



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Campsiandra comosa*
Benth. (FABACEAE)

LEOMARA ANDRADE DA SILVA

Manaus, Amazonas

Dezembro de 2020

LEOMARA ANDRADE DA SILVA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Campsiandra comosa*
Benth. (FABACEAE)**

ORIENTADORA: Dra. CECILIA VERONICA NUNEZ

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas, com ênfase em Botânica.

Manaus, Amazonas

Dezembro de 2020

Ficha catalográfica



DIVISÃO DO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BOTÂNICA



ATA DEFESA PÚBLICA DE TESE DE
DOUTORADO DISCENTE DO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BOTÂNICA) DO INSTITUTO
NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA.

Aos vinte e dois dias do mês de dezembro de 2020 às 14:00 horas, através do Google Meet, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dra. Daiane Martins Ramos, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Dra. Rita de Cassia Saraiva Nunomura, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Dra. Waldireny Caldas Rocha, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), tendo como suplentes: Dra. Rosa Helena Veras Mourão, da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e Dr. Jorge Luís López-Lozano, da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO, intitulada: “ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Campsiandra comosa* Benth. (FABACEAE)” discente: Leomara Andrade da Silva, sob orientação: Dra. Cecília Veronica Nunez. Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
DAIANE MARTINS RAMOS	(X) APROVADO () REPROVADO	<i>Daiane Martins Ramos</i>
RITA DE CASSIA SARAIVA NUNOMURA	(X) APROVADO () REPROVADO	<i>Rita de Cassia Saraiva Nunomura</i>
WALDIRENY CALDAS ROCHA	(X) APROVADO () REPROVADO	<i>Waldireny Caldas Rocha</i>
JORGE LUÍS LÓPEZ-LOZANO	() APROVADO () REPROVADO	
ROSA HELENA VERAS MOURÃO	() APROVADO () REPROVADO	

Manaus (AM), 22 de dezembro de 2020.

OBS: Observar as sugestões e observações realizadas pela banca na correção da tese.

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dr. Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Botânica
PO. 116/2017 - DIBOT/INPA

DEDICATÓRIA

**À minha querida mãe
e a todos os mestres que contribuíram com a minha formação.**

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de dar continuidade na minha formação, bem como o apoio para realização da minha pesquisa de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À minha orientadora, Dr^a Cecília Verônica Nunez pela oportunidade concedida em fazer parte do seu grupo de pesquisa e pelas contribuições no meu desenvolvimento profissional.

Ao grupo da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais, em especial ao Magno e Sabrina que sempre são muito prestativos e profissionais.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica por auxiliarem na ampliação dos meus conhecimentos em diferentes subáreas da Biologia. E em especial, a Dr^a Isolde Ferraz por todo apoio e ensinamentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, em especial ao grupo que estava no início da minha chegada em Manaus e me deu muito apoio e auxílio para os novos desafios no laboratório.

Aos três excepcionais amigos, Andrei, David e Lana, que estão firmes até hoje nessa missão de sermos colegas de laboratório e amigos de vida. Muito obrigada, por todos os momentos compartilhados, aprendizados e parcerias. Vocês me fizeram rir até quando estive triste e me ajudaram a ser forte diante de tantas situações difíceis. Que a parceria continue por muitos e muitos anos.

Aos demais amigos de longa data, Aline, Daniela, Rosa Mourão, Tácia, Valéria, Vinicius e Yasmim que sempre me apoiaram e mesmo geograficamente distantes se fazem presente de alguma forma na minha vida.

Ao meu melhor amigo e meu amor, Cárllison Oliveira que sempre foi testemunha de cada passo dado na minha vida e é responsável por todos os passos que não recuei nesta fase em Manaus. Obrigada por compartilhar sua sabedoria e companherismo.

À minha família, em especial minha mãe que mesmo não compreendo muito o espaço acadêmico, sempre se preocupa com meus objetivos e roga a Nossa Senhora para que me proteja. Todo meu amor e eterno agradecimento, afinal sem ela nem estaria aqui hoje.

A todas as outras pessoas queridas que não foram mencionadas, mas que carinhosamente estão no meu coração.

À Deus, por me guiar e proporcionar sabedoria nos momentos bons e ruins.

“Não coloque um ponto final nas suas esperanças.”

Pe. Fábio de Melo.

RESUMO

Este trabalho apresenta dados do estudo químico e biológico dos extratos hexânico e metanólico das folhas, ramos e casca do tronco de *Campsiandra comosa* Benth. O material vegetal coletado foi seco, moído e extraído com hexano, metanol e água consecutivamente, para obtenção dos extratos. Após a análise fitoquímica dos extratos brutos por RMN de ^1H , o extrato metanólico das cascas foi selecionado e submetido à prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada, fracionado e isolado as respectivas substâncias: o β -sitosterol (um fitosterol), o lupeol (um triterpeno) e dois flavonoides: 4',5,7-triidroxiflavona (apigenina) e 7,4'-dihidroxiflavona. O mesmo método foi usado para o extrato hexânico das folhas nas qual, outro flavonóide também foi isolado, a 3,7,4'-trimetóxi-quercetina. As substâncias isoladas foram identificadas por meio da análise de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (técnicas uni e bidimensionais) e espectrometria de massas, e os dados foram comparados com a literatura acadêmica. Para o estudo biológico dos extratos, foram avaliados a toxicidade, o potencial antioxidante, antibacteriano e antiangiogênico dos extratos metanólico e hexânico das folhas, ramos e cascas de *C. comosa*. Os extratos apresentaram atoxicidade frente à *Artemia salina*, e quando avaliada sua capacidade antibacteriana, o maior percentual de inibição foi observado apenas para os extratos metanólicos de ramos (69%) e casca do tronco (52%), na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ contra *P. fluorescens*. Porém, para que os extratos sejam considerados ativos contra as cepas analisadas, eles devem ter valores de inibição $\geq 80\%$. Apenas os extratos metanólicos apresentaram atividade antioxidante, e com exceção dos extratos hexânicos dos ramos e da casca, os demais extratos foram ativos no processo de inibição da angiogênese. Os resultados alcançados neste trabalho são dados importantes para o conhecimento científico de *C. comosa* destacando as substâncias isoladas, bem como a ausência de toxicidade e o potencial antiangiogênico dos extratos. Em diferentes contextos, pode-se considerar a contribuição para estudos futuros, como a análise quimiotaxonômica do gênero e a avaliação de um potencial produto químico natural.

Palavras chave: Angiogênese, Antioxidante, Antibacteriano, Toxicidade, RMN.

ABSTRACT

This work presents data from the chemical and biological study of the hexanic and methanolic extracts of the leaves, branches and bark of the trunk from *Campsiandra comosa* Benth. The plant material collected was dried, ground and extracted with hexane, methanol and water consecutively, to obtain the extracts. After phytochemical analysis of the crude extracts by ¹H NMR, the methanolic extract of the barks was selected and submitted to phytochemical prospection by thin layer chromatography, fractionated and isolated the respective substances: β -sitosterol (a phytosterol), lupeol (a triterpene) and two flavonoids: 4',5,7-trihydroxyflavone (apigenin) and 7,4'-dihydroxyflavone. The same method was used for the hexanic extract of the leaves in which another flavonoid was also isolated, the 3,7,4'-trimethoxy-quercetin. The isolated substances were identified by analyzing of ¹H and ¹³C NMR spectra (uni- and bidimensional techniques) and mass spectrometry, and the data were compared with the academic literature. For the biological study of the extracts, were evaluated the toxicity, antioxidant, antibacterial and antiangiogenic potential of the methanolic and hexanic extracts of the leaves, branches and barks of *C. comosa*. The extracts showed atoxicity, and when their antibacterial capacity was evaluated, the highest percentage of inhibition was observed only for methanolic extracts from branches (69%) and trunk bark (52%), at a concentration of 1000 μ g/mL against *P. fluorescens*. However, for the extracts to be considered active against the strains analyzed, they should have inhibition values \geq 80%. Only the methanolic extracts showed antioxidant activity, and except for the hexanic extracts of the branches and bark, the other extracts were active in the process of angiogenic inhibition. The results achieved in this work are important data for the scientific knowledge of *C. comosa* highlighting the isolated substances, as well as the absence of toxicity and antiangiogenic potential of the extracts. In different contexts, one can consider the contribution to future studies, such as the chemotaxonomic analysis of the genus and the evaluation of a potential natural chemical product.

Keywords: Angiogenesis, Antioxidant, Antibacterial, Toxicity, NMR.

SUMÁRIO

Introdução.....	20
Revisão Bibliográfica.....	21
Plantas como fonte de substâncias bioativas	21
Substâncias aromáticas	23
Terpenos	24
Alcaloides	26
Propriedades biológica e química de substâncias ativas em extratos vegetais	27
Toxicidade de plantas.....	27
Angiogênese e antiangiogênese	28
Antibacterianos	31
Antioxidantes	32
Fabaceae	34
Caesealpinioideae.....	37
Gênero <i>Campsiandra</i>	37
<i>Campsiandra comosa</i> Benth.	38
Referências	40
Objetivos	53
Objetivo geral	53
Objetivos específicos	53
CAPÍTULO 1	54
Estudo fitoquímico das folhas e cascas de <i>Campsiandra comosa</i> Benth.....	54
Introdução.....	55
Material e Métodos	56
Coleta e preparo do material vegetal	56
Obtenção dos extratos de <i>C. comosa</i>	57
Cromatografia em camada delgada dos extratos de <i>C. comosa</i>	58

Fracionamento do extrato metanólico das cascas do tronco de <i>C. comosa</i>	59
Fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	61
Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	66
Fracionamento coluna CEHf 19-21	67
Fracionamento da coluna CEHf 22-23.....	70
Fracionamento CEHf (22-23) 2-3.....	70
Fracionamento CEHf (22-23) 4.....	70
Fracionamento CEHf 25-28	71
Fracionamento CEHf (34).....	72
Identificação das substâncias isoladas	74
Resultados	75
Rendimento dos extratos obtidos.....	75
Análise por CCDC dos extratos de <i>C. comosa</i>	76
Legenda: Órgão da planta utilizado 1) folhas, 2) ramos e 3) cascas.	76
Isolamento e identificação de substâncias.....	76
Substância 1	77
Substância 2.....	79
Substância 3.....	81
Substância 4.....	87
Figura 33: Mapa de correlação HMBC da 7,4-dihydroxiflavona (DMSO d ₆ - 300 e 75 MHz).	89
Substância 5.....	90
Referências	95
CAPÍTULO 2	99
Avaliação das atividades tóxica, antiangiogênica, antioxidante e antimicrobiana de <i>Campsiandra comosa</i> Benth.....	99
Introdução.....	100
Material e métodos.....	101

Coleta e preparo do material vegetal	101
Obtenção dos extratos de <i>C. comosa</i>	101
Avaliação da toxicidade dos extratos de <i>C. comosa</i> frente à <i>Artemia salina</i>	102
Atividade antioxidante dos extratos de <i>C.comosa</i>	103
Método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	103
Método Fe ³⁺ em complexo com a fenantrolina	103
Avaliação da Atividade Antibacteriana	105
Avaliação antiangiogênica pelo método CAM.....	106
Resultados	108
Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	108
Atividade antioxidante pelos métodos DPPH e Fe ³⁺ /fenantrolina.....	109
Avaliação da Atividade Antibacteriana	112
Avaliação da atividade antiangiogênica.....	114
Conclusão	119
Referências	120
Anexos	
Espectro de RMN de ¹ H da substância 1, β-sitosterol (CDCl ₃ , 300 MHz).....	125
Espectro de RMN de ¹ H da substância 2, lupeol (CDCl ₃ , 300 MHz).....	126
Espectro RMN de ¹ H da apigenina em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 e 75 MHz).	127
Espectro de RMN de ¹ H de 7,4-dihidroxi-flavona (DMSO- <i>d</i> ₆ - 300 e 75 MHz).	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias bioativas de acordo com sua classe química e sua atividade biológica ou química.....	22
Tabela 2: Atividades biológicas e químicas de algumas espécies da família Fabaceae	35
Tabela 3: Propriedades biológicas descritas na literatura para o gênero <i>Campsiandra</i>	38
Tabela 4: Sistemas utilizados no fracionamento da CFDcs 3-4 do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	59
Tabela 5: Sistemas utilizados no fracionamento da CFD 3-4_ 2-6 do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	60
Tabela 6: Sistemas utilizados no fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	62
Tabela 7: Sistemas utilizados no fracionamento da CFA 5-6 proveniente da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	62
Tabela 8: Sistemas utilizados no fracionamento da CFA 7-9 proveniente da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	65
Tabela 9: Sistemas utilizados no fracionamento do extrato hexânico de folhas (CEHf) de <i>C. comosa</i>	67
Tabela 10: Sistemas utilizados no fracionamento da coluna CEHf 19-21 das folhas de <i>C. comosa</i>	68
Tabela 11: Sistemas utilizados no fracionamento da (CEHf 19-21_2-3) do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	68
Tabela 12: Sistemas utilizados no fracionamento da CEHf 22-23 do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	70
Tabela 13: Sistemas utilizados no fracionamento da CEHf 25-28 do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	71
Tabela 14: Sistemas utilizados no fracionamento da CEHf 34 do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	73
Tabela 15: Massa dos extratos obtidos e seus respectivos rendimentos a partir da extração com.....	75
Tabela 16: Deslocamentos químicos (δ) RMN de ^1H comparados com os valores padrões da literatura.	78
Tabela 17: Deslocamentos químicos (δ) RMN de ^1H comparados com os valores padrões da literatura.....	80

Tabela 18: Extratos e seus códigos utilizados para as amostras.....	101
Tabela 19: Escala de interpretação da atividade antioxidante (Martins <i>et al.</i> , 2014).	105
Tabela 20: Cepas e suas respectivas identificações, utilizadas no ensaio antibacteriano.	105
Tabela 21: Taxa de sobrevivência de <i>A. salina</i> frente ao teste de toxicidade em diferentes concentrações dos extratos hexânicos e metanólicos de <i>C. comosa</i>	108
Tabela 22: Atividade antioxidante dos extratos hexânicos e metanólicos de <i>C. comosa</i> frente ao DPPH.....	110
Tabela 23: Atividade antioxidante dos extratos hexânicos e metanólicos de <i>C. comosa</i> frente ao Fe ³⁺ / fenantrolina.....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alguns exemplos de substâncias aromáticas de ocorrência em plantas.....	24
Figura 2: Alguns exemplos de terpenos de ocorrência em plantas.....	25
Figura 3: Alguns exemplos de alcaloides de ocorrência em plantas.	26
Figura 4: Alguns exemplos de substâncias antiangiogênicas isoladas de plantas.	30
Figura 5: <i>C. comosa</i> : (a) no seu habitat natural, (b) fruto e (c) inflorescência.....	39
Figura 6: Mapa de identificação do Lago Catalão (AM), local de coleta de <i>C. comosa</i>	57
Figura 7: Fluxograma demonstrando a obtenção dos extratos de folhas, ramos e cascas de <i>C. comosa</i>	58
Figura 8: Fluxograma do fracionamento e isolamento das substâncias 1, 2 e 3 no extrato metanólico da fase DCM das cascas de <i>C. comosa</i>	61
Figura 9: Fluxograma do fracionamento da CFA 5-6_25-28 da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	63
Figura 10: Fluxograma do fracionamento da CFA 5-6_30-32_2 da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	64
Figura 11: Fluxograma do fracionamento da (CFA 7-9) e isolamento da substância 6 *(ainda em análise) da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i>	66
Figura 12: Fluxograma do fracionamento da fração CEHf 19-21 do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	69
Figura 13: Fluxograma do fracionamento da fração CEHf 25-28 do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	72
Figura 14: Fluxograma do fracionamento da fração CEHf 34 do extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	73
Figura 15: Análise por CCDC dos extratos hexânicos e metanólicos	76
Figura 16: Estrutura molecular do β -sitosterol.	77
Figura 17: Espectro de massa molecular da substância β -sitosterol.	77
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da substância 1, β -sitosterol (CDCl_3 , 300 MHz).	78
Figura 19: Estrutura molecular do lupeol.....	79
Figura 20: Espectro de massas da substância lupeol	80
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H da substância 2, lupeol (CDCl_3 , 300 MHz).....	81

Figura 22: Estrutura molecular da substância 4',5,7-trihidroxi-flavona.	82
Figura 23: Espectro de massa molecular da substância 3.	82
Figura 24: Sinais dos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B de um flavonoide.	83
Figura 25: Espectro RMN de ¹ H da apigenina em DMSO- <i>d</i> ₆ (300 e 75 MHz).....	83
Figura 26: Mapa de correlação HSQC da substância 3 (DMSO <i>d</i> ₆ ; 300 e 75 MHz).....	84
Figura 27: Mapa de correlação COSY da substância 3 (DMSO <i>d</i> ₆ - 300 e 75 MHz).	85
Figura 28 : Espectro de ¹ H RMN do flavonoide Apigenina (DMSO <i>d</i> ₆ - 300 e 75 MHz)	86
Figura 29: Estrutura molecular da 7,4'-dihidroxi-flavona.	87
Figura 30: Sinais de hidrogênios em 7,88 e 6,91 ppm, característicos de flavonoides.	87
Figura 31: Espectro de ¹ H de RMN da 7,4-dihidroxi-flavona (DMSO- <i>d</i> ₆ - 300 e 75 MHz)....	88
Figura 32: Mapa de correlação HSQC ¹ H de 7,4-dihidroxi-flavona (DMSO <i>d</i> ₆ - 300 e 75 MHz).	88
Figura 33: Mapa de correlação HMBC da 7,4-dihidroxi-flavona (DMSO <i>d</i> ₆ - 300 e 75 MHz).	89
Figura 34: Mapa de correlação COSY da 7,4-dihidroxi-flavona (DMSO <i>d</i> ₆ - 300 e 75 MHz). 90	
Figura 35: Estrutura molecular 3,7,4'-trimetóxi-quercetina.....	91
Figura 36: Espectro de ¹ H de RMN do flavonoide 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (CDCl ₃ - 300 e 75 MHz).	92
Figura 37: Mapa de correlação HSQC do flavonoide 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (CHCl ₃ <i>d</i> - 300 e 75 MHz).	92
Figura 38: Mapa de correlação HMBC do flavonoide 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (CHCl ₃ <i>d</i> - (300 e 75 MHz).....	93
Figura 39: Ilustração representativa do ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	102
Figura 40: Ilustração representativa do ensaio antioxidante com DPPH e Fe ³⁺ /Fenantrolina.	104
Figur 41. Ilustração representativa do ensaio antibacteriano	106
Figura 42: Ilustração representativa do ensaio antiangiogênico pelo método HET-CAM. ...	107
Figura 43: Curva de calibração do ácido ascórbico utilizado como padrão para o ensaio antioxidante.	109

Figura 44: Percentual de inibição, obtidos pelos extratos de <i>C. comosa</i>	1093
Figura 45: Imagens da rede vascular das membranas corioalantóicas, após o tratamento com o controle e o extrato metanólico das cascas de <i>C. comosa</i> , sendo (A) FoMeOH, (B) RaMeOH e (C) CsMeOH.....	115
Figura 46: Percentual de vasos sanguíneos inibidos pelos extratos metanólicos de <i>C. comosa</i> . (A): folhas; (B): ramos; (C): cascas, em diferentes concentrações e comparado ao controle negativo (CN).	116
Figura 47: Imagens da rede vascular das membranas corioalantóicas, após o tratamento com o controle (CN) e o extrato hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	117
Figura 48: Percentual de vasos sanguíneos inibidos pelos extratos hexânico das folhas de <i>C. comosa</i>	117

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- ^{13}C – Carbono treze
- CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
- CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
- CDCl_3 – Clorofórmio Deuterado
- ^1H – Hidrognio
- INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- AA – cido ascórbico
- Acetil-CoA- Acetilzozenzima A
- AcOEt – Acetato de Etila
- APCI – Atmospheric-pressure chemical ionization
- ATCC: American Type Culture Colletion
- BHA- hidroxianisol butilado
- BHT- hidroxitolueni butilado
- $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ - Sulfato crico
- CHI – Chalcona isomerase
- CHS – Chalcona sintase
- CL_{50} – Concentração letal
- CLSI – Clinical and Laboratory Sstandards Institute
- cm – centímetro
- CN – Controle negativo
- COSY – Correlation Spectroscopy
- DCM – Diclorometano
- CsHex- Extrato hexano das cascas
- CsMeOH - Extrato metanólico das cascas
- Da- Dalton
- DAHP – 3-desoxi-d-arobino-heptulosnico-7-fosfato
- DMAPP – dimetilalil fosfato
- DMSO - Dimetilsufóxido
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DMSO-d_6 – Dimetilsulfóxido Deuterado
- DPPH -2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- E1 - idade embrionária de 1 dia

E2 – idade embrionária de 2 dias
E6 - idade embrionária de 6 dias
E8- idade embrionária de 8 dias
EM – Espectrometria de massa
EROS – Espécies reativas de oxigênio
ESI – Isopentil difosfato
F3H – Flavona-3-hidroxilase
FeCl₃ – Cloreto Férrico
FoHex- Extrato hexano das folhas
FoMeOH – Extrato metanólico das folhas
g- grama
g/L – grama por litro
H – altura
h – altura
H₂O – água
HCl – ácido clorídrico
HET-CAM – Teste da membrana coriográfica da galinha
Hex – Hexano
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC – High Performace Liquid Cromatography
HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Coherence
HUEC – Artéria umbilical endotelial humana
Hz – hertz
IOC/FDA: Instituto Osvaldo Cruz – Food and Drug Administartion.
IPP – Isopentil fosfato
IV – Infravermelho
J- constante de acoplamento
KHz – kilohertz
KV- Kilovats
L- litro
LABB-INPA - Laboratório de Bioprospeção e Biologia do Inpa
LC/MS –
LC-DAD-MS - Cromatografia Líquida Ultra Rápida Acoplada a Detector por Arranjo de Diodos e a Espectrômetro de Massas

m/z – relação massa por carga
MeOH – Metanol
MEP- 2-C-metil-D-eritriitol-4-fosfato
mg – miligrama
mg/mL – miligrama por microlitro
MHz- megahertz
min – minutos
mL- microlitro
mm – milímetro
nm – nanômetro
NP/PEG – defenilboriloxietilamina / polietilenoglicol
OG- octilo
OH - hidroxila
PEP- ácido fosfoenolpirúvico
PG- galato de propril
ppm – parte por milhão
RaHex- Extrato hexano dos ramos
RaMeOH – Extrato metanólico dos ramos
RMN - ressonância magnética nuclear
S- sul
TBHQ- terc-butilhidroquinona
TGF- fatores de crescimento transformados
TMS - tetrametilsilano
TNF- fatores de necrose tumoral
tR – tempo de retenção
UV - ultravioleta
VEGF- fator de crescimento endotelial vascular
W- oeste
 $\mu\text{g/mL}$ – micrograma por microlitro
 μL – microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

' – minutos

< – menor

> – maior

\geq – maior igual que

\emptyset – diâmetro

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

β – beta

δ – deslocamento químico

Introdução

As plantas presentes em diferentes ecossistemas apresentam uma variedade de micromoléculas que viabilizam a adaptação em ambientes específicos e possibilita que esses organismos vegetais desempenhem funções em resposta ao estresse biótico e abiótico, flexibilidade metabólica e de desenvolvimento, além de interações com outros organismos (Lim & Bowles, 2012). Esse fenômeno da biodiversidade com o arsenal químico presente na natureza caracteriza a evolução de diversos produtos químicos naturais, a partir de moléculas com diferentes estruturas e uma variedade de grupos funcionais formando substâncias que podem interagir diretamente se ligando com outras moléculas biológicas específicas (McChesney *et al.*, 2007).

