tradicionais de espécies de Fabaceae motivaram estudos visando à compreensão de suas propriedades químicas e bioativas, levando ao isolamento de várias substâncias. A espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir por exemplo, encontrada na Caatinga e no Cerrado, tem sido estudada por 30 anos devido aos seus efeitos teratogênicos sobre animais ruminantes, o que levou a estudos que isolaram de suas folhas, casca, flores e sementes substâncias de várias classes de produtos naturais importantes, como alcaloides, saponinas, flavonoides e terpenos, sendo o alcaloide indólico *N,N*-dimetiltryptamina apontado como o principal responsável pelos efeitos teratogênicos em ruminantes (Bezerra *et al.*, 2021).

Em um estudo realizado com extratos das partes aéreas da espécie *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) encontrada na América do Sul, o extrato bruto mostrou-se efetivo e altamente seletivo para células leucêmicas, enquanto o extrato hexânico fracionado a partir do extrato bruto e a chalcona isolada 2',4'-dihidroxi-5'-prenilchalcona mostraram-se efetivas contra a proliferação de todas as nove linhagens de células cancerígenas testadas (Landim *et al.*, 2021). Outro exemplo é o gênero *Hymenaea* da família Fabaceae, o qual é amplamente distribuído nas Américas Central e do Sul e tem sido utilizado na medicina tradicional da região nordeste do Brasil (e em outras regiões neotropicais) para tratar inflamações, infecções bacterianas, feridas e outras doenças, além de ser fonte de diversas substâncias isoladas, principalmente das classes de terpenos e flavonoides (Oliveira *et al.*, 2018).

Espécies do gênero *Inga*, amplamente utilizadas por comunidades indígenas no tratamento de feridas e diversas outras doenças também mostrou-se fonte produtos naturais como saponinas identificadas na casca de *I. marginata*, esteróis glicosilados e flavonoides nas raízes de *I. edulis* e altas concentrações de fenólicos em outras espécies do gênero. Além disso, foram também encontradas substâncias com propriedades antioxidantes, antibacterianas e antiplasmódicas nesse gênero (Lima *et al.*, 2022). Estudos também tem apontado o gênero *Swartzia*, o qual é bastante abundante e diverso na região norte do Amazonas, como fonte de produtos naturais com propriedades antimicrobianas e antifúngicas associadas (Negreiros e Nunez, 2023).

### 1.9. *Swartzia* spp.

O gênero neotropical *Swartzia*, da família Fabaceae e subfamília Papilionoideae, encontra-se distribuído desde o sul do México e ilhas caribenhas até o sul do Brasil e Bolívia, sendo especialmente prevalente nas florestas úmidas da planície da bacia amazônica e escudo das guianas. As espécies de *Swartzia* possuem poucas sinapomorfias morfológicas que possam abranger todo o gênero. No geral, suas flores são pouco usuais com cálice deiscente irregular, corola monopétala ou ausente, androceu zigomorfo com estames de dois tamanhos diferentes e gineceu com ginóforo (Torke e Mansano, 2009). Seus frutos são deiscentes, suas sementes são ariladas, as folhas são imparipinadas com raque estipulada e os galhos liberam um exsudado avermelhado quando cortados (Torke e Mansano, 2009, Barbosa *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2021). O gênero *Swartzia* engloba cerca de 180 espécies, das quais 112 ocorrem no Brasil e 81 ocorrem na região norte do Brasil (Torke e Mansano, 2009; Flora e Funga do Brasil, 2023). A maioria das espécies são árvores de médio a grande porte, as quais possuem valor econômico associado à madeira e valor alimentício na dieta de primatas (Meirelles e Souza, 2015).

*Swartzia polyphylla* (DC), conhecida como Paracutaca-de-terra-firme, é uma árvore perene de dossel com alturas que podem variar de 3 a 40 metros que ocorre tanto no estrato vegetal mais alto das florestas de igapó da bacia Amazônica (portanto sendo submetida à inundação por poucos meses em relação aos estratos mais baixos), quanto nos ecossistemas de campinarana e terra firme. Seus frutos em forma de vagem se abrem na árvore e liberam uma semente grande, a qual apresenta dimorfismo quanto à adaptação à flutuação (Williamson *et al.*, 1999; Parolin *et al.*, 2003; Flora e Funga do Brasil, 2023; *Swartzia polyphylla* DC. in GBIF Secretariat, 2023). O tronco normalmente apresenta sapopemas altas e onduladas e na

entrecasca há exsudação vermelha abundante. Encontra-se geograficamente distribuída na região norte do Brasil nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Rondônia, e também no Peru, Colômbia, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Equador (Batista, 2021; Flora e Funga do Brasil, 2023, *Swartzia polyphylla* DC. in GBIF Secretariat, 2023).

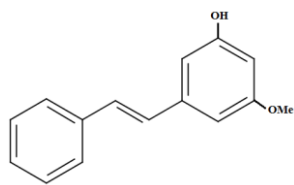
*Swartzia tessmannii* Harms é uma árvore de terra firme e campinarana que pode atingir 7 metros ou mais. Ocorre nas regiões norte e centro-oeste do Brasil, nos estados do Amazonas, Pará e Mato Grosso, e também no Peru, Venezuela e Colômbia (Flora e Funga do Brasil, 2023; *Swartzia tessmannii* Harms in GBIF Secretariat, 2023). *Swartzia ulei* Harms é uma árvore endêmica do Brasil que ocorre nos ecossistemas de campinarana e terra firme dos estados do Amazonas e Pará. Diferencia-se de *S. polyphylla* e *S. tessmannii* principalmente por seus galhos aveludados em tom amarelado, por esta razão sendo conhecida popularmente como Murajibóia-amarela ou Murajubóia-jerimum (Flora e Funga do Brasil, 2023; *Swartzia ulei* Harms in GBIF Secretariat, 2023).

#### **1.10. FITOQUÍMICA DE *Swartzia* spp.**

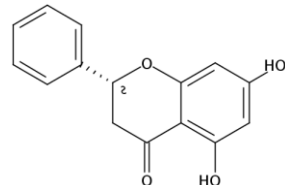
Do total de espécies conhecidas deste gênero, apenas 21 tiveram algum tipo de estudo químico associado em termos de perfil químico, usos terapêuticos tradicionais e substâncias ou extratos bioativos, algumas delas sendo apenas vagamente caracterizada. Foram encontradas principalmente substâncias terpênicas e fenólicas da classe dos flavonoides, além de diferentes graus de atividade antifúngica (de baixa a alta) e antibacteriana, dentre outras atividades biológicas e químicas (Negreiros e Nunez, 2023).

##### **1.10.1. *Swartzia apetala* Raddi**

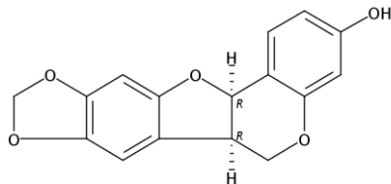
A partir dos extratos hexânicos do tronco de *S. apetala* foram isolados um estilbeno, uma flavanona, um pterocarpano e fitoesteróis, enquanto do extrato metanólico das folhas foram isolados uma saponina triterpênica, dois flavonóis e um triterpeno (Figura 3). Algumas das substâncias isoladas foram submetidas a um ensaio antifúngico contra nove cepas de leveduras do gênero *Candida* spp., resultando em inibições baixas e moderadas (Araujo *et al.*, 2009) (Tabela 3).



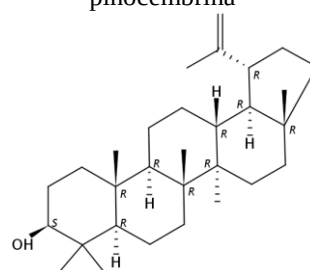
3-metoxi-5-estirilfenol



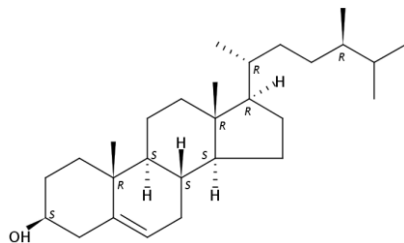
pinocembrina



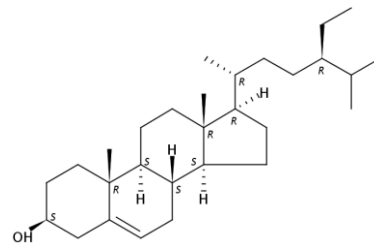
maackiain



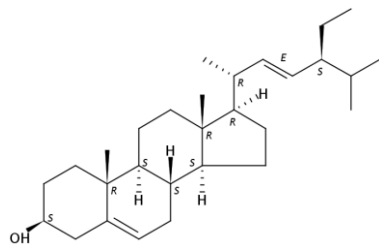
lupeol



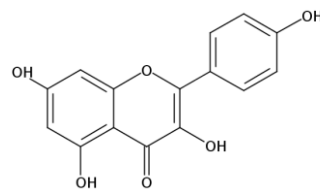
campesterol



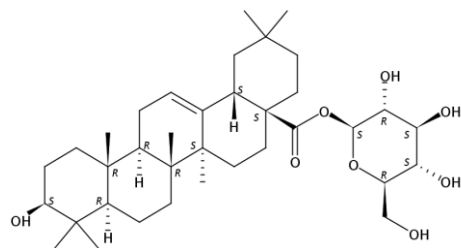
$\beta$ -sitosterol



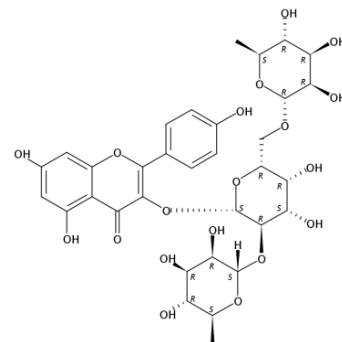
estigmasterol



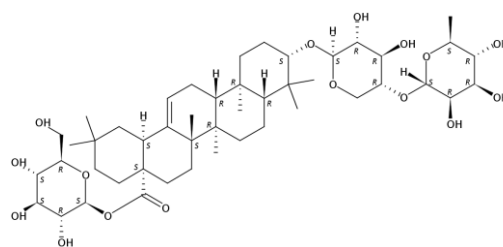
kaempferol



ácido 28-(o- $\beta$ -d-glicopiranosil) oleanólico

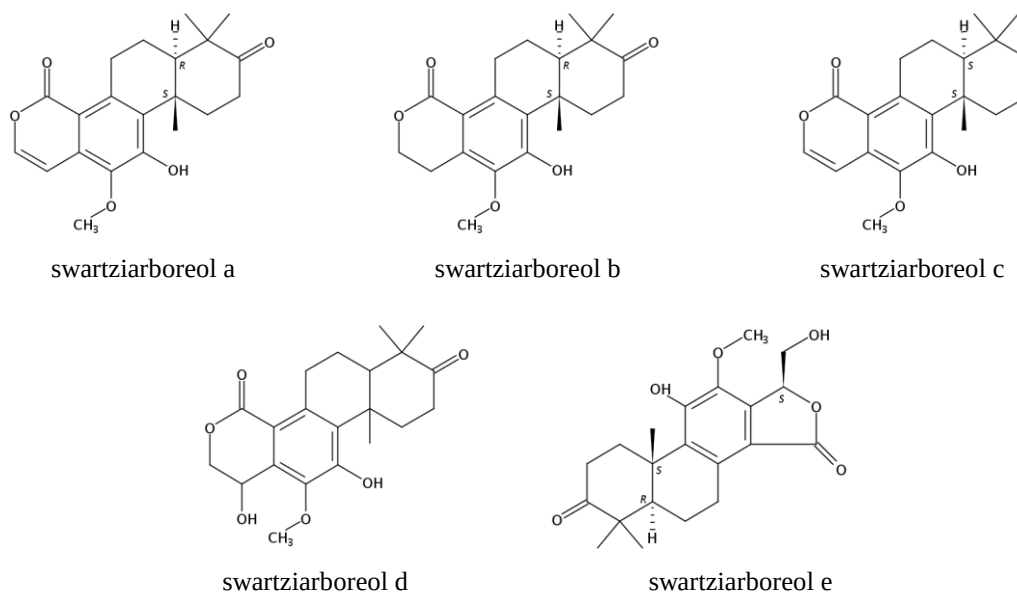


mauritianina

éster  $\beta$ -d-glicopiranosil**Figura 3: Substâncias isoladas de *S. apetala***

### 1.10.2. *Swartzia arborescens* (Aubl.) Pittier

Segundo Orphelin *et al.* (1996), extratos de *S. arborescens* permitiram o isolamento de cinco diterpenos (Figura 4) (Tabela 3).

**Figura 4: Substâncias isoladas de *S. arborescens***

### 1.10.3. *Swartzia argentea* Spruce ex. Benth

São poucos os registros sobre o perfil químico de *S. argentea*, porém foi documentado por Kffuri *et al.* (2016) que o chá da casca dessa espécie tem sido utilizado no tratamento contra malária por povos indígenas do Alto Rio Negro no Amazonas (Tabela 1). Também foram detectadas algumas classes químicas no extrato etanólico da casca dessa espécie através

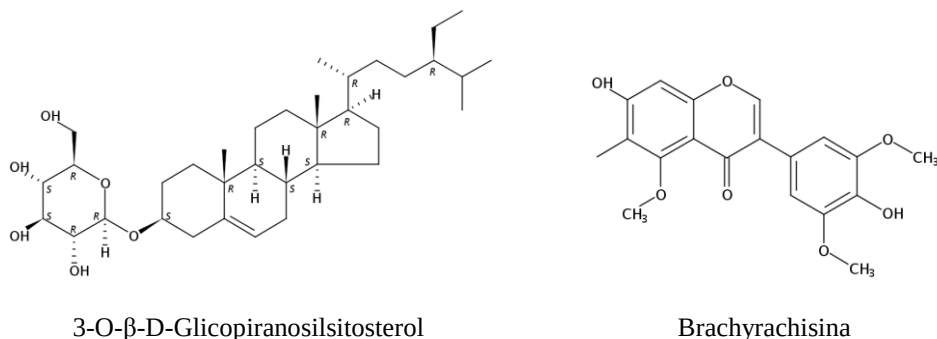
de testes histoquímicos, incluindo flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos (Barbosa *et al.*, 2006).

**Tabela 1: Usos terapêuticos de *Swartzia spp. in natura***

| Espécie            | Uso                 | Condição clínica                      | Referência                  |
|--------------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| <i>S. argentea</i> | Decocção da casca   | Malária                               | Kffuri <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>S. oblata</i>   | Decocção da casca   | Escabiose<br>Hemorragia<br>Inflamação | Yazbek <i>et al.</i> , 2019 |
|                    | Decocção das folhas | Dor muscular<br>Inflamação            | Yazbek <i>et al.</i> , 2019 |

#### 1.10.4. *Swartzia brachyrachis* Harms

A partir do extrato benzênico da casca de *S. brachyrachis* foi isolada a isoflavona 7,4'-dihidroxi-5,3',5'-trimetoxi-6-metilisoflavona, também conhecida como Brachyrachisina. Já a partir do extrato clorofórmico da casca, foi isolado o esteróide 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilsitosterol (Sanchez *et al.*, 1999) (Figura 5) (Tabela 3).



**Figura 5: Substâncias isoladas de *S. brachyrachis***

#### 1.10.5. *Swartzia flaemingii* Raddi

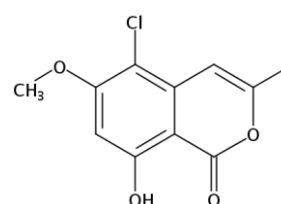
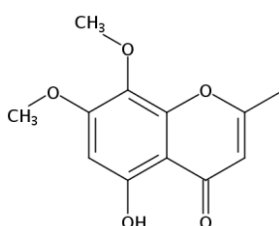
A partir exsudação obtida do tronco de *S. flaemingii* dissolvida em metanol deuterado, foram obtidos os fenóis e flavonoides totais, resultando em valores relevantes para esses componentes. Devido a isso, Oliveira *et al.* (2021) também mediu a capacidade de redução do íon férrico, o que resultou em um valor comparável à capacidade da vitamina C (Tabela 2).

Tabela 2: Extratos brutos de *Swartzia* spp. e atividades biológicas

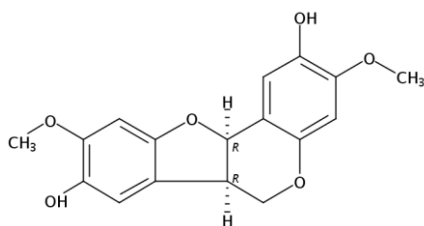
| Espécie               | Solvente          | Parte da planta                   | Atividade biológica             | Referência                     |
|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>S. flaemingii</i>  | metanol- <i>d</i> | látex                             | antioxidante (alta)             | Oliveira <i>et al.</i> , 2021  |
| <i>S. langsdorfii</i> | metanol- <i>d</i> | látex                             | antioxidante (alta)             | Oliveira <i>et al.</i> , 2021  |
|                       | etanol            | folhas                            | antioxidante (moderada)         | Santos <i>et al.</i> , 2009    |
|                       | etanol            | fruto e semente                   | <i>Artemia salina</i>           | Magalhães <i>et al.</i> , 2003 |
|                       | etanol            | raízes, folhas, sementes e frutos | <i>Biomphalaria glabrata</i>    | Magalhães <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>S. leptopetala</i> | etanol            | frutos                            | inibição enzimática             | Jiménez <i>et al.</i> , 2001   |
| <i>S. polyphylla</i>  | metanol           | casca                             | antibacteriana                  | Roumy <i>et al.</i> , 2019     |
|                       | hexano            | casca                             | larvicida e antimicobactericida | Rojas <i>et al.</i> , 2006     |
|                       | metanol           | casca                             | antifúngica                     | Rojas <i>et al.</i> , 2006     |

#### 1.10.6. *Swartzia laevicarpa* Amshoff

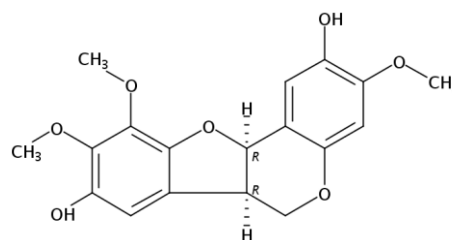
Por meio de testes histoquímicos realizados no extrato etanólico da casca de *S. laevicarpa*, detectou-se a presença de flavonoides, taninos, flavanonas, flavonas, flavonóis, xantonas, triterpenoides e indícios de outras substâncias (Barbosa *et al.*, 2006). Também por meio do extrato etanólico da madeira, foram isolados seis isoflavonoides: (6aR,11aR)-2,8-dihidroxi-3,9-dimetoxipterocarpano; (6aR,11aR)-2,8-dihidroxi-3,9,10-trimetoxipterocarpano; (6aR,11aR)-8-hidroxi-3,4,9,10-tetrametoxipterocarpano; 5-cloro-8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina; 7-cloro-8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina e 5-hidroxi-7,8-dimetoxi-2-metilcromona (Braz-Filho, Moraes e Gottlieb, 1979). O extrato metanólico dos resíduos da madeira permitiu o isolamento do isoflavonoide 3'-hidroxi-7,8,4',5'-tetrametoxipterocarpano (Garcia *et al.*, 2018) (Figura 6) (Tabela 3).



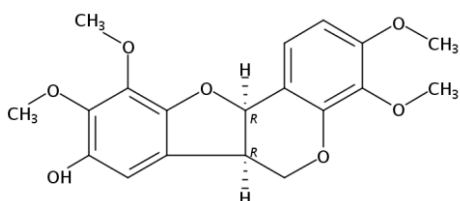
5-hidroxi-7,8-dimetoxi-2-metilcromona



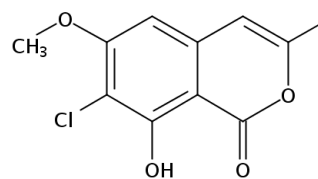
5-cloro-8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina



(6aR,11aR)-2,8-dihidroxi-3,9-dimetoxipterocarpano



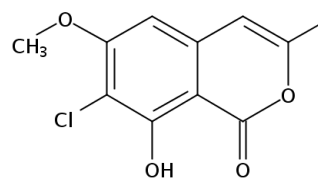
(6aR,11aR)-2,8-dihidroxi-3,9,10-trimetoxipterocarpano



(6aR,11aR)-8-hidroxi-3,4,9,10-tetrametoxipterocarpano



7-cloro-8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina

**Figura 6: Isoflavonoides isolados de *S. laevicarpa*****1.10.7. *Swartzia langsdorfii* Raddi**

Por meio do fracionamento do extrato etanólico de folhas de *S. langsdorfii* foram isolados os triterpenos pentacíclicos ácido oleanólico e lupeol, e as saponinas ácido oleanólico 3-soforosídeo e éster 3-O-β-D-(6'-metil)-glicopiranosil-28-O-β-D-glicopiranosil-oleanato (Figura 7). Ambas as saponinas tiveram atividade antifúngica moderada, enquanto o ácido oleanólico apresentou atividade baixa e o lupeol mostrou-se inativo contra as espécies de fungo *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (Marqui *et al.*, 2008). O extrato de éter de petróleo das raízes permitiu o isolamento dos diterpenos 11-O-metilswartziarboreol C e 15,16-dihidrosartziarboreol C, sendo o último ativo contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (Magalhães *et al.*, 2005) (Tabela 3).