A forma mais utilizada para o isolamento de produtos naturais bioativos tem sido realizada com o auxílio de bioensaios apropriados, envolvendo frequentes fracionamentos e o monitoramento das atividades biológicas almejando a identificação das substâncias ativas (Brusotti *et al.*, 2014). Além disso, o conhecimento das atividades biológicas e/ou substâncias químicas de plantas é associada também a informações valiosas para novas fontes econômicas e na expansão da quimiotaxonomia, biossíntese, entre outros (Farnsworth, 1966).

Essa variedade de substâncias, em sua maioria desconhecidas, estão inseridas em diferentes táxons como em espécies representantes da família Fabaceae. Uma família botânica identificada em todos os biomas brasileiros, no qual é utilizada em diferentes propósitos, como fontes de alimentos, produtos farmacêuticos, setores agrícolas e outras matérias-primas (Morris, 1999; BFG, 2015). No entanto, por ser muito diversa e amplamente distribuída, Fabaceae ainda apresenta diversas lacunas quanto ao conhecimento do potencial químico e biológico de várias espécies.

Uma dessas espécies pouco conhecida é *Campsiandra comosa* Benth., uma árvore abundante em vários estados da região Norte do Brasil e comum em ambientes de várzea (Souza, 2012). Trata-se de uma espécie que na literatura apresenta poucas informações, com alguns estudos referentes a morfologia, uso etnobotânico, além de testes de triagens com seus extratos (Silva *et al.*, 1988; Jovel *et al.*, 1996). Logo, é pertinente pesquisas mais abrangentes que busquem caracterizar o conhecimento químico e suas propriedades biológicas, fundamentais para ampliar as investigações sobre o potencial tanto de *C. comosa*, assim como de Fabaceae e agregar novas informações para futuros estudos. Além disso, *C. comosa* está inserida em locais frágeis (floresta de igapó) e de difícil recuperação, devido à intervenção humana e reestruturação mais lenta da flora quando atingida, definindo também uma

importância ecológica e estrutural na manutenção desse ecossistema (Junk *et al.*, 1989; Almeida *et al.*, 2004).

Na pesquisa de produtos naturais, realizar o estudo biológico, além de isolar e identificar substâncias presentes e/ou que possam apresentar princípios ativos provenientes de seus extratos torna-se fundamental para a realização da pesquisa de uma planta. Visto que são informações básicas, mas não menos importante, estritamente essenciais na exploração dos recursos vegetais e suas interações.

Revisão Bibliográfica

Plantas como fonte de substâncias bioativas

As plantas são capazes de produzir uma enorme diversidade de metabólitos, muito maior do que qualquer outro organismo (Wang *et al.*, 2019). Algumas espécies podem produzir um subconjunto de metabólitos com uma variação particularmente abundante, decorrente principalmente do ambiente em que se encontra (Ferne & Tohge, 2017). Logo, esse arsenal de substâncias fornece às plantas um meio eficaz para defesa e condução de estresses causados por fatores edafoclimáticos e organismos “vivos”, que naturalmente são expostos ao longo da vida. Ou seja, regulam a interação entre plantas e meio ambiente e mediam alguns aspectos fisiológicos como o desenvolvimento, reprodução, simbiose e outros (Ncube & Staden, 2015).

Quanto à sua classificação, os metabólitos produzidos por plantas são caracterizados em primários e secundários. Os metabólitos especializados (secundários) são formados a partir dos metabólitos primários que fornecem substâncias essenciais para homeostase celular, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos e ácidos graxos. Eles são definidos como permanentes nas plantas, porém algumas vias metabólicas já apresentam uma diversidade evolutiva (Maeda, 2019). Os metabólitos secundários não são fundamentais para os processos básicos, porém desempenham funções essenciais na adaptação, sobrevivência e interação. Ocorrem em baixa concentração e em células específicas ou órgãos da planta, no qual podem ser substâncias bioativas que exercem efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos em humanos ou animais (Bougard *et al.*, 2001; Azmir *et al.*, 2013).

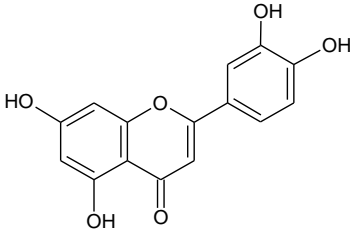
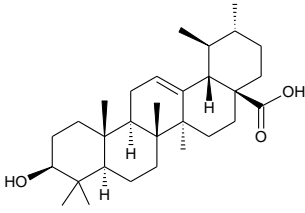
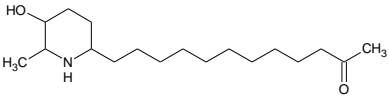
Os metabólitos secundários são formados por uma grande variedade de moléculas, alguns são mais restritos e estão presentes a uma espécie ou a um grupo taxonômico (Fang *et al.*, 2018). E com a evolução de metodologias para elucidação de substâncias químicas, foi possível caracterizar até as menores substâncias presentes nas plantas. Além disso, esses estudos demonstraram a diversidade e complexidade química sintetizada pelos vegetais. Esses

metabólitos são formados de acordo com a coevolução de plantas, insetos, microrganismos e mamíferos, que por sua vez, conduz a síntese de metabólitos com funções de defesa, ou atração (Rhodes, 1994).

Dessa forma, os metabólitos secundários com uma rica diversidade estrutural, são classificados de acordo com sua rota biossintética e podem ser divididos em três classes principais: substâncias aromáticas, terpenos e alcaloides (Bourgad *et al.*, 2001).

Os metabólitos secundários, presentes nessas diferentes classes químicas são um grupo heterogêneo de substâncias de ocorrência natural que são utilizados também para identificar novas promissoras biomoléculas provenientes de espécies vegetais (Anand *et al.*, 2019). Em função dessas propriedades, diversas substâncias são isoladas e avaliadas quanto sua eficácia biológica, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Substâncias bioativas de acordo com sua classe química e sua atividade biológica ou química.

Classe	Substância	Atividade	Referências
Flavonoide		Neuroprotetora	Patil <i>et al.</i> , 2014
		Antiangiogênica	Zang <i>et al.</i> , 2017
		Alelopatia	Wang <i>et al.</i> , 2018
		Anti-inflamatória	Aziz <i>et al.</i> , 2018
		Antitumoral	Imran <i>et al.</i> , 2019
Luteolina			
Terpeno		Antituberculose	Woldemichael <i>et al.</i> , 2003
		Anti-herpes	Bag <i>et al.</i> , 2012
		Antileshimania	Yamaomotto <i>et al.</i> , 2014
		Antimicrobiana e antioxidante	Nascimento <i>et al.</i> , 2014
		Antifúngica	Shu <i>et al.</i> , 2019
ácido ursólico			
Alcaloide		Antimicrobiana	Sansores-Peraza <i>et al.</i> , 2000
		Anti-inflamatório e Antinociceptivas	Silva <i>et al.</i> , 2012
		Antimalárica	Pivatto <i>et al.</i> , 2014
		Antiproliferativa	Pereira <i>et al.</i> , 2016
(-)-cassina			

Substâncias aromáticas

A formação de substâncias aromáticas pode ocorrer através da Acetil-CoA (Acetilcoenzima A), mas o principal caminho desses metabólitos é a via do ácido chiquímico, na qual a combinação de uma molécula de ácido fosfoenolpirúvico (PEP) originada da glicólise e a eritrose-4-fosfato (derivada da pentose fosfato) formam um açúcar de sete carbonos chamado DAHP (3-desoxi-d-arabino-heptulosônico-7-fosfato) sendo este ciclizado e reduzido para a formação do chiquimato. A via do ácido chiquímico também é encarregada pela formação de proteínas, que exercem funções importantes nos tecidos vegetais, responsáveis diretamente na formação de fenólicos (Karakaya, 2004; Cohen & Kennedy, 2010).

A partir desse processo pode ocorrer a formação de ácidos fenólicos, fenóis simples que apresentam apenas um grupo carboxila que também podem ser precursores para outras substâncias, ou podem ser produzidos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano, iniciando a via do fenilpropanoide (Dias *et al.*, 2016). A produção desses aminoácidos aromáticos apresenta um mecanismo de resposta com a função de regulação de fluxos. Uma maior produção de triptofano, por exemplo, provocará um fluxo de carbono para a produção de fenilalanina e tirosina (Verpoorte *et al.*, 1999).

Com isso, inicia-se a produção de fenólicos mais complexos a partir da desaminação da fenilalanina em ácido cinâmico (formando cumarinas) e depois a conversão em ácido *p*-cumárico. A partir da geração de ácido *p*-cumárico pode haver à formação de ácidos hidroxicinâmicos (como exemplo o ácido caféico) ou ácido *p*-cumárico que podem levar à formação de lignina. Através das enzimas CHS (chalcona sintase), CHI (chalcona isomerase) e F3H (flavanona-3-hidroxilase), o ácido *p*-cumárico é também convertido em flavonóis e flavan-3-ols, esses formam proantocianidinas e antocianinas (Dias *et al.*, 2016).

Estruturalmente, o grupo de fenólicos apresenta um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila, variando de simples moléculas fenólicas a substâncias altamente polimerizadas (Bravo 1998). São caracterizados em diferentes classes (Fig. 1) como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, ligninas e taninos (Shahidi & Yeo, 2018).

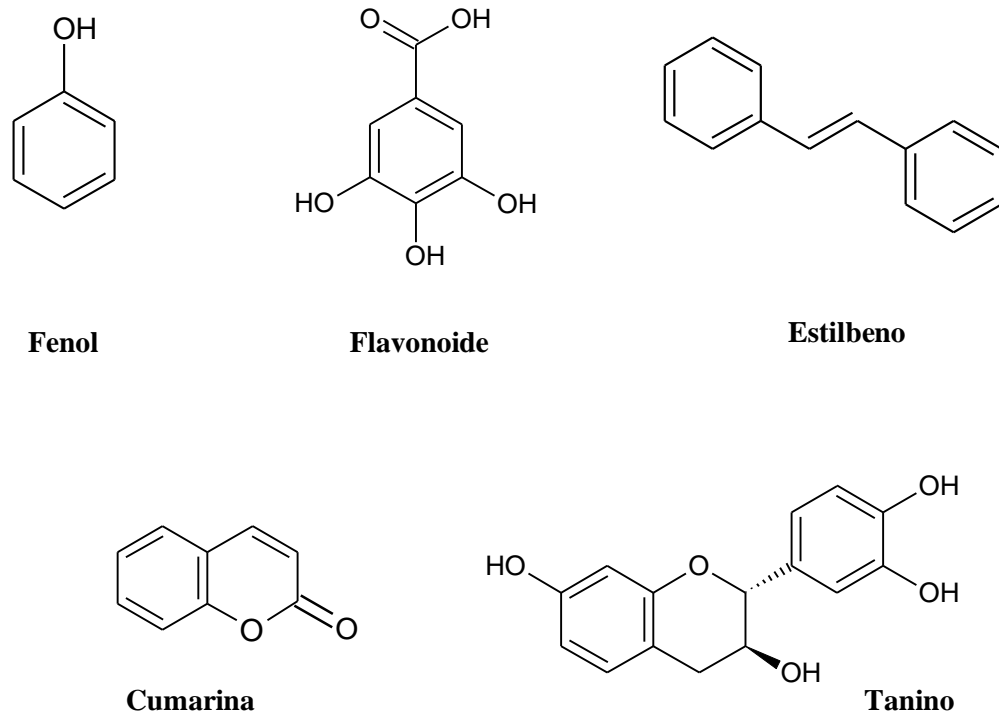


Figura 1: Alguns exemplos de substâncias aromáticas de ocorrência em plantas.

As substâncias fenólicas além de exercerem função no crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas, estão entre as principais substâncias ativas com diferentes propriedades biológicas e farmacológicas tais como, antioxidantes, anti-inflamatórios, anticâncer, antimicrobiano, antialérgico, antiviral, cardioprotetor, entre outros (Tungmunnithum *et al.*, 2019).

Terpenos

Os terpenos são uma grande e variável classe de metabólitos produzidos por plantas e alguns animais (Paduch *et al.*, 2007). São derivados de moléculas precursoras de cinco carbonos, o isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil fosfato (DMAPP). Sua biossíntese é formada por duas vias independentes, a via do mevalonato (MVA), que opera no citosol das plantas e pela via do 2-C-metil-D-eritriol-4-fosfato (MEP), encontrada nos plastídios (Cheng *et al.*, 2007).

Na natureza, os terpenos ocorrem como hidrocarbonetos, ou variedades oxigenadas que integram álcoois, éteres, ésteres, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos. Esses terpenoides formam o maior grupo de substâncias naturais com diferentes estruturas conhecidas na literatura (Maiome & Baran, 2007; Qiu *et al.*, 2017). De acordo com o número de unidades de isopreno em uma molécula, os terpenos podem ser classificados como:

monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos (C_{5n}) (Fig. 2) (Zurich, 1953).

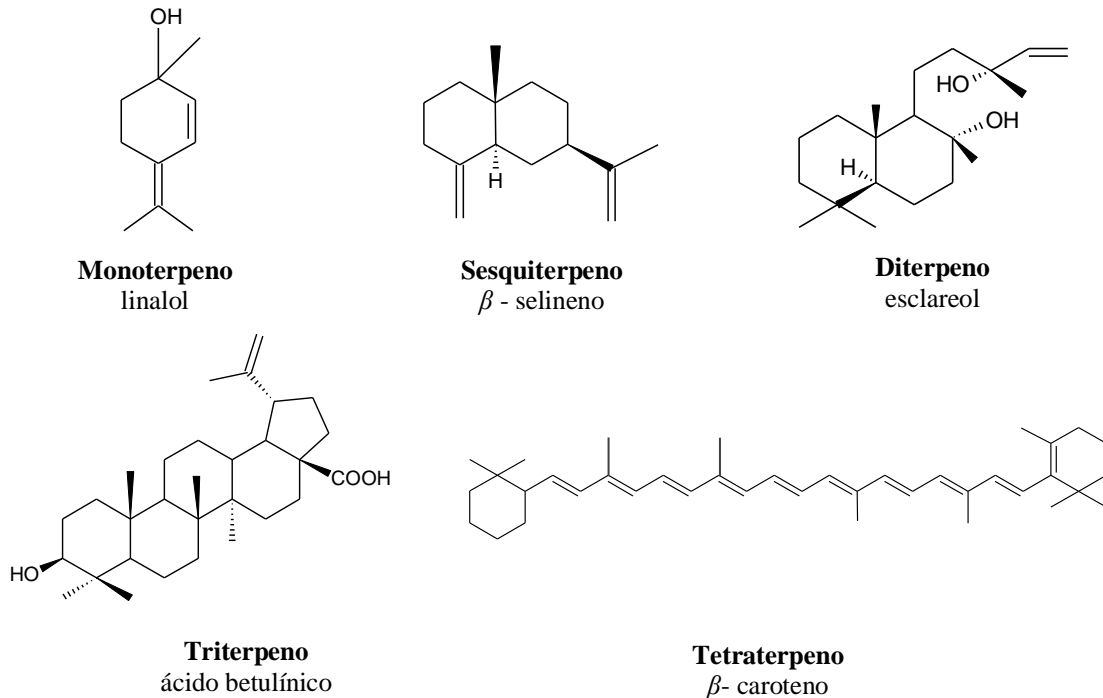


Figura 2: Alguns exemplos de terpenos de ocorrência em plantas.

Substâncias terpênicas, no geral, são abundantes em legumes, frutos e flores. Podem estar em alta concentração nas estruturas reprodutivas das plantas durante ou pós-floração. Além disso, altas concentrações podem ser atrativas (fragrância em plantas) ou repelentes (toxicidade para herbívoros e patógenos) (Theis & Lerdau, 2003). Logo, possuem um alto valor econômico em produtos cosméticos, farmacêuticos, alimentícios, entre outras aplicações industriais (Caputi & Aprea, 2011).

Para terpenos são documentadas relevantes informações biológicas, compreendendo funções estruturais, metabólicas e fisiológicas. Dessa forma, diferentes atividades são descritas, como por exemplo, antibacteriana, antifúngica, antihiperlipidêmica, antiparasitária, anticâncer, anti-inflamatória, e outras (Theis & Lerdau, 2003; Paduch *et al.*, 2007).

Alcaloides

Os alcaloides são um grupo de importantes metabólitos secundários encontrados em plantas, animais marinhos e microrganismos (Cordell *et al.*, 2001). A maioria dos alcaloides é derivada do metabolismo dos aminoácidos alifáticos e dos aminoácidos aromáticos e quimicamente formam um grupo de substâncias que apresentam nitrogênio, com um ou mais nitrogênios ligados a um anel heterocíclico (Debnath *et al.*, 2018).

Atualmente, são consideradas algumas subclasses de acordo com o esqueleto de carbono dos alcaloides. Desse modo, são classificados em: alcaloides verdadeiros, originados de aminoácidos, que possuem anel heterocíclico com nitrogênio; protoalcaloides também derivados de aminoácidos, mas não apresentam nenhum anel heterocíclico ligado a nitrogênio; e pseudoalcaloides, derivados de outras vias e que possuem anel heterocíclico com nitrogênio (Fig. 3). No geral, os alcaloides também são classificados e divididos em alcaloides heterocíclicos e não heterocíclicos (Sireesha *et al.*, 2019).

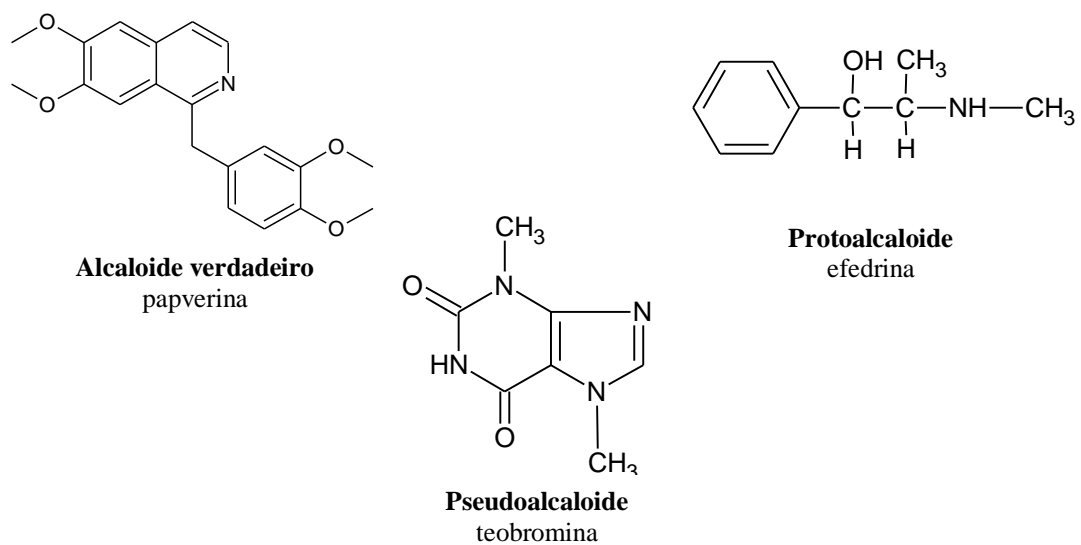


Figura 3: Alguns exemplos de alcaloides de ocorrência em plantas.