A avaliação do teor de fenóis totais presente nos extratos etanólicos de diferentes partes dos frutos dessa espécie revelou que na casca havia alta quantidade de fenóis e por esse motivo o extrato da casca foi submetido a um ensaio antioxidante, o qual apresentou capacidade moderada de reduzir o radical livre DPPH (Roesler *et al.*, 2007) (Tabela 2). O látex dissolvido em metanol deuterado por sua vez apresentou alto teor de fenóis e flavonoides totais e capacidade de reduzir o íon férrico comparável à da vitamina C, enquanto

o extrato etanólico das folhas apresentou capacidade moderada de reduzir o radical livre DPPH (Santos *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2021) (Tabela 2).

Outras atividades biológicas documentadas para a espécie incluem a letalidade do microcrustáceo *Artemia salina*, utilizando mistura de saponinas obtidas do fruto e semente, e também a atividade moluscicida dos extratos etanólicos de raízes, folhas, sementes e frutos contra *Biomphalaria glabrata* (Tabela 2). As saponinas em mistura presentes no ensaio contra *A. salina* foram identificadas como  $\beta$ -D-glicopiranosil[ $\alpha$ -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-3 $\beta$ -hidroxiolean-12-ene-28-oato e  $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-3 $\beta$ -hidroxiolean-12-eno-28-oato (Magalhães *et al.*, 2003) (Tabela 3).

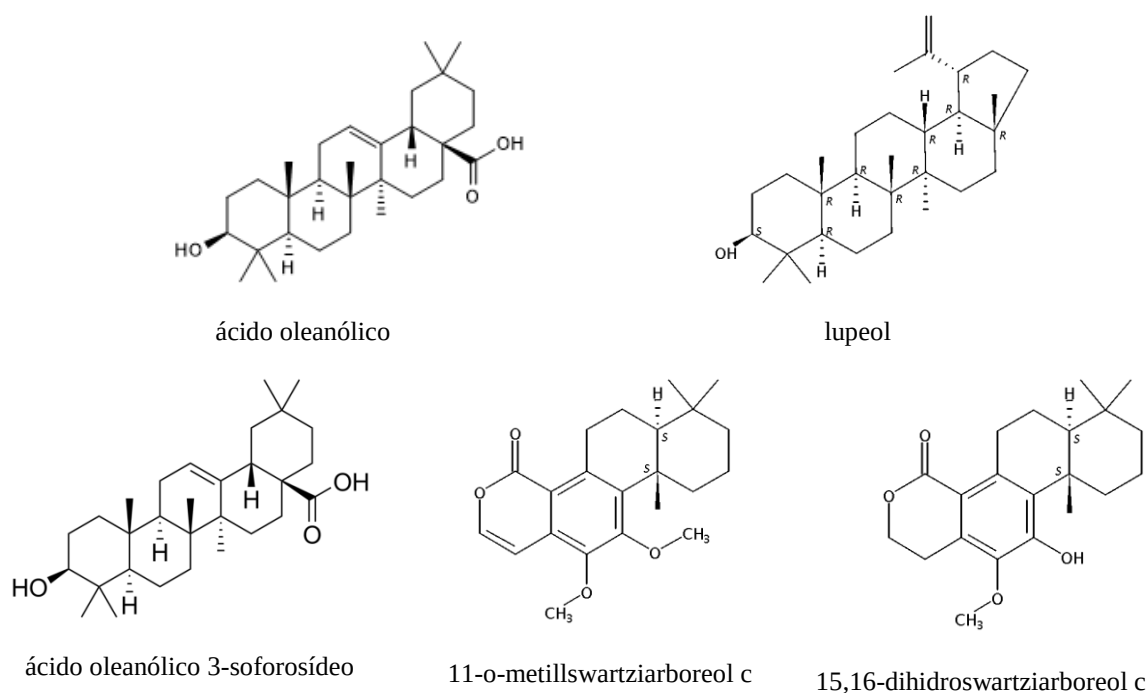
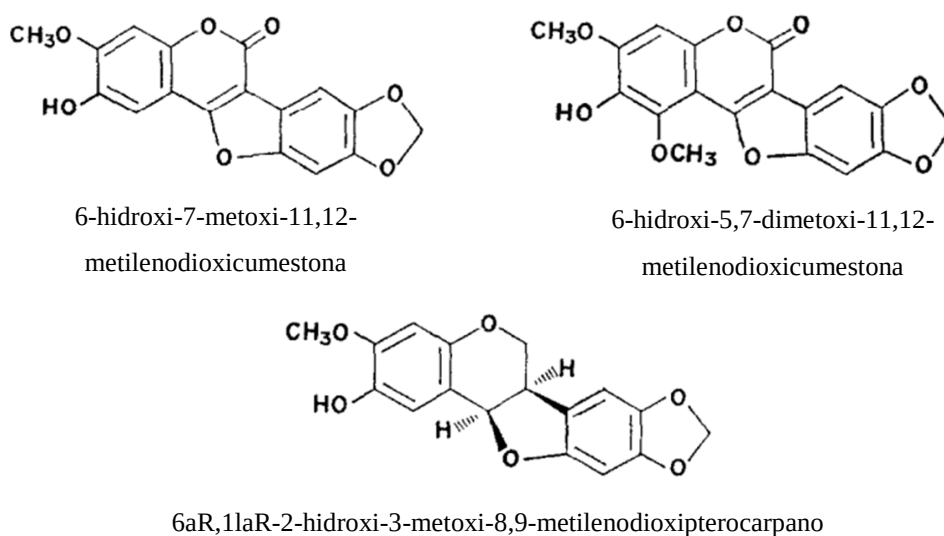


Figura 7: Substâncias isoladas de *S. langsdorfii*

#### 1.10.8. *Swartzia leiocalycyna* Benth.

A partir do extrato cetônico do cerne de *S. leiocalycyna* foram isoladas duas cumestonas, 6-hidroxi-5,7-dimetoxi-11,12-metilenodioxicumestona e 6-hidroxi-7-metoxi-11,12-metilenodioxicumestona, e um pterocarpano, 2-hidroxi-3-metoxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (Donnelly e Fitzgerald, 1971) (Figura 8) (Tabela 3).



**Figura 8: Substâncias isoladas de *S. leiocalycyna***

#### **1.10.9. *Swartzia leptopetala* Benth**

Extratos etanólicos dos frutos, folhas e galhos de *S. leptopetala* foram avaliados para atividades biológicas como atividade cardiovascular (diminuição de pressão arterial), letalidade contra *A. salina* e inibição enzimática (controle de hiperglicemia). No ensaio de atividade cardiovascular, o extrato de frutos levaram todos os animais experimentais à morte e os extratos de folhas e galhos não obtiveram nenhuma atividade. Também não houve letalidade de *A. salina* causada por nenhum dos extratos. Quanto ao ensaio de controle hiperglicêmico, os extratos de folhas e galhos apresentaram inibição relevante contra a enzima responsável pela hiperglicemia (Jiménez *et al.*, 2001) (Tabela 2).

#### **1.10.10. *Swartzia longistipitata* Ducke**

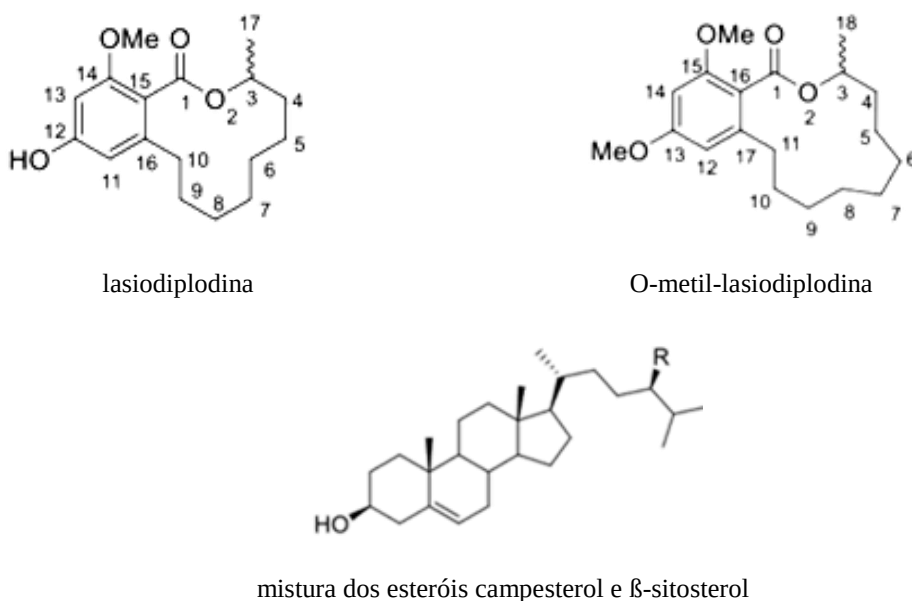
Somente um estudo fitoquímico foi registrado para essa espécie, no qual proteínas extraídas das sementes apresentaram inibição moderada de fungos fitopatogênicos (Ramos *et al.*, 2018) (Tabela 2).

#### 1.10.11. *Swartzia macrocarpa* Spruce ex. Benth

Há o registro de testes histoquímicos realizados a partir do extrato etanólico da casca de *S. macrocarpa*, por meio dos quais foram detectadas as classes de flavonoides, antocianinas, chalconas, auronas, flavononols, taninos condensados, esteróis, saponinas e triterpenos, além de compostos fenólicos na casca da semente (Barbosa *et al.*, 2021).

#### 1.10.12. *Swartzia oblata* R.S. Cowan

O fracionamento dos extratos etanólicos da casca de *S. oblata* permitiu o isolamento de dois macrolídeos, lasiodiplodina e *O*-metil-lasiodiplodina, e dois esteróis em mistura, campesterol e sitosterol (Silva *et al.*, 2019) (Figura 9). Também foi documentado o uso terapêutico das folhas e casca no tratamento de diversas condições clínicas, como dor muscular, escabiose e hemorragia (Yazbek *et al.*, 2019) (Tabela 1).



**Figura 9: Substâncias isoladas de *S. oblata***

#### 1.10.13. *Swartzia panacoco* (Aubl.) R.S.Cowan

Algumas classes químicas foram detectadas por meio de testes histoquímicos realizados a partir de extratos etanólicos da casca de *S. panacoco*, são elas: flavonoides, taninos, flavanonas, flavononols, chalconas, auronas, esteróis, saponinas e triterpenos (Barbosa *et al.*, 2006).

#### 1.10.14. *Swartzia pendula* Spruce ex Benth

Somente um estudo fitoquímico foi registrado para essa espécie, no qual proteínas extraídas das sementes apresentaram inibição moderada de fungos fitopatogênicos (Ramos *et al.*, 2018).

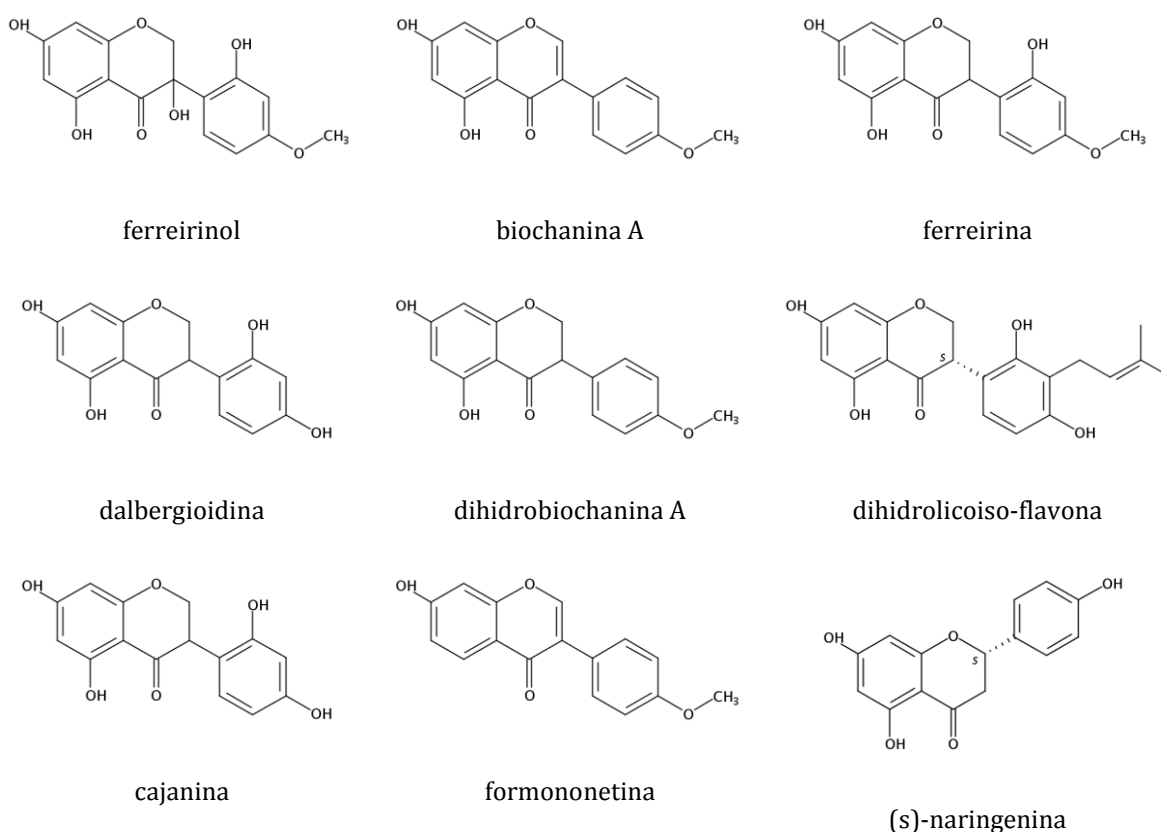
#### 1.10.15. *Swartzia polyphylla* DC.

Essa espécie, conhecida vulgarmente como “cumaceba”, é a espécie com maior número de registros de estudos químicos, nos quais já foram isolados principalmente flavonoides e saponinas, além de atividade antimicrobiana moderada. A partir do extrato etanólico da madeira de *S. polyphylla*, foi isolada a isoflavanona 3-hidroxiisoflavanona, também conhecida como ferreirinol. Já do extrato etanólico do cerne foram isolados a isoflavona biochanina A, as isoflavanonas ferreirina, dalbergioidina e dihidrobiochanina A, e a isoflavanona prenilada dihidrolicoiso-flavona (Dubois e Sneden, 1995) (Figura 10).

O extrato metanólico do cerne por sua vez, permitiu o isolamento de sete flavonoides conhecidos como (S) naringenina, formononetina, biochanina A, ferreirina, dalbergioidina, 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavanona (dihidrobiochanina A) e 5,2',4'-trihidroxi-7-metoxiisoflavanona (cajanina). As isoflavanonas (dihidrobiochanina A, ferreirina, dalbergioidina e cajanina) mostraram relevante inibição contra as bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, enquanto a flavanona (naringenina) e isoflavanonas (formononetina e biochanina A) não mostraram inibição relevante (Tabela 3) (Osawa *et al.*, 1992).

Na Amazonia peruana, as cascas maceradas de *S. polyphylla* junto às cascas de outras espécies têm sido utilizadas em mistura com etanol 18-20% e mel como estimulantes sexuais. No entanto, após analisar o potencial dos extratos metanólicos e hidrometanólicos das cascas em inibir a enzima-alvo inibida pela droga comercial conhecida como estimulante sexual (Viagra®), verificou-se que as cascas dessa espécie não apresentam potencial inibitório para a enzima-alvo, porém outras classes de interesse farmacognológico foram encontradas na análise fitoquímica das cascas pulverizadas, como taninos condensados baseados em (epi)-afzelequina-(epi)-catequina, elagitaninos e flavonoides (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2018).

Os extratos metanólicos da casca e galhos de *S. polyphylla* apresentaram relevante atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas *Streptococcus agalactiae* e *S. dysgalactiae* e atividade moderada contra outras cepas bacterianas e fúngicas (Roumy *et al.*, 2019). Proteínas extraídas das sementes de *S. polyphylla* apresentaram alto potencial de inibição contra cepas fúngicas (Ramos *et al.*, 2018). Já as fases hexânica e metanólica do extrato etanólico das cascas permitiu o isolamento de substâncias ativas biologicamente. T-cadinol, obtida da fase hexânica, apresentou atividade moderada contra *Mycobacterium tuberculosis* e causou 100% de mortalidade de larvas da espécie *Culex quinquefasciatus*. A partir da fase metanólica foram isoladas as substâncias biochanina A e dihidrobiochanina A, as quais apresentaram alta atividade antifúngica (Rojas *et al.*, 2006) (Figura 10).



**Figura 10: Substâncias isoladas de *S. polyphylla***

#### 1.10.16. *Swartzia psilonema* Harms

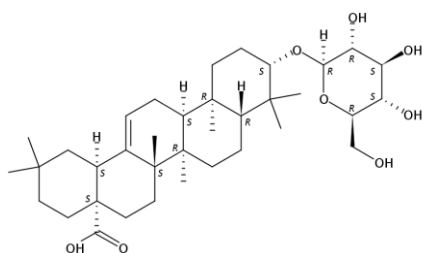
A madeira de *S. psilonema* mostrou-se moderadamente resistente ao ser exposta a espécies de fungos decompositores (Silveira *et al.*, 2018).

### 1.10.17. *Swartzia recurva* Poepp

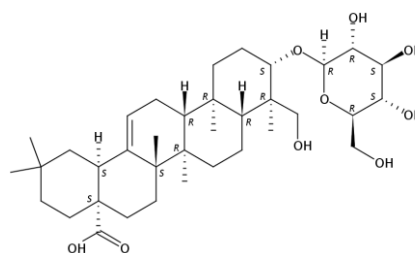
Testes histoquímicos realizados na casca da semente de *S. recurva* detectaram compostos fenólicos, enquanto que nos cotilédones foram detectados alcaloides (Barbosa *et al.*, 2021), além de demonstrar inibição fúngica moderada contra *Fusarium* sp. e *Phomopsis* sp. por meio do extrato de proteínas extraídas das sementes (Ramos *et al.*, 2018).

### 1.10.18. *Swartzia schomburgkii* Benth.

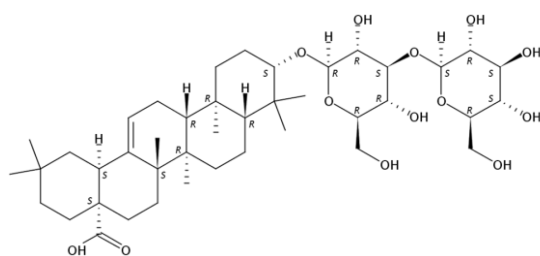
A partir do extrato metanólico das folhas e casca de *S. schomburgkii* foram isoladas as saponinas ácido oleanólico 3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (androseptosídeo A), hederagenina-3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (HNSaponina D<sub>1</sub>), ácido oleanólico 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (randianina), ácido oleanólico 3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (ácido oleanólico 3-soforosídeo, acutosídeo A), ácido oleanólico 3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopiranosil]-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (anchusósido 2) e éster 3-*O*- $\beta$ -D glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xilopiranosil]-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-28-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (araliasaponina IV) (Figura 11) (Tabela 3) (Abdel-Kader *et al.*, 2000).



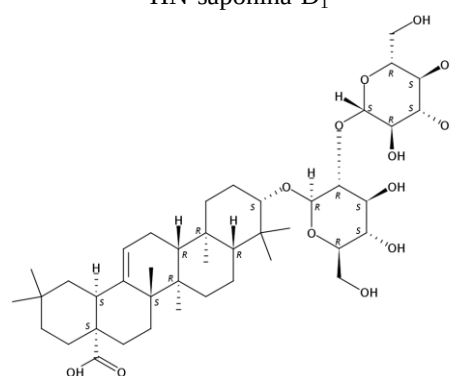
androseptosídeo A



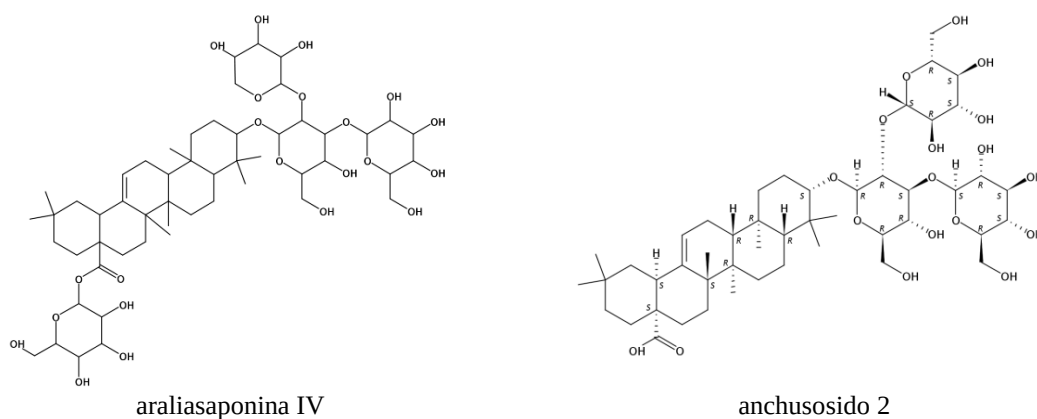
HN-saponina-D<sub>1</sub>



randianina



acutosídeo A



**Figura 11. Substâncias isoladas de *S. schomburgkii***

#### **1.10.19. *Swartzia sericea* Vogel**

O extrato de proteínas obtidas das sementes de *S. sericea* apresentou alta inibição contra fungos decompositores (Ramos *et al.* 2018). Testes histoquímicos através de aplicação de reagentes detectaram no arilo, casca da semente e cotilédones de *S. sericea* a presença de compostos fenólicos, enquanto no arilo e casca da semente foi detectada a presença de alcaloides (Barbosa *et al.*, 2021).

#### **1.10.20. *Swartzia simplex* (Sw.) Spreng**

O extrato bruto diclorometânico das raízes de *S. simplex* e os diterpenos isolados a partir dele exibiram inibição fúngica (Figura 12). O extrato bruto inibiu o crescimento de cepas suscetíveis de *C. albicans*, assim como os diterpenos swartziaboreol B, (5S, 10S)-11,15(R)-dihidroxi,12-metoxiswartziaboreol G, simplexeno C, simplexeno D e 11,12-dihidroxi-15,16-dihidrodswartziaboreol C (Tabela 3).

Já na inibição do crescimento da cepa selvagem de *C. albicans*, duas substâncias mostraram-se bastante ativas: (5S, 10S)-11,15-(R)-dihidroxi,12-metoxiswartziaboreol G e simplexeno D, a última sendo também bastante ativa contra o biofilme fúngico (Favre-Godal *et al.*, 2015). Dorsaz *et al.* (2017) também documentaram a ação antifúngica de simplexeno D e metoxiswartziaboreol G obtidos de *S. simplex* contra o crescimento do fungo patogênico *Candida albicans* e seu biofilme.

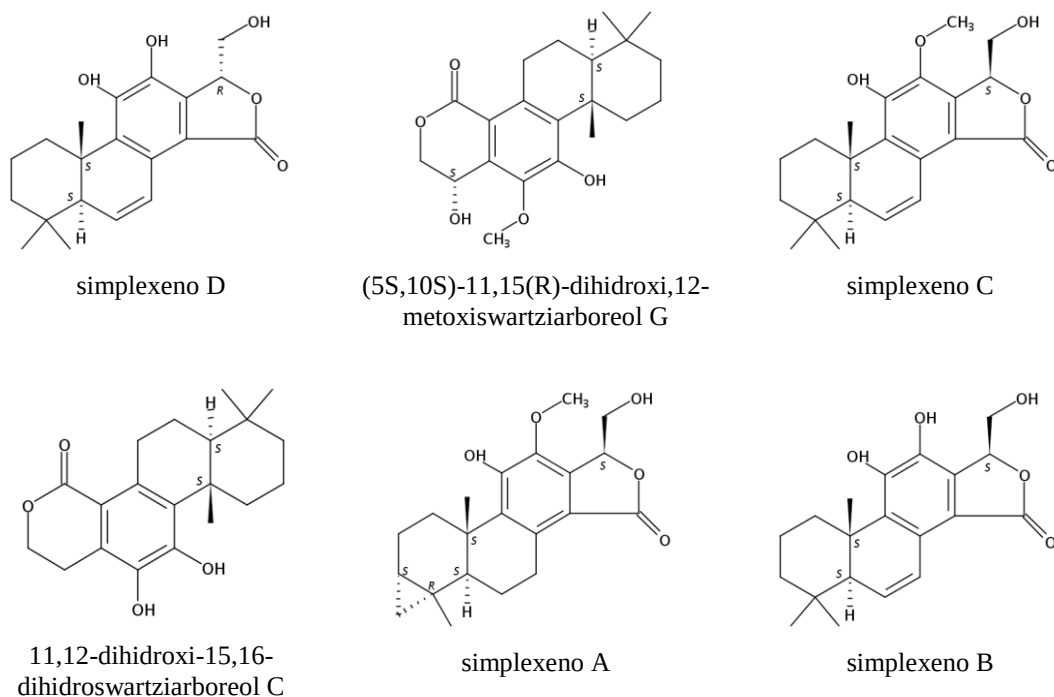


Figura 12: Substâncias isoladas de *S. simplex*

#### 1.10.21. *Swartzia ulei* Harms

A partir do extrato benzênico do tronco de *S. ulei* foram isolados dois esteróis em mistura, sitosterol e estigmasterol, e o ácido *O*-acetiloleanolico (Figure 13) (Formiga *et al.*, 1975).

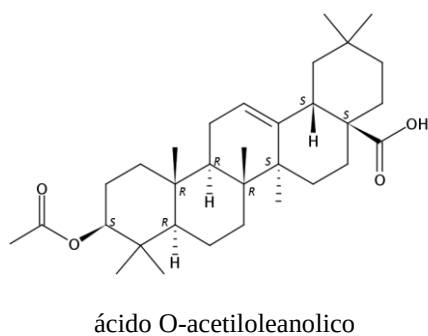


Figura 13: Substância isolada de *S. ulei*

Tabela 3: Substâncias isoladas e atividades biológicas de *Swartzia* spp.

| Espécie                  | Solvente         | Parte da planta | Substâncias isoladas                                              | Atividade biológica                                                     | Referência                 |
|--------------------------|------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| <i>S. apetala</i>        | hexano           | galhos          | estilbeno<br>flavanona<br>pterocarpano<br>triterpeno<br>esteróide | antifúngica (moderada)<br>antifúngica (moderada)<br>antifúngica (baixa) | Araujo et al., 2009        |
|                          | metanol          | folhas          | saponina<br>triterpênica<br>flavonol<br>triterpeno                | antifúngica (baixa)                                                     |                            |
| <i>S. arborescens</i>    | -                | -               | diterpenos                                                        | -                                                                       | Orphelin et al., 1996      |
| <i>S. brachyrachis</i>   | benzeno          | casca           | isoflavona                                                        | -                                                                       | Sanchez et al., 1999       |
|                          | clorofórmio      | casca           | esteróide                                                         | -                                                                       | Sanchez et al., 1999       |
| <i>S. laevicarpa</i>     | etanol           | tronco          | pterocarpanos<br>isocumarinas                                     | -                                                                       | Braz-Filho et al., 1979    |
|                          | metanol          | madeira         | pterocarpano                                                      | -                                                                       | Garcia et al., 2018        |
| <i>S. langsdorfii</i>    | etanol           | folhas          | triterpeno<br>flavonoide<br>saponina                              | antifúngica (baixa)<br>antifúngica (moderada)<br>antifúngica (moderada) | Marqui et al., 2008        |
|                          | éter de petróleo | raiz            | diterpenos                                                        | antibacteriana                                                          |                            |
| <i>S. leiocalycina</i>   | cetona           | cerne           | cumestonas                                                        | -                                                                       | Donelly & Fitzgerald, 1971 |
| <i>S. longistipitata</i> | -                | sementes        | proteínas                                                         | antifúngica                                                             | Ramos et al., 2018         |
| <i>S. oblata</i>         | etanol           | folhas e galhos | macrolídeos                                                       | antitumoral (baixa)                                                     | Silva et al., 2019         |

|                        |                  |                |                                      |                                                                         |                                                                                   |
|------------------------|------------------|----------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <i>S. pendula</i>      | -                | sementes       | proteínas                            | antifúngica                                                             | Ramos <i>et al.</i> , 2018                                                        |
| <i>S. recurva</i>      | -                | sementes       | proteínas                            | antifúngica                                                             | Ramos <i>et al.</i> , 2018                                                        |
| <i>S. schomburgkii</i> | metanol          | folhas e casca | saponinas<br>triterpenos             | -                                                                       | Abdel-Kader <i>et al.</i> , 2000                                                  |
| <i>S. langsdorfii</i>  | etanol           | folhas         | triterpeno<br>flavonoide<br>saponina | antifúngica (baixa)<br>antifúngica (moderada)<br>antifúngica (moderada) | Marqui <i>et al.</i> , 2008                                                       |
| <i>S. polyphylla</i>   | etanol e metanol | casca e cerne  | isoflavonas<br>flavanona             | antifúngica<br>antibacteriana                                           | Dubois e Sneden, 1995<br>Rojas <i>et al.</i> , 2006<br>Osawa <i>et al.</i> , 1992 |
|                        | etanol           | casca          | sesquiterpeno                        | larvicida<br>antimicobacteriana                                         | Rojas <i>et al.</i> , 2006                                                        |
|                        | -                | sementes       | proteínas                            | antifúngica                                                             | Ramos <i>et al.</i> , 2018                                                        |
| <i>S. sericea</i>      | -                | sementes       | proteínas                            | antifúngica                                                             | Ramos <i>et al.</i> , 2018                                                        |
| <i>S. simplex</i>      | diclorometano    | raiz           | diterpenos                           | antifúngica                                                             | Favre-Godal <i>et al.</i> , 2015                                                  |
| <i>S. ulei</i>         | benzeno          | tronco         | esteróides<br>triterpenos            | -                                                                       | Formiga <i>et al.</i> , 1975                                                      |

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos de folhas e galhos de *Swartzia polyphylla*, *S. ulei* e *S. tessmannii* e isolar e identificar os metabólitos secundários dos extratos ativos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos de folhas e galhos de *Swartzia* spp. frente aos ensaios químicos com o radical DPPH e o íon de  $\text{Fe}^{3+}$ /Fenantrolina.
- Avaliar os extratos quanto ao potencial antibacteriano contra cepas de micro-organismos patotênicos.

- c. Fracionar os extratos ativos de *Swartzia* spp. por meio de técnicas cromatográficas, isolar e identificar as substâncias presentes.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. REVISÃO**

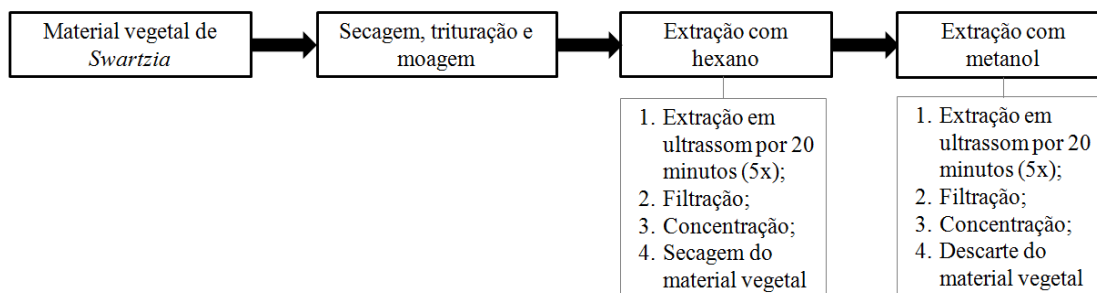
As informações relativas às substâncias isoladas e atividades biológicas reunidas nesse estudo foram obtidas principalmente da base de dados científica ‘*SciFinder*’ digitando o termo “*Swartzia*”, o que retornou 199 referências relativas ao gênero. Nós checamos 9.180 resultados obtidos ao digitar o mesmo termo na base de dados ‘*Google Scholar*’. As imagens das estruturas e substâncias foram coletadas do *SciFinder*.

#### **3.2. COLETA DAS PARTES VEGETAIS**

A coleta das folhas e galhos das espécies *S. ulei*, *S. tessmannii* e *S. polyphylla* foi realizada na reserva Ducke – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Foram utilizados sacos de 200L para armazenar o material coletado, os quais foram devidamente identificados com o nome da espécie. As exsicatas foram depositadas no herbário do INPA sob os números de registro 303751 (*S. polyphylla*), 303752 (*S. tessmannii*), 303753 (*S. ulei*). As coletas foram registradas e contam com a autorização de acesso do CGEN número A6D49D5.

#### **3.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS**

As partes das plantas separadas foram secas em estufa. Após a secagem, os galhos foram cortados e pulverizados em moinho de martelo e as folhas foram pulverizadas em moinho de facas. Após a moagem do material, o material foi extraído com hexano usando ultrassom por 20 minutos, seguido por filtração. Este material vegetal foi extraído mais quatro vezes com hexano seguindo as mesmas etapas da primeira extração. Após isso, o material foi despejado em bandejas de alumínio cobertas com folha de alumínio furadas para a evaporação do primeiro solvente utilizado. Após a secagem, o mesmo material foi extraído com metanol utilizando o mesmo procedimento da extração anterior com hexano (Figura 14).



**Figura 14. Etapas de extração do material vegetal de *Swartzia* spp.**

Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo e transferidos para frascos de vidro, anotando-se a massa para calcular o rendimento. Ao final do processo de extração, foram obtidos 12 extratos: seis hexânicos e seis metanólicos (Tabela 4).

**Tabela 4: Massas dos extratos obtidos de *Swartzia* spp.**

| Espécie              | Parte da planta | Solvente | Peso seco (g) | Massa extrato (g) | Rendimento (%) |
|----------------------|-----------------|----------|---------------|-------------------|----------------|
| <i>S. polyphylla</i> | galhos          | hexano   | 100           | 0,1606            | 0,16           |
| <i>S. polyphylla</i> | folhas          | hexano   | 100           | 0,3835            | 0,38           |
| <i>S. polyphylla</i> | galhos          | metanol  | 100           | 4,222             | 4,2            |
| <i>S. polyphylla</i> | folhas          | metanol  | 100           | 7,4323            | 7,43           |
| <i>S. tessmannii</i> | galhos          | hexano   | 1000          | 0,7610            | 0,076          |
| <i>S. tessmannii</i> | folhas          | hexano   | 100           | 3,5906            | 3,59           |
| <i>S. tessmannii</i> | galhos          | metanol  | 100           | 3,8938            | 3,89           |
| <i>S. tessmannii</i> | folhas          | metanol  | 100           | 10,027            | 10,02          |
| <i>S. ulei</i>       | galhos          | hexano   | 700           | 0,5633            | 0,08           |
| <i>S. ulei</i>       | folhas          | hexano   | 100           | 1,1961            | 1,19           |
| <i>S. ulei</i>       | galhos          | metanol  | 100           | 5,3069            | 5,30           |
| <i>S. ulei</i>       | folhas          | metanol  | 100           | 6,9165            | 6,91           |

### 3.4. ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina*

Preparou-se uma solução salina contendo 38 g de sal marinho e 1 L de água destilada, na qual adicionaram-se 10 mg de cistos de *A. salina*. Os cistos foram mantidos nessa solução por 48 horas sob constante aeração através de uma bomba de água, iluminação constante com lâmpada fluorescente e temperatura variando entre 27 a 30 °C. Ao fim de 48 h, as larvas eclodidas foram transferidas para microplacas de 24 poços, cada poço recebendo 10 larvas.

As microplacas contendo as larvas de *A. salina* foram divididas da seguinte forma: a. três poços (triplicata) contendo 50 µL do extrato solubilizado em DMSO 2,5% (C= 1000 µg/mL) e 950 µL de solução salina; b. três poços contendo 50 µL de DMSO (2,5%) e 950 µL de solução salina como controle negativo; c. três poços contendo 1 mL de solução salina como branco. As placas foram mantidas sob iluminação de lâmpada fluorescente por 24 h. Após esse período, contabilizou-se o número de larvas sobreviventes em todos os poços. A análise foi feita na concentração de 500 µg/mL, não sendo necessário encontrar a Concentração Letal de 50% (CL<sub>50</sub>).

### 3.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

Para a realização destes ensaios foram utilizados microrganismos cedidos pelo Laboratório de Micro-Organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz (Tabela 5). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada extrato, com o crescimento biológico determinado por colorimetria e leitura em espectrofotômetro, segundo metodologia adaptada de CLSI, 2015.

Os inóculos foram preparados com o auxílio de uma alça calibrada descartável, onde as colônias bacterianas provenientes de culturas puras de 24 horas foram inoculadas em caldo Müeller Hinton e homogeneizadas. A turvação do inóculo foi comparada e ajustada à turvação do tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a uma suspensão contendo aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

Cada microorganismo teste foi diluído na proporção de 1:20 e 10 µL de cada foi inoculado nas placas. Em seguida foram adicionados em cada poço da placa 100 µL dos extratos em uma concentração de 1000 µg/mL solubilizados em DMSO 5%. Para a determinação do crescimento microbiano em cada poço após o período de incubação, foram utilizados os métodos de colorimetria e espectrofotometria.

No método de colorimetria, foram adicionados 40 µL do corante 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) nos poços contendo todos os extratos hexânicos. Após a adição do corante, os poços foram incubados por 30 minutos e após incubação foram observados quanto a suas colorações. Poços com a coloração rosa indicam que os micro-organismos continuaram seu metabolismo e, por ação enzimática, reduziram o TTC e originaram o trifênil formazan, o qual permanece dentro das células e as deixam coradas. Poços incolores indicam inibição

microbiana devido à perda de capacidade de redução do TTC (Ramos, Pizzolito e Pizzolito, 2006).

A leitura utilizando o método de espectrofotometria foi aplicada aos extratos metanólicos e aos extratos hexânicos que apresentaram pouco ou nenhum crescimento bacteriano pela leitura colorimétrica (os que não apresentaram coloração rosa). As placas tiveram suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro a 625 nm logo após a adição dos extratos e inoculação dos microorganismos. Após isso, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e após esse período foram lidas novamente em espectrofotômetro a 625 nm para obter os valores de crescimento das bactérias. O controle positivo utilizado foi o antibiótico oxitetraciclina a 125 µg/mL e como controle negativo foi utilizado o próprio meio de cultura.

**Tabela 5: Micro-organismos utilizados no ensaio antimicrobiano**

| ATCC           | Micro-organismo                | Sigla |
|----------------|--------------------------------|-------|
| 10C/FDA 110-36 | <i>Aeromonas hydrophila</i>    | AH    |
| 15947          | <i>Edwardsiella tarda</i>      | ET    |
| 11775          | <i>Escherichia coli</i>        | EC    |
| 19296          | <i>Nocardia brasiliensis</i>   | NB    |
| 10038          | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | PF    |
| 10145          | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | PA    |
| 13880          | <i>Serratia marcescens</i>     | SM    |
| 13883          | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | KP    |
| 13076          | <i>Salmonella enterica</i>     | SE    |
| 12600          | <i>Staphylococcus aureus</i>   | SA    |
| 22019          | <i>Candida parapsilosis</i>    | CP    |
| 19606          | <i>Acinetobacter baumannii</i> | AB    |

Para calcular o crescimento biológico após o período de incubação de 24 h, subtraiu-se o valor médio das absorbâncias obtidas em triplicata após a incubação (Tabela 13), pelo valor médio das absorbâncias obtidas em triplicata antes da incubação (Tabela 12). O valor obtido da subtração foi equiparado ao valor médio do controle negativo, cujo crescimento microbiano esperado foi de 100%. Com esses valores, foi possível calcular a porcentagem de inibição de cada extrato frente aos micro-organismos inoculados (Figura 15).

**Crescimento microbiano:**

$$1. \quad AA_{MD2} - AA_{MD1} = AA_{CR}$$

$$2. \quad \% CR = 100 * \frac{AA_{CR}}{Ctrl -}$$

**Inibição dos extratos:**

$$\% In = 100 - CR$$

AA<sub>MD1</sub>: média das absorbâncias antes da incubação.  
 AA<sub>MD2</sub>: média das absorbâncias após incubação.  
 AA<sub>CR</sub>: crescimento microbiano  
 Ctrl -: média das absorbâncias do controle negativo  
 CR: crescimento microbiano em %  
 In: inibição microbiana em %

Figura 15. Cálculo de crescimento microbiano e inibição dos extratos.

### 3.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.6.1. ENSAIO COM O RADICAL LIVRE DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Foi preparada uma solução contendo 2,8 mg de DPPH solubilizados em 1 mL de DCM, na qual foi adicionado MeOH até atingir o volume de 100 mL, obtendo-se uma concentração de 28 µg/mL de DPPH. O ácido ascórbico, parâmetro antioxidante utilizado, foi dissolvido em água deionizada na concentração de 900 µg/mL e a partir desta solução obtiveram-se seis alíquotas nas concentrações 0, 90, 180, 360, 540 e 720 µg/mL para a obtenção da curva de calibração. Para a curva de calibração com DPPH, adicionaram-se 990 µL da solução de 28 µg/mL de DPPH em seis micro tubos, mais 10 µL das alíquotas de ácido ascórbico nas diferentes concentrações. Foi realizada uma leitura em espectrofotômetro a 517 nm após 30 minutos de reação.