Os alcaloides são conhecidos por apresentarem um papel importante na defesa química das plantas, atuando com efeitos fisiológicos que exercem sobre os animais, como insetos. Além disso, apresentam potentes propriedades biológicas de importância veterinária, farmacológica e para medicina (Adamisk *et al.*, 2020). Com base nisso, esses fitoconstituintes podem atuar como narcóticos analgésicos, anticâncer, antiviral, relaxante muscular,

antimicrobiano, antioxidante, quimioterápicos, estimulantes do sistema nervoso central, entre outros (Bribi, 2018). Todo esse potencial medicinal aumenta o interesse para a aplicação industrial, e são designadas inúmeras pesquisas para extração de alcaloides em plantas (Peng *et al.*, 2019).

No entanto, existe uma distribuição mais específica para determinados grupos, onde esses alcaloides são frequentemente usados como marcadores quimiotaxonômicos (Wink, 2008). Muitos deles já foram isolados e caracterizados em diferentes famílias botânicas. Entre as mais importantes estão Amarylidaceae, Annonaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Buxaceae, Celastraceae, Fabaceae, Lauraceae, Liliaceae, Loganiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Solanaceae (Cordell *et al.*, 2011).

Propriedades biológica e química de substâncias ativas em extratos vegetais

Atualmente, pesquisas desenvolvidas com produtos naturais abrangem plantas (25%), microrganismos (13%) e animais (3%), que representam vantagens significativas por apresentar uma diversidade química como fontes que podem ser utilizadas para a saúde e o bem estar humano (Calixto, 2019). Portanto, na busca de princípios ativos em vegetais é importante compreender que a priori, qualquer substância presente em uma planta pode ser considerada um princípio ativo, independente da sua concentração ou de informações conhecidas ou não sobre a molécula (Cechinel Filho, 1997).

Existem vários métodos utilizados na investigação da atividade de um alvo biológico de substâncias naturais. No entanto, técnicas ideais devem atender a alguns critérios, como rapidez, facilidade, confiabilidade, alta sensibilidade, seletividade, disponibilidade e baixo custo (Hamburguer & Hosttetamn, 1991). Nos tópicos a seguir, serão abordadas informações associadas às atividades biológicas e químicas realizadas neste trabalho, demonstrando sua importância e aplicação.

Toxicidade de plantas

As substâncias presentes nas plantas podem se apresentar como tóxicas com a capacidade de causar alguma alteração fisiológica prejudicial a algum organismo, ou também auxiliar na identificação de toxinas valiosas para determinação de papéis fisiológicos e patológicos (Harvey *et al.*, 1998). Assim, a toxicologia estabelece a necessidade em analisar qualitativamente (efeitos) e quantitativamente (concentração) moléculas que possam interagir com o sistema biológico, avaliando a probabilidade de possíveis danos sobre a natureza, à saúde humana ou ao meio ambiente (Hayes & Dixon, 2017)

A possibilidade de uma substância ou mais substância em provocar danos em sistemas biológicos é representada por diversas reações, que vai desde a alergia na pele até distúrbios no sistema cardiovascular, respiratório, digestivo, neurológico, entre outros casos que podem levar o óbito (Harvey *et al.*, 1998 Hudson *et al.*, 2018). No entanto, em alguns casos isso dependerá da concentração, do tempo de exposição, das características e propriedades dessas toxinas à qual o organismo é submetido (Botha & Penrith, 2008).

Em extratos vegetais, a triagem toxicológica tornou-se um importante aliado para o desenvolvimento de fármacos e principalmente, para a extensão do potencial terapêutico de moléculas presentes na planta (Parasuraman, 2011). A maioria dos princípios ativos de uma planta é tóxica em doses elevadas, por isso é importante que seja realizado um bioensaio eficaz e simples para triagem de substâncias nocivas ao organismo animal, direcionando também ao isolamento de substâncias de interesse, associados a bioensaios mais específicos (Meyer *et al.*, 1982).

Uma das técnicas mais simples para investigar a toxicidade é o ensaio utilizando ovos de *Artemia salina*, que apresenta conveniência e o baixo custo para determinar a toxicidade de substâncias puras e principalmente extratos vegetais que apresentam uma mistura de diferentes substâncias que podem camuflar algum efeito tóxico (Hui *et al.*, 1989). O ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* é frequentemente utilizado e pode estabelecer uma associação com diferentes bioensaios, como por exemplo, atividade antimicrobiana, larvicida, inseticida, citotoxicidade, anticonvulsivante, antitumoral, antifúngica, antioxidante, entre outros (Moshi *et al.*, 2007; Nino *et al.*, 2006; Bücker *et al.*, 2013; Hossain *et al.*, 2004; Ogbole *et al.*, 2017; Sagrin *et al.*, 2019).

Essa versatilidade aplicada com outras atividades biológicas confirma a sensibilidade e importância do teste na triagem de uma planta, principalmente para reconhecer se existem substâncias que atuam com efeitos tóxicos, além de auxiliar posteriormente na identificação dessas toxinas que também podem apresentar propriedades medicinais se utilizadas em menores concentrações (Ndhala *et al.*, 2013).

Angiogênese e antiangiogênese

O sistema vascular é um dos principais eventos produzidos ainda na organogênese, que vai se desenvolvendo até formar um sistema circulatório funcional com novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes (Coultas *et al.*, 2005). Logo, esse processo chamado angiogênese é essencial no crescimento e regeneração de tecidos fundamentais no desenvolvimento inicial e na fase adulta de um indivíduo. Auxilia em vários processos como

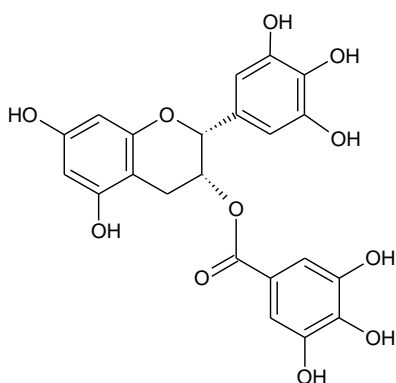
na cicatrização de feridas, remodelação de tecidos, luteinização do folículo do ovário, desenvolvimento placentário e gravidez (Ferrara, 2004).

No entanto, mesmo apresentando importantes funções fisiológicas, pode ocorrer um processo patológico da angiogênese, em que o crescimento inadequado dos vasos sanguíneos leva a má circulação e até a morte dos tecidos. Esses distúrbios podem causar doenças isquêmicas, oculares e inflamatórias, tumores, doenças autoimunes, entre outras (Mojis *et al.*, 2008). Por tanto, se o mecanismo angiogênico atua em equilíbrio com ativadores pró-angiogênicos e inibidores, os angiostáticos, desempenham seu papel de acordo com a necessidade do organismo. Porém, se ocorrer a desregulação da angiogênese, com uma neovascularização ineficiente ou excessiva há uma contribuição para o desenvolvimento de patologias (Berges & Benjamin, 2003).

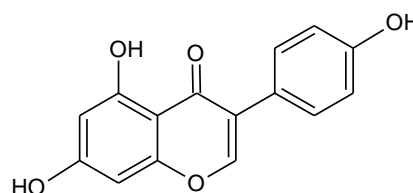
A inflamação e a angiogênese, por exemplo, apresentam indícios de elementos essenciais para a manutenção de diferentes condições patológicas. Esses processos são regulados por várias moléculas e eventos celulares importantes para a ativação de leucócitos e formação de novos vasos sanguíneos. Podem ocorrer pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento transformados (TGF), que atuam com o objetivo de reduzir ou inibir a formação dos vasos sanguíneos controlando processos fisiopatológicos (Moura *et al.*, 2011).

Atualmente, sabe-se que alguns fitoquímicos auxiliam na inibição da angiogênese patológica, e de acordo com a medicina tradicional chinesa, muitas ervas são usadas no tratamento de doenças angiogênicas, sendo uma prática coerente devido as inúmeras substâncias ativas presentes nas plantas (Fan *et al.*, 2006). Essa prática é sustentada pela ação antiangiogênica de diferentes espécies de plantas e suas respectivas substâncias isoladas e testadas. E entre as classes de metabólitos presentes nos vegetais, os alcaloides, terpenoides, polifenóis, apresentam propriedades antiangiogênicas citadas na literatura, tais como: (1) epigalocatequina-3-galato, (2) genisteína, (3) wogonina, (4) camptotecina, (5) lupeol, (6) triptolide (Fig. 4) (Wang *et al.*, 2003; You *et al.*, 2003; He *et al.*, 2009; Hoseinkhani *et al.*, 2020; Sulaiman *et al.*, 2014; Huynh *et al.*, 2017).

(1)



(2)



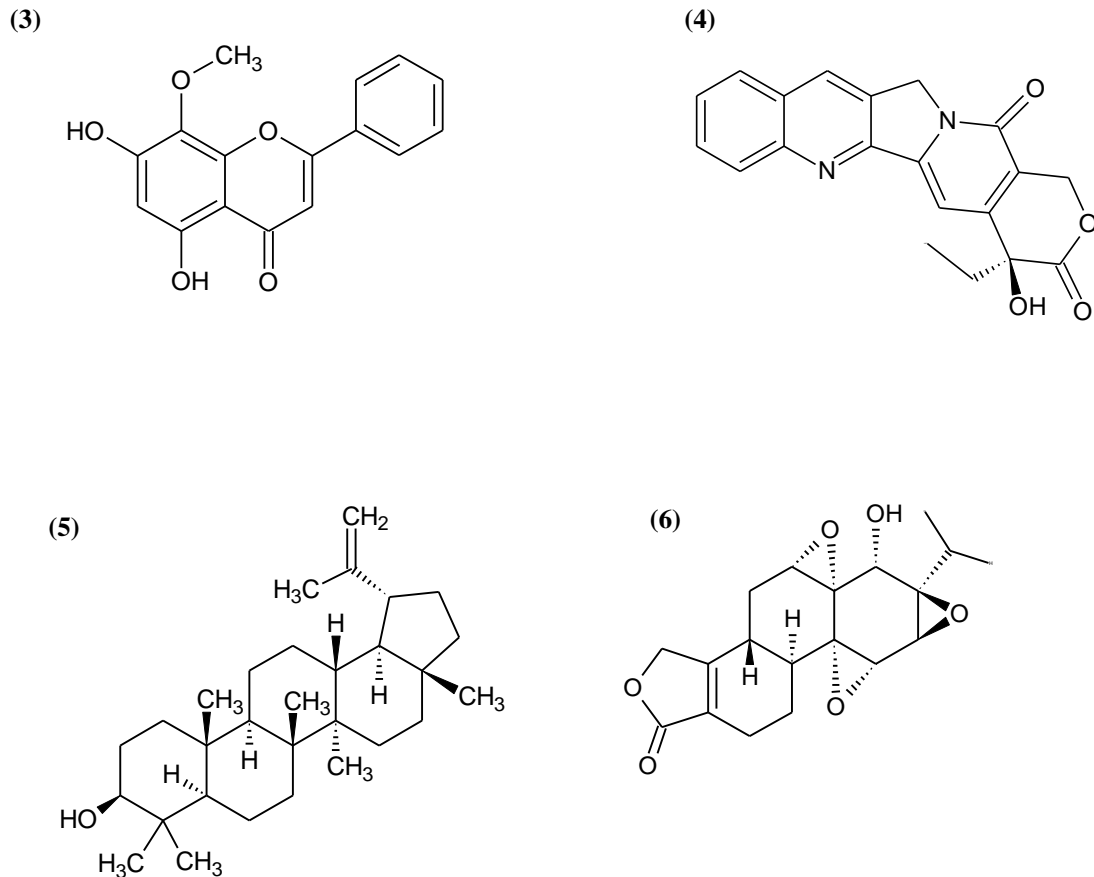


Figura 4: Alguns exemplos de substâncias antiangiogênicas isoladas de plantas.

Mesmo com substâncias já isoladas e disponíveis como medicamentos antiangiogênicos, principalmente VEGF, são reconhecidos os seus efeitos colaterais que incluem coágulos nas artérias, hipertensão, hemorragia, toxicidade cardíaca, trombose e outros (Chen & Cleck, 2009). Porém, extratos e substâncias provenientes de plantas, como exemplificado anteriormente, buscam a eficiência de fitoquímicos na modulação da angiogênese como estratégia alternativa para uma menor toxicidade, o que é comumente investigado para diferentes atividades biológicas (Rajasekar *et al.*, 2019).

Antibacterianos

As bactérias são os organismos mais antigos da Terra, são variados, flexíveis e que pode ter uma relação comensal a todos os mamíferos. Podem representar grande relevância ou ser danoso ao um organismo, dependendo das interações com o hospedeiro. Ainda que determinados microrganismos possam ser mutualísticos, existe uma grande quantidade patogênica e que pode causar inúmeras doenças infecciosas potencialmente letais (Cheesman *et al.*, 2017).

Um dos focos de pesquisas realizadas em laboratórios é a busca por agentes antibacterianos, que tem recebido atenção principalmente devido ao fenômeno designado “superbactérias”. Esse termo se refere a microrganismos que sofreram consecutivas mutações tornando-os mais resistentes e com maior transmissibilidade (Davies & Davies, 2010). Uma consequência do uso indevido ou excessivo de antibióticos pela população, assim como o uso inapropriado de antibióticos na agricultura, na aquicultura, e no meio ambiente em geral (Manyi-Loy *et al.*, 2018; Lulijwa *et al.*, 2019).

Devido a esses fatores, o desenvolvimento da vida útil limita a resistência desses medicamentos e resulta em uma necessidade emergencial na educação pública para o uso de antibióticos, melhoras no saneamento básico, reinvestigação em antibióticos obsoletos, maior controle na aplicação de antibióticos, o uso de opções não antibióticas a doenças infecciosas, maiores colaborações da indústria e governo, além do incentivo em alternativas a partir de produtos naturais (Bush *et al.*, 2011).

Uma ampla gama de mecanismos realizada pelas cepas bacterianas apresenta insensibilidade ao medicamento, como por exemplo: através da síntese de enzimas como a β -lactamase, inativando fármacos e incapacitando a interação do receptor alvo (proteínas); através da diminuição de absorção de moléculas exógenas, com a limitação dos fármacos para parte intracelular; bombas de efluxo, eliminando substâncias para o meio extracelular, assegurando a integridade do material genético microbial; alteração da conformação do local de ação, impedindo que os antibióticos exerçam interação no sítio de ligação e por meio de transferência por conjugação ou através dos plasmídeos (Silva & Aquino, 2018). E a partir desse conhecimento são intensamente pesquisadas possíveis soluções em função da resistência de antibióticos (Davies & Davies, 2010).

Além disso, a descoberta de agentes antibacterianos diminuiu gradativamente, representada por antibióticos sintetizados ou descobertos na última década. Com organismos multirresistentes, os produtos naturais tornaram-se uma das fontes mais propícia para descoberta de novos antibacterianos, confirmados por dados que comprovam que mais de

50% de agentes clínicos são de produtos naturais ou seus derivados (Newman & Cragg 2013; Niu & Li, 2019).

No geral, muitas espécies vegetais possuem substâncias ativas com propriedades antimicrobiana, identificadas em classes de substâncias fenólicas, alcaloides, terpenoides, peptídeos, entre outros (Cowan, 1999). Naturalmente, algumas dessas substâncias podem ser biossintetizadas para agir na prevenção ou combate de microrganismos patógenos que podem ser mais do que fisiologicamente importantes (Guimarães *et al.*, 2010). As variações na estrutura química e mecanismos de ação resultam em uma boa base para selecionar futuras moléculas antimicrobianas (Savoia, 2012).

Outro método eficaz para combater a resistência bacteriana é a combinação sinérgica de substâncias provenientes de extratos vegetais com propriedade antimicrobiana e antibióticos convencionais (Hemaiswarya *et al.*, 2008). Como por exemplo, a associação da substância quercetina e o medicamento amoxicilina que aumentaram significativamente a eficácia contra *Staphylococcus epidermis* resistente a amoxicilina (Siriwong *et al.*, 2016). As drogas antimicrobianas combinadas a produtos naturais possibilitam a restauração de um medicamento já existente, permitindo o uso clínico muito mais rápido e como um custo menor, visto que um dos bioativos combinado já foi extensamente avaliado (Cheesman *et al.*, 2017).

Por tanto, compreende-se que as plantas coevoluíram com patógenos e dessa forma desenvolveram respostas eficazes através da produção de substâncias químicas, as quais, atualmente, são o alvo de muitos trabalhos científicos (Datta *et al.*, 2011). Mas apesar do crescente número de trabalhos desenvolvidos com substâncias antibacterianas, ainda são poucos os medicamentos obtidos de origem vegetal com uso clínico, sendo este um fator de grande importância para pesquisas que visam o isolamento de substâncias e a avaliação de suas propriedades biológicas, assim como seus efeitos sinérgicos (Cheesman *et al.*, 2017).

Antioxidantes

Em um organismo vivo, as células do corpo utilizam oxigênio para gerar energia e por consequência são formados os radicais livres como subprodutos. Os mesmos podem ser espécies reativas de oxigênio (EROS) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNS) (Pham-Huy *et al.*, 2008). Essas espécies podem exercer um papel benéfico ou prejudicial, em estabilidade apresentam positivas respostas celulares e cumprem funções imunológicas, porém em alta concentração causam efeitos negativos em seres humanos, plantas e animais causando o estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2007).

O surgimento dessas espécies reativas pode ser ocasionado por mecanismos de inflamação, pela ativação de células imunes, estresse mental, exercícios excessivos, isquemia, infecções, câncer e envelhecimento. Por forma exógena é recorrente da poluição do ar e da água, consumo de álcool e cigarro, metais pesados, algumas drogas, solventes, radiação, gordura e óleo de alimentos (Adwas *et al.*, 2019). Em contato com o corpo as substâncias exógenas são absorvidas por diferentes vias e degradadas ou metabolizadas em radicais livres (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Os antioxidantes, por sua vez, podem diminuir ou bloquear esses radicais livres em excesso e impedir outras reações através de vários mecanismos. Eles podem atuar eliminando espécies que iniciam a peroxidação; íons metálicos quelantes, incapacitando-os de gerar espécies reativas ou decompor peróxidos lipídicos, eliminação de O_2^- impedindo a formação de peróxidos; interrupção da reação de cadeia autoxidativa e/ou reduzindo as concentrações localizadas de O_2 (Brewer *et al.*, 2011).

Esses mecanismos de defesa são classificados em endógenos (enzimáticos e não enzimáticos) principalmente pela ação das enzimas catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e superóxido dismutase (Young & Woodside, 2001). E como antioxidantes exógenos consumidos através da ingestão de alimentos ou suplementos, que contem vitamina C e E, carotenoides, flavonoides, polifenóis, ômega-3, entre outros (Bouayed & Bohn, 2010). No entanto, a indústria alimentícia utiliza há muito tempo antioxidantes sintéticos, como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueni butilado (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ), galato de propil (PG) e de octilo (OG), mas estes apresentam alguns consequências a longo prazo, como efeitos tóxicos e carcinogênicos (Gulcin, 2020).

Toda essa problemática oriunda dos antioxidantes sintéticos, que apresentam respostas antagônicas com seu uso ocasionou um crescente interesse para a compreensão do mecanismo de ação dos radicais livres e a busca por outras substâncias naturais (Bouayed & Bohn, 2010; Shalaby & Shanab, 2013). Os vegetais, como se sabe, produzem diferentes moléculas e é uma alternativa onde se reconhece o potencial antioxidante principalmente em substâncias polifenólicas, que podem ser detectados em todos os órgãos da planta (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Os polifenóis apresentam uma ou mais hidroxilas em sua estrutura e são divididos em dois grupos principais: os ácidos fenólicos e os flavonoides com atividades antioxidantes até melhores quando comparada aos sintéticos (Simić *et al.*, 2007). A ação antioxidante de substâncias fenólicas depende do número de grupos hidroxila (OH) na estrutura do anel e de seus arranjos. Uma posição orto, por exemplo, confere maior estabilidade ao radical,

caracterizando maior propriedade antioxidante proporcional ao número de hidroxila. Assim, quanto maior a presença de hidroxilas, maior o potencial antioxidante (Cheyner *et al.*, 2013).

Os vegetais possuem uma diversidade de fitoquímicos, o que incentiva pesquisas com plantas um aliado para identificação de substâncias antioxidantes naturais, com um baixo custo, compatibilidade com a ingestão alimentar, além de não possuírem efeitos nocivos para o organismo (Sindhi *et al.*, 2013; Gulcin, 2020). Como uma das fontes promissoras, estão às espécies de Fabaceae, frequentemente relatadas na literatura pelo seu potencial como antioxidante, reforçada por apresentar polifenóis como uma das principais classes da família (Wink, 2003; Wink, 2008).

Fabaceae

A família Fabaceae, originalmente conhecida como Leguminosa, é a terceira maior família botânica dentre as Angiospermas, compreendendo aproximadamente 946 gêneros e cerca de 24.505 espécies (LPWG, 2017; The Plant List, 2020). No Brasil, é constituída por 234 gêneros e 2.941 espécies (Flora do Brasil, 2020). Fabaceae apresenta variadas formas de vida com hábitos como árvores, ervas, arbustos, subarbustos, lianas e mais raras, aquáticas. Representando uma ampla plasticidade fisiológica, ocorrendo em diferentes ambientes. Dessa forma, estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais e em zonas áridas e semiáridas do planeta (Schrire *et al.*, 2005).

Fabaceae é bastante diversificada morfológicamente, fisiologicamente e ecologicamente. Morfológicamente, por exemplo, as flores abrangem disposições radialmente simétricas, bilateralmente simétricas e assimétricas, no qual garante uma diversidade de polinizadores, como insetos, pássaros e morcegos (LPWG, 2017). As folhas, comumente são compostas, às vezes simples ou unifolioladas e regularmente apresentam pulvinos basais (Stevens, 2001). O fruto é característico do tipo legume, no entanto também ocorrem outros tipos, como drupa, sâmara, folículo, craspédio e lomento (Barroso *et al.*, 1999).