Para determinação da absorbância da reação entre o DPPH e os extratos foram utilizados 990 µL de DPPH (28 µg/mL em metanol) e 10 µL da solução das amostras teste (de extratos ou frações) a uma concentração de 500 µg/mL, em triplicata. Como controle negativo foram utilizados 990 µL de DPPH (28 µg/mL em metanol) e 10 µL de água deionizada. Foi realizada uma leitura em espectrofotômetro a 517 nm após 30 minutos de reação. A variação da absorbância dos extratos foi comparada com as do ácido ascórbico para uma avaliação quantitativa do potencial oxidante dos extratos obtidos.

A fim de observar se as amostras contêm substâncias de potencial antioxidante na mistura, elas também foram adicionadas em cromatoplaça com gel de sílica e eluídas em acetato/metanol 9:1. Após eluição, as cromatoplaças foram adicionadas em estufa por alguns minutos até a evaporação total dos solventes do sistema de eluição. Após secagem, foi

aplicado o DPPH• e a placa foi incubada no escuro por 30 minutos. A substância utilizada como referência na cromatoplaça foi a quercetina (Souza *et al.*, 2007).

### 3.6.2. ENSAIO COM O $\text{Fe}^{3+}$ EM COMPLEXO COM A FENANTROLINA

Foi preparada uma solução tampão com 4,7628 g de acetato de sódio ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) solubilizada em 950 mL de água deionizada em balão volumétrico, depois foram adicionados aproximadamente 3,7 mL de ácido acético glacial ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ), completando o volume com água deionizada até atingir 1 L e ajustando o pH para 4,5. Nesta solução foram solubilizados 0,25 g de 1,10-fenantrolina ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e o volume foi completado com a solução tampão até o volume de 100 mL. Após isso, foi preparada outra solução com 8,6344 g de sulfato de ferro amoniacal [ $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ] solubilizado e completando o volume com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1% (v/v) em balão volumétrico até atingir 1 L.

Para a obtenção da curva de calibração de  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina, foram adicionados em seis novos microtubos 10  $\mu\text{L}$  das alíquotas de ácido ascórbico em diferentes concentrações, mais 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão de  $\text{Fe}^{3+}$  e 980  $\mu\text{L}$  da solução 1,10-fenantrolina 0,25%. Após 1 hora, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 515 nm.

Para determinação da absorbância da reação entre o  $\text{Fe}^{3+}$ /fenantrolina e os extratos, foram utilizados 980  $\mu\text{L}$  da solução de 1,10-fenantrolina mais 10  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Fe}^{3+}$  e 10  $\mu\text{L}$  da solução das amostras teste (extratos ou frações) a uma concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Como controle negativo foi utilizado uma solução de 1,10-fenantrolina mais 10  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Fe}^{3+}$  e 10  $\mu\text{L}$  de água deionizada. Após 1 hora, foi realizada uma leitura da absorbância em espectrofotômetro a 515 nm.

### 3.7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos obtidos foram analisados em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC - Whatman<sup>TM</sup>) com a utilização de diversos solventes orgânicos como eluentes de acordo com a polaridade do extrato analisado. Para os extratos brutos hexânicos, foram utilizados como eluentes os solventes diclorometano e hexano em proporções variadas. Para os extratos brutos metanólicos, os eluentes utilizados foram acetato e metanol. Os reveladores físicos que foram utilizados para a visualização dos constituintes químicos dos extratos foram as luzes ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e os

reveladores químicos foram o anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico  $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]$ , Reagente de Dragendorff, cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) e NP/PEG.

Dois extratos foram escolhidos para ser fracionados, baseado em sua atividade biológica e reação dos seus componentes aos reveladores utilizados. O extrato hexânico dos galhos de *S. tessmannii* foi fracionado em coluna aberta utilizando como adsorvente a sílica. O extrato metanólico dos galhos de *S. tessmannii* foi particionado em três fases: diclorometano, acetato e hidrometanol, das quais foram fracionadas as fases acetato, diclorometano e hidrometanólica.

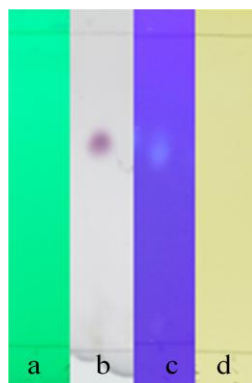
### 3.8. FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DE GALHOS DE *S. tessmannii*

O adsorvente utilizado para o fracionamento do extrato hexânico dos galhos de *S. tessmannii* foi sílica gel 60 (Macherey-Nagel, 0,04-0,063 mm/230-400 mesh ASTM), a qual foi depositado em coluna de vidro de capacidade de 100 mL e dimensões de 3 cm de diâmetro e 45 cm de altura. A sílica foi depositada a uma altura de 28 cm na coluna. Foram obtidas 86 frações cujas fases móveis referentes a cada sistema são descritas na Tabela 6.

As frações 9, 10 e 11 foram reunidas na Fração 9-11, a qual foi analisada por meio de CCDC, onde foi possível observar uma banda roxa em anisaldeído e azul fluorescente em NP/PEG, indicando possivelmente um esteroide ou triterpeno (Figura 16). Por meio dos RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi possível constatar a presença de uma mistura de substâncias, as quais foram nomeadas de substâncias 1 e 2.

**Tabela 6: Sistemas de solventes, frações e suas respectivas massas do fracionamento do extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii*.**

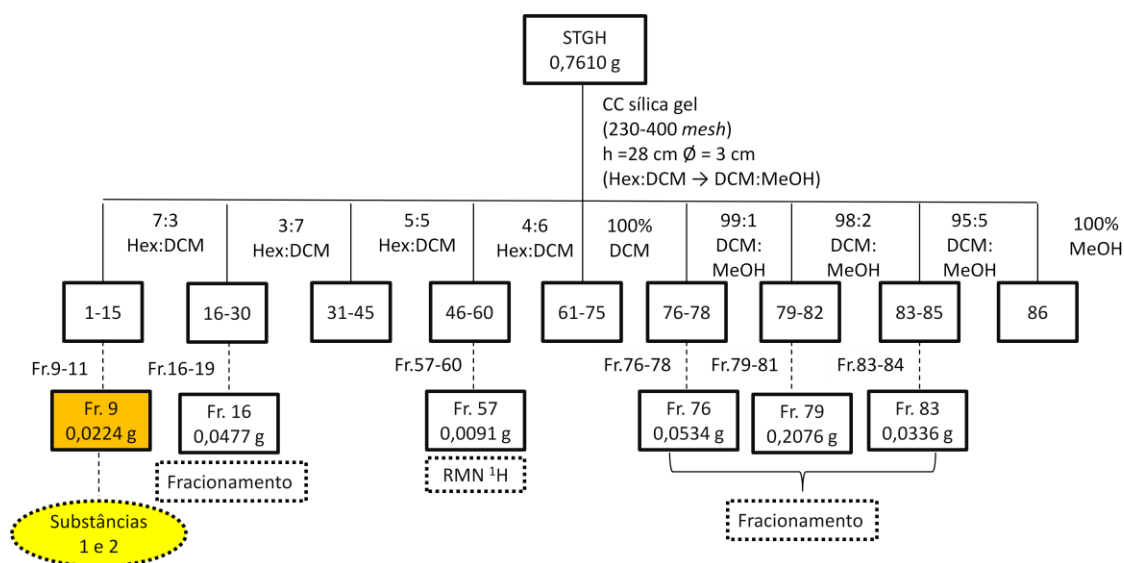
| Frações | Sistema          |
|---------|------------------|
| 1-15    | Hexano/DCM 7:3   |
| 16-30   | Hexano/DCM 5:5   |
| 31-45   | Hexano/DCM 4:6   |
| 46-60   | Hexano/DCM 3:7   |
| 61-75   | DCM 100%         |
| 76-78   | DCM/acetato 99:1 |
| 79-82   | DCM/acetato 98:2 |
| 83-85   | DCM/acetato 95:5 |
| 85-86   | MeOH 100%        |



Legenda: a. UV 254; b. Anisaldeído; c. NP/PEG; d.  $\text{FeCl}_3$ . Sistema: Hexano / DCM 6:4

**Figura 16. Cromatoplas de CCDC da fração 9-11.**

As frações 57, 58, 59 e 60 foram reunidas e nomeadas como Fração 57-60, da qual se obteve um espectro de RMN  $^1\text{H}$  que não permitiu a inferência de nenhuma substância de interesse. As frações 16 (reunião das frações 16, 17, 18 e 19), 76 (reunião das frações 76, 77 e 78), 79 (reunião das frações 79, 80 e 81) e 83 (reunião das frações 83 e 84) seguiram sendo fracionadas (Figura 17).



**Figura 17: Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii*.**

### 3.8.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 16

A Fração 16 rendeu 0,0439 g de massa. O adsorvente utilizado foi sílica gel 60 (Macherey-Nagel, 0,04-0,063 mm/230-400 mesh ASTM), o qual foi depositado em coluna de vidro de capacidade de 25 mL e 1,2 cm de diâmetro. A sílica foi depositada a uma altura de

16,5 cm na coluna. As fases móveis e frações obtidas em cada sistema estão dispostas na Tabela 7.

**Tabela 7: Fases móveis e frações da Fração 16**

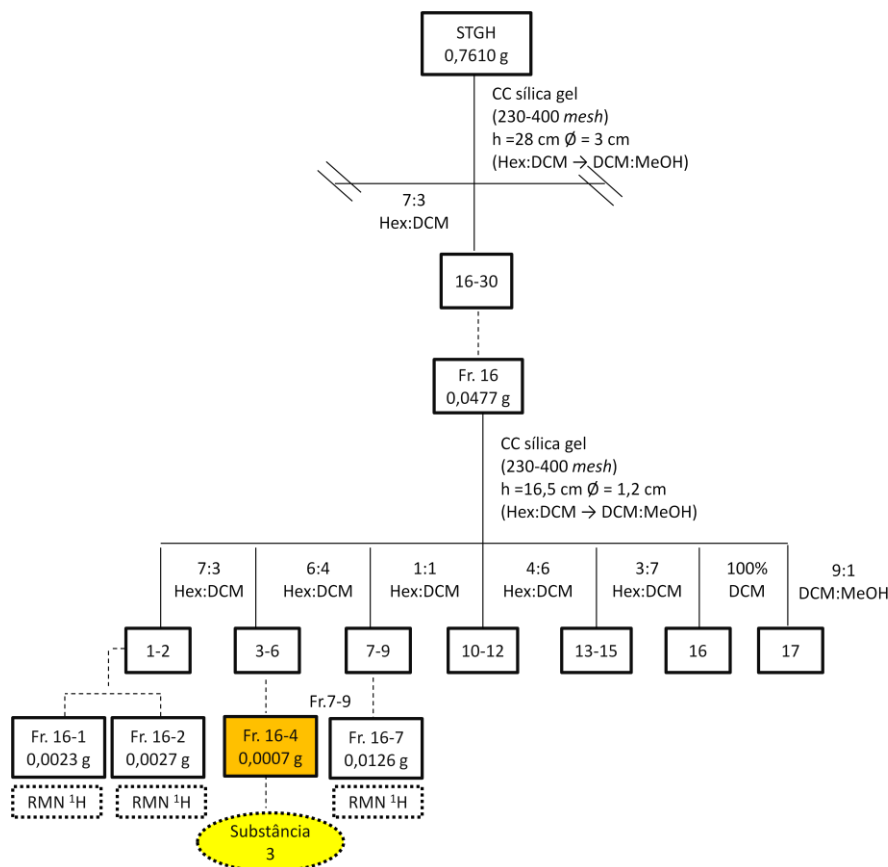
| Frações       | Sistema        |
|---------------|----------------|
| 16-1 a 16-2   | Hexano/DCM 7:3 |
| 16-3 a 16-6   | Hexano/DCM 6:4 |
| 16-7 a 16-9   | Hexano/DCM 1:1 |
| 16-10 a 16-12 | Hexano/DCM 4:6 |
| 16-13 a 16-15 | Hexano/DCM 3:7 |
| 16-16         | DCM 100%       |
| 16-17         | DCM/MeOH 9:1   |

Após análise em CCDC, foram obtidos os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das frações 16-1, 16-2 e 16-4. A Fração 16-3 (reunião das frações 16-3, 16-4 e 16-5) foram purificadas em HPLC, porém não se obteve massa suficiente para posterior elucidação. Os espectros das frações 16-1 e 16-2 não apresentaram sinais relevantes de substâncias. Foram encontrados sinais indicadores de flavonoides através do RMN  $^1\text{H}$  da fração 16-4, o que também foi possível observar através da CCDC dessa fração (Figura 18).



Legenda: a. UV 254; b. NP/PEG; c.  $\text{FeCl}_3$ ; d. Anisaldeído. Sistema de eluição: Hexano/DCM 1:1

**Figura 18. Cromatoplas de CCDC da fração 16-4.**



**Figura 19. Fluxograma do fracionamento da Fração 16**

Por esta razão a Fração 16-4 foi também analisada por meio de RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e COSY, por meio dos quais foi possível identificar a substância 3 (Figura 19).

### 3.8.2. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 76

A Fração 76 rendeu 0,0515 g de massa. O adsorvente utilizado foi sílica gel 60 (Macherey-Nagel, 0,04-0,063 mm/230-400 *mesh* ASTM), o qual foi depositado em coluna de vidro de capacidade de 25 mL e 1,5 cm de diâmetro. A sílica foi depositada a uma altura de 16,5 cm na coluna. A partir desse fracionamento foram obtidas 11 frações, as quais foram numeradas de 76-1 a 76-11. As frações 76-1 a 76-3 foram obtidas a partir do sistema DCM/MeOH 99:1. As frações 76-1 a 76-7 foram obtidas por meio do sistema DCM/MeOH 98:2. Por fim, as frações 76-8 a 76-11 foram colhidas por meio do sistema DCM/MeOH 95:5. Não foram encontradas substâncias de interesse nesse fracionamento.

### 3.8.3. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 79

A Fração 79 rendeu 0,2094 g de massa e seu fracionamento foi chamado de Coluna III. O adsorvente utilizado foi Florisil® (Macherey-Nagel, 0,15-0,25 mm/ 60-100 *mesh*

ASTM), o qual foi depositado em coluna de vidro de capacidade de 50 mL e 1,3 cm de diâmetro. A sílica foi depositada a uma altura de 40 cm na coluna. Esse fracionamento gerou 42 frações, as quais foram numeradas de 79-1 a 79-42. As frações 79-1 e 79-2 foram eluídas em DCM/MeOH 99:1, as frações 79-3 a 79-12 foram eluídas em DCM/MeOH 99:2, as frações 79-13 a 79-22 foram eluídas em DCM/MeOH 95:5, as frações 79-23 a 79-30 foram eluídas em DCM/MeOH 8:2; as frações 79-31 a 79-37 foram eluídas em DCM/MeOH 7:3 e as últimas frações, de 79-38 a 79-42, foram recolhidas em DCM/MeOH 5:5. Não foram encontradas substâncias de interesse nesse fracionamento.

#### **3.8.4. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 83**

A Fração 79 rendeu 0,0343 g de massa e seu fracionamento foi chamado de Coluna IV. O adsorvente utilizado foi sílica gel 60 (Macherey-Nagel, 0,04-0,063 mm/230-400 *mesh* ASTM), o qual foi depositado em coluna de vidro de capacidade de 25 mL e de 1,3 cm de diâmetro. A sílica foi depositada a uma altura de 12 cm na coluna. Foram obtidas 16 frações por meio desse fracionamento, os quais foram numerados de 83-1 a 83-16. As frações 83-1 a 83-7 foram obtidas por meio do sistema DCM/MeOH 95:5, as frações 83-8 a 83-13 foram recolhidas por meio do sistema DCM/MeOH 9:1 e as frações finais, de 83-14 a 83-16 foram obtidas pelo sistema DCM/MeOH 85:15.

As frações 83-3 e 83-4 foram reunidas e nomeadas como Fração 83-3. As frações 83-5, 83-6 e 83-7 foram reunidas e nomeadas como Fração 83-5. As frações 83-8 e 83-9 foram reunidas e nomeadas como Fração 83-8. Todas estas frações foram purificadas em HPLC, porém não se obteve massa suficiente para elucidação posterior.

### **3.9. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO DE GALHOS DE *S. tessmannii***

#### **3.9.1. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO**

Foram dissolvidos 3g do extrato metanólico dos galhos de *S. tessmannii* em 150 mL de mistura contendo metanol e água destilada em uma proporção 1:1 (75 mL de MeOH / 75 mL de H<sub>2</sub>O). Após a dissolução completa, a solução foi adicionada em balão volumétrico e logo após foi adicionada a primeira fase – diclorometano – na mesma proporção de 150 mL. O processo de adição de 150 mL de diclorometano à solução hidro-metanólica foi realizado 3 vezes, recolhendo-se em um erlenmeyer de 500 mL antes cada adição. Recolhido o material dissolvido em DCM, foi adicionada a segunda fase – acetato de etila – repetindo-se o mesmo

processo de adição de 150 mL e recolhimento por três vezes. Finalizado o recolhimento da fase acetato, foi recolhida a fase hidrometanólica. As três fases foram colocadas em estufa para secagem dos solventes. As massas obtidas estão dispostas na Tabela 8.

**Tabela 8: Massa das fases obtidas em partição líquido-líquido**

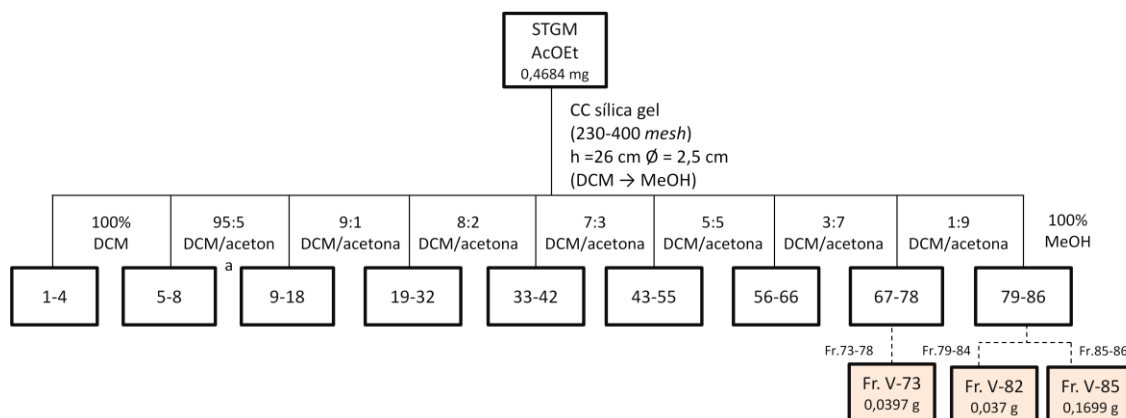
| Fase                  | Massa    |
|-----------------------|----------|
| DCM                   | 0,272 g  |
| Acetato de etila      | 0,4684 g |
| H <sub>2</sub> O/MeOH | 1,5945 g |

### 3.9.2. FRACIONAMENTO DA FASE ACETATO DE ETILA

A fase acetato de etila obtida da partição líquido-líquido do extrato metanólico de galhos de *S. tessmannii* rendeu 0,4684 g de massa. O adsorvente utilizado foi sílica gel 60 (Macherey-Nagel, 0,04-0,063 mm/230-400 *mesh* ASTM), o qual foi depositado em coluna de vidro de 2,5 cm de diâmetro. A sílica foi depositada a uma altura de 26 cm na coluna. As fases móveis e frações obtidas em cada sistema estão dispostas na Tabela 9 e Figura 20.

**Tabela 9: Fases móveis e frações da fase acetato**

| Frações | Sistema          |
|---------|------------------|
| 1 a 4   | DCM 100%         |
| 5 a 8   | DCM/acetona 95:5 |
| 9 a 18  | DCM/acetona 9:1  |
| 19 a 32 | DCM/acetona 8:2  |
| 33 a 42 | DCM/acetona 7:3  |
| 43 a 55 | DCM/acetona 5:5  |
| 56 a 66 | DCM/acetona 3:7  |
| 67 a 78 | DCM/acetona 1:9  |
| 79 a 86 | MeOH 100%        |



**Figura 20: Fluxograma do fracionamento da fase acetato do extrato metanólico de *S. tessmannii*.**

As frações 79-84 foram reunidas e nomeadas como Fração V-82. As frações 85 e 86 foram reunidas e nomeadas como Fração V-85. As frações 73-78 foram reunidas e nomeadas como Fração V-73. As Frações V-73, V-82 e V-85 foram fracionadas posteriormente em C18.

### 3.9.2.1. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO V-73

A Fração V-73 rendeu 0,0397 g e foi fracionada em C18 (Phenomenex) de 2 g/12 mL. Foram obtidas 18 frações a partir desse fracionamento. Os solventes utilizados para eluir as frações 1 e 2 foram H<sub>2</sub>O/MeOH 6:4, em seguida, as frações de 3 a 5 foram obtidas por meio da fase móvel H<sub>2</sub>O/MeOH 5:5, as frações de 6 a 8 foram obtidas em H<sub>2</sub>O/MeOH 4:6, de 9 a 11 em H<sub>2</sub>O/MeOH 3:7, de 12 a 14 em H<sub>2</sub>O/MeOH 1:9, depois MeOH 100% para as frações 15 a 17 e por fim, acetato de etila 100% para a fração 18. Não foram encontradas substâncias de interesse nesse fracionamento.

### 3.9.2.2. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO V-82

A Fração V-82 rendeu 0,037 g e foi fracionada em C18 (Phenomenex) de 5 g/20 mL. Obtiveram-se 18 frações a partir desse fracionamento, cujos sistemas iniciaram em H<sub>2</sub>O/MeOH 7:3, onde foram coletadas as frações de 1 a 4. Em seguida, no sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 6:4 foram obtidas as frações de 5 a 7. No sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 5:5 obtiveram-se as frações de 8 a 11. No sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 3:7 obtiveram-se as frações de 12 a 14. No sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 2:8 obtiveram-se as frações 15 e 16. Por fim, adicionando-se metanol 100% obteve-se a fração 17 e acetato de etila 100% obteve-se a fração 18. Não foram encontradas substâncias de interesse nesse fracionamento.

### 3.9.2.3. FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO V-85

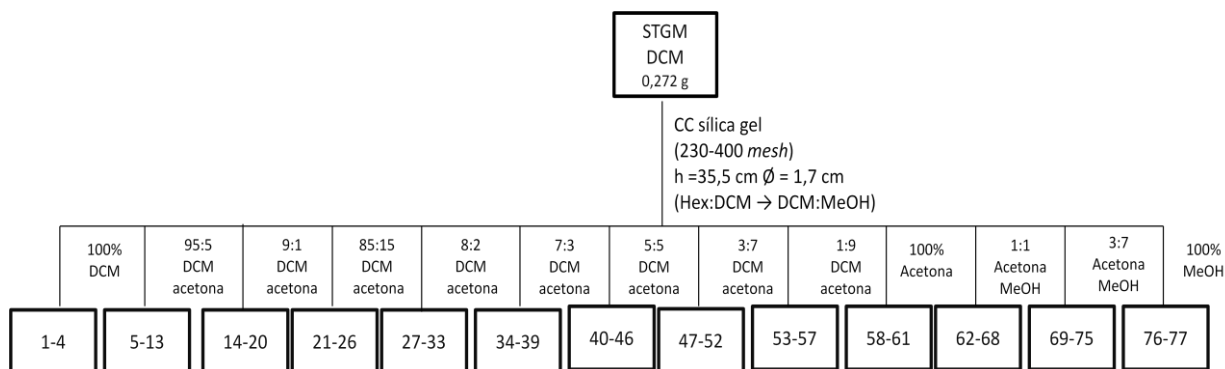
A Fração V-85 rendeu 0,1699 g e foi fracionada em C18 (Phenomenex) de 20g / 120 mL. Foram obtidas 37 frações nesse fracionamento. As frações de 1 a 4 foram eluídas no sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 8:2. As frações de 5 a 10 foram obtidas por meio do sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 7:3. As frações de 11 a 14 foram obtidas a partir do sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 6:4. As frações de 15 a 23 foram obtidas por meio do sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 5:5. Por meio do sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 3:7 obtiveram-se as frações de 24 a 29. As frações de 30 a 35 foram eluídas no sistema H<sub>2</sub>O/MeOH 2:8. Por fim, as frações 36 e 37 foram obtidas por meio da adição de metanol 100%.

### 3.9.3. FRACIONAMENTO DA FASE DCM

A fase diclorometano obtida da partição líquido-líquido do extrato metanólico de galhos de *S. tessmannii* rendeu 0,272 g de massa. O adsorvente utilizado foi sílica gel 60 (Macherey-Nagel, 0,04-0,063 mm/230-400 mesh ASTM), o qual foi depositado em coluna de vidro de capacidade de 100 mL e 1,7 cm de diâmetro. A sílica foi depositada a uma altura de 35,5 cm na coluna. As fases móveis e frações obtidas em cada sistema estão dispostas na Tabela 10 e Figura 21.

**Tabela 10: Fases móveis e frações da Fase DCM**

| Frações | Sistema           |
|---------|-------------------|
| 1 a 4   | DCM 100%          |
| 5 a 13  | DCM/Acetona 95:5  |
| 14 a 20 | DCM/Acetona 9:1   |
| 21 a 26 | DCM/Acetona 85:15 |
| 27 a 33 | DCM/Acetona 8:2   |
| 34 a 39 | DCM/Acetona 7:3   |
| 40 a 46 | DCM/Acetona 5:5   |
| 47 a 52 | DCM/Acetona 3:7   |
| 53 a 57 | DCM/Acetona 1:9   |
| 58 a 61 | Acetona 100%      |
| 62 a 68 | Acetona/MeOH 1:1  |
| 69 a 75 | Acetona/MeOH 3:7  |
| 76 e 77 | MeOH 100%         |



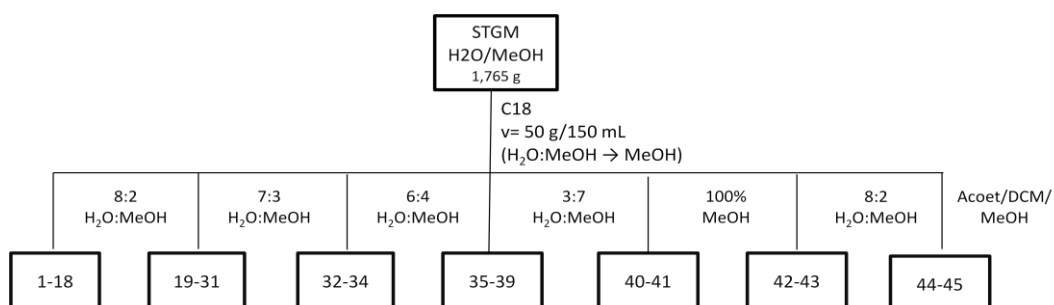
**Figura 21: Fluxograma do fracionamento da fase DCM**

### 3.9.4. FRACIONAMENTO DA FASE HIDROMETANÓLICA

A hidrometanólica obtida da partição líquido-líquido do extrato metanólico de galhos de *S. tessmannii* rendeu 1,765 g de massa e foi fracionada em C18 (Phenomenex) de 50g / 150 mL. As fases móveis e frações obtidas em cada sistema estão dispostas na Tabela 11 e Figura 22.

**Tabela 11: Fases móveis e frações da Fase H<sub>2</sub>O/MeOH**

| Frações | Sistema                   |
|---------|---------------------------|
| 1 a 18  | H <sub>2</sub> O/MeOH 8:2 |
| 19 a 31 | H <sub>2</sub> O/MeOH 7:3 |
| 32 a 34 | H <sub>2</sub> O/MeOH 6:4 |
| 35 a 39 | H <sub>2</sub> O/MeOH 3:7 |
| 40 a 41 | 100% MeOH                 |
| 42 a 43 | H <sub>2</sub> O/MeOH 8:2 |
| 44 a 45 | AcOEt/DCM/MeOH            |



**Figura 22: Fluxograma do fracionamento da fase H<sub>2</sub>O/MeOH**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina*

Quanto à toxicidade ao microcrustáceo *Artemia salina*, foram testados ao todo 12 extratos na concentração de 500 µg/mL, em triplicata. Após o período de incubação, os microcrustáceos permaneceram vivos nos poços de 11 extratos e também nos poços controle e branco (DMSO e H<sub>2</sub>O). Nos poços contendo o extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii*, porém, houve mortalidade de nove indivíduos no primeiro poço, oito indivíduos no segundo poço e oito indivíduos no terceiro poço, resultando, portanto em uma mortalidade de 83% para este extrato.

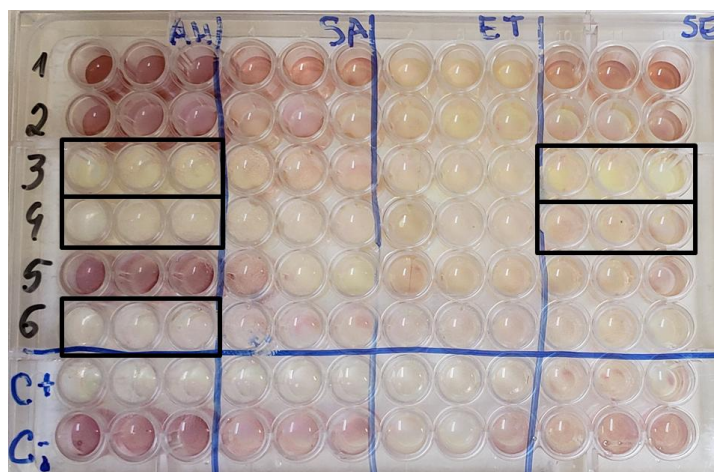
Magalhães et al. (2005) analisou a concentração necessária de extratos de galhos de *S. langsdorffii* Raddi com diferentes solventes para causar a mortalidade de 50% dos indivíduos de *A. salina* (LC<sub>50</sub>). O extrato obtido com metanol teve LC<sub>50</sub> de 86,74 µg/mL; o extrato obtido com éter de petróleo teve LC<sub>50</sub> de 66,06 µg/mL; e o extrato obtido com diclorometano teve LC<sub>50</sub> de 53,17 µg/mL. Os dois extratos com menor LC<sub>50</sub> foram fracionados e, do extrato obtido com éter de petróleo foram isolados os diterpenos 11-O-Metilswartzziarboreol C e 15,16-Dihidroswartzziarboreol C, e do extrato obtido com diclorometano foi isolado o diterpeno 11,12-Di-O-acetilswartzziarboreol C.

Embora, no presente estudo não tenha sido determinada a LC<sub>50</sub> para os extratos, o resultado do ensaio com *A. salina*, juntamente com o resultado de outros ensaios, também contribuiu para a escolha do extrato que seria fracionado posteriormente. Sendo assim, o único extrato que levou à mortalidade de indivíduos de *A. salina* foi o extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii*, sendo este, portanto, conduzido ao fracionamento.

### 4.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

Os extratos hexânicos submetidos ao corante TTC mostraram inibição ao crescimento microbiano de apenas três das 10 cepas microbianas viáveis testadas no ensaio, indicada pela ausência de coloração rosa nas placas (Figura 23). Duas cepas (*Edwardsiella tarda* e *Candida parapsilosis*) não cresceram. O extrato de folhas de *S. ulei*, indicado como o número 3 nas placas teste, inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila* (AH) e *Salmonella enterica* (SE). O extrato de galhos de *S. tessmannii*, indicado como o número 4, inibiu o crescimento de

*Aeromonas hydrophila* e *Salmonella enterica*. Por fim, o extrato de galhos de *S. ulei*, indicado na placa como número 6, inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila*. Somente os extratos de folhas de *S. ulei* (número 3) e de galhos de *S. tessmannii* (número 4) foram testados novamente com leitura espectrofotométrica posteriormente, pois foram os únicos extratos hexânicos que apresentaram inibição contra mais de uma cepa microbiana.



Legenda: 1. *S. tessmannii* folhas; 2. *S. polyphylla* folhas; 3. *S. ulei* folhas; 4. *S. tessmannii* galhos; 5. *S. polyphylla* galhos; 6. *S. ulei* galhos; AH - *Aeromonas hydrophila*; SA - *Staphylococcus aureus*; ET - *Edwardsiella tarda*; SE - *Salmonella enterica*; C+ antibiótico oxitetraciclina; C- meio de cultura.

**Figura 23: Placa teste onde houve inibição do crescimento microbiano dos extratos hexânicos, indicada pela ausência de coloração rosa nos poços destacados.**

Quanto ao resultado da leitura espectrofotométrica (Tabelas 12 e 13) aplicada aos extratos metanólicos e dois extratos hexânicos (os quais apresentaram inibição no ensaio colorimétrico), extratos das três espécies de *Swartzia* na concentração de 1000 µg/mL inibiram o crescimento microbiano de algumas cepas.

**Tabela 12: Absorbâncias pré-incubação**

|    | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | Ctrl - | Ctrl + |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AH | 0,2028 | 0,1069 | 0,4419 | 0,1179 | 0,1221 | 0,0888 | 0,1929 | 0,2605 | 0,0491 | 0,0510 |
| SE | 0,2044 | 0,1064 | 0,4410 | 0,1358 | 0,1162 | 0,0868 | 0,2078 | 0,2754 | 0,0509 | 0,0512 |
| KP | 0,1963 | 0,0985 | 0,4430 | 0,1050 | 0,1362 | 0,0797 |        |        | 0,0487 | 0,0508 |
| CP | 0,1952 | 0,1000 | 0,4303 | 0,1126 | 0,1461 | 0,0831 |        |        | 0,0492 | 0,0498 |
| AB | 0,2031 | 0,2843 | 0,4328 | 0,1107 | 0,1133 | 0,0878 |        |        | 0,0506 | 0,0504 |
| NB | 0,1882 | 0,0945 | 0,4210 | 0,1054 | 0,1117 | 0,0806 |        |        | 0,0486 | 0,0486 |
| PF | 0,2068 | 0,0955 | 0,4353 | 0,1113 | 0,1361 | 0,0811 |        |        | 0,0479 | 0,0498 |
| PA | 0,2163 | 0,1009 | 0,4277 | 0,1072 | 0,1109 | 0,0825 |        |        | 0,0475 | 0,0514 |
| SA | 0,2017 | 0,0975 | 0,1252 | 0,4270 | 0,1176 | 0,0793 |        |        | 0,0505 | 0,0485 |
| SM | 0,1935 | 0,0964 | 0,1057 | 0,4184 | 0,1377 | 0,0775 |        |        | 0,0495 | 0,0494 |
| EC | 0,1951 | 0,1005 | 0,4222 | 0,1271 | 0,1272 | 0,0811 |        |        | 0,0490 | 0,0504 |

Tabela 13: Absorbâncias pós-incubação

|    | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | Ctrl - | Ctrl + |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AH | 0,4521 | 0,6621 | 1,0168 | 0,6482 | 0,5486 | 0,6376 | 0,3818 | 0,4393 | 0,5380 | 0,0497 |
| SE | 0,7633 | 0,7632 | 1,1708 | 0,7354 | 0,7595 | 0,6830 | 0,5942 | 0,4248 | 0,4823 | 0,1904 |
| KP | 0,1732 | 0,5839 | 0,9007 | 0,4569 | 0,2355 | 0,5821 |        |        | 0,5443 | 0,0518 |
| CP | 0,1611 | 0,1437 | 0,4667 | 0,1265 | 0,1400 | 0,1103 |        |        | 0,1588 | 0,1420 |
| AB | 0,6014 | 0,5593 | 0,8966 | 0,6226 | 0,5363 | 0,6886 |        |        | 0,5852 | 0,1600 |
| NB | 0,6058 | 0,5581 | 0,8914 | 0,5593 | 0,6373 | 0,5666 |        |        | 0,5598 | 0,2533 |
| PF | 0,6056 | 0,5952 | 0,8539 | 0,5311 | 0,6116 | 0,7574 |        |        | 0,4419 | 0,0515 |
| PA | 0,7108 | 0,5776 | 0,8409 | 0,6484 | 0,6055 | 0,7537 |        |        | 0,4407 | 0,1584 |
| SA | 0,4557 | 0,5632 | 0,6237 | 0,9472 | 0,6625 | 0,6419 |        |        | 0,4532 | 0,1626 |
| SM | 0,6768 | 0,6173 | 0,6473 | 0,9363 | 0,6944 | 0,6802 |        |        | 0,5229 | 0,2533 |
| EC | 0,6299 | 0,6141 | 0,8874 | 0,6804 | 0,6098 | 0,6800 |        |        | 0,5071 | 0,2006 |

O extrato metanólico de folhas de *S. polyphylla* (número 1 na Tabela 14) inibiu o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em 95% (5% de crescimento da cepa). O extrato metanólico de galhos de *S. ulei* (número 5 na Tabela 14) inibiu o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* em 70% (30% de crescimento da cepa). O extrato hexânico de folhas de *S. ulei* (número 7 na Tabela 14) inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila* em 51% (49% de crescimento da cepa). Por fim, o extrato hexânico de galhos de *S. tessimannii* (número 8 na Tabela 14) inibiu o crescimento de *Aeromonas hydrophila* em 53% (47% de crescimento da cepa) e de *Salmonella enterica* em 54% (46% de crescimento da cepa) (Tabela 14).

Tabela 14: Porcentagem de crescimento microbiano na concentração de 1000 µg/mL

| Extrato<br>Micro-organismo | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8        | Ctrl -   | Ctrl +   |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| AH                         | 61±0,055  | 124±0,040 | 128±0,023 | 118±0,025 | 97±0,020  | 122±0,011 | 49±0,032  | 47±0,023 | 53±0,022 | 4±0,002  |
| SE                         | 141±0,052 | 164±0,094 | 180±0,022 | 150±0,019 | 160±0,058 | 150±0,033 | 101±0,018 | 46±0,017 | 48±0,007 | 19±0,012 |
| KP                         | 5±0,020   | 108±0,008 | 102±0,015 | 81±0,02   | 30±0,006  | 111±0,023 |           |          | 54±0,053 | 5±0,001  |
| AB                         | 84±0,008  | 96±0,006  | 96±0,029  | 105±0,012 | 88±0,093  | 121±0,019 |           |          | 58±0,035 | 16±0,071 |
| NB                         | 91±0,021  | 100±0,031 | 101±0,032 | 98±0,031  | 112±0,028 | 122±0,010 |           |          | 56±0,049 | 25±0,043 |
| PF                         | 114±0,029 | 139±0,011 | 119±0,019 | 119±0,027 | 133±0,029 | 184±0,035 |           |          | 44±0,047 | 5±0,001  |
| PA                         | 138±0,014 | 134±0,011 | 118±0,012 | 150±0,020 | 138±0,006 | 183±0,016 |           |          | 44±0,024 | 15±0,006 |
| SA                         | 75±0,207  | 128±0,013 | 136±0,022 | 141±0,069 | 147±0,031 | 152±0,038 |           |          | 45±0,005 | 16±0,019 |
| SM                         | 112±0,019 | 120±0,022 | 125±0,044 | 120±0,002 | 128±0,010 | 138±0,012 |           |          | 52±0,050 | 25±0,005 |
| EC                         | 106±0,032 | 123±0,010 | 112±0,012 | 131±0,013 | 116±0,008 | 141±0,018 |           |          | 50±0,034 | 20±0,020 |

Legenda: 1. *S. polyphylla* folhas MeOH; 2. *S. ulei* folhas MeOH; 3. *S. tessimannii* folhas MeOH; 4. *S. polyphylla* galhos MeOH; 5. *S. ulei* galhos MeOH; 6. *S. tessimannii* galhos MeOH; 7. *S. ulei* folhas Hex; 8. *S. tessimannii* galhos Hex; AH - *Aeromonas hydrophila*; SE - *Salmonella enterica*; KP - *Klebsiella pneumoniae*; AB - *Acinetobacter baumannii*; NB - *Nocardia brasiliensis*; PF - *Pseudomonas fluorescens*; PA - *Pseudomonas aeruginosa*; SA - *Staphylococcus aureus*; SM - *Serratia marcescens*; EC - *Escherichia coli*.

Embora o extrato metanólico de folhas de *S. polyphylla* tenha inibido apenas o micro-organismo *Klebsiella pneumoniae*, este apresentou a maior inibição dentre todos os extratos testados, com o valor de inibição de 95% semelhante ao valor do antibiótico utilizado como

controle positivo (antibiótico oxitetraciclina a 125 µg/mL). Bactérias gram-negativas têm se mostrado menos suscetíveis a extratos de plantas devido a sua dupla camada protetora composta por uma membrana externa de lipopolissacarídeos e uma membrana interna cuja composição é peptidoglicano (Biswas *et al.*, 2013). Por essa razão, a alta inibição encontrada para o extrato metanólico de *S. polyphylla* contra uma bactéria gram-negativa é um resultado relevante, além de ser o primeiro registro de atividade de um extrato de *S. polyphylla* contra essa bactéria.

Outros autores já documentaram atividade antimicrobiana para extratos de casca e galhos de *S. polyphylla* contra outras cepas não testadas no presente estudo, como por exemplo, Roumy *et al.* (2019) registraram para o extrato metanólico de galhos de *S. polyphylla* um valor de Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 0,15 mg.mL<sup>-1</sup> contra as bactérias gram-positivas *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*, o qual é menor que os valores de referência do antibiótico gentamicina (0,25 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente) e, portanto, considerado bastante ativo.

Roumy *et al.* (2019) também registrou inibição de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> (Valor de referência: gentamicina 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) do extrato metanólico de galhos de *S. polyphylla* contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*, valor este que denota alta atividade de inibição, estando portanto em contradição com a baixa inibição encontrada no presente estudo para a mesma bactéria (25% de inibição). Essas diferenças podem ser ocasionadas pela aplicação de diferentes métodos de avaliação antibacteriana, tipo de solvente utilizado nos extratos e concentração dos extratos nos ensaios, uma vez que até mesmo substâncias isoladas podem ter resultados diferentes (Cushnie e Lamb, 2005).