No Brasil, representantes da família Fabaceae estão presentes nos seis biomas, sendo considerada a família mais rica em espécies da Floresta Amazônica e na Caatinga, é a segunda mais abundante na Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal, e a quarta mais numerosa no Pampa (BFG, 2015). Muitas espécies são economicamente importantes, sendo utilizadas para a produção de alimentos e matérias-primas para indústria (Singh *et al.*, 2007). Além disso, também é uma opção significativa para redução de fertilizantes nitrogenados na produção agrícola, devido a sua relação simbiótica com bactérias do solo (Torabian *et al.*, 2019). Sendo assim, as espécies de leguminosas são essenciais em ecossistemas naturais, agricultura e

agrossilvicultura, que podem ser habitualmente praticadas com associação a informação e tecnologias que mostrem sua importância (Graham & Vance, 2003).

Devido à sua capacidade de serem fixadoras de nitrogênio, espécies de Fabaceae podem produzir mais metabólitos secundários contendo nitrogênio do que outras plantas não fixadoras. Porém, Leguminosas produzem menos mono, sesqui e diterpenos. Os principais metabólitos que ocorrem nessa família incluem alcaloides, aminoácidos não proteicos, cianogênicos, peptídeos, fenólicos, policetídeos e terpenoides (Wink, 2013). Contudo, devido a uma grande diversidade de classes de substâncias na família não foi possível a descrição de muitas moléculas que possivelmente podem ser comuns a taxons vizinhos, e isso pode ocorrer devido a evolução das plantas caracterizando a produção de seus metabólitos e também pela falta de investigação em vários táxons (Wink, 2003).

Para os diversos gêneros em Fabaceae, são destacadas diferentes propriedades biológicas que os conceituam como importantes aliados na prospecção de produtos naturais. Dessa forma, várias pesquisas são realizadas em busca de novas substâncias ativas a partir do estudo das atividades biológicas, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Atividades biológicas e químicas de algumas espécies da família Fabaceae.

Espécie	Propriedade biológica	Parte da planta utilizada	Referência
<i>Andira inermis</i>	Atividade antiplasmódica	Cascas e sementes	Kraft <i>et al.</i> , 2000
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Atividade antiulcera	Cascas	Martins <i>et al.</i> , 2002
<i>Calliandra portoricensis</i>	Atividade analgésica	Folhas	Agunu <i>et al.</i> , 2005
<i>Copaifera multijuga</i>	Atividade antineoplásica	Exsudado	Gomes <i>et al.</i> , 2008
<i>Senna spectabilis</i>	Atividade anticonvulsivante	Folhas	Bum <i>et al.</i> , 2010
<i>Bowdichia virgilioides</i>	Atividade ansiolítica	Cascas e caule	Vieira <i>et al.</i> , 2013
<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	Atividade gastroprotetora	Cascas	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
<i>Bituminaria bituminosa</i>	Atividade antibacteriana e antioxidante	Partes aéreas	Azzouzi <i>et al.</i> , 2014

<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Atividade citotóxica	Folhas	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Brownea grandiceps</i>	Atividade no sistema de coagulação e fibrinólise	Flores	Pereira & Brazon, 2015
<i>Dalbergia sissoo</i>	Atividade acaricida	Folhas	Singh <i>et al.</i> , 2016
<i>Plathymenia reticulata</i>	Atividade inibitória contra o veneno de <i>Bothrops atrox</i>	Cascas	Moura <i>et al.</i> , 2016
<i>Amburana cearensis</i>	Atividade neuroprotetora	Sementes	Pereira <i>et al.</i> , 2017
<i>Crotalaria retusa</i>	Atividade anti-nociceptiva e anti-inflamatória	Sementes	Aragão <i>et al.</i> , 2017
<i>Libidibia férrea</i>	Atividade antiproliferativa, apoptótica e antioxidante	Frutos	Guerra <i>et al.</i> , 2017
<i>Cassia grandis</i>	Atividade hipoglicêmica	Frutos	Prada <i>et al.</i> , 2018
<i>Clitoria ternatea</i>	Atividade antialérgica e antitússica	Flores	Singh <i>et al.</i> , 2018
<i>Deguelia duckeana</i>	Atividade antifúngica	Raiz e ramos	Lima <i>et al.</i> , 2018
<i>Spartium junceum</i>	Atividade anticâncer	Flores	Nanni <i>et al.</i> , 2018
<i>Bauhinia variegata</i>	Antidiabética; anti-hiperlipidêmica e antioxidante	Flores	Tripathi <i>et al.</i> , 2019
<i>Calpurnia áurea</i>	Atividade anti-inflamatória	Folhas	Ayal <i>et al.</i> , 2019
<i>Tamarindus indica</i> Liin.	Atividade analgésica e anti-inflamatória	Casca, raízes, folhas e sementes	Komakech <i>et al.</i> , 2019

De acordo com a revisão da literatura para essa tese, utilizando plataformas como “sciencedirect”; “scielo”; “periódicos capes”, há uma desigualdade em pesquisas e publicações realizadas entre tribos, subfamílias e gêneros de Fabaceae. Provavelmente, tal situação ocorre devido à carência de informações taxonômicas, essenciais para o desenvolvimento da pesquisa em outras áreas, como ocorre com a subfamília Caesalpinioideae. A qual é a menos compreendida taxonomicamente e filogeneticamente (Bruneau *et al.*, 2001).

Caesalpinioideae

Até recentemente, a família Fabaceae era representada por três subfamílias: Caesalpinioideae DC., Mimosoideae DC. e Papilionoideae DC. (LPWG, 2013). No entanto, análises filogenéticas mais abrangentes propõem uma nova classificação reconhecendo seis subfamílias: Cercidoideae, Detarioideae, Duparquetioideae, Dialioideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae. Esta última subfamília agrupa Mimosoideae, agora considerada um clado distinto (LPWG, 2017).

Caesalpinioideae é a segunda maior subfamília de Fabaceae, com aproximadamente 148 gêneros e 4.400 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do Sudeste Asiático, África e América do Sul (Jaca & Nikonk, 2015; LPWG, 2017). Representantes de Caesalpinioideae possuem hábitos variados, como árvores, ervas, lianas, ou herbáceas, com ou sem espinhos (LPWG, 2017).

A subfamília Caesalpinioideae é subdividida em cinco tribos: Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae, Detarieae e Amherstieae (Bruneau *et al.*, 2001). Dentre essas tribos, Caesalpinieae é um grupo historicamente complexo, divididos em 8 a 9 grupos com espécies de plantas ornamentais e medicinais (El-Nashar *et al.*, 2015). Outra característica relatada são as espécies nodulantes na subfamília, não muito comum, mas que pode ocorrer em *Chamaecrista* Moench (Cassiane), *Campsiandra* Benth., *Chidlowia* Hoyle, *Dimorphandra*, *Erythrophleum* Afzel, *Jacqueshuberia* Ducke, *Mellanoxylon* Schott, *Moldenhawera* Schrad, e *Tachigali* Aubl. (Sprent *et al.* 2013).

As espécies de Caesalpinioideae apresentam classes de substâncias como aminoácidos não proteicos, cumarinas, glicosídeos cianogênicos, feniletilamina, triptaminas, alcaloides β -carbolinados, entre outros (LPWG, 2017). E de acordo com alguns desses metabólitos com propriedades interessantes, existem espécies bastante populares e investigadas na literatura da tribo Caesalpinieae como o jucá (*Libidibia ferrea*) e a faveira (*Peltophorum dubium*). No entanto, o conhecimento químico de muitas espécies desse grupo ainda é incipiente (Manzanilla & Bruneau, 2012) como, por exemplo, as espécies do gênero *Campsiandra*.

Gênero Campsiandra

Atualmente *Campsiandra* inclui 18 espécies (The Plant List, 2020), distribuídas desde os estados brasileiros do Amazonas, Amapá, Roraima e Pará, até a Amazônia Peruana, Colombiana e Boliviana. O gênero *Campsiandra* apresenta forma de vida como árvores e ocorre em floresta de igapó, floresta de várzea, floresta estacional perenifólia ou floresta ombrófila (Flora do Brasil, 2020).

Mesmo com poucas informações atribuídas ao gênero *Campsiandra*, é possível encontrar na tabela 3 um resumo com diferentes abordagens, representado por várias espécies desse grupo. Dentre as espécies citadas está *C. comosa*, que foi estudada de forma limitada.

Tabela 3: Propriedades biológicas descritas na literatura para o gênero *Campsiandra*.

Espécie	Atividade biológica	Parte utilizada	Referência
<i>C. comosa</i>	Levantamento etnobotânico	Cascas	Jovel <i>et al.</i> , 1996
<i>C. comosa</i> var. <i>laurifolia</i> (Benth.) Cowan	Screening biológico e fitoquímico, com a identificação das classes de triterpenoides, flavonoides e 3,4-dihydroxyflavonol	Folhas e ramos	Jiménez <i>et al.</i> , 2001
<i>C. comosa</i>	Identificação de taninos das folhas e cascas através de tecidos	Folhas e cascas	Hernes & Hedges, 2004
<i>C. angustifolia</i>	Dispersão e estabelecimento das sementes de <i>C. angustifolia</i>	Sementes	Farji- Brener <i>et al.</i> , 2005
<i>C. guayanensis</i>	Isolamento de 13 novas saponinas triterpenóides	Partes aéreas	Braca <i>et al.</i> , 2006
<i>C. comosa</i>	Atividade antioxidante das sementes	Sementes	Padilla <i>et al.</i> , 2008
<i>C. comosa</i> <i>Campsiandra</i> sp.	Atividade antibacteriana frente a <i>M. tuberculosis</i> (INHR) resultado negativo	Ramos	Carrion <i>et al.</i> , 2013
<i>C. comosa</i> ; <i>C. laurifolia</i>	Baixa atividade antifúngica frente a <i>C. glabrata</i> e <i>C. parapsilosis</i>	Cascas, ramos, sementes e frutos	Rodrigues <i>et al.</i> , 2014

***Campsiandra comosa* Benth.**

Campsiandra comosa com sinônimas de: *C. comosa* var. *comosa*, *C. surinamensis* Klinhoonte, *C. comosa* var *laurifolia* (The Plant List, 2013) é conhecida popularmente como acapurana ou comandá-açu, é uma árvore de tamanho médio das florestas de igapó (Fig. 5), caracterizados por ambientes inundados por rios de águas pretas ou claras (Yunk, 1989). A

espécie pode ser encontrada na Colômbia, Suriname e Venezuela. No Brasil, ocorre nos estados do Amazonas, Amapá, Roraima e Pará. Seus frutos são do tipo vagens com sementes discoides que flutuam na água e podem ser dispersas por hidrocoria (Souza, 2012).



Figura 5: *C. comosa*: (a) no seu habitat natural, (b) fruto e (c) inflorescência. Fonte: a autora

As sementes de *C. comosa* são amplamente utilizadas como alimento de habitantes regionais, sendo já conhecido seu potencial nutricional e sua propriedade antioxidante (Sánchez *et al.*, 1987; Padilla *et al.*, 2008). Na região da Bacia do rio Amazonas, a decocção de folhas e cascas de *C. comosa* é popularmente usada para dor de dente e inflamação, sendo confirmada com a atividade antinociceptiva periférica do extrato hidroalcoólico da casca (Rodrigues *et al.*, 2010). Taninos foram identificados nos extratos das folhas de *C. comosa* e o extrato metanólico da casca apresentou atividade antibacteriana frente à *Mycobacterium tuberculosis* (Hernes & Hedges 2004; Carrion *et al.*, 2013).

Nesse sentido, como os estudos químicos não foram completamente aprofundados e descritos na literatura e alguns resultados preliminares realizados pelo grupo do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Inpa (LABB-INPA) apresentaram bioatividade do extrato da espécie, o presente trabalho buscou contribuir com o estudo químico e biológico dos extratos das folhas, ramos e cascas do tronco de *C. comosa*. São pretendidas novas

informações a cerca da espécie, como o isolamento e identificação de moléculas, além do potencial biológico.

Referências

- Adamski, Z.; Blythe, L. L.; Milella, L.; Bufo, S. A. 2020. Biological activities of alkaloids: from toxicology to pharmacology. *Toxins*, 12: 210.
- Adwas, A. A.; Elsayed, A. S. I.; Quwaydir, F. A. 2019. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6: 43-47.
- Agunu, A.; Abdurahman, E. M.; Shok, M.; Yusuf, S. A. 2005. Analgesic activity of the roots and leaves extracts of *Calliandra portoricensis*. *Fitoterapia*, 76: 442-445.
- Almeida, S. S.; Amaral, D. D.; Silva, A. S. L. 2004. Análise florística e estrutura de florestas de Várzea no estuário amazônico. *Acta Amazônica*, 34: 513-524.
- Anand, U.; Jacobo-Herrera, N.; Altemimi, A.; N, Lakhssassi. 2019. A Comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, 9: 258.
- Aragão, D. P.; Souza, B. S.; Brito, T. V.; Santana, L. A. B.; Silva, R. M. P.; Oliveira, A. P.; Pereira, A. C. T. C.; Ferreira, G. P.; Barbosa, A. L. R.; Oliveira, J. S. 2017. The anti-inflammatory and antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93: 536-542.
- Ayal, G.; Belay, A.; Kahaliw, W. 2019. Evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of the leaves of *Calpurnia aurea* (Ait.) Benth (Fabaceae) in mice. *Wound Medicine*, 25: 100151.
- Aziz, N.; Kim, M.; Cho, J. Y. 2018. Anti-inflammatory effects of luteolin: a review of in vitro, in vivo, and in silico studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 225: 342-358.
- Azmir, J.; Zaidul, I, S, M.; Rahman, M. M.; Sharif, K.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. A.; Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 137: 426-436.
- Azzouzi, S.; Zaabat, N.; Medjroubi, K.; Akkal, S.; Benlabeled, K.; Smati, F.; Dijoux-Franca, M-G. 2014. Phytochemical and biological activities of *Bituminaria bituminosa* L. (Fabaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4: 882-885.
- Bag, P.; Chattopadhyay, D.; Mukherjee, H.; Ojha, D.; Mandal, N.; Sarkar, M. C.; Chatterjee, T.; Das, Gobardhan.; Chakraborti. 2012. Anti-herpes vírus activities of bioactive fraction and isolated pure constituent of *Mallotus peltatus*: an ethnomedicine from Andaman Islands. *Virology Journal*, 9: 1-12.

- Barroso, G. M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F. 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Vol 2. Imprensa Universitária, Viçosa, 377 p.
- Berges, G.; Benjamin, L. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3: 401-410.
- BFG, 2015. The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66: 1085-1113.
- Botha, C. J.; Penrith, M. L. 2008. Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 549-558.
- Bouayed, J.; Bohn, T. 2010. Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3: 228-237.
- Bougard, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
- Braca, A.; Abdel-Razik, A. F.; Mendez, J.; Tommasi, N. 2006. Triterpenoid saponins from *Campsiandra guayanensis*. *Journal of Natural Products*, 69: 240-246.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333.
- Brewer, S. 2011. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 221-247.
- Bribi, N. 2018. Pharmacological activity of alkaloids: a Review. *Asian Journal of Botany*, 1: 1-6.
- Bruneau, A.; Forest, F.; Herendeen, P. S.; Klitgaard, B. B.; Lewis, G. P. 2001. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany*, 26: 487-514.
- Brusotti, G.; Cesari, I.; Dentamaro, A.; Caccialanza, G. 2014. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87: 218-228.
- Bücker A.; Falcão-Bücker N. C.; Nunez, C. V.; Pinheiro, C. C.; Tadei, W. P. 2013. Evaluation of larvicidal activity and brine shrimp toxicity of rhizome extracts of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46: 377-380.

- Bum, E. N.; Nkantchoua, G, C, N.; Njikam, N.; Taiwe, G. S. 2010. Anticonvulsant and sedative activity of leaves of *Senna spectabilis* in mice. *International Journal of Pharmacology*, 6: 123-128.
- Bush, K.; Courvalin, P.; Dantas, G.; Davies, J.; Eisenstein, B.; Huovinen, P.; *et al.* 2011. Tackling Antibiotic Resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 849-846.
- Calixto, J. B. 2019. The role of natural products in modern drug discovery. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 91: e20190105.
- Caputi, L.; Aprea, E. 2011. Use of terpenoids as natural flavouring compounds in food industry. *Recent Patents on Foods, Nutrition & Agriculture*, 3: 9-16.
- Carrion, L. L.; Ramos, D. F.; Martins, D.; Osório, M. I. C.; Cursino, L. M. C. C.; Mesquita, D. W. O.; Nunez, C. V.; Silva, P. E. A. 2013. Antimycobacterial activity of brazilian amazon plants extracts. *International Journal of Phytomedicine*, 5: 479-485.
- Cechinel-Filho, V.; Yunes, R. A. 1997. Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*, 21: 99-105.
- Cheesman, M. J.; Ilanko, A.; Blonk, B.; Cock, I. E. 2017. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?. *Pharmacognosy Reviews*, 11: 57-72.
- Chen, H.; Cleck, J. N. 2009 Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6: 465-477.
- Cheng, A.; Lou Y.; Mao, Y.; Lu, S.; Wang, L.; Chen, X. 2007. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 179-186.
- Cheyrier, V.; Comte, G.; Davies K. M.; Lattanzio, V.; Martens, S. 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiologic Biochemical*, 72: 1-20.
- Cohen, S. D.; Kennedy, J. A. 2010. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 50: 620-643.
- Cordell, G. A.; Quinn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R. 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, 15: 183-205.
- Coultas, L.; Chawengsaksophak, K.; Rossant, J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438: 937-945.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.

- Datta, S.; Pal, N. K.; Nandy, A. K. 2011. Inhibition of the emergence of multi drug resistant *Staphylococcus aureus* by *Withania somnifera* root extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2019: 917-920.
- Davies, J.; Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74: 417-433.
- Debnath, B.; Singh, W. S.; Das, M.; Goswami, S.; Singh, M. K.; Maiti, D.; Manna, K. 2018. Role of plant alkaloids on human health: a review of biological. *Materials Today Chemistry*, 9: 56-72.
- Dias, M. I.; Sousa M. J.; Alves, R. C.; Ferreira, I. C. F. R. 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. *Industrial Crops and Products*, 82: 9-22.
- El-Nashar, H.; Eldahsan, O. A.; Singab, A. N. 2015. The tribe Caesalpinieae (Fabaceae): Na undated review on pharmacological aspects. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4: 215.
- Fan, T-P.; Yeh, J-C.; Leung, K. W.; Yue, P. Y. K.; Wong, R. N. S. 2006. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27: 297-309.
- Farji-Brener, A. G. Durán, S.; Alejandro, H.; Herbas.; E.; Castañeda, Ochoa, J.; Mônica. 2005. La semilla de *Campsiandra angustifolia* (Fabaceae: Caesalpinioideae) como unreflejo de laspresionesselectivas sobre sudispersión y establecimiento. *Revista de Biología Tropical*, 53: 63-71.
- Farnsworth, N. M. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. *Pharmaceutical Sciences*, 55: 225-251.
- Fernie, A. R.; Tohge, T. 2017. The genetics of plant metabolism. *Annual Review of Genetics*, 51: 287-310.
- Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25: 581-611.
- Flora do Brasil, 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 06 dez. 2020.
- Gomes, N. M.; Rezende, C. M.; Fintes, S. P.; Howell, A. M. C.; Langdraf, R. G.; Matheus, M. E.; Pinto, A. C.; Fernandes, P. D. 2008. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 179-184.
- Graham, P. H.; Vance, C. P. 2003. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65: 93-106.
- Guerra, A. C. V. A.; Soares, L. A. L.; Ferreira, M. R. A.; Araújo, A. A.; Rocha, H. A. O.; Medeiros, J. S.; Cavalcante, R. S.; Araújo Júnior, R. F. 2017. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92: 696-706.

- Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33: 667-679.
- Gulcin, I. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: na update overview. *Archives of Toxicology*, 94: 651-715.
- Hamburguer, M.; Hostettman, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30: 3864-3874.
- Harvey, A. L.; Bradley, K. N.; Cochran, S. A.; Rowan, E. G.; Pratt, J. A.; Quillfeldt, J. A.; Jerusalinsky, D. A. 1998. What can toxins us for drug discovery? *Toxicon*, 36: 1635-1640.
- Hayes, A. W.; Dixon, D. 2017. Cornerstones of toxicology. *Toxicologic Pathology*, 45: 57-63.
- He, M-F.; Huang, Y-H.; Wu, L-W.; Ge, W.; Shaw, P-C.; Bit, P. P-H. 2009. Triptolide functions as a potent angiogenesis inhibitor. *International Journal of Cancer*, 126: 266-278.
- Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A. K.; Doble, M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639-652.
- Hernes, P. J.; Hedges, J. I. 2004. Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68: 1293-1307.
- Hoseinkhani, Z.; Norooznezhad, F.; Rastegari-Pouyani, M.; Mansouri, K. 2020. Medicinal plants extracts with antiangiogenic activity: where is the link? *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10: 370-378.
- Hossain, M. S.; Easmin, S.; Islam, M. S.; Rashid, M. 2004. Novel thiocyanato complexes with potent cytotoxic and antimicrobial properties. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 56: 1519-1525.
- Hudson, A.; Lopez, E.; Almalki, A. J.; Roe, A. L.; Calderón, A. I. 2018. A review of the toxicity of compounds found in herbal dietary supplements. *Planta Medica*, 84: 613-626.
- Hui, Y-H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C-J.; McLaughlin, J. L. 1989. Bullatacin and bullatacinone two highly potent acetogenins from *Annona bullata*. *Journal of Natural Products*, 52: 463-477.
- Huynh, D. L.; Sharma, N.; Singh, A. K.; Sodhi, S. S.; Jião-Jião, Z.; Mongre, R. K.; Ghosh, M.; Kim, N.; Park, Y. H.; Jeong, D. K. 2017. Anti-tumor activity of wogonin, an extract from *Scutellaria baicalensis*, through regulating different signaling pathways. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15: 0015-0040.