Outra bactéria testada por Roumy *et al.* (2019) que também foi testada no presente estudo foi a bactéria gram-negativa *Acinetobacter baumannii*, a qual evidenciou atividade de inibição pouco relevante (1,2 mg.mL<sup>-1</sup>, Valor de referência: gentamicina 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>), em conformidade com o resultado obtido no presente estudo (9% de inibição). Nenhum extrato hexânico de *S. polyphylla* apresentou inibição microbiana.

Dos quatro extratos obtidos a partir de *S. ulei*, três apresentaram alguma atividade microbiana. Dos extratos das folhas, o hexânico apresentou inibição em ambos os ensaios (colorimétrico e espectrofotométrico) contra *Aeromonas hydrophila* (51% de inibição). Dos extratos de galhos, o extrato hexânico apresentou inibição no ensaio colorimétrico contra *Aeromonas hydrophila*; porém essa atividade não se repetiu na leitura espectrofotométrica. Já

o extrato metanólico mostrou uma atividade de inibição de 70% de inibição contra *Klebsiella pneumoniae*. Até o presente estudo ainda não havia sido documentada nenhuma atividade biológica relativa à espécie *S. ulei*.

Em relação aos extratos obtidos a partir de *S. tessmannii*, não houve atividade para nenhum extrato de folhas. Dos extratos de galhos, por sua vez, apresentaram inibição somente os extratos hexânicos, cujos resultados foram consistentes em ambos os ensaios colorimétrico e espectrofotométrico para as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Salmonella enterica*. Este também é o primeiro registro de atividade biológica para *S. tessmannii*. Tendo em vista que o extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii* foi o único extrato que apresentou inibição contra mais de um microorganismo, além da atividade obtida anteriormente para esse mesmo extrato contra *A. salina*, este foi o extrato escolhido para ser fracionado.

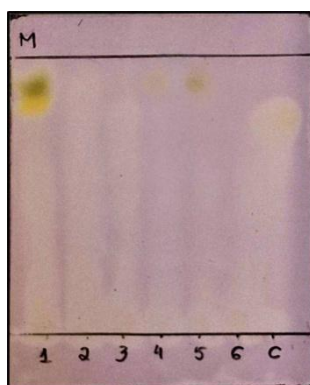
#### 4.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Somente os extratos metanólicos foram testados quanto à atividade antioxidante com DPPH $\bullet$  e Fe $^{3+}$ /fenantrolina, uma vez que o metanol promove extração mais completa de substâncias polares como os compostos fenólicos, os quais têm sido apontados como os principais responsáveis pela atividade antioxidante em extratos vegetais (Roesler *et al.*, 2007; Roumy *et al.*, 2019). A avaliação da atividade antioxidante das amostras frente ao radical livre DPPH $\bullet$  permite avaliar a capacidade das substâncias em sequestrar radicais livres ao doar um elétron ou um radical hidrogênio, tornando o radical livre estável e diminuindo sua absorbância, além de mudar a coloração do roxo (radical livre) para o amarelo pálido (radical estabilizado). Já o método utilizando o Fe $^{3+}$  em complexo com a fenantrolina permite avaliar a capacidade das amostras em reduzir o íon Fe $^{3+}$  para Fe $^{2+}$  de modo que ele possa ser quelado pela fenantrolina.

Em ambos os ensaios os valores obtidos são medidos em equivalência de ácido ascórbico, os quais devem ser próximos de 1 para que sejam considerados ativos. No entanto, todos os extratos testados retornaram valores distantes de 1, portanto mostrando-se inativos na redução do radical livre DPPH $\bullet$  e também na redução do íon Fe $^{3+}$  a Fe $^{2+}$ . Estes resultados contrastam com os de Santos *et al.* (2009) para o extrato etanólico de folhas de *S. langsdorffii*, cujo valor de 1.532 obtido no ensaio com DPPH $\bullet$ , expresso em equivalência de quercetina (Valor de referência para a quercetina: 0.017), indica atividade antioxidante moderada. Em outro estudo realizado com o extrato etanólico de cascas de *S. langsdorffii* frente ao radical

DPPH• e expresso em equivalência de ácido gálico (Valor de referência para o ácido gálico:  $1,38 \pm 0,01$ ), foi encontrado o valor de  $37,42 \pm 1,54$ , o qual indica inatividade assim como no presente estudo.

É possível que a inatividade dos extratos no presente estudo esteja relacionada à baixa solubilidade dos extratos e ao grau de mistura das substâncias, uma vez que foram testados somente extratos brutos e, portanto, outras substâncias presentes no extrato podem estar interferindo na capacidade de redução das substâncias ativas. A presença de substâncias antioxidantes em mistura puderam ser observadas no ensaio realizado em cromatografia em camada delgada. Ao serem eluídas em cromatoplaças de sílica, as amostras apresentaram rastros amarelos similares ao da quercetina, o que indica a presença de substâncias capazes de estabilizar o radical livre em mistura nos extratos brutos, mudando sua coloração de roxo para amarelo na área onde as amostras foram eluídas (Figura 24).



Legenda: 1. *S. tessmannii* folhas; 2. *S. tessmannii* galhos; 3. *S. ulei* galhos; 4. *S. ulei* folhas; 5. *S. polyphylla* folhas; 6. *S. polyphylla* galhos; C – quercetina.

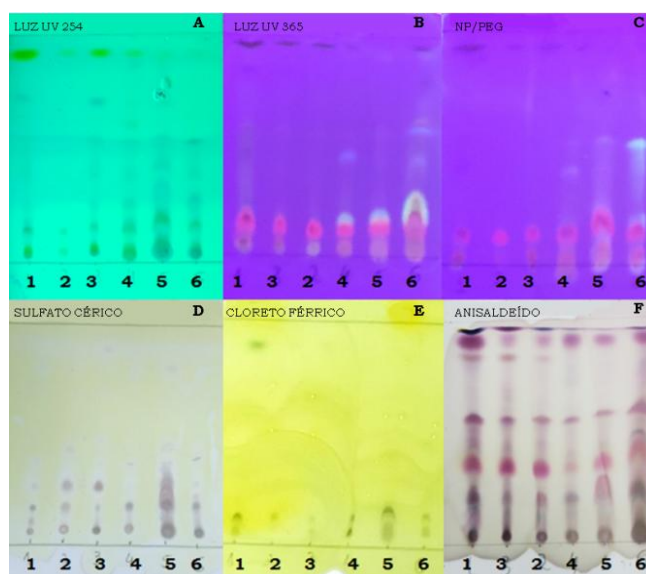
**Figura 24:** Extratos brutos eluídos em AcOEt/MeOH 9:1 com aplicação de solução de DPPH•.

#### 4.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS BRUTOS

##### 4.4.1. CCD EXTRATOS HEXÂNICOS

As placas cromatográficas foram submetidas a reveladores gerais com o objetivo de identificar as principais classes químicas presentes nos extratos. Foi possível observar para o extrato de galhos de *S. tessmannii* uma banda fluorescente azul-esverdeada sob UV-365 nm (Figura 25 – B/6) e intensificada com NP-PEG (Figura 25 – C/6) que teve a fluorescência diminuída sob UV-254 nm (Figura 25 – A/6). Essas características são indicativas de flavonoides (Wagner e Bladt, 1996). O cloreto férrico (Figura 25 – E), utilizado para a

identificação de fenóis em geral, não apresentou manchas escuras indicativas de flavonoides. Também não foram identificadas manchas laranja indicativas de alcaloides para o revelador Dragendorff (Wagner e Bladt, 1996; Hernandez, Kato e Bacchi, 2017, p. 355), o que já era esperado devido ao padrão quimiotaxonômico da família Fabaceae e também do gênero *Swartzia* (Negreiros e Nunez, 2023). As manchas roxas/lilás observadas nas cromatoplacas reveladas com anisaldeído (Figura 25 – F) e sulfato cérico (Figura 25 – D) indicam a presença de terpenos ou esteroides (Wagner e Bladt, 1996).



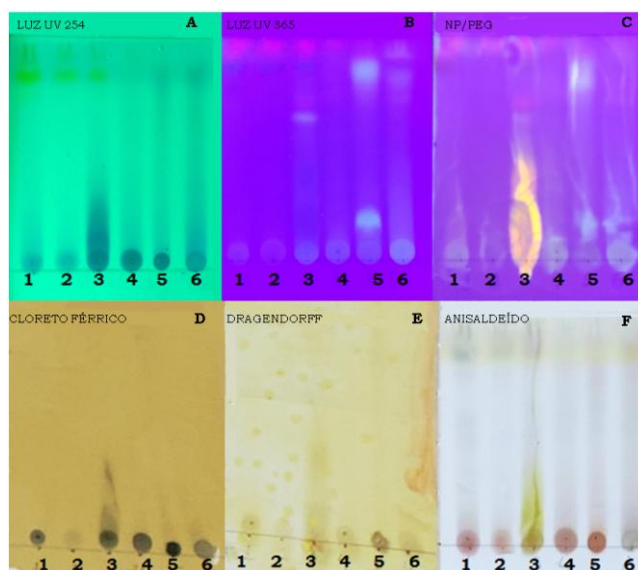
Legenda: 1. *S. polyphylla* folhas; 2. *S. ulei* folhas; 3. *S. tessmannii* folhas; 4. *S. polyphylla* galhos; 5. *S. ulei* galhos; 6. *S. tessmannii* galhos

**Figura 25: CCD dos extratos brutos hexânicos.**

#### 4.4.2. CCD EXTRATOS METANÓLICOS

Compostos aromáticos e sistemas altamente conjugados normalmente absorvem a luz UV-254 nm, o que resulta em manchas escuras sob este revelador. Esta característica pôde ser observada principalmente para o extrato de folhas de *S. tessmannii* (Figura 26 – A/3), que também apresentou fluorescência amarela intensificada por NP/PEG (Figura 26 – C/3), uma mancha escura observada sob cloreto férrico (Figura 26 – D/3) e coloração amarela observada sob anisaldeído (Figura 26 – F/3), o que aponta para a presença de flavonoide neste extrato. Também foi possível observar manchas escuras sob luz UV-254 nm e cloreto férrico para todos os extratos de galhos (Figura 26 – A/4,5,6 – D/4,5,6), o que indica a presença de flavonoides também nesses extratos. A coloração vermelha observada sob anisaldeído (na origem) pode indicar a presença de triterpeno no extrato de galhos de *S. ulei* (Figura 26 – F/5)

(Wagner e Bladt, 1996). Nenhum indício de alcaloide foi observado com o revelador Dragendorff (Figura 26 – E).



Legenda: 1. *S. polyphylla* folhas; 2. *S. ulei* folhas; 3. *S. tessmannii* folhas; 4. *S. polyphylla* galhos; 5. *S. ulei* galhos; 6. *S. tessmannii* galhos.

**Figura 26: CCD dos extratos brutos metanólicos.**

## 4.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

### 4.5.1. EXTRATOS HEXÂNICOS

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em 300 MHz dos extratos hexânicos (Figura 27) se mostraram bastante semelhantes no geral, no entanto, algumas particularidades puderam ser observadas de acordo com o material vegetal e espécie. Dentre as semelhanças, pode-se observar que todos apresentaram picos entre 0,5 e 2,0 ppm, indicando hidrogênios protegidos de metilas, correspondentes a presença de terpenos. Também se pode observar entre 4,5 e 5,5 ppm sinais indicativos de ligações duplas em todos os espectros.

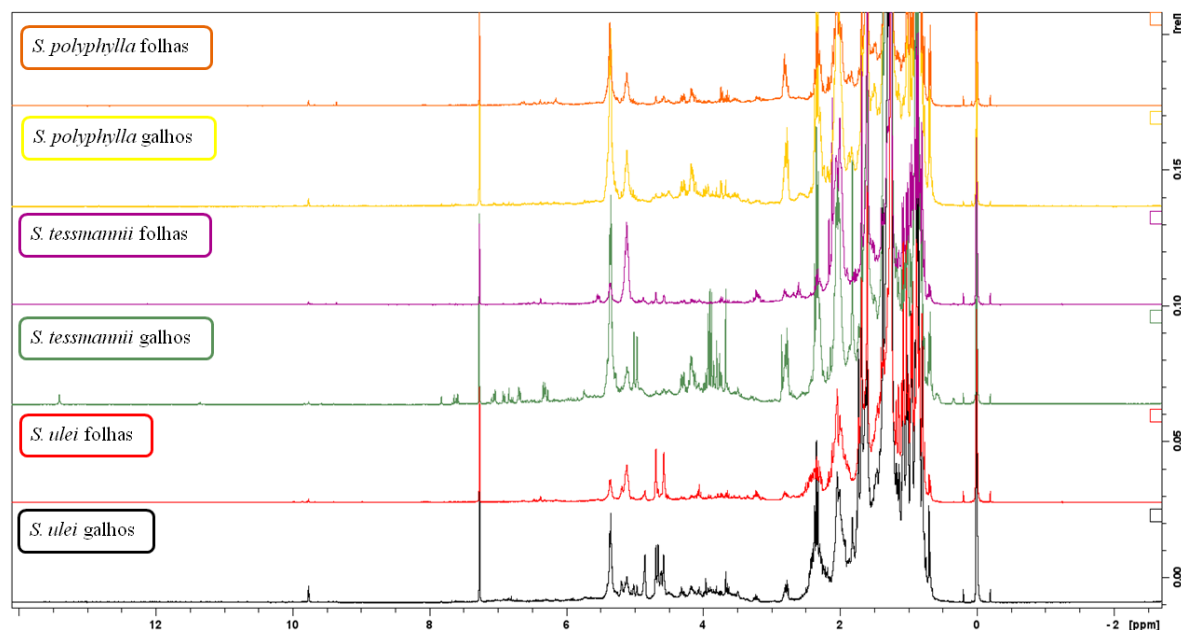


Figura 27: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos hexânicos solubilizados em clorofórmio-d.

O espectro de *S. tessmannii* apresentou sinais de ligações duplas não só nas regiões em comum com os outros espectros, mas também entre 6,2 e 6,4 ppm e 6,6 e 7,0 ppm, os quais não estavam presentes nos outros extratos. Além disso, este foi o único que apresentou sinais na região dos prótons aromáticos em 7,1 ppm e entre 7,5 e 7,7 ppm, o que pode indicar a presença de flavonoides (Figura 28).

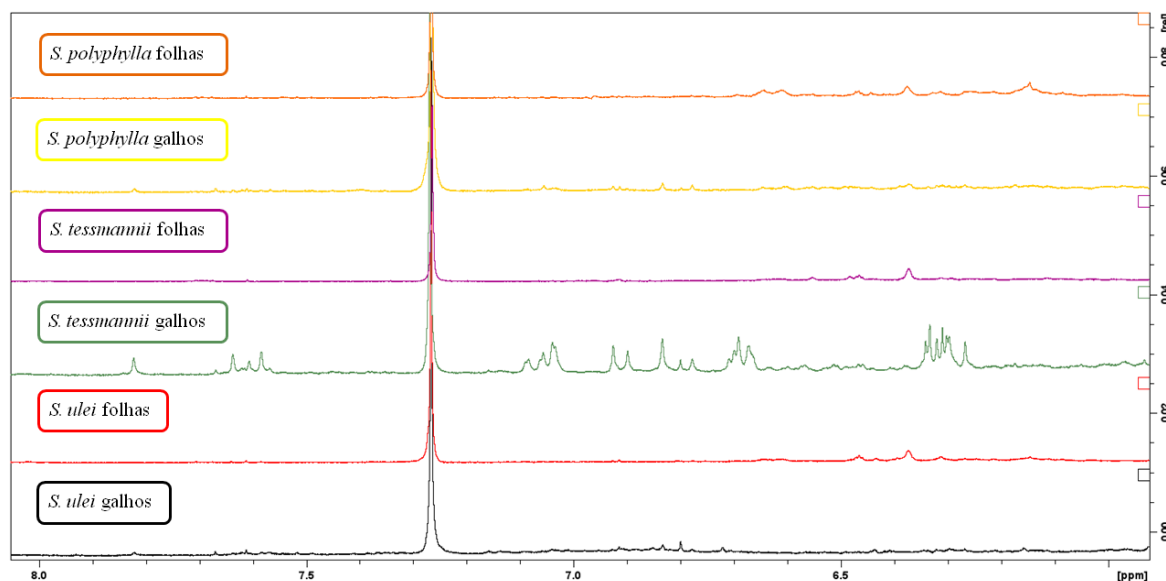


Figura 28: RMN de  $^1\text{H}$  – Ampliação da região entre 6,2 e 7,7 ppm para *S. tessmannii*.

Os sinais mais intensos para este mesmo espectro entre 3,6 e 4,0 ppm em relação aos demais (Figura 29) podem indicar a presença de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos (possivelmente metoxilas), o que também corrobora para a presença de flavonoides.

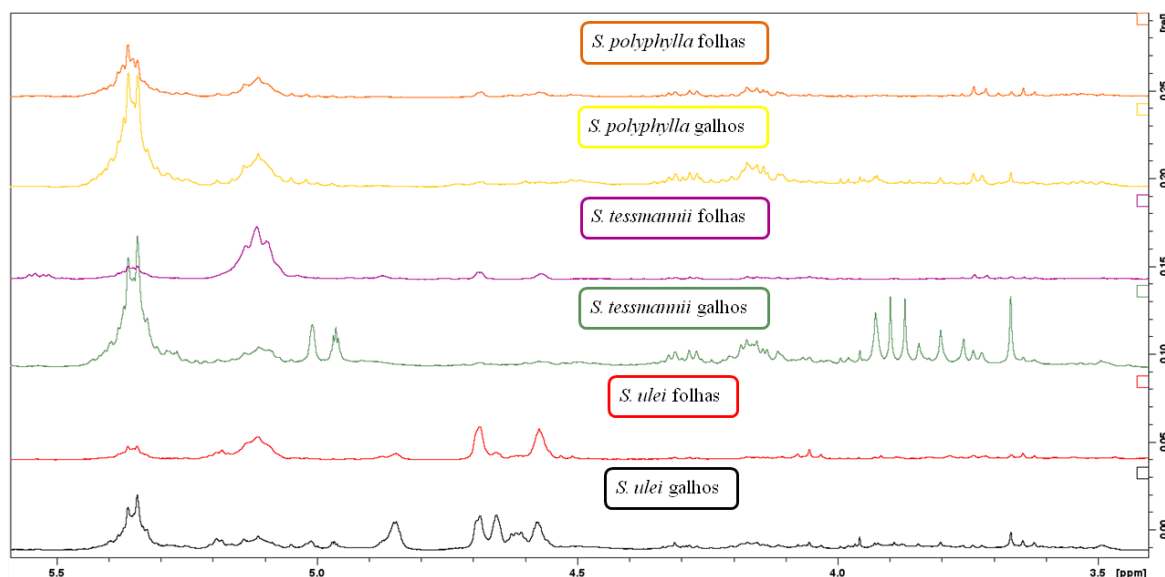
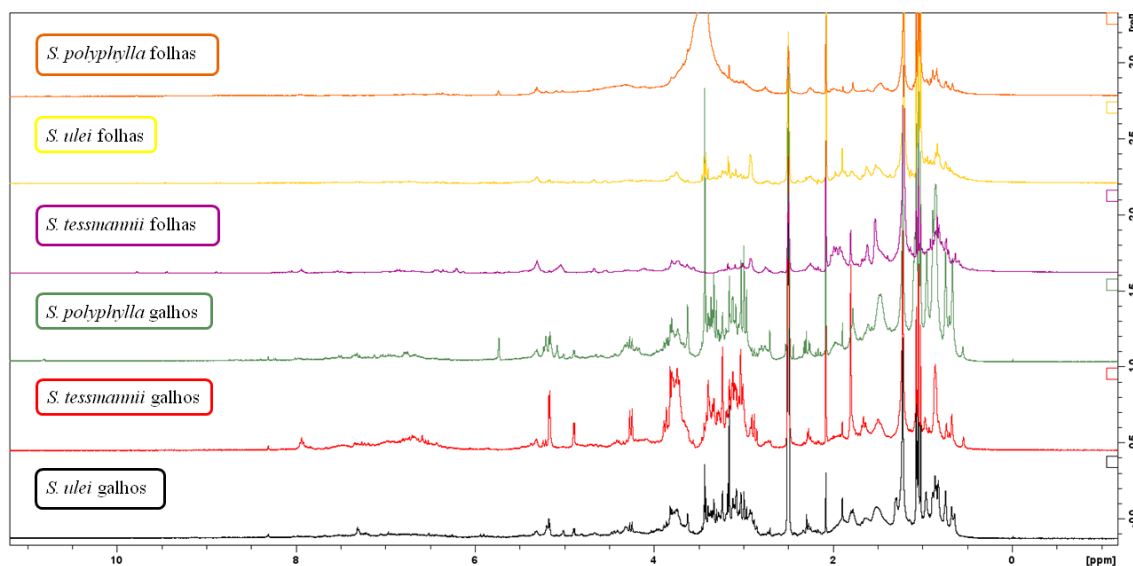


Figura 29: RMN de  $^1\text{H}$  – Ampliação da região entre 3,5 e 5,5 ppm para *S. tessmannii*.