- Imran, M.; Rauf, A.; Abu-Izneid, T.; Nadeem, M.; Shariati, M. A.; Khan, I. A.; et al. 2019. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112: 108612.
- Jaca, T. P.; Nkonki, T. 2015. A taxonomic revision of the genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinieae: Fabaceae) in southern Africa. *South African Journal of Botany*, 98: 180-181.
- Jiménez, G.; Hasegawa, M.; Rodríguez, M.; Estrada, O.; Méndez, J.; Castillo, A.; Gonzales-Mujica, F.; Motta, N.; Vásquez, J.; Romero-Vecchione, E. 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 77-83.
- Jovel, E. M.; Cabanillas, J.; Towers, G. H. 1996. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Mestizo people of Suni Mirañó, Loreto, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, 53: 149-156.
- Junk, W. J.; Bayley, P. B.; Sparks, R. E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*, 106: 110-127.
- Karakaya, S. 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 453-464.
- Komakech, R.; Kim, Y-G.; Matsabisa, M.; Kang, Y. 2019. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Tamarindus indica* Linn (Fabaceae): a narrative review. *Integrative Medicine Research*, 8: 181-186.
- Kraft, C.; Jenett-Siems, K.; Siems, K.; Gupta, M. P.; Bienzle, U.; Eich, E. 2000. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 131-135.
- Lim, E-K.; Bowles, D. 2012. Plant production systems for bioactive small molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 271-277.
- Lima, N. M. 2018. Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Deguelia duckeana*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28: 697-702.
- LPWG - The Legume Phylogeny Working Group. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66: 44-77.
- LPWG, 2013. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62: 217-248.
- Lulijwa, R.; Rupia, E. J.; Alfaro, A. C. 2019. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, 12: 640-663.
- Maeda, H. A. 2019. Evolutionary Diversification of Primary Metabolism and Its Contribution to Plant Chemical Diversity. *Frontiers in Plant Science*, 10: 881.

- Maiome, T.; Baran, P. S. 2007. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nature Chemical Biology*, 3: 396-407.
- Manyi-Loh, C.; Mamphweli, N. S.; Meyer, E. L.; Okoh, A. I. 2018. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*, 23: 1-48.
- Manzanilla, V.; Bruneau, A. 2012. Phylogeny reconstruction in the Caesalpinieae grade (Leguminosae) based on duplicated copies of the sucrose synthase gene and plastid markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65: 149-162.
- Martins, D. T. O.; Lima, J. C. S.; Rao, V. S. N. 2002. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. *Phytotherapy Research*, 16: 427-431.
- McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. 2007. Plant natural products: back to the future or into extinction?. *Phytochemistry*, 68: 2015-2022.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnan, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McL Aughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45: 31-34.
- Mojzis, J.; Varinska, L.; Mojzisova, G.; Kostova, I.; Mirossay, L. 2008. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacological Research*, 57: 259-265.
- Morris, J. B. 1999. Legume Genetic Resources with Novel "Value Added" Industrial and Pharmaceutical Use. In: J. Janick (ed.), Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. p. 196-201.
- Moshi, M. J.; Mbwambo, Z. H.; Nondo, R. S. O.; Masimna, P. J.; Kapingu, M. C.; Magelewanya, E. S. 2007. Anticonvulsant activity of *Diospyros fischeri* root extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 4: 226-230.
- Moura, S. A. L.; Ferreira, M. A. N. D.; Andrade, S. P.; Reis, M. L. C.; Noviello, M.L.; Cara, D. C. 2011. Brazilian Green própolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Original research article*, 2011: 182703.
- Moura, V. M.; Silva, W. C. R.; Raposo, J. D. A.; Freitas-de-Sousa, L. A.; dos Santos, M. C.; Oliveira, R. B.; Mourão, R. H. V. 2016. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. *Journal of Ethnopharmacology*, 183: 136-142.
- Nanni, V.; Canuti, L.; Gismondi, A.; Canini, A. 2018. Hydroalcoholic extract of *Spartium junceum* L. flowers inhibits growth and melanogenesis in B16-F10 cells by inducing senescence. *Phytomedicine*, 46: 1-10.
- Nascimento, P. G. G.; Lemos, T. L. G.; Bizerra, A. M. C.; Arriaga, A. M. C.; Ferreira, D. A.; Santiago, G. M.; Braz-Filho, R.; Costa, J. G. M. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of Ursolic Acid and Derivatives. *Molecule*, 19: 1317-1327.

- Ncube, B.; Staden, J. V. 2015. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. *Molecules*, 20: 12698-12731.
- Ndhala, A. R.; Ncube, B.; Okem, A.; B.Mulaudzi, R. B.; Staden, J. V. 2013. Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. *Food and Chemical Toxicology*, 62: 609-621.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug. *Biochimica e Biophysica Acta*, 1830: 3670-3685.
- Nino, J.; Correa, Y.; Mosquera, O. 2006. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombian biodiversity. *Pharmaceutical Biology*, 44: 14-18.
- Niu, G.; Li, W. 2019. Next-generation drug discovery to combat antimicrobial resistance. *Trends in Biochemical Sciences*, 44: 961-972.
- Ogbole, O. O.; Segun, P. A.; Adeniji, A. J. 2017. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis PF active extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17: 494.
- Padilla, F. C.; Corner, A. M.; Rached, L. Bou. 2008. Contenido de polifenols y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58: 1-6.
- Paduch, R.; Kandefér-Szerszén, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentales*, 55: 315-327.
- Parasuraman, S. 2011. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2: 74-79.
- Patil, S. P.; Jain, P. D.; Sancheti, J. S.; Ghumatkar, P. J.; Tambe, R.; Sathaye, S. 2014. Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*, 86: 192-202.
- Peng, J.; Zheng, T-T.; Li, X.; Liang, Y.; Wang, L-J.; Huang, Y-C.; Xiao, H-T. 2019. Plant-derived alkaloids: the promising disease-modifying agents for inflammatory bowel disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10: 351.
- Pereira, B.; Brazón, J. 2015. Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system. *Journal of Ethnopharmacology*, 160: 6-13.
- Pereira, E. P. L.; Braga-de Souza, S.; Santos, C. C.; Santos, L. O.; Cerqueira, M. D.; Ribeiro, P. R.; Fernandez, L. G.; Silva, V. D. A.; Costa, S. L. 2017. *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27: 199-205.
- Pereira, R. M.; Ferreira-Silva, G. A.; Pivatto, M.; Santos, L. A.; Bolzani, V. S.; Paula, D. A. C.; Oliveira, J. C.; Viegas Júnior, C.; Ionta, M. 2016. Alkaloids derived from flowers of

Senna spectabilis, (-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG₂ cells for inducing cell cycle arrest in G₁/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D₁ expression. *Toxicol in Vitro*, 31: 86-92.

Pham-Huy, A. L.; He, H.; Pham-Huy. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4: 89-96.

Pivatto, M.; Baccini, L. R.; Sharma, A.; Nakabashi, M.; Danuello, A.; Viegas Jr, C.; Garcia, C. R. S.; Bolzani, V. S. 2014. Antimalarial activity of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* and semisynthetic derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25: 1900-1906.

Prada, A. L.; Amado, J. R. R.; Keita, H.; Zapata, E. P.; Carvalho, H.; Lima, E. S.; Sousa, T. P.; Carvalho, J. C. T. 2018. *Cassia grandis* fruit extract reduces the blood glucose level in alloxan-induced diabetic rats. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 103: 421-428.

Qiu, C.; Smuts, J.; Schug, K. A. 2017. Analysis of terpenes and turpentine using gas chromatography with vacuum ultraviolet detection. *Journal of Separation Science*, 40: 869- 877.

Rajasekar, J.; Perumal, M. K.; Vallikannan, B. 2019. A critical review on anti-angiogenic property of phytochemicals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 71: 1-15.

Rhodes, M. J. C. 1994. Physiological role for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, 24: 1-20.

Ribeiro, A. R. S.; Diniz, P. B. F.; Estevam, C. S.; Pinheiro, M. S.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Thomazzi, S. M. 2013. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 147: 383-388.

Rodrigues, E.; Duarte-Almeida, J. M.; Pires, J. M. 2010. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 981-991.

Rodrigues, K.; Ramos, D. F.; Carrion, L. L.; Cursino, L. M. C.; Jefreys, M. F.; Pedroza, L. S.; Osório, M. I. C.; Oliveira, J. L.; Andrade, J. I. A.; Fernandes, C. C.; Nunez, C. V.; Silva, P. E. A. 2014. Antifungal activity of Brazilian Amazon plants extract against some species of *Candida* spp. *International Journal of Phytotherapy*, 5: 445-453.

Sagrin, M. S.; Lasano, N. F.; Shukri, R.; Ramali, N. S. 2019. Antioxidant properties and toxicity assessment of the *Crescentia cujete* extracts in brine shrimp (*Artemia salina*). *Sains Malaysiana*, 48: 831-840.

Sánchez, J. E.; Barreiro, J. A.; Arreaza, O. B. 1987. Use of chigo (*Campsiandra comosa* Benth) seeds in human nutrition. III. Energetic value of chigo flour. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 37: 454-467.

- Sansores-Peraza, P.; Rosaldo-Vallado, M.; Brito-Loeza, W.; Mena-Rejón, G. J.; Quijanno, L. 2000. Cassine, an antimicrobial alkaloid from *Senna racemosa*. *Fitoterapia*, 71: 690-692.
- Savoia, D. 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7: 979-990.
- Schrire, B.; Lavin, M.; Lewis, G. P. 2005. Global distribution patterns of the Leguminosae: insights from recent phylogenies. *Plant diversity and complexity patterns: local, regional and global dimensions*, 55: 375-422.
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidants activity and health effects – A review. *Journal of Functional Food*, 18: 820-897.
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. 2018. Bioactivities of Phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1573.
- Shalaby, E. A.; Sanaa, M.; Shanab, M. M. 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7: 528-539.
- Shu, C.; Zhao, H.; Jiao, W.; Liu, B.; Cao, J.; Jiang, W. 2012. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing back spot rot on Apple fruit and possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae*, 256: 108636.
- Silva, K. A. B. S.; Manjavachi, M. N.; Paszuck, A. F.; Pivatto, M.; Viegas Jr, C.; Bolzani, V. S.; Calixto, J. B. 2012. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. *Neuropharmacology*, 62: 967-977.
- Silva, M. F.; Goldman, G. H.; Magalhães, F. M.; Moreira, F. W. 1988. Germinação natural de 10 leguminosas arbóreas da Amazônia – I. *Acta Amazônica*, 18: 9-26.
- Silva, M. J. D.; Carvalho, A. J. S.; Rocha, C. Q.; Vilegas, W.; Silva, M. A.; Gouvêa, C. M. C. P. 2014. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpiniiifolia* leaves: chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. *South African Journal of Botany*, 93: 64-69.
- Silva, M. O.; Aquino, S. 2018. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 8: 472-482.
- Simić, A.; Manojlovic, Segan, D.; Todorovic. 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12: 2327-2340.
- Sindhi, V.; Gupta, V.; Sharma, K.; Bhatnagar, S.; Kumari, R.; Dhaka, N. 2013. Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7: 828-835.

- Singh, N. K.; Garabadu, D.; Sharma, P.; Shrivastava, S. K.; Mishra, P. 2018. Anti-allergy and anti-tussive activity of *Clitoria ternatea* L. in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 224: 15-26.
- Singh, N. K.; Vemu, J. B.; Purna, M.; Singh, H.; Dumka, V. K.; Sharma, S. K. 2016. Acaricidal activity of leaf extracts of *Dalbergia sissoo* Roxb. (Fabaceae) against synthetic pyrethroid resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Research in Veterinary Science*, 106: 1-6.
- Singh, R. J.; Chung, G. H.; Nelson, R. L. 2007. Landmark research in legumes. *Genome*, 50: 525-537.
- Sireesha, B.; Reddy, B. V.; Basha, S. K.; Chandra, K.; Anasuya, D.; Bhavani, M. 2019. A review on pharmacological activities of alkaloids. *World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*, 1: 230-234.
- Siriwong, S.; Teethaisong, Y.; Thumau, K.; Dunkhunthod, B.; Eumkeb, G. 2016. The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 17: 1-24.
- Souza, L. A. G. 2012. Guia da biodiversidade de Fabaceae do Alto Rio Negro. Projeto Fronteiras: Alto Rio Negro. Amazonas, 118 p.
- Sprent, J. I.; Ardley, J. K.; James, E. K. 2013. From North to South: a latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany*, 89: 31-41.
- Stevens, P.F. (2001 em diante). *Site de filogenia de angiospermas*. Versão 14, julho de 2017. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [acessado em 07 de junho de 2020].
- Sulaiman, R.; Basavarajappa, H. D.; Corson, T. W. 2014. Natural product inhibitors of ocular angiogenesis. *Experimental Eye Research*, 129: 161-171.
- The Plant List (2020). Versão 1.1. Publicado na Internet; <http://www.theplantlist.org/> (acessado em 1º de janeiro de 2020).
- Theis, N.; Lerchau, N. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164: 93-102.
- Torabian, S.; Farhangi-Abriz, S.; Denton, M. D. 2019. Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. *Soil and Tillage Research*, 185: 113-121.
- Tripathi, A.; Gupta, P. S.; Singh, S. K. 2019. Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of *Bauhinia variegata* flower extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19: 101142.
- Tungmunnithum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yangsabai, A. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical. *Medicines*, 5: 93.

- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Mark, T. D.; Mazur, M.; Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidant in normal physiological. *The International of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84.
- Verpoorte, R.; Heijden, R. V.; Hoopen, H. J. G.; Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21: 467-479.
- Vieira, L. F. A.; Reis, M. D. S.; Brandão, A. R. A.; Viana, I. M. M. N.; Silva, J. P.; Barreto, E.; Smaniotto, S. 2013. Anxiolytic-like effect of the extract from *Bowdichia virgilioides* in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23: 680-686.
- Wang, F.; Cao, Y.; Liu, H-Y.; Xu, S-F.; Han, R. 2003. Anti-invasion and anti-angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells. *Journal of Asian Natural Products Research*, 5: 121-129.
- Wang, H.; Tang, M.; Su, C.; Zhang, W.; Xu, R.; Guan, Y.; Dai, C. 2018. The alleopathic compound luteolin from peanut litter affects peanut nodule formation and the rhizosphere microbial community. *Agronomy Journal*, 110: 2587-2595.
- Wang, S.; Alseekh, S.; Fernie, A. R.; Luo, J. 2019. The structure and function of major plant metabolite modifications. *Molecular Plant*, 12: 899-919.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.
- Wink, M. 2008. Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution. *Natural Product Communications*, 3: 1205-1216.
- Wink, M. 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 89: 164-175.
- Woldemichael, G. M.; Franzblau, S. G.; Zhang, F.; Wang, Y.; Timmermann, B. N. 2003. Inhibitory Effect of Sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Medica*, 69: 628-631.
- Yamamoto, E. S.; Campos, B. L. S.; Laurenti, M. D.; Lago, J. H. G.; Grecco, S. S.; Corbett, C. E. P.; Passero, F. D. 2014. Treatment triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits Leishmania (*Leishmania*) amazonensis spreading and improves Th1 immune response in infected mice. *Parasitology Research*, 113: 333-339.
- You, Y-J.; Nam, N-H.; Kim, Y, K.; Bae, K-H.; Ahn, B-Z. 2003. Antiangiogenic Activity of Lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytotherapy Research*, 17: 341-344.
- Young, I. S.; Woodside, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186.
- Yunk, 1989.

Zang, M.; Hu, L.; Zhang, B.; Zhu, Z.; Li, J.; Zhu, Z.; Yan, M.; Liu, B. 2017. Luteolin suppresses angiogenesis and vasculogenic mimicry formation through inhibiting Notch1-VEGF signaling in gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490: 913-919.

Zurich, L. R. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9: 357-396.

Objetivos

Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico dos extratos de folhas, ramos e cascas de *Campsiandra comosa* Benth. e avaliar suas atividades química e biológicas.

Objetivos específicos

- Fracionar e purificar as substâncias presentes nos extratos de folhas, ramos e cascas de *C. comosa*;
- Testar extratos e/ou substâncias isoladas para as atividades de toxicidade frente à *Artemia salina*, antioxidante, antimicrobiana e antiangiogênese;
- Identificar ou elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas por meio de métodos espectroscópicos e espectrométricos.

CAPÍTULO 1

Estudo fitoquímico das folhas e cascas de *Campsiandra comosa* Benth.

Introdução

As substâncias derivadas das plantas tornaram-se um grande interesse em virtude das suas variáveis aplicações como matérias-primas para indústrias agrícolas, cosméticos, de alimentos e drogas farmacêuticas (Balandrim *et al.*, 1985; Campos *et al.*, 2018). Entretanto, mesmo sendo considerado de grande importância o isolamento e a identificação de substâncias naturais são representados por uma pequena porcentagem comparada à quantidade de espécies vegetais que dispomos na nossa flora (Hamburger & Hostettman, 1991; Harvey, 2000).

A fitoquímica, por sua vez, pode contribuir significativamente através da caracterização estrutural dos metabólitos secundários presentes em um vegetal (Braz-Filho, 2010). Dessa forma, as plantas a serem analisadas podem ser utilizadas frescas ou secas e coletadas aleatoriamente ou de acordo com indicações de comunidades tradicionais (Das *et al.*, 2010). As práticas de extração utilizam a separação das substâncias da matriz vegetal, empregando técnicas e solventes seletivos para extração. Os solventes difundem-se nos tecidos sólidos das plantas com a finalidade de solubilizar as substâncias que apresentam a mesma polaridade (Pandhey & Tripathi, 2014).

Existem algumas variações em métodos de extração, mas o fundamental é moer o material vegetal o mais fino, para aumentar a área de superfície de contato obtendo por sua vez, um maior rendimento do extrato (Das *et al.*, 2010). Com a definição de diferentes objetivos, são aplicados também diferentes métodos, entre eles, a extração por exaustão que consiste na extração sucessiva com solventes em ordem crescente de polaridade com o propósito de obter uma vasta diversidade de substâncias presentes no extrato (Tiwari *et al.*, 2011).

Com um conjunto de metabólitos, a maioria dos produtos naturais necessita de um bom grau de separação e purificação para obtenção das substâncias. O processo de separação inclui as características moleculares referentes à adsorção (líquido-sólido), partição (líquido-líquido) e afinidade ou diferença de pesos moleculares (Coskum, 2016). Além disso, a cromatografia em camada fina e cromatografia em coluna como ferramentas analíticas, também são técnicas bastante utilizadas por serem mais vantajosas, econômicas e apresentar disponibilidade em diferentes fases estacionárias (Altemini *et al.*, 2017). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também é utilizada para separação de substâncias, assim como no processo de purificação das mesmas, esse método é bastante utilizado devido a sua

versatilidade, tempo e reprodutibilidade na separação de produtos naturais (Wolfender *et al.*, 2010). Porém, as escolhas das técnicas a serem utilizadas, dependem do grau de mistura do extrato ou fração (Thammana, 2016).

Para a determinação das informações estruturais que levam a identificação da(s) substância(s) presentes em um extrato são utilizadas técnicas espectroscópicas, ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN de ^1H e ^{13}C) e espectrometria de massa (EM), que auxiliam na caracterização estrutural das moléculas (Rasul, 2018). Essas técnicas contribuem e permitem satisfatoriamente a determinação das substâncias, porém devem ser considerados o tipo do material vegetal, características do solvente utilizado e quantidade da amostra (Abubakar & Haque, 2020). Dessa maneira, um direcionamento eficiente pode ser realizado para a obtenção de uma fração ativa ou produtos naturais puros, com características químicas e biológicas importantes (Hostettman *et al.*, 1996).

O presente capítulo trata da análise fitoquímica dos extratos hexânico e metanólico de folhas e cascas do tronco de *Campsiandra comosa*.

Material e Métodos

Coleta e preparo do material vegetal

O material de *C. comosa* foi coletado no Lago do Catalão (S 03° 09.396' / W 059° 55.217') próximo à cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil (Fig. 6), e a exsicata está depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA (n° 258668 e possui números de código de barras: INPA0030758 e INPA0030759). A coleta foi registrada no SISGEN sob o número AF9CA41. A coleta foi realizada no mês de agosto, no período de transição (chuvoso para o seco) e identificada com auxílio do parataxonomista Lucas Mergulhão. O mesmo indivíduo coletado já apresentava identificação em herbário. O material coletado foi separado em folhas, ramos e cascas do tronco, em seguida foram secos em estufa de circulação ventilada a <50 °C e posteriormente triturados em moinho de facas (Tecnal, modelo Willye TE-650, Brasil), levando em consideração que os ramos eram firmes e resistentes.



Figura 6: Mapa de identificação do Lago Catalão (AM), local de coleta de *C. comosa*

Obtenção dos extratos de *C. comosa*

O material vegetal seco (folhas, ramos e cascas) foi submetido à extração com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano - Hex; metanol - MeOH e água - H₂O). Cada extração foi realizada por três vezes em banho de ultrassom (40 kHz) por 20 minutos para cada solvente. Os extratos hexânicos e metanólicos foram concentrados em evaporador rotativo (Fisatom, Brasil) e os extratos aquosos concentrados em um liofilizador (Christ, Alemanha) (Fig. 7).