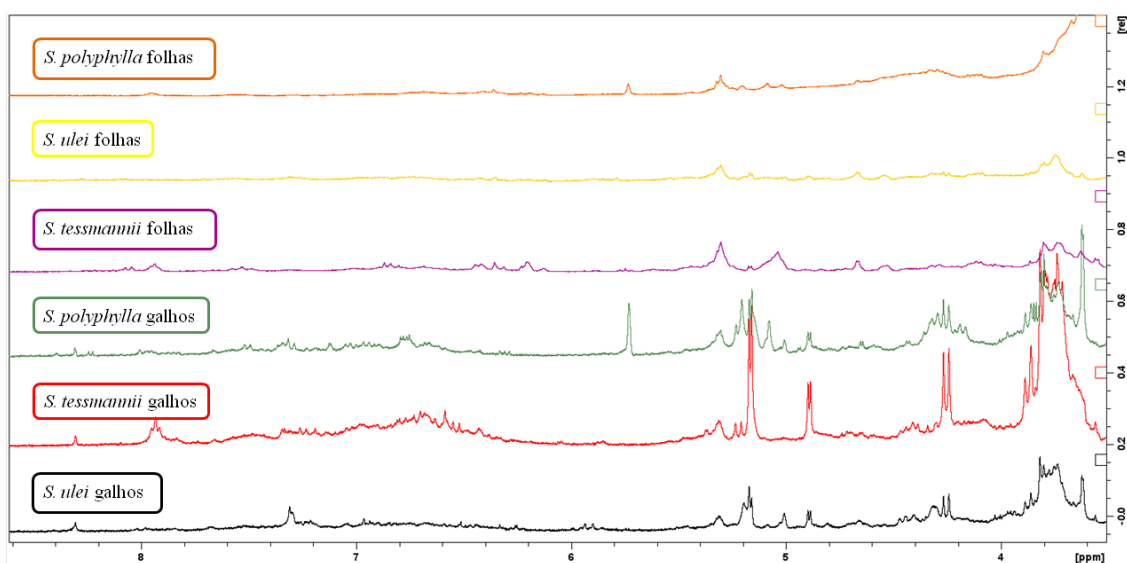
#### 4.5.2. EXTRATOS METANÓLICOS

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos metanólicos também foram encontrados sinais metílicos entre 0,5 e 1,5 ppm, indicando a presença de terpenos. Entre 2,8 e 3,4 ppm os sinais foram presentes apenas nos extratos de galhos. Sinais nessa região indicam cadeias alifáticas com um ou dois substituintes. Um pico proeminente em 3,5 ppm somente no espectro de *S. polyphylla* galhos também foi observado (Figura 30).



**Figura 30: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos metanólicos solubilizados em DMSO-d.**

No espectro de *S. tessmannii* galhos também foi observado um sinal sobressaindo entre 3,6 e 3,8 ppm (Figura 31). Sinais entre 4,0 e 5,4 ppm também estiveram presentes somente nos espectros de galhos e mais proeminentes entre 4,2 e 4,6 ppm e em 5,2 ppm para *S. tessmannii*, os quais são característicos de ligações duplas (Figura 31). Também houve sinais entre 6,0 e 8,0 ppm somente nos espectros de galhos, também com maior destaque em *S. tessmannii*, portanto indicando que há aromaticidade presente nos extratos de galhos, com maior concentração no extrato de *S. tessmannii*.

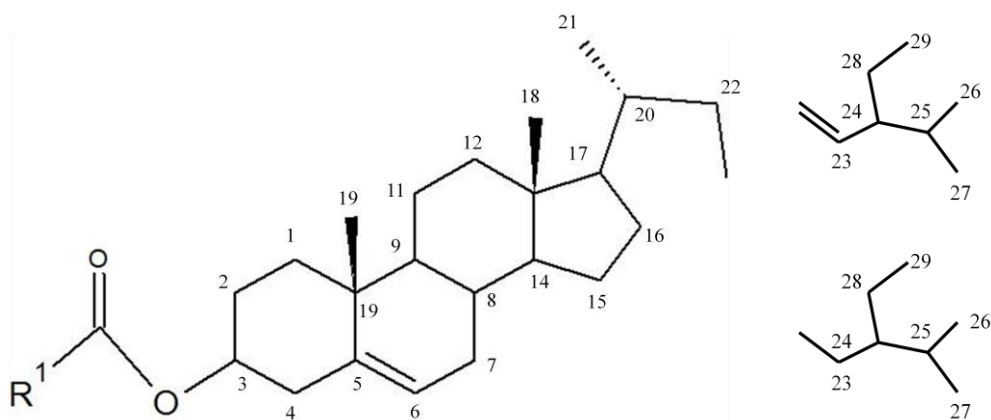


**Figura 31: RMN de  $^1\text{H}$  – Ampliação da região entre 3,5 e 8,0 ppm para *S. tessmannii*.**

#### 4.6. FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO DE GALHOS DE *S. tessmannii*

##### 4.6.1. SUBSTÂNCIAS 1 E 2: SITOSTEROL E ESTIGMASTEROL ESTERIFICADO COM ÁCIDO GRAXO

A mistura das substâncias sitosterol e estigmasterol foi obtida do extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii* como cristais brancos (Figura 32). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 33) apresentou sinal em  $\delta$  0,68, referente aos hidrogênios metílicos de ambas as moléculas na posição H-19. Em  $\delta$  4,59 está um multipletto referente ao H-3 de ambas as moléculas, sinal este que tipicamente encontra-se em  $\delta$  3,52 quando ligado a um grupo OH destes esteroides (Pedroza *et al.*, 2020), mas devido à esterificação com ácido graxo nesta posição, seu deslocamento aumenta para aproximadamente 4,6 (Verleyen *et al.*, 2002). Em  $\delta$  5,14 e  $\delta$  5,01 está um multipletto referente aos H-22 e H-23 do estigmasterol somente. O sinal intenso encontrado em  $\delta$  1,25 refere-se aos hidrogênios metílicos e metilênicos da cadeia de ácido graxo (Nguyen *et al.*, 2004).



**Figura 32. Estrutura geral das substâncias 1 e 2**

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34) foi possível observar os sinais dos carbonos C-5 e C-6 em  $\delta$  138,7 e  $\delta$  122,5 respectivamente. Os C-22 e C-23, referentes somente ao estigmasterol, podem ser observados em  $\delta$  138,3 e  $\delta$  129,2. Os carbonos carbonílicos referentes aos ésteres de ambos o sitosterol e estigmasterol podem ser observados em  $\delta$  173,3 e  $\delta$  173,7, respectivamente. Os sinais encontrados no espectro de  $^{13}\text{C}$  permitiram inferir que a cadeia de ácido graxo assemelha-se ao palmitato (Yun *et al.*, 2014) (Tabela 16).

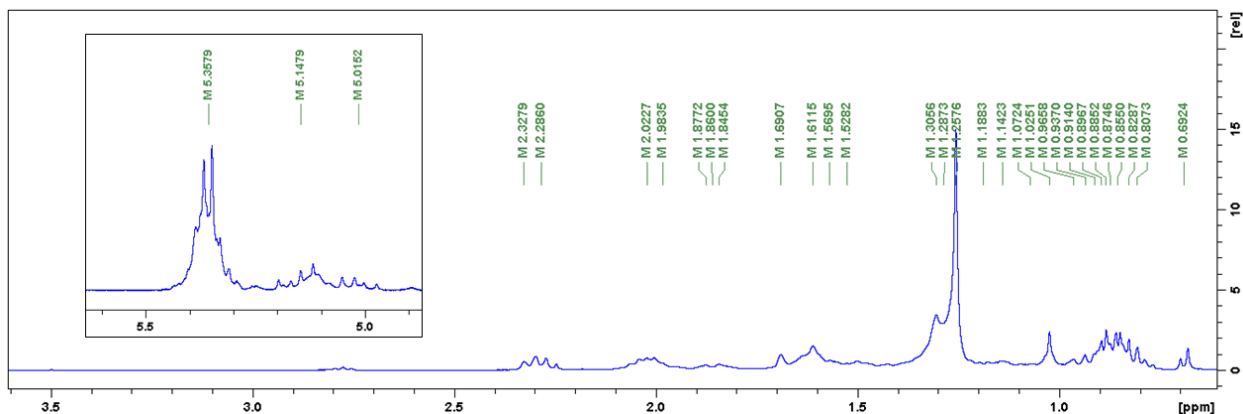


Figura 33 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias 1 e 2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

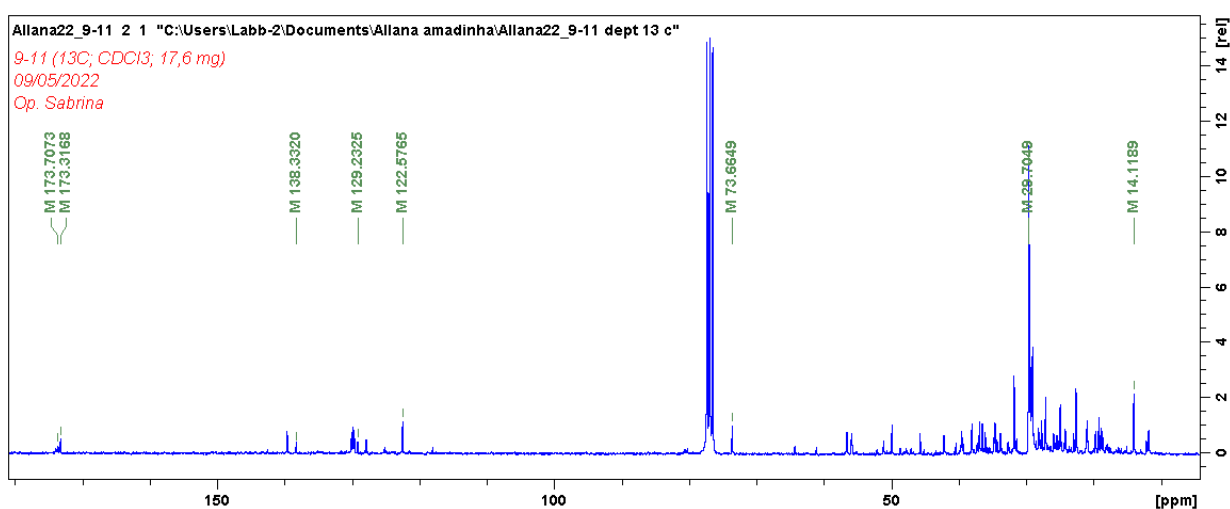


Figura 34 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias 1 e 2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 16 – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (ppm) das substâncias 1 e 2 comparados com a literatura, ambos em  $\text{CDCl}_3$  (1. Silva et al., 2023; 2. Nguyen et al., 2004; 3. Yun XJ et al., 2014; 4. Nuñez, 1996; 5. Takale et al., 2023).**

| Posição | Observado<br>$\delta \text{ H}$ | Literatura        | Observado<br>$\delta \text{ C}$ | Literatura          |
|---------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------|
| 1       | 1,86 (1H, d, J = 9,63 Hz)       | 1,85 <sup>2</sup> | 36,97                           | 37,26 <sup>3</sup>  |
| 2       | 1,61 (1H, m)                    | 1,61 <sup>2</sup> | 29,69                           | 29,70 <sup>2</sup>  |
| 3       | 4,59 (1H, m)                    | 4,6 <sup>4</sup>  | 73,66                           | 78,39 <sup>3</sup>  |
| 4       | 2,28 (1H, m)                    | 2,27 <sup>2</sup> | 39,35                           | 39,12 <sup>3</sup>  |
| 5       | -                               | -                 | 139,68 (Q)                      | 140,69 <sup>3</sup> |
| 6       | 5,35 (1H, m)                    | 5,34 <sup>1</sup> | 122,57                          | 121,7 <sup>3</sup>  |
| 7       | 1,98 (2H, m)                    | 1,98 <sup>2</sup> | 31,89                           | 31,95 <sup>3</sup>  |
| 8       | 1,52 (1H, m)                    | 1,52 <sup>2</sup> | 31,83                           | 31,84 <sup>3</sup>  |
| 9       | 0,93 (1H, m)                    | 0,93 <sup>2</sup> | 50,00                           | 50,12               |
| 10      | -                               | -                 | 36,57 (Q)                       | 36,71 <sup>3</sup>  |
| 11      | 1,56 (2H, m)                    | 1,56 <sup>2</sup> | 20,99                           | 21,06 <sup>3</sup>  |
| 12      | 2,02 (2H, m)                    | 2,02 <sup>2</sup> | 39,69                           | 39,73 <sup>3</sup>  |
| 13      | -                               | -                 | 42,28 (Q)                       | 42,26 <sup>3</sup>  |
| 14      | 1,02 (1H, s)                    | 1,01 <sup>2</sup> | 56,65                           | 56,61 <sup>3</sup>  |
| 15      | 1,07 (2H)                       | 1,08 <sup>2</sup> | 24,27                           | 24,28 <sup>3</sup>  |
| 16      | 1,84 (m)                        | 1,83 <sup>2</sup> | 28,23                           | 28,32 <sup>3</sup>  |

|                     |                           |                   |        |                     |
|---------------------|---------------------------|-------------------|--------|---------------------|
|                     | 1,87 (m)                  | 1,86 <sup>2</sup> |        |                     |
| 17                  | 1,14 (1H, m)              | 1,12 <sup>2</sup> | 56,00  | 56,02 <sup>3</sup>  |
| 18                  | 1,02 (3H, s)              | 1,00 <sup>1</sup> | 11,84  | 11,75 <sup>3</sup>  |
| 19                  | 0,69 (3H, d, J = 5,36 Hz) | 0,67 <sup>1</sup> | 19,30  | 19,20 <sup>3</sup>  |
| 20                  | -                         | 1,36 <sup>2</sup> | 36,13  | 36,17 <sup>3</sup>  |
| 21                  | 0,91 (3H, s)              | 0,92 <sup>1</sup> | 18,76  | 18,79 <sup>3</sup>  |
| 22 (sitosterol)     | -                         | 1,00 <sup>2</sup> | 33,89  | 33,89               |
| 23 (sitosterol)     | 1,18 (2H, m)              | 1,18 <sup>2</sup> | 25,99  | 26,16               |
| 22 (estigmasterol)  | 5,14 (1H, m)              | 5,14 <sup>1</sup> | 138,3  | 138,33 <sup>5</sup> |
| 23 (estigmasterol)  | 5,01 (1H, m)              | 5,00 <sup>1</sup> | 129,2  | 129,28 <sup>5</sup> |
| 24                  | 0,96 (1H, m)              | 0,95 <sup>2</sup> | 45,78  | 45,82 <sup>3</sup>  |
| 25                  | 1,69 (1H, m)              | 1,66 <sup>2</sup> | 29,32  | 29,24               |
| 26                  | 0,82 (3H, m)              | 0,83 <sup>1</sup> | 19,00  | 18,99 <sup>3</sup>  |
| 27                  | 0,80 (3H, m)              | 0,81 <sup>1</sup> | 19,81  | 19,76 <sup>3</sup>  |
| 28                  | 1,25 (2H, m)              | 1,26 <sup>2</sup> | 23,02  | 23,17 <sup>3</sup>  |
| 29                  | 0,85 (3H, m)              | 0,85 <sup>1</sup> | 11,96  | 11,94 <sup>3</sup>  |
| C=O (sitosterol)    | -                         | -                 | 173,3  |                     |
| C=O (estigmasterol) | -                         | -                 | 173,7  |                     |
| 1'                  | -                         | -                 | 174,04 | 174,56 <sup>2</sup> |
| 2'                  | 2,32                      | 2,34 <sup>2</sup> | 34,69  | 34,26 <sup>2</sup>  |
| 3'                  | 1,61 (1H, m)              | 1,61 <sup>2</sup> | 25,03  | 24,97 <sup>2</sup>  |
| 4'                  | 1,28                      | 1,28 <sup>2</sup> | 29,26  | 29,26 <sup>2</sup>  |
| 5'                  | 1,25                      | 1,26 <sup>2</sup> | 29,69  | 29,45 <sup>2</sup>  |
| 6'                  | 1,25                      | 1,26 <sup>2</sup> | 29,58  | 29,68 <sup>2</sup>  |
| 7'-12'              | 1,25                      | 1,26 <sup>2</sup> | 29,69  | 29,77 <sup>3</sup>  |
| 13'                 | 1,25                      | 1,26 <sup>2</sup> | 29,15  | 29,39 <sup>3</sup>  |
| 14'                 | 1,25                      | 1,26 <sup>2</sup> | 31,51  | 31,88 <sup>3</sup>  |
| 15'                 | 1,30 (bs)                 | 1,30 <sup>2</sup> | 22,68  | 22,7 <sup>3</sup>   |
| 16'                 | 0,87 (3H, m)              | 0,88 <sup>2</sup> | 14,12  | 14,12 <sup>2</sup>  |

#### 4.6.2. SUBSTÂNCIA 3: LINCHEXANTONA

A substância 3 foi isolada ao fracionar a Fração 16 obtida do extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii* (Figura 35). Ela foi nomeada inicialmente como Fração 16-4 e foi obtida por meio do sistema **Hexano/DCM 1:1**. O espectro de <sup>1</sup>H (Figura 36) mostrou um duplo duplete em δ 6,69 ( $J = 2,4$  e  $0,2$  Hz) com integral para 1H e outro duplo duplete em δ 6,67 ( $J = 2,6$  e  $0,8$  Hz) também com integral para 1H. Sinais nessa região indicam a presença de aromáticos e os valores encontrados são compatíveis aos H-6 e H-8 do anel A de certos flavonoides. Porém, a presença de mais dois dupletos com integral para 1H em δ 6,33 ( $J = 2,38$  Hz) e δ 6,36 ( $J = 2,38$  Hz) indicam a presença de hidrogênios posicionados de maneira simétrica na molécula, o que não corresponde com a estrutura típica de um flavonoide.

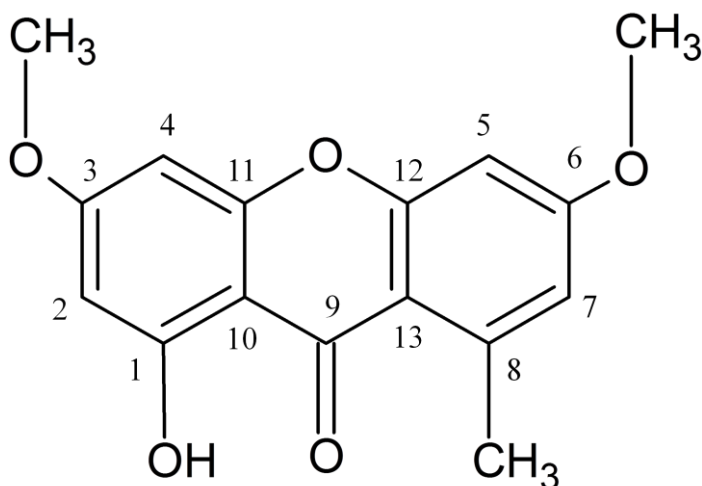


Figura 35. Estrutura da substância 3

Também foram observados sinais referentes a presença de duas metoxilas em  $\delta$  3,88 e  $\delta$  3,92, além de uma metila em  $\delta$  2,85, os quais apontam para a estrutura de xantona. Além disso, sinal em  $\delta$  13,41 aponta para a presença de uma hidroxila que forma ligação de hidrogênio com uma carbonila próxima, a qual pôde ser observada em  $\delta$  182,4 no espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 37). De acordo com o observado nas correlações HMBC, a metoxila em  $\delta$  3,88 está ligada a um carbono em  $\delta$  165,8, e a metoxila em  $\delta$  3,92 está ligada a um carbono em  $\delta$  163,7, os quais se referem aos C-3 e C-6 da estrutura da xantona, respectivamente. A metila observada em  $\delta$  2,85 por sua vez, correlacionou-se com o carbono em  $\delta$  143,4, referente ao C-8 da estrutura da xantona. Portanto, a estrutura observada foi identificada como lichexantona (Silva *et al.*, 2023).