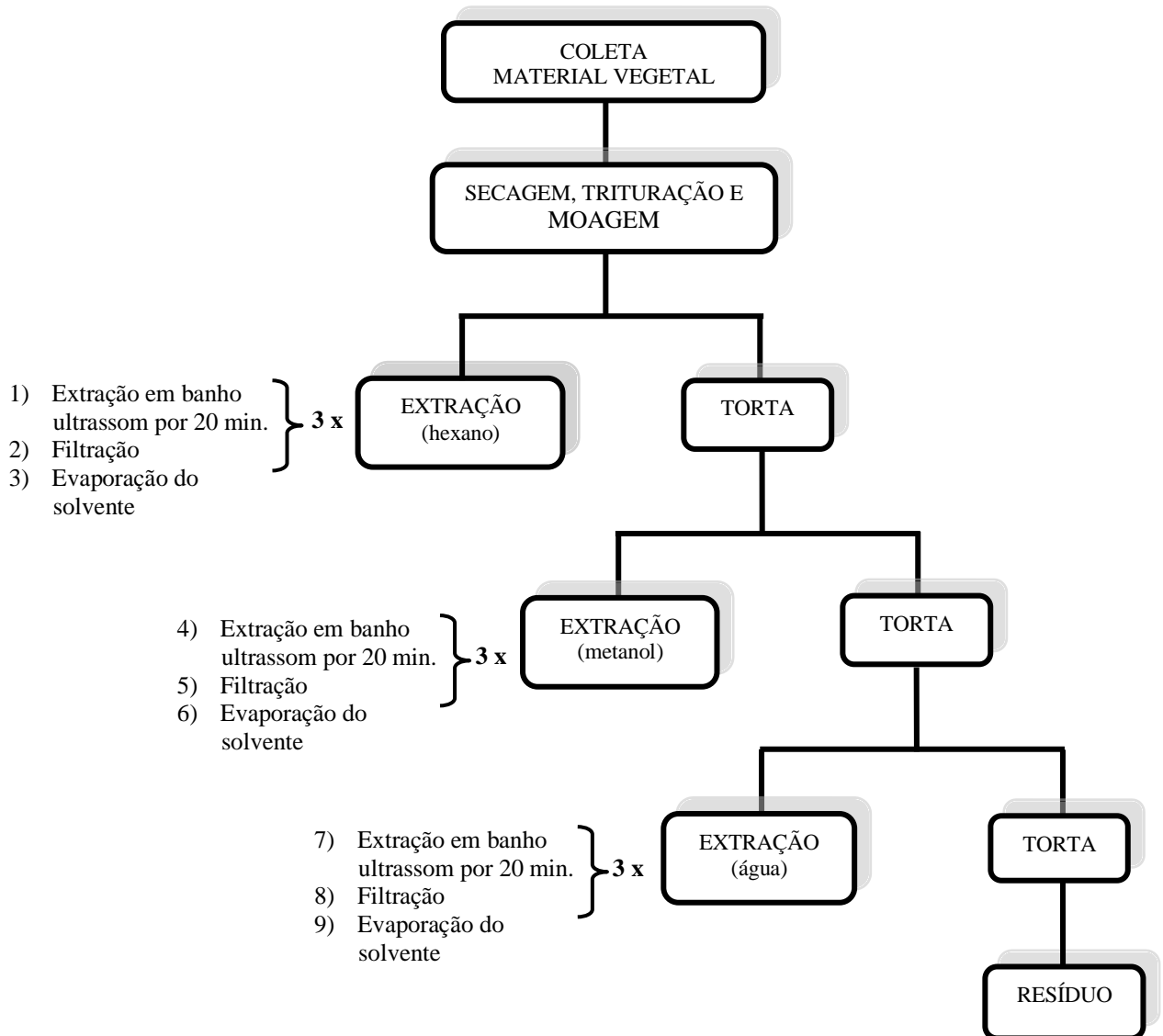


Figura 7: Fluxograma demonstrando a obtenção dos extratos de folhas, ramos e cascas de *C. comosa*.

Foram obtidos extratos hexânicos, metanólicos e aquoso das folhas, ramos e cascas do tronco. No entanto, para o estudo fitoquímico e biológico nesta tese foram utilizados apenas os extratos metanólicos e hexânicos devido a grande quantidade de material e tempo de execução do trabalho.

Cromatografia em camada delgada dos extratos de *C. comosa*

A partir dos extratos hexânicos e metanólicos de folhas, ramos e cascas de *C. comosa* foi realizado uma triagem, na qual os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Os mesmos foram aplicados com auxílio de capilares de vidro em cromatoplaças de sílica gel (Macherey - Nagel) e observados em câmera de luz UV nos

comprimentos de onda 254 e 365 nm, e revelados com reagentes químicos NP/PEG, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, FeCl_3 e anisaldeído sulfúrico. De acordo com a triagem por CCDC, foram observadas classes de substâncias terpênicas e fenólicas, principalmente flavonoides, o extrato metanólico das cascas foi escolhido para iniciar as primeiras análises e fracionamentos.

Fracionamento do extrato metanólico das cascas do tronco de *C. comosa*

Inicialmente, o extrato metanólico das cascas (10 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido em um funil de separação. O extrato foi dissolvido em 1 L de uma solução de MeOH/H₂O (1:1) e extraído três vezes, primeiramente com diclorometano (DCM), obtendo-se a fase DCM e depois com acetato de etila (AcOEt) também extraído em três repetições, obtendo a fase AcOEt. Após a análise por CCDC das fases obtidas, a fase DCM foi selecionada para o fracionamento, pois a mesma apresentava maior riqueza de classes químicas.

Para uma melhor separação das moléculas por peso molecular, visto a dificuldade na separação por diferença de polaridade, a fase DCM (381 mg) foi fracionada em uma coluna aberta (\emptyset x h: 3 cm x 30 cm) com Sephadex LH-20 utilizando como eluente MeOH 100% em modo isocrático. Foram coletadas 30 frações que foram posteriormente reunidas: frações 3-4 (187 mg), 10 (44 mg), 11-12 (17 mg), 13-14 (24 mg) e 15-17 (17 mg). A fração 3-4 (CFDcs 3-4) foi selecionada e refracionada em coluna aberta (1,3 x 32 cm) de sílica (18,7 g) com a fase móvel Hex/AcOEt (7: 3) até MeOH 100% (Tab. 4).

Tabela 4: Sistemas utilizados no fracionamento da CFDcs 3-4 do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/AcOEt (7:3)	0-6
Hex/AcOEt (6:4)	7-9
Hex/AcOEt (1:1)	10-13
Hex/AcOEt (3:7)	14-17
AcOEt 100%	19-22
AcOEt/MeOH (1:1)	23-26
MeOH 100%	27-30

Trinta subfrações foram coletadas e analisadas por CCDC, dentre as quais as subfrações 2-6 foram refracionadas. Para esse fracionamento (CFD 3-4_2-6) foi usada uma

coluna aberta (\emptyset x h: 1,2 x 17,5 cm) de sílica (7,5 g) com a fase móvel Hex/DCM até DCM/MeOH (95: 5), no qual foram obtidas 20 subfrações (Tab. 5). Após análise por CCDC, RMN e espectrometria de massas (EM), as subfrações de 5-7 e 9-12 depois de reunidas por apresentaram maior pureza, foram caracterizadas e definidas como substâncias 1 e 2, respectivamente.

Tabela 5: Sistemas utilizados no fracionamento da CFD 3-4_2-6 do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM (1:1)	0-2
Hex/DCM (4:6)	3-5
Hex/DCM (3:7)	5-7
Hex/DCM (2:8)	8-12
Hex/DCM (1:9)	12-13
DCM 100%	14-15
DCM/MeOH (95:5)	16-20

Para auxiliar na purificação das outras frações (10, 11-12, 13-14, 15-17) foi realizada a técnica de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), usando placas de vidro de 20 x 20 cm revestidas com sílica gel e um indicador de fluorescência (Macherey-Nagel - 0,2-0,5 mm). Para o preparo das placas, 100 g de sílica foram solubilizados em 300 mL de água destilada. Uma vez solubilizada e sem formação de bolhas visíveis, a sílica foi aplicada às placas. Após a aplicação, as placas foram secas em estufa por 1 hora a 100 °C para evaporar completamente a água e ativar a sílica.

Foram utilizadas quatro placas para análise, utilizando as seguintes frações selecionadas: 10 (placa 1), 11-12 (placa 2), 13-14 (placa 3) e 15-17 (placa 4). Após ativação, as amostras foram aplicadas com o auxílio de capilares de vidro, com um espaço de 1 cm da base, a fim de evitar o contato com o eluente. As placas foram eluídas com o sistema DCM/acetona (7:3) e em seguida observadas sob luz UV (365 nm), onde duas subfrações foram coletadas de cada placa eluída. Após análise por CCDC de cada placa todas as subfrações denominadas como 1 foram coletadas, analisadas e identificadas como substância 3, a subfração 2 coletada estava em mistura, não sendo possível sua identificação. Os

solventes utilizados foram de classe comercial (Araguaia) e destilados no laboratório. Os solventes deuterados, utilizados nas análises espectroscópicas, foram do Cambridge Isotope Laboratories. O fluxograma está representando as etapas acima na figura 8.

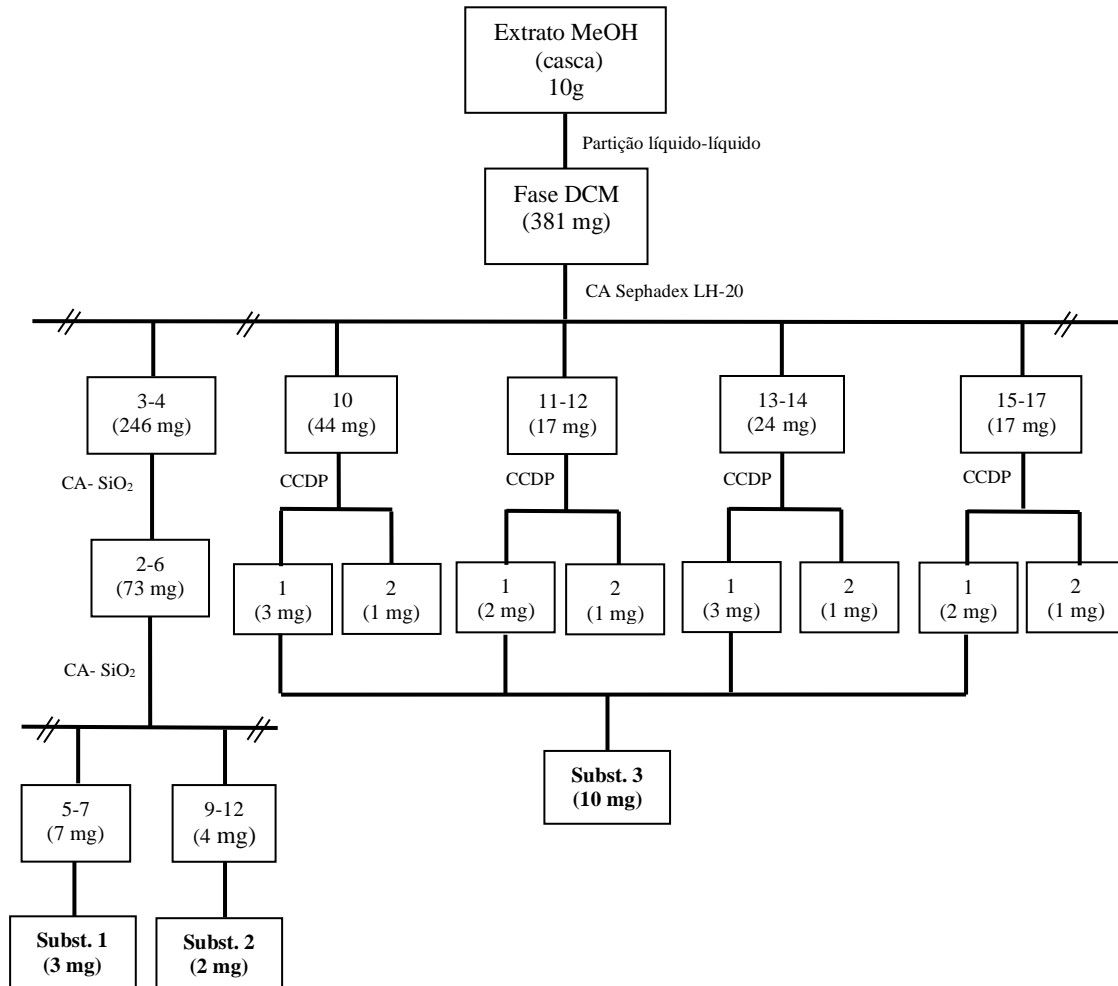


Figura 8: Fluxograma do fracionamento e isolamento das substâncias 1, 2 e 3 no extrato metanólico da fase DCM das cascas de *C. comosa*.

Fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*

Após investigação dos metabólitos secundários presentes na fase DCM do extrato MeOH, o estudo fitoquímico foi direcionado para a fase AcOEt. Através de análise por CCDC da fase AcOEt, foi possível inferir também a presença da classe de terpenos e fenólicos, com evidências para os flavonoides quando revelados em NP/PEG.

A fase AcOEt (900 mg) foi fracionada em coluna aberta (\emptyset x h: 2,7 cm x 30 cm) de sílica gel (100 g). A amostra precisou ser preparada em pastilha, já que a mesma não era

solúvel no primeiro sistema da coluna. A fase móvel utilizada foi o sistema AcOEt/MeOH 7:3 até MeOH 100%, no qual foi coletado um total de 30 frações (Tab. 6).

Tabela 6: Sistemas utilizados no fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
AcOEt/MeOH (7:3)	0-5
AcOEt/MeOH (6:4)	6-10
AcOEt/MeOH (5:5)	11-16
AcOEt/MeOH (1:1)	17-21
AcOEt/MeOH (3:7)	22-25
MeOH 100%	26-30

A análise por CCDC das frações obtidas nessa coluna apresentou frações interessantes para identificação de fitoquímicos quando utilizados os reveladores físicos, anisaldeído sulfúrico, FeCl₃ e NP/PEG. No entanto, foram selecionadas as primeiras nove frações, pois as demais ainda continham muita mistura não sendo possível obter um sistema de separação favorável. As frações 5-6 e 7-9 foram reunidas e refracionadas. Após serem reveladas com NP/PEG as mesmas apresentaram fluorescência intensa quando observadas sob luz UV 365 nm, bem como manchas escuras em anisaldeído sulfúrico e em FeCl₃, na mesma área de retenção.

Para o primeiro fracionamento foi feita uma coluna aberta de florisil- MARCA (Ø x h: 2 cm x 57 cm), da fração 5-6 (213 mg), com preparo da amostra em pastilha. Os sistemas de eluição utilizados foram de DCM/AcOEt (7:3) até MeOH 100% (Tab. 7)

Tabela 7: Sistemas utilizados no fracionamento da CFA 5-6 proveniente da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM/AcOEt (7:3)	0-2
DCM/AcOEt (6:4)	3-6
DCM/AcOEt (1:1)	7-11
DCM/AcOEt (3:7)	12-15

AcOEt 100%	17-20
AcOEt/acetona (9:1)	21-25
AcOEt/acetona (8:2)	26-27
AcOEt/acetona (6:4)	28
AcOEt/acetona (1:1)	29-30
AcOEt/MeOH (9:1)	31-33

Para essa coluna (CFA 5-6) foram obtidas 33 frações que foram analisadas por CCDC, de onde foram reunidas as frações 25-28 para análise de RMN de ^1H e as frações de 30-32 para um novo fracionamento. Por apresentarem indícios de substâncias fenólicas essas frações foram selecionadas para dar continuidade aos fracionamentos. Contudo, apenas a fração 25-28 (CFA 5-6_25-28) apresentou-se mais isolada quando reveladas em CCDC, com fluorescência azul bem intensa em luz UV 365nm e branca em NP/PEG. Após análise dos espectros uni e bidimensionais a mesma foi identificada e caracterizada como substância 4. Essas etapas estão descritas no fluxograma (Fig. 9)

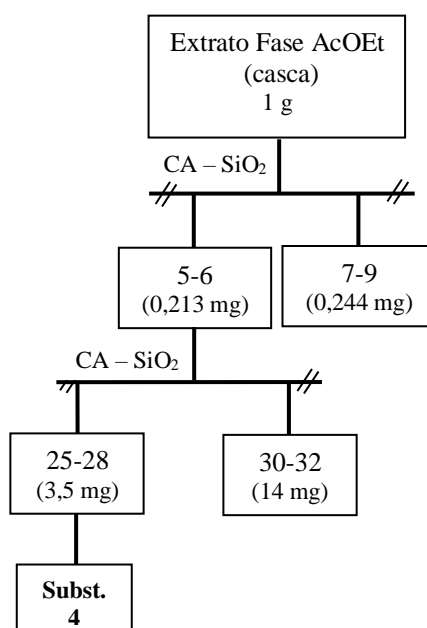


Figura 9: Fluxograma do fracionamento da CFA 5-6_25-28 da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

A fração 30-32 (CFA5-6_30-32) foi submetida a técnica de CCDP, para purificação de substâncias de interesse. No entanto, quando a amostra foi solubilizada no sistema DCM/AcOEt foi possível observar a formação de duas fases com uma parte incolor e outra

bem escura (de coloração laranja). Então se optou por coletar essas fases separadamente e analisar por CCDP a fração que apresentou maior massa.

A amostra da fração 2 (CFA 5-6_30-32_2) com 10,4 mg foi solubilizada no sistema DCM/AcOEt (7:3) e eluída uma única vez, sendo suficiente a separação em 3 manchas quando observadas sob luz UV 254 e 365 nm. Essas manchas foram coletadas e observadas, por CCDC, da qual as subfrações 1 e 2 foram selecionadas para análise de RMN de ^1H . No entanto, não foi possível realizar a identificação das substâncias, pois as mesmas ainda encontravam-se em mistura e em baixa concentração. As etapas desse fracionamento estão representadas na figura 10.

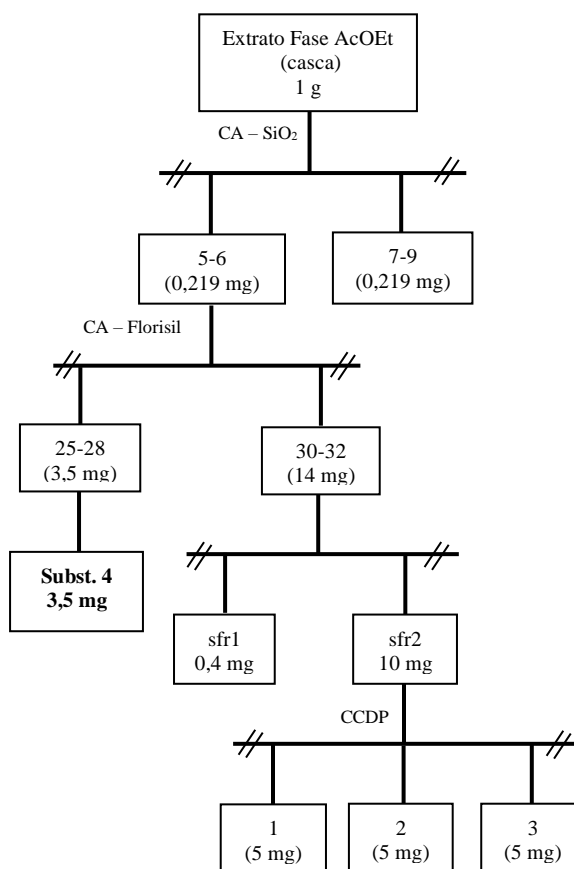


Figura 10: Fluxograma do fracionamento da CFA 5-6_30-32_2 da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

O fracionamento da fração 7-9 (CFA 7-9), oriundas da coluna da fase AcOEt, foi realizado em coluna aberta (\emptyset x h: 1,8 x 63 cm) de sílica (24 g), com 244 mg de amostra

preparada em pastilha. A fase móvel utilizada foi DCM/AcOEt (7:3) até acetona/MeOH (9:1), obtendo-se 32 frações (Tab. 8).

Tabela 8: Sistemas utilizados no fracionamento da CFA 7-9 proveniente da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM/AcOEt (7:3)	0-3
DCM/AcOEt (6:4)	4-8
DCM/AcOEt (1:1)	9-13
DCM/AcOEt (3:7)	14-17
AcOEt 100%	18-21
AcOEt/acetona (9:1)	22-24
AcOEt/acetona (8:2)	25-26
AcOEt/acetona (6:4)	28-29
AcOEt/acetona (1:1)	30
AcOEt/MeOH (9:1)	31-32

As frações coletadas foram analisadas por CCDC, entre as quais as mesmas foram reunidas de 2-10 e 13-18. A fração classificada como CFA 7-9_2-10, que apresentou o mesmo R_f e característica de um flavonoide, foi analisada por RMN de ¹H obtendo-se dados uni e bidimensionais. Porém, como a fração apresentou características semelhantes à substância 3 (Fase DCM), a amostra foi purificada por HPLC, com objetivo de certificar que se tratava ou não da mesma substância já isolada.

A purificação foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (modelo) utilizando uma coluna (C18) semi-preparativa (Phenomenex®, 250 x 10 mm, 5 µm), com volume de injeção 50 µL, fluxo 4,7 mL/min e eluição isocrática com 75% MeOH/H₂O. Foram coletadas 4 frações, no qual a fração 3 correspondia a substância de interesse, no tempo de retenção (t_R) de 5,78 minutos. A fração 4, foi então analisada por RMN de ¹H confirmando que a substância 5 isolada da fase AcOEt correspondia a mesma substância 3 isolada na fase DCM das cascas de *C. comosa*.

A fração 13-18 da coluna CFA 7-9 também formou duas fases, sendo selecionada a fração 1 com maior massa (7 mg). Essa fração (CFA 7-9_13-18) foi purificada por CCDP utilizando como fase móvel CHCl₃/MeOH (9:1) e eluída apenas uma vez. Foram separadas 4

manchas que foram visualizadas em luz UV 254 e 365 nm, caracterizadas em 4 frações (Fig. 11). A fração 2 obtida, apresentou características flavonoídicas, sendo analisada por RMN de ^1H e espectrometria de massas. No entanto, até o fechamento desta tese, a substância ainda está em processo de elucidação estrutural.

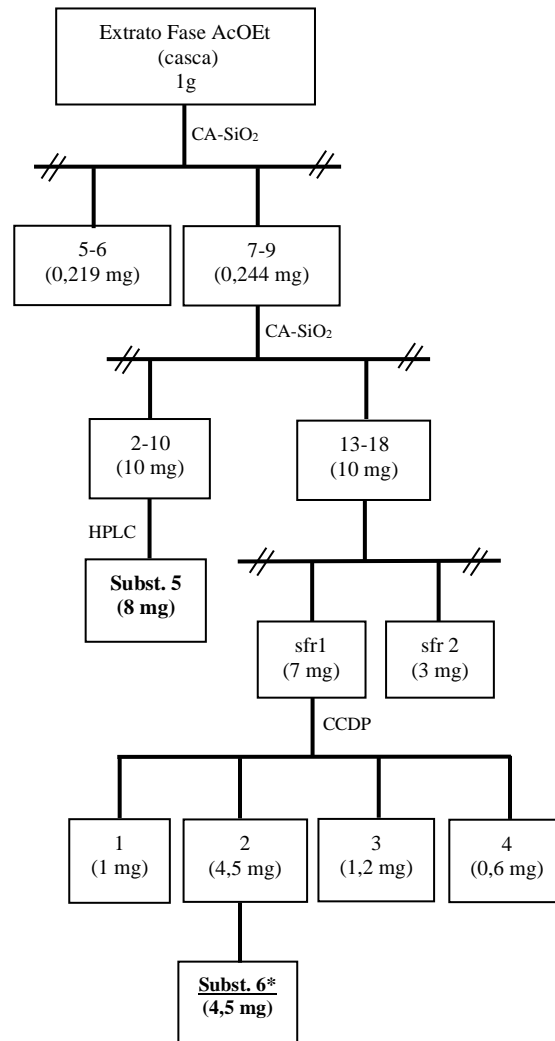


Figura 11: Fluxograma do fracionamento da (CFA 7-9) e isolamento da substância 6 *(ainda em análise) da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas de *C. comosa*.

Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*

O extrato hexânico de folhas foi a amostra seguinte a ser selecionada para análise e fracionamento. Primeiramente, foi realizada uma análise por CCDC, utilizando os reveladores físicos (luz UV 254 e 365 nm) e químicos (NP/PEG, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, FeCl_3 e anisaldeído sulfúrico), no qual foi observada a presença de substâncias terpenicas e indícios de flavonoides quando revelados com FeCl_3 e NP/PEG.

O fracionamento foi realizado com 6g do extrato de folhas (CEHf) preparado em forma de pastilha. Foi utilizada uma coluna aberta (\emptyset x h: 3 cm x 30 cm) de sílica, com fase móvel Hex/AcOEt (8:2) a AcOEt/MeOH (1:1), da qual foram obtidas 39 frações (Tab. 9).

Tabela 9: Sistemas utilizados no fracionamento do extrato hexânico de folhas (CEHf) de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/AcOEt (8:2)	0-8
Hex/AcOEt (7:3)	8-18
Hex/AcOEt (6:4)	19-25
Hex/AcOEt (1:1)	26-30
100% AcOEt	31-35
AcOEt/MeOH (1:1)	35-39

Após o fracionamento, as frações coletadas foram analisadas por CCDC e de acordo com a utilização dos reveladores físicos (luz UV 254 e 365 nm) e químicos (anisaldeído, FeCl₃, NP/PEG), as frações foram reunidas em 19-21 (100 mg), 22-23 (83 mg), 25-28 (35 mg), 29-30 (229 mg) e refracionadas, bem como a fração 34 que também se mostrou interessante para continuação do fracionamento do extrato hexânico, pois apresentou um perfil de várias manchas com diferentes colorações intensificadas em luz UV 365 nm e NP/PEG.

Fracionamento coluna CEHf 19-21

O fracionamento da amostra CEHf 19-21 (100 mg) foi realizado em coluna aberta (\emptyset x h: 23 cm x 1 cm) de sílica (10 g) e a fase móvel CHCl₃/MeOH (98:02) até MeOH 100%, obtendo-se 24 frações (Tab. 10).

Tabela 10: Sistemas utilizados no fracionamento da coluna CEHf 19-21 das folhas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
CHCl ₃ /MeOH (98:2)	0-3
CHCl ₃ /MeOH (97:3)	4-6
CHCl ₃ /MeOH (96:4)	7-9
CHCl ₃ /MeOH (95:5)	10-11
CHCl ₃ /MeOH (94:6)	12-13
CHCl ₃ /MeOH (93:7)	14-15
CHCl ₃ /MeOH (92:8)	16-17
CHCl ₃ /MeOH (91:9)	18-19
CHCl ₃ /MeOH (90:10)	20-21
100% MeOH	22-24

A fração 2-3 quando analisada por CCDC apresentou manchas com coloração amarelada em anisaldeído, escuras em FeCl₃ e fluorescências bem intensas nas cores amarelo e azul, características de flavonoides, quando reveladas em NP/PEG, sob luz UV 365 nm. Dessa forma, essas frações foram reunidas e refracionadas. A CEHf 19-21_2-3 (12 mg) foi fracionada em coluna aberta (Ø x h: 8 cm x 1 cm) de sílica (1,2 g), utilizando como fase móvel o sistema CHCl₃/MeOH (98:02) até MeOH 100%, obtendo-se 13 frações (Tab. 11).

Tabela 11: Sistemas utilizados no fracionamento da (CEHf 19-21_2-3) do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
CHCl ₃ /MeOH (98:2)	0-3
CHCl ₃ /MeOH (96:4)	4-6
CHCl ₃ /MeOH (94:6)	7-9
CHCl ₃ /MeOH (90:10)	10-11
CHCl ₃ /MeOH (1:1)	12
MeOH 100%	13

As frações recolhidas foram novamente avaliadas por CCDC, reveladas em luz UV 254 e 365 nm, anisaldeído sulfúrico, FeCl_3 e NP/PEG. A fração alvo com características flavonoídicas na CCDC ainda encontrava-se em mistura, que aparentemente estavam em menor concentração. Visando uma melhor separação, foi selecionada a fração 1 (CEHf 19-21_2-3_1) (7 mg) para um novo fracionamento que foi realizada em coluna aberta (\varnothing x h: 7 cm x 1 cm) de sílica (0,7 g) utilizando um único sistema ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1), obtendo-se 3 frações. A separação foi acompanhada com luz UV 365 nm. Dessa coluna foi coletada a substância de interesse na fração 1 que posteriormente foi enviada para análise de RMN de ^1H , confirmando o isolamento e identificação da substância 6, do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*. As etapas acima estão representadas na figura 12.

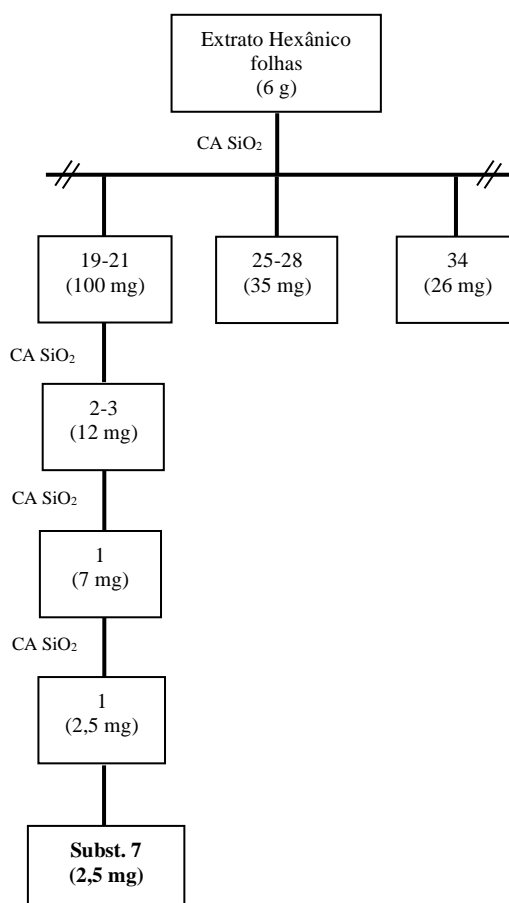


Figura 12: Fluxograma do fracionamento da fração CEHf 19-21 do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*.

Fracionamento da coluna CEHf 22-23

As frações 22-23 (83 mg) obtidas da CEHf foram reunidas, preparada em pastilha e fracionada em coluna aberta (\varnothing x h: 11cm x 1,5 cm) de sílica (8,3 g). A fase móvel utilizada foi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:02) até MeOH 100%, obtendo-se 18 frações (Tab.12).

Tabela 12: Sistemas utilizados no fracionamento da CEHf 22-23 do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:2)	0-2
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (96:4)	3-5
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (94:6)	6-7
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (92:8)	8-10
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10)	11-12
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (88:12)	13-15
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20)	15-17
MeOH 100%	18

As frações obtidas foram analisadas por CCDC com os reveladores físicos (luz UV 254 nm e 365 nm) e químicos (anisaldeído sulfúrico, FeCl_3 e NP/PEG). As frações obtidas de 1-4 revelaram manchas escuras em anisaldeído sulfúrico e em FeCl_3 , no entanto mais fracas e fluorescência em NP/PEG e sob luz UV 365 nm. No entanto, as frações 2-3 apresentavam similaridade, por isso foram reunidas para refracionamento. A fração 4, não revelou em FeCl_3 , mas também foi selecionada para refracionamento separadamente.

Fracionamento CEHf (22-23) 2-3

A fração 2-3 (7 mg) foi fracionada em coluna aberta (\varnothing x h: 8 cm x 1 cm) de sílica (0,7 g), utilizando-se um único sistema para eluição $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ (9:1). Foram obtidas 4 frações, que foram analisadas por CCDC para identificar a presença da mancha escura e intensa reveladas. No entanto não foi obtido êxito neste fracionamento.

Fracionamento CEHf (22-23) 4

A fração 4 proveniente da coluna 22-23 (35 mg) foi refractionada em coluna aberta de sílica (\emptyset x h: 28,5 cm x 0,8 cm), com (3,5 g) de sílica gel. Os sistemas de eluição utilizados foram CHCl_3 /acetona (9:1) até acetona 100%. Foram obtidas 7 frações, dentre elas as frações (2-5) que apresentaram na análise de CCDC manchas amarelo mais escuro, quando reveladas com anisaldeído e FeCl_3 . As mesmas foram submetidas a análise de RMN de ^1H , no entanto devido a pouca massa não foi possível identificar a substância.

Fracionamento CEHf 25-28

A fração 25-28 (70 mg) foram reunidas e fracionadas em coluna aberta (\emptyset x h: 35 cm x 1,5 cm) de sílica (7 g) utilizando como fase móvel CHCl_3 /MeOH (98:02) até CHCl_3 /MeOH (84:16). Foram obtidas um total de 28 frações (Tab. 13).

Tabela 13: Sistemas utilizados no fracionamento da CEHf 25-28 do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*

Sistemas de eluição	Frações coletadas
CHCl_3 /MeOH (98:2)	0-4
CHCl_3 /MeOH (97:3)	5-7
CHCl_3 /MeOH (96:4)	8-9
CHCl_3 /MeOH (95:5)	10-11
CHCl_3 /MeOH (94:6)	12-14
CHCl_3 /MeOH (93:7)	15-17
CHCl_3 /MeOH (92:8)	18-19
CHCl_3 /MeOH (91:9)	20-21
CHCl_3 /MeOH (90:10)	22-23
CHCl_3 /MeOH (85:15)	24-25
CHCl_3 /MeOH (84:16)	26-28

Ao serem analisadas por CCDC a fração 1 apresentou indícios de flavonoides, no entanto foi obtida pouca massa. A fração 4, por apresentar fluorescência no mesmo R_f em NP/PEG e manchas azulada em anisaldeído sulfúrico, foi selecionada para um novo fracionamento. O fracionamento da CEHf 25-28_4 com 9 mg foi refractionada em coluna aberta (\emptyset x h: 8 cm x 1 cm) de sílica (0,9 g) utilizando como fase móvel CHCl_3 /MeOH 9:1 e

$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2, obtendo-se 6 frações. As frações 4 e 5 apresentaram um perfil químico semelhante e aparentemente sem misturas, as mesmas foram reunidas e analisadas por RMN. Não foi possível identificar a molécula, mas de acordo com alguns sinais característicos foi possível inferir que se tratava de um triglicerídeo. O fluxograma referente às etapas acima estão representadas na figura 13.

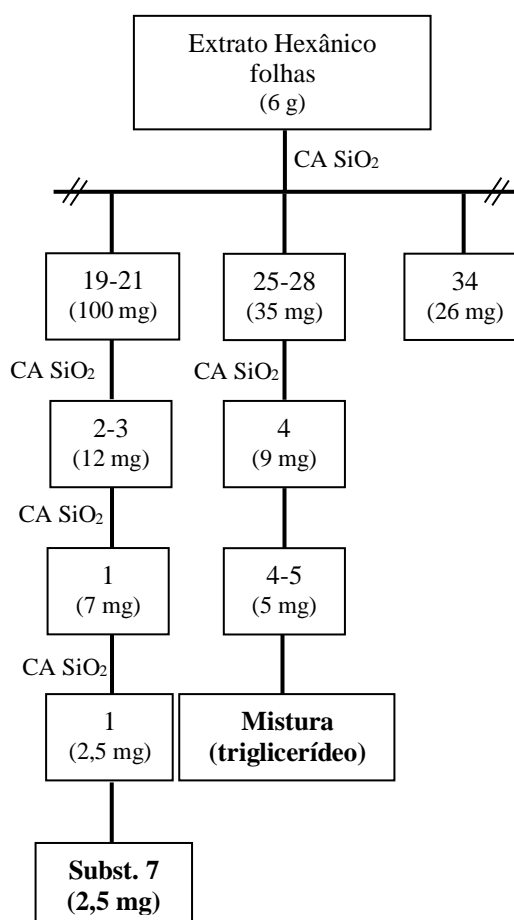


Figura 13: Fluxograma do fracionamento da fração CEHf 25-28 do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*.

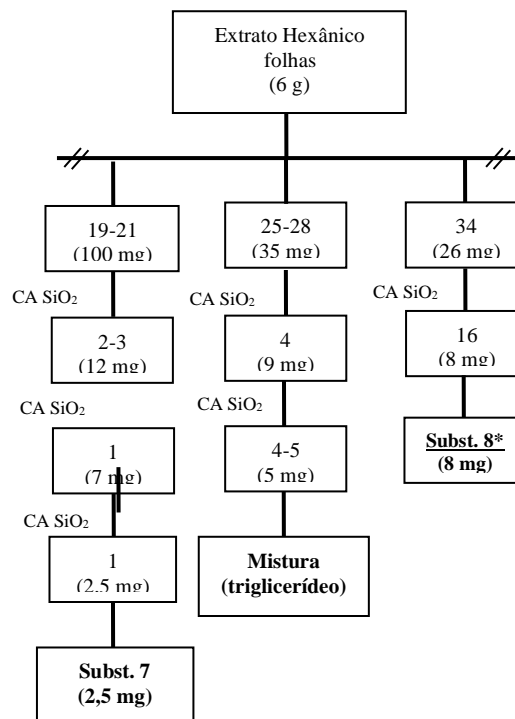
Fracionamento CEHf (34)

A fração 34 (263 mg) do extrato hexânico de folhas foi selecionada para refracionamento em coluna aberta (\emptyset x h: 29 cm x 1,7 cm) de sílica (26 g), utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:02) até $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20). No total, foram obtidas 29 frações (Tab. 14).

Tabela 14: Sistemas utilizados no fracionamento da CEHf 34 do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*.

Sistemas de eluição	Frações coletadas
CHCl ₃ /MeOH (98:2)	0-2
CHCl ₃ /MeOH (96:4)	3-6
CHCl ₃ /MeOH (94:6)	7-10
CHCl ₃ /MeOH (92:8)	11-14
CHCl ₃ /MeOH (90:1)	15-17
CHCl ₃ /MeOH (88:13)	18-20
CHCl ₃ /MeOH (86:14)	21-24
CHCl ₃ /MeOH (80:20)	25-26
CHCl ₃ /MeOH (90:10)	27-29

Após análise por CCDC, a fração 16 coletada apresentou uma mancha marrom escura ao ser revelado em anisaldeído sulfúrico e fluorescência azul intensa em NP/PEG sob luz UV 365 nm, sendo então enviada para análise de RMN de ¹H e ¹³C. A fração está em reanálise para melhor identificação e confirmação da substância de número 8 de *C. comosa*, presente no extrato hexânico das folhas. A descrição anterior está representada no fluxograma abaixo (Fig. 14).

**Figura 14:** Fluxograma do fracionamento da fração CEHf 34 do extrato hexânico das folhas de *C. comosa*.

Identificação das substâncias isoladas

Para a identificação estrutural das substâncias isoladas, foi utilizado o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 300 MHz (Fourier 300-Bruker) da Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais do INPA. As substâncias foram dissolvidas em solventes deuterados e os espectros de RMN uni e bidimensionais foram registrados em 300 MHz. Os dados de RMN foram processados com os softwares ACD/NMR Processor Academic Edition da Advanced Chemistry Development Inc. (ACD/Labs) e TopSpin 3.6.2 (Bruker). Os valores dos deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) tendo o tetrametilsilano (TMS) como referência interna e as constantes de acoplamento (J) expressas em Hertz (Hz).

As massas exatas das substâncias foram obtidas por Espectrometria de Massas no modo positivo de ionização e com fonte APCI (Atmospheric-pressure chemical ionization) e ESI (Eletron Spray Ionization). As análises em LC-DAD-MS (Cromatografia Líquida Ultra Rápida Acoplada a Detector por Arranjo de Diodos e a Espectrômetro de Massas) foram obtidas pelo cromatógrafo Prominense UFLC (Shimadzu), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPDM-20A e injetor automático SIL-20A assim como espectrômetro de massas MicroTOF-Q II (Bruker). As análises foram realizadas por coluna Shim-pac XR-ODS C₁₈ (2,0 mm x 50,0 mm i.d.).

Para a substância 1, utilizou-se gradiente de eluição A(2-PrOH + 0,1 % HCOOH)/B(ACN + 0,1 % HCOOH) nas seguintes proporções: 100% em 0-5 min; 100 - 90% em 5-15 min; 90% em 15-17 min; 90-100% em 17-18 min e 100% em 18-20 min, com fluxo de 0,3 mL/min, *Split* de 0,06 mL(MS)/0,34 mL(desc), detecção no UV à 190-400 nm e pressão de 854 psi.

Para a substância 2, utilizou-se gradiente de eluição A(2-PrOH + 0,1 % HCOOH)/B(ACN + 0,1 % HCOOH) nas seguintes proporções: 100% em 0-4 min; 100 - 80% em 4-10 min; 80% em 10-15 min; 80-100% em 15-17 min e 100% em 17-20 min, com fluxo de 0,3 mL/min, *Split* de 0,06 mL(MS)/0,34 mL(desc), detecção no UV à 190-400 nm e pressão de 854 psi.

Para a substância 3, utilizou-se gradiente de eluição A(H₂O + 0,1 % HCOOH)/B(ACN + 0,1 % HCOOH) nas seguintes proporções: 100% em 0-4 min; 100 - 80% em 4-10 min; 80% em 10-15 min; 80-100% em 15-17 min e 100% em 17-20 min, com fluxo de 0,4 mL/min, *Split* de 0,06 mL(MS)/0,34 mL(desc), detecção no UV à 190-400 nm e pressão de 854 psi.

As condições aplicadas no espectrômetro de massas foram realizadas com voltagem de fonte APCI, 4,5 kV (modo positivo) e 2,6 kV (modo negativo); temperatura capilar, 250 °C; modo *full-scan* (100-900 Da). Apenas para a substância 3 foi possível realizar a análise também em modo negativo.

Resultados

Rendimento dos extratos obtidos

A partir dos extratos obtidos foi possível observar variações nos rendimentos. No extrato hexânico as folhas apresentaram maior porcentagem (1,55%), porém o mesmo continha uma maior massa de material vegetal. O mesmo foi observado no extrato metanólico das folhas com um rendimento de 5,25%. O rendimento obtido de acordo com o respectivo material vegetal (Tab. 15) foi um dos critérios também utilizado para iniciar a investigação fitoquímica de *C. comosa*.

Pode-se destacar ainda que o extrato metanólico se sobressai ao rendimento do extrato hexânico, mesmo que tenha sido utilizada uma quantidade menor de material como nas folhas e ramos. Isso ocorre devido a diferença na polaridade dos solventes de extração explicada em uma análise realizada em *Severinia buxifolia*. Assim como no estudo com *C. comosa*, os pesquisadores comprovaram um maior rendimento no extrato metanólico, indicando que a extração foi mais eficiente com solventes polares, sugerindo também uma maior concentração de substâncias apolares no extrato da planta (Truong et al. 2019).