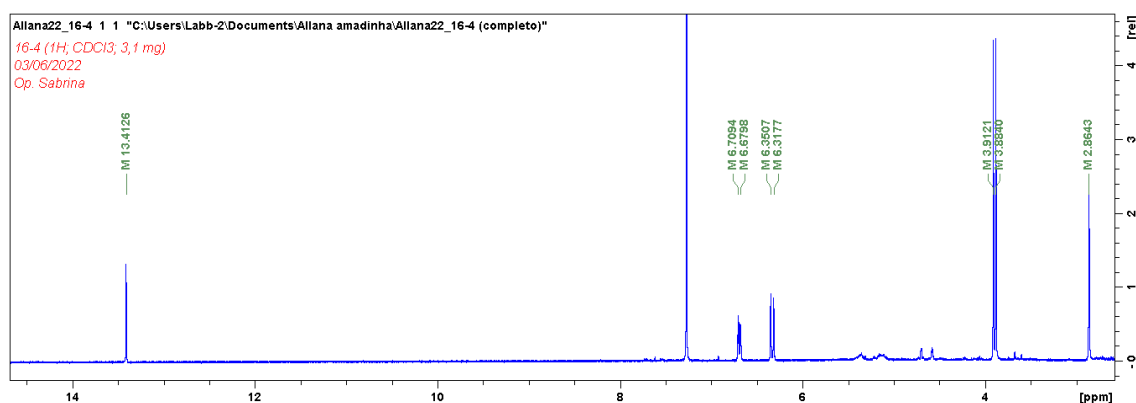


Figura 36 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 3 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

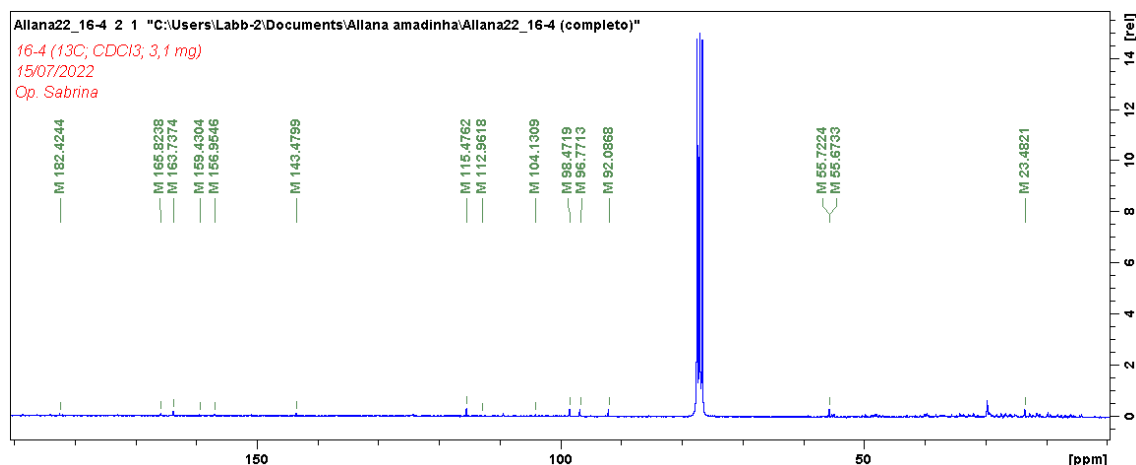


Figura 37 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 3 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Tabela 17 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  (ppm) da substância 3 (linchexantona) comparados com a literatura em  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz)). (Silva et al., 2023).

| Posição              | Observado                                         |                   | Literatura                         |                   |
|----------------------|---------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|
|                      | $\delta\text{ H}$                                 | $\delta\text{ C}$ | $\delta\text{ H}$                  | $\delta\text{ C}$ |
| 1                    | 13,41 (OH, s, 1H)                                 | 163,7             | 13,39 (OH, s, 1H)                  | 163,7             |
| 2                    | 6,31 (d, $J = 2,38\text{ Hz}$ , 1H)               | 96,7              | 6,29 (d, $J = 2,3\text{ Hz}$ , 1H) | 96,7              |
| 3                    | -                                                 | 165,8             | -                                  | 165,7             |
| 4                    | 6,35 (d, $J = 2,38\text{ Hz}$ , 1H)               | 92,0              | 6,32 (d, $J = 2,3\text{ Hz}$ , 1H) | 92,0              |
| 5                    | 6,70 (dd, $J = 2,4\text{ e } 0,2\text{ Hz}$ , 1H) | 98,4              | 6,68 (d, $J = 2,3\text{ Hz}$ , 1H) | 98,3              |
| 6                    | -                                                 | 163,7             | -                                  | 163,7             |
| 7                    | 6,67 (dd, $J = 2,6\text{ e } 0,8\text{ Hz}$ , 1H) | 115,4             | 6,66 (m, 1H)                       | 115,3             |
| 8                    | -                                                 | 143,4             | -                                  | 143,4             |
| 9                    | -                                                 | 182,4             | -                                  | 182,3             |
| 10                   | -                                                 | 104,1             | -                                  | 104,1             |
| 11                   | -                                                 | 156,9             | -                                  | 156,9             |
| 12                   | -                                                 | 159,4             | -                                  | 159,3             |
| 13                   | -                                                 | 112,9             | -                                  | 112,9             |
| $\text{OCH}_3$ (C-3) | 3,88 (s, 3H)                                      | 55,7              | 3,86                               | 55,6              |
| $\text{OCH}_3$ (C-6) | 3,91 (s, 3H)                                      | 55,6              | 3,89                               | 55,6              |
| $\text{CH}_3$        | 2,86 (s, 3H)                                      | 23,45             | 2,84                               | 23,4              |

## 5. CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível observar atividade antimicrobiana relevante (95%) do extrato metanólico de folhas de *S. polyphylla* contra a cepa bacteriana gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*, reportada pela primeira vez para a espécie vegetal. O extrato hexânico de folhas de *S. ulei* apresentou atividade moderada contra *Aeromonas hydrophila* (51%) e o extrato hexânico de galhos de *S. tessmannii* apresentou atividade moderada contra *Aeromonas hydrophila* (53%) e *Salmonella enterica* (54%), também reportadas pela primeira vez para ambas as espécies.

Nenhum dos extratos mostrou potencial antioxidante nos ensaios com o radical livre DPPH• e com o íon férrico em complexo com fenantrolina, porém apresentaram capacidade de redução do radical DPPH• em mistura através de eluição do extrato bruto em placa cromatográfica.

O extrato mais ativo sobre *Artemia salina* foi o extrato hexânico dos galhos de *S. tessmannii*, o qual foi escolhido para ser fracionado. O fracionamento cromatográfico permitiu o isolamento das substâncias: lichexantona e a mistura de sitosterol e estigmasterol esterificados com ácidos graxos. Este é o primeiro relato do isolamento dessas substâncias a partir de galhos de *S. tessmannii*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Faizal, A; Geelen, D. 2013. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews*, 12: 877–893.
- Alves, E.G.; Vinholis, A.H.C.; Casemiro, L. A.; Furtado, N.A.J.C.; Silva, M.L.A.; Cunha, W.R.; Martins, C. H. G. 2008. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química nova* 31: 1224-1229.
- Asfaw, M.M.; Abebe, F.B. 2021. Traditional medicinal plant species belonging to Fabaceae family in Ethiopia: A systematic review. *International Journal of Plant Biology*, 12: 8473.
- Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P. et al. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33: 1582-1614.
- Athayde, M.L.; Taketa, A.T.C.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P. 2017. Saponinas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 285-303.
- Barbosa, T.C.; Mendonça, M.S.; Muniz, M.S.D. 2021. Morphoanatomical and histochemical study of seeds of four species of *Swartzia* (Fabaceae - Papilionoideae) at Tupé Sustainable Development Reserve AM/Brazil. *Botanical Sciences*, 99: 863-876.
- Batista, A.W.S. 2021. Variação intraespecífica de pitaica (*Swartzia polyphylla* DC.) (Fabaceae) em florestas inundáveis, Caxiuanã, Pará. *Revista Terceira Margem Amazônia*. 6: 191-207.
- Bernardes, L.S.C.; Lang, K.L.; Petrovick, P.R.; Schenkel, E.P. 2017. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 107-128.
- Bezerra, J.J.L.; Pinheiro, A.A.V.; Lucena, R.B. 2021. Phytochemistry and teratogenic potential of *Mimosa tenuiflora* (willd.) poir. (Fabaceae) in ruminants: A systematic review. *Toxicon*, 195: 78-85.
- Biswas, B.; Rogers, K.; McLaughlin, F.; Daniels, D.; Yadav, A. 2013. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*, 1: 746165.
- Borges, L.P.; Amorim, V.A. 2020. Metabólitos secundários de plantas. *Revista Agrotecnologia*, 11: 54-67.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Labensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28: 25-30.

Charles, D.J. 2013. *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. Springer, London. 610 pp.

Christenhusz, M.J.M.; Byng J.W.B. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261: 201-217.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard - 10th Edition. CLSI Document M07 A10, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicroioal Agents*, 26: 343–356.

De Filippis, B.; Ammazalorso, A.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; Maccallini, C.; Amoroso, R. 2017. Anticancer activity of stilbene-based derivatives. *ChemMedChem*, 12(8): 558-570.

Dorsaz, S.; Snäkä, T.; Favre-Godal, Q.; Maudens, P.; Boulens, N.; Furrer, P.; Ebrahimi, S.N.; Hamburger, M.; Allémann, E.; Gindro, K.; Queiroz, E.F. 2017. Identification and mode of action of a plant natural product targeting human fungal pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(9): 10-1128.

Dubrovina, A.S.; Kiselev, K.V. 2017. Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, 246: 597-623.

Fabaceae in GBIF Secretariat, 2022. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset (<https://doi.org/10.15468/39omei>). Acesso em: 21/08/2023.

FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023. Fabaceae (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23178>). Acesso em: 24/08/2023.

Goel, A.; Kumar, A.; Raghuvanshi, A. 2013. Synthesis, Stereochemistry, Structural Classification, and Chemical Reactivity of Natural Pterocarpan. *Chemical reviews*, 113: 1614-1640.

Górniak, I.; Bartoszewski, R.; Króliczewski, J. 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry reviews*, 18: 241-272.

Harb, T.B.; Torres, P.B.; Pires, J.S.; Santos, D.Y.A.C.; Chow, F. 2016. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, 1: 2-6.

- Heinzmann, B.M.; Spitzer, V.; Simões, C.M.O. 2017. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 167-184.
- Hernandes, L.S.; Kato, E.T.M.; Bacchi, E.M. 2017. Alcaloides tropânicos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 349-363.
- Huang, Q.; Wang, Y.; Wu, H.; Yuan, M.; Zheng, C.; Xu, H. 2021. Xanthone Glucosides: Isolation, Bioactivity and Synthesis. *Molecules*, 26(18): 5575.
- Humphrey, A.J.; Beale, M.H. 2006. Terpenes. In: Crozier, A.; Clifford, M.N.; Ashihara, H. (Ed.). *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing, p. 47-101.
- Jain, C.; Khatana, S.; Vijayvergia, R. 2019. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10: 494-504.
- Jiménez-González, L.; Álvarez-Corral, M.; Muñoz-Dorado, M.; Rodríguez-García, I. 2008. Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 7: 125-154.
- Kapingu, M.C.; Magadula, J.J., 2008. Prenylated xanthenes and a benzophenone from *Baphia kirkii*. *Natural Product Communications*, 3(9): 1934578X0800300921.
- Kreis, W.; Munkert, J.; Pádua, R.M. 2017. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 147-166.
- Kuete, V. 2010. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. *Planta Medica*, 76: 1479–1491.
- Kumari, S.; Prya, P.; Misra, G.; Yadav, G. 2013. Structural and biochemical perspectives in plant isoprenoid biosynthesis. *Phytochemical Reviews*, 12: 255-291.
- Landim, E.M.B.S.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.; Pomini, A.M.; Pastorini, L.H.; Santin, Silvana M. Oliveira. 2021. Antiproliferative activity and chemical constituents of *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). *Natural Product Research*, 35(12): 2056-2059.
- Lima, N.M.; Marqui, S.R.; Andrade, T.J.A.S.; Silva, D.H.S. 2022. Phytochemical, metabolic profiling and antiparasitic potential from *Inga semialata* leaves (Fabaceae). *Natural Product Research*, 36(7): 1898-1903.

- Lizazman, M.A., Karunakaran, T.; Jong, V.Y.M. 2022. Trapezifolixanthone as a common constituent in the genus *Calophyllum*: An insight Review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44: 102471.
- Magalhães, A.F.; Tozzi, A.M.G.A.; Santos, C.C.; Magalhães, E.G. 2005. Swartziaboreol diterpenes from *Swartzia langsdorffii* Raddi. *Journal of Natural Products*, 68: 1290-1292.
- Marangoni, F.; Poli, A. 2010. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61: 193-199.
- Maroyi, A. 2023. Medicinal Uses of the Fabaceae Family in Zimbabwe: A Review. *Plants*, 12: 1255.
- Meirelles, A.C.; Souza, L.A.G.S. 2015. Germinação natural de oito espécies de *Swartzia* (Fabaceae, Faboideae) da Amazônia. *Scientia Amazonia*, 4: 84-92.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nicohols, D.E.; McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45: 31-34.
- Shahzad, N.; Khan, W.; Shadab, M.D.; Ali, A.; Saluja, S.S.; Sharma, S.; Al-Allaf, F.A.; Abduljaleel, Z.; Ibrahim, A.A.I.; Abdel-Wahab, A.F.; Afify, M.A.; Al-Ghamdi, S.S. 2017. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88: 786-794.
- Nattagh-Eshtivani, E.; Barghchi, H.; Pahlavani, N.; Barati, M.; Amiri, Y.; Fadel, A.; Khosravi, M.; Talebi, S.; Arzhang, P.; Ziaei, R.; Ghavami, A. 2021. Biological and pharmacological effects and nutritional impact of phytosterols: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 36: 299-322.
- Nguyen, A.T.; Malonne, H.; Duez, P.; Vanhaelen-Fastre, R.; Vanhaelen, M.; Fontaine, J. 2004. Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fitoterapia*, 75: 500-504.
- Novais, J.A.P. 2007. *Desenvolvimento e validação de método para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais secos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 113p.
- Oliveira, C.A.; Mansano, V.F.; Teixeira, S.P.; Brandes, A.F.N.; Baratto, L.C.; Leitão, S.G.; Santana, M.N.; Rodrigues, I.A.; Paulino, J.V. 2021. Bloodwood: the composition and secreting-site of the characteristic red exudate that gives the name to the *Swartzia* species (Fabaceae). *Journal of Plant Research*, 134: 127-139.
- Oliveira, F.G.S.; Araújo, C.S.; Rolim, L.A.; Barbosa-Filho, J.M.; Almeida, J.R.G.S. 2018. The genus *Hymenaea* (Fabaceae): A chemical and pharmacological review. *Studies in natural products chemistry* 58: 339-388.

- Osawa, K.; Yasuda, H.; Maruyama, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. 1992. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 40(11): 2970-2974.
- Parolin, P.; Ferreira, L.V.; Junk, W.J. 2003. Germination characteristics and establishment of trees from central Amazonian flood plains. *Tropical Ecology*, 44: 157-169.
- Pedroza, L.S.; Salazar, M.G.M.; Osorio, M.I.C.; Fachin-Espinar, M.T.; Paula, R.C.; Nascimento, M.F.A.; Oliveira, A.B.; Nunez, C.V. 2020. Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. *Fitos*, 14: 476-491.
- Rahman, A.H.M.M.; Parvin, M.I.A. 2014. Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. *Research in Plant Sciences*, 2: 6-8.
- Ramos, M.V.; Brito, D.; Freitas, C.D.T.; Gonçalves, J.F.C.; Porfirio, C.T.M.N.; Lobo, M.D. P.; Monteiro-Moreira, A.C.O.; Souza, L.A.C.; Fernandes, A.V. 2018. Proteomic identification and purification of seed proteins from native Amazonian species displaying antifungal activity. *Planta*, 248: 197-209.
- Ramos, T.Z.; Pizzolitto, E.L.; Pizzolitto, A.C. 2006. *Revista brasileira de análises clínicas*, 38(3): 197-199.
- Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. 2014. Composição Molecular das Células Vegetais. In: Evert, R.F.; Eichhorn, S.E.; Kraus, J.E.; Vauex, P.L. (Eds.). 8ª ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 18 -37.
- Remali, J.; Sahidin, I.; Aizat, W.M. 2022. Xanthone Biosynthetic Pathway in Plants: A review. *Frontiers in Plant Science*, 13:809497.
- Rodrigues, A.T. 2018. *Farmacognosia*, Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S. A, 208 p.
- Roesler, R.; Malta, L.G.; Carrasco, L.C.; Holanda, R.B.; Sousa, C.A.S.; Pastore, G.M. 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27: 53-60.
- Rojas, R.; Bustamante, B.; Ventosilla, P.; Fernandez, I.; Caviedes, L.; Gilman, R.H.; Lock, O.; Hammond, G.B. 2006. Larvicidal, antimycobacterial and antifungal compounds from the bark of the Peruvian plant *Swartzia polyphylla* DC. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54(2): 278-279.
- Rosado-Vallado, M.; Brito-Loeza, W.; Mena-Rejon, G.J.; Quintero-Marmol, E.; Flores-Guido, J.S. 2000. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. *Fitoterapia*, 71: 570-573.

- Roumy, V.; Macedo, J.C.R.; Bonneau, N.; Samaillie, J.; Azaroual, N.; Encinas, L.A.; Rivière, C.; Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Antherieu, S.; Pinçon, C.; Neut, C.; Siah, A.; Gutierrez-Choquevilca, A.; Ruiz, L. 2019. Plant therapy in the Peruvian Amazon (Loreto) in case of infectious diseases and its antimicrobial evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 249: 112411.
- Santos, A.B.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Santos, L.A.; Schmidt, T.M.; Baffa, O. 2009. Antioxidant Properties of Plant Extracts: an EPR and DFT Comparative Study of the Reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20: 1483-1492.
- Schulze, A.E.; Beelders, T.; Koch, I.S.; Erasmus, L.M.; Beer, D.; Joubert, E. 2015. Honeybush herbal teas (*Cyclopia* spp.) contribute to high levels of dietary exposure to xanthenes, benzophenones, dihydrochalcones and other bioactive phenolics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44:139-148.
- Sharifzadeh, A; Khosravi, A.R.; Shokri, H.; Shirzadi, H. 2018. Potential effect of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol) alone and in combination with fluconazole against clinical isolates of *Candida albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*. *Journal De Mycologie Medicale*, 28: 294-299.
- Silva, D.R.; Fachin-Espinar, M.T.; Nunez, C.V. 2023. Triterpenos, esteroides e lichexantona isolados dos extratos hexânicos de folhas e galhos de *Macrolobium acaciifolium* e atividade antibacteriana. *CONCILIUM*, 23: 343-356.
- Silva, E.M.; Araújo, R.M.; Freire-Filha, L.G.; Silveira, E.R.; Lopes, N.P.; Paula, J.E.D.; Braz-Filho, R.; Espindola, L.S. 2013. Clusiavaxanthone and tocotrienol series from *Clusia pernambucensis* and their antileishmanial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24: 1314-1324.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2016. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora, 502p.
- Souza, T.J.T.; Apel, M.A.; Bordignon, S.; Matzenbacher, N.I.; Zuanazzi, J.A.S.; Henriques, A.T. 2007. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 368-372.
- Swartzia polyphylla* DC. in GBIF Secretariat. 2023. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset (<https://doi.org/10.15468/39omei>). Acesso em: 30/08/2023.

*Swartzia ulei* Harms in GBIF Secretariat. 2023. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset (<https://doi.org/10.15468/39omei>). Acesso em 30/08/2023.

Takale, N.; Kothawale, T.; Ghule, B.; Kotagale, N. 2023. Isolation, identification, and quantification of stigmasterol in *Hygrophila schulli* plant by a validated high-performance thin-layer chromatography–densitometric method. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 1-13.

Takemoto, K.; Arita, M. 2009. Heterogeneous distribution of metabolites across plant species. *Physica A*, 388: 2771-2780.

Termentzi, A.; Fokialakis, N.; Skaltsounis, A.L. 2011. Natural Resins and Bioactive Natural Products Thereof as Potential Antimicrobial Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 17: 1267–1290.

The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *TAXON*, 66: 44-77.

Torke, B.M.; Mansano, V.F. 2009. A phylogenetically based sectional classification of *Swartzia* (Leguminosae-Papilionoideae). *TAXON*, 58: 913-924.

Valletta, A.; Iozia, L.M.; Leonelli, F. 2021. Impact of Environmental Factors on Stilbene Biosynthesis. *Plants*, 10(1): 90.

Verleyen, T.; Forcades, M.; Verhe, R.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; Greyt, W. 2002. Analysis of Free and Esterified Sterols in Vegetable Oils. *JAOCs*, 79: 117-122.

Vieira, L.M.M.; Kijjoa, A. 2005. Naturally-occurring xanthonoids: recent developments. *Current medicinal chemistry*, 12(21): 2413-2446.

Wagner, H.; Bladt, S. 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media, 384 p.

Williamson, G.B.; Costa, F.; Vera, C.V. 1999. Dispersal of Amazonia Trees: Hydrocory in *Swartzia polyphylla*. *Biotropica*, 31: 460-465.

Wink, M. 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 89: 164-175.

Yun, X.J.; Shu, H.M.; Chen, G.Y.; Ji, M.H.; Ding, J.Y. 2014. Chemical Constituents from Barks of *Lannea coromandelica*. *Chinese Herbal Medicine*, 6: 65-69.

Liao, Y.; Li, Z.; Zhou, Q.; Sheng, M.; Qu, Q.; Shi, Y.; Yang, J.; Lv, L.; Dai, X.; Shi, X. 2021. Saponin surfactants used in drug delivery systems: A new application for natural medicine components. *International Journal of Pharmaceutics*, 603: 120709.

Zuanazzi, J.A.S.; Montanha, J.A.; Zulcolotto, S.M. Saponinas. *In*: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 285-303.