Tabela 15: Massa dos extratos obtidos e seus respectivos rendimentos a partir da extração com os solventes hexano e metanol.

	Extrato	Material vegetal seco (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Hexano	Folhas	1,400	21,79	1,55
	Ramos	800	1,18	0,14
	Cascas	400	0,64	0,16
Metanol	Folhas	1,337	70,28	5,25
	Ramos	400	1,5	0,37
	Cascas	400	4,87	1,21

Análise por CCDC dos extratos de *C. comosa*

Com os resultados obtidos foi possível inferir inicialmente com análise de CCDC (Fig. 15) e através dos reveladores físicos (luz UV 254 e 365 nm), a presença de grupos cromóforos, com a intensificação das cores pelo uso dos reveladores químicos (NP/PEG, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, FeCl_3 e anisaldeído) indicou a presença de substâncias terpênicas nos três extratos hexânicos (manchas com cores rosas e roxas em $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ e anisaldeído), substâncias fenólicas nos extratos metanólicos das cascas e ramos (manchas com cores escuras com FeCl_3) e flavonoides nos três extratos metanólicos (manchas com coloração amarela intensa com NP/PEG e cores escuras com FeCl_3).

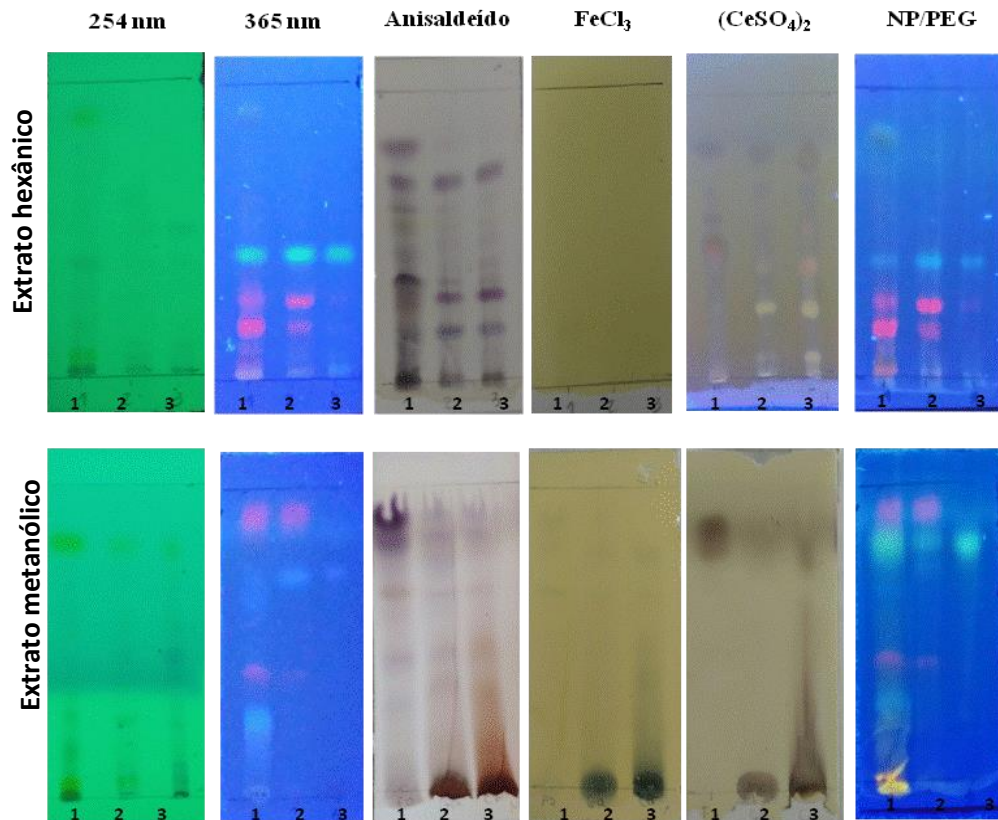


Figura 15: Análise por CCDC dos extratos hexânicos (1ª seção) utilizando o sistema Hex /AcOEt 8:2 e metanólicos (2ª seção), eluídos com o sistema AcOEt/MeOH (9:1).

Legenda: Órgão da planta utilizado 1) folhas, 2) ramos e 3) cascas.

Isolamento e identificação de substâncias

O estudo fitoquímico do extrato metanólico das cascas de *C. comosa* conduziu ao isolamento de cinco substâncias, sendo um esterol, um triterpeno e três flavonoides. Duas

outras substâncias estão em processo de elucidação estrutural e serão publicadas em artigos posteriores.

Substância 1

O espectro RMN de ^1H da fração 6 (Fig. 16) é referente a substância 1 (3 mg; Rf: 0,2), isolada na fase DCM do extrato metanólico das cascas. Com base nas informações espectroscópicas e dados da literatura de Cayme & Ragasa, 2004 (Tab. 16), a substância foi identificada como β -sitosterol. A mesma também foi confirmada por EM com m/z 397 [414 - $\text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$ (modo positivo) correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ (Fig. 17)

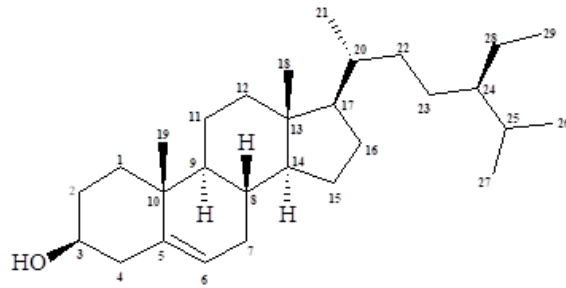


Figura 16: Estrutura molecular do β -sitosterol.

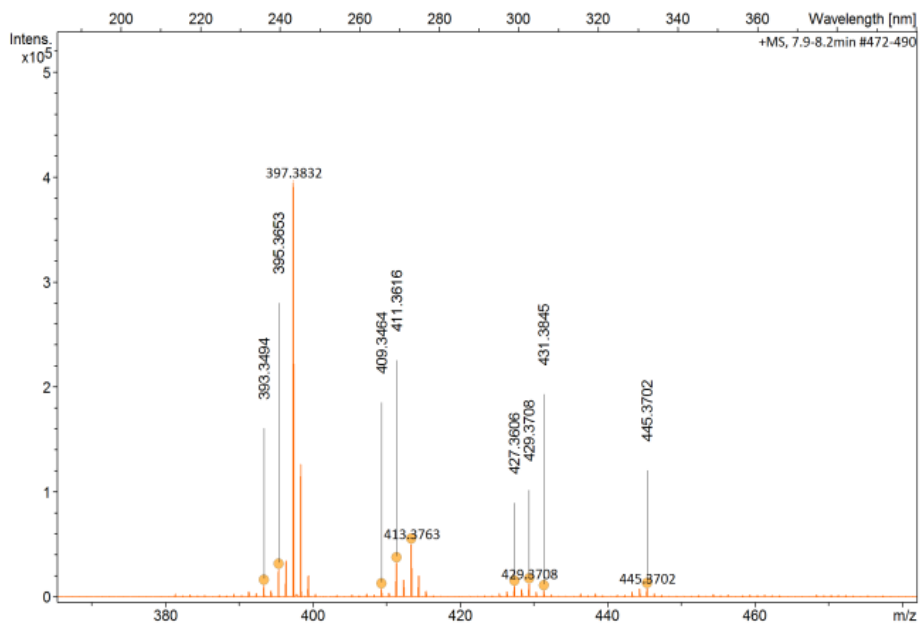
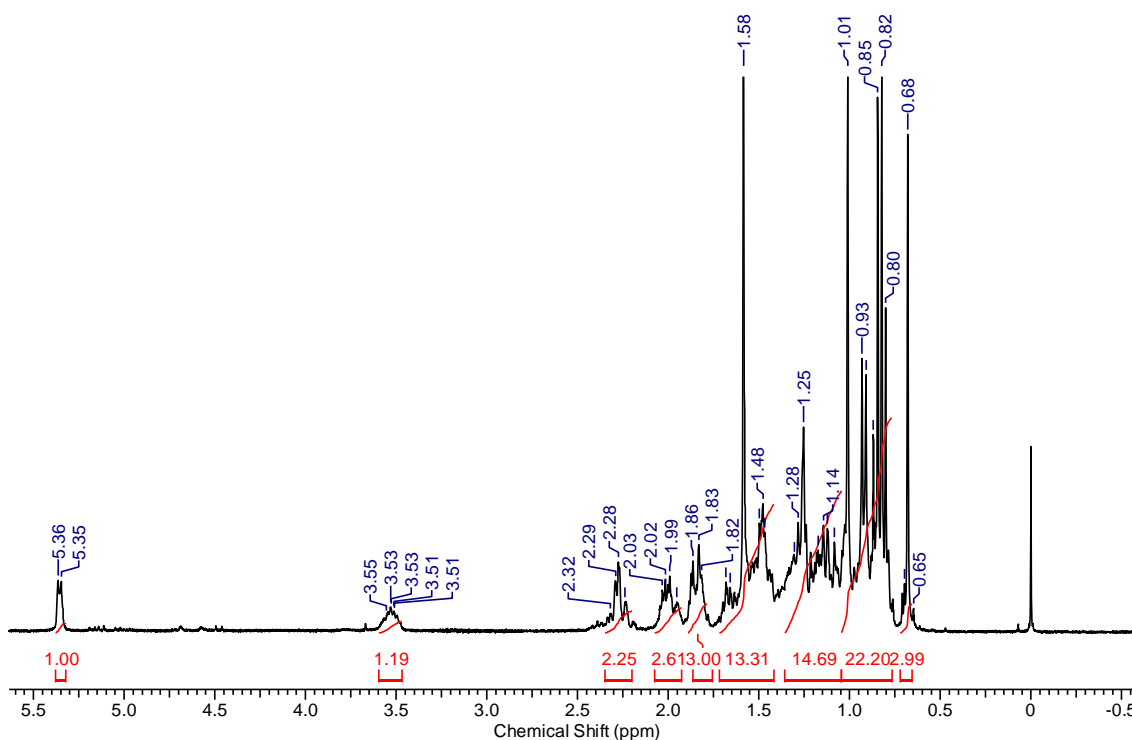


Figura 17: Espectro de massa molecular da substância β -sitosterol.

Tabela 16: Deslocamentos químicos (δ) RMN de ^1H comparados com os valores padrões da literatura.

Posição	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ observado	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ literatura
3	3,53	3,53
6	5,35	5.35
18	0,68	0,68
19	1,01	1,01
21	0,93	0,94
26	0,81	0,82
27	0,83	0,83
29	0,85	0,85

No espectro (Fig. 18), foi observado um duplete em 5,3 ppm ($J = 5,22$ Hz) correspondente ao H-5 e um multiplete em 3,5 ppm, correspondente ao H-3 que são característicos de hidrogênios olefínico e carbinólico, respectivamente. Também foram observados sinais com deslocamento em 0,68 ppm (s, 3H) da posição do H-18, 0,81 ppm (d, $J = 6,89$ Hz, 3H) do H-26, 0,83 ppm (d, $J = 6,61$ Hz, 3H) para o H-27, 0,85 ppm (s, 3H) correspondente ao H-29, 0,93 ppm (s, 3H) para H-21 e 1,01 ppm (s, 3H) para H-19.

**Figura 18:** Espectro de RMN de ^1H da substância 1, β -sitosterol (CDCl_3 , 300 MHz).

Na literatura consultada, o β -sitosterol é um importante esteroide amplamente distribuído no reino vegetal, que já foi isolado e purificado por diferentes métodos cromatográficos em diferentes famílias botânicas (Saeidnia *et al.*, 2014). Do mesmo modo, essa substância é frequentemente descrita na literatura devido suas diferentes propriedades biológicas. Rahuman *et al.*, (2008), por exemplo, demonstraram a eficácia do β -sitosterol, isolado das folhas de *Abutilon indicum*, contra *Aedes aegypti*, *Aedes stephensi* e *Culex quinquefasciatus*. Além disso, o β -sitosterol possui uma atividade significativa contra promastigotas de *Leishmania* (Shah *et al.*, 2019) e atua com um papel benéfico como agente anticâncer e angiogênico terapêutico (Choi *et al.*, 2002; Novotny *et al.*, 2017). No geral, são consideradas várias vertentes que podem ser aplicadas ao β -sitosterol, tão importantes quanto o seu papel na estabilização da membrana das plantas (Babu & Jayaraman, 2020).

Substância 2

O espectro de RMN de ^1H da fração 12 (3 mg; Rf: 0,32) foi identificada como lupeol, substância **2** (Fig. 19), isolada da fase DCM do extrato MeOH das cascas. As informações obtidas também foram comparadas e confirmadas de acordo com Beserra *et al.*, (2018) (Tab. 17), também corroborada pela análise de EM como m/z 409 $[426 - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ (modo positivo), correspondendo à fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ (Fig. 20).

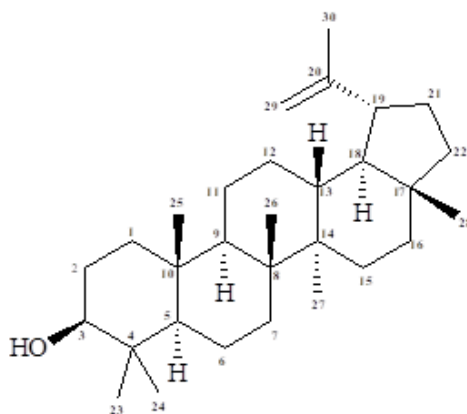


Figura 19: Estrutura molecular do lupeol.

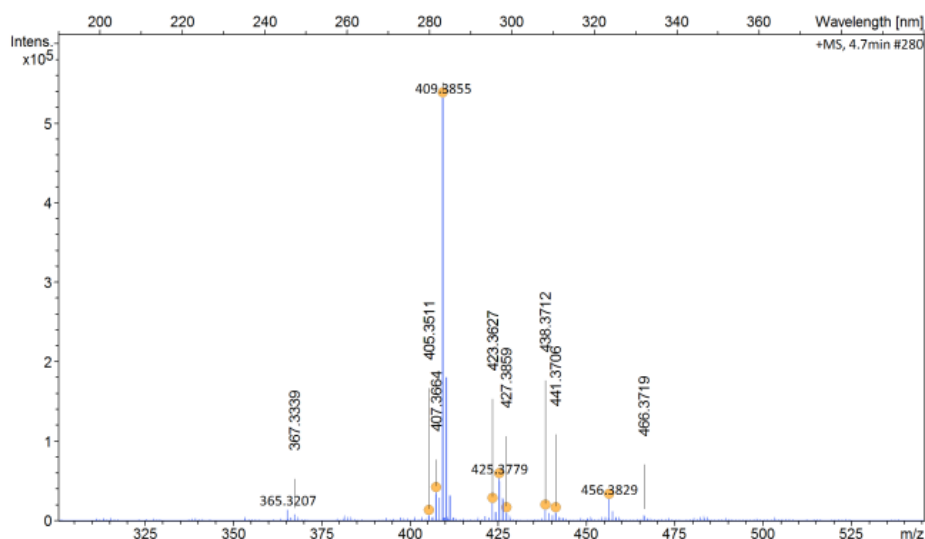


Figura 20: Espectro de massas da substância lupeol

Tabela 17: Deslocamentos químicos (δ) RMN de ^1H comparados com os valores padrões da literatura.

Posição	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ observado	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ literatura
2	1,92	3,53
3	3.19	5.35
19	2,38	0,68
23	0,97	1,01
24	0,76	0,94
25	0,83	0,82
26	1,03	0,83
27	0,94	0,85
28 ^a	4,57	4,55
29b	4,69	4,67

De acordo com o espectro de RMN de ^1H (Fig. 21) foram observados dois sinais em 4,69 ppm (d, $J = 2,24$ Hz, 1H, H-29a) e 4,57 ppm (dd, $J = 2,24; 1,21$ Hz, 1H, H-29b) característicos de átomos de hidrogênio de dupla ligação. Foi verificado também um sinal em 3,19 ppm (m, 1H) atribuído ao H-3 e característico de um hidrogênio carbinólico indicando a presença da configuração β . Foram observados também sinais em 2,38 ppm (dt, $J = 10,80; 5,68$ Hz, 1H) do H-19, 1,92 ppm (m, 2H) do H-2, 0,76 ppm (s, 3H) do H-24, 079 ppm (s, 3H) do H-28, 0,83 ppm (s, 3H) do H-25), 0,94 ppm (s, 3H) H-27, 0,97 ppm (s, 3H) do H-23, 1,03 ppm (s, 3H) do H-26 e 1,68 ppm (s, 3H) do H-30.

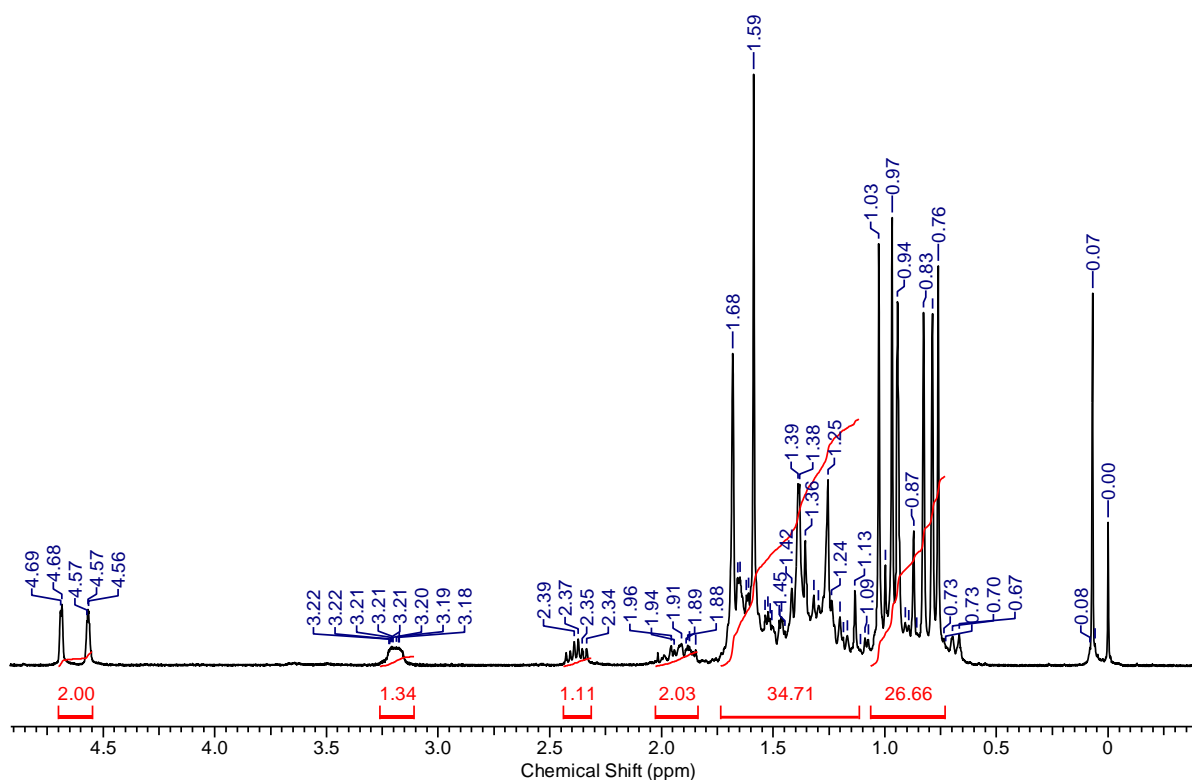


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H da substância 2, lupeol (CDCl_3 , 300 MHz).

O lupeol é considerado um dos mais abundantes triterpenos, sendo identificado em diferentes espécies de plantas conhecidas, como em representantes da família Fabaceae: *Andira*, *Dypterix*, *Poincianella*, *Deguelia* e outros (Silva *et al.*, 2006; Puebla *et al.*, 2010; Siddique & Saleem, 2011; Oliveira *et al.*, 2016). Essa substância apresenta uma importante relevância, devido ao seu amplo espectro de atividades farmacológicas (Patil *et al.*, 2018). De acordo com pesquisas já realizadas e associadas a recentes estudos, a síntese química do lupeol melhora sua bioatividade para obtenção de substâncias promissoras e propriedades desejáveis (Molinowska *et al.*, 2019).

Substância 3

O espectro de RMN de ^1H da fração 1 (10 mg; Rf: 0,6) foi identificada como 4',5,7-trihidroxiflavona (Fig. 22), isolada da fase DCM do extrato MeOH das cascas. As informações obtidas através da análise de RMN também foram comparadas com a literatura

de Fathiazad *et al.*, (2006) e confirmada por EM como m/z 269 (modo negativo) e m/z 271 (modo positivo), correspondente à fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$ (Fig. 23)

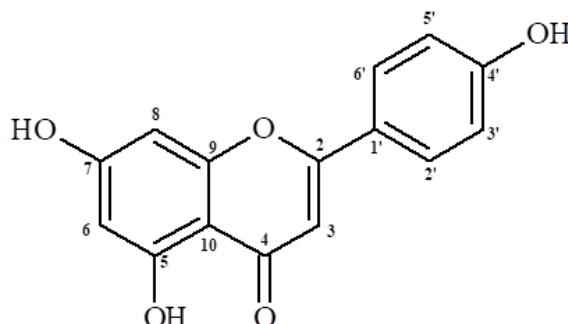


Figura 22: Estrutura molecular da substância 4',5,7-trihidroxi-flavona.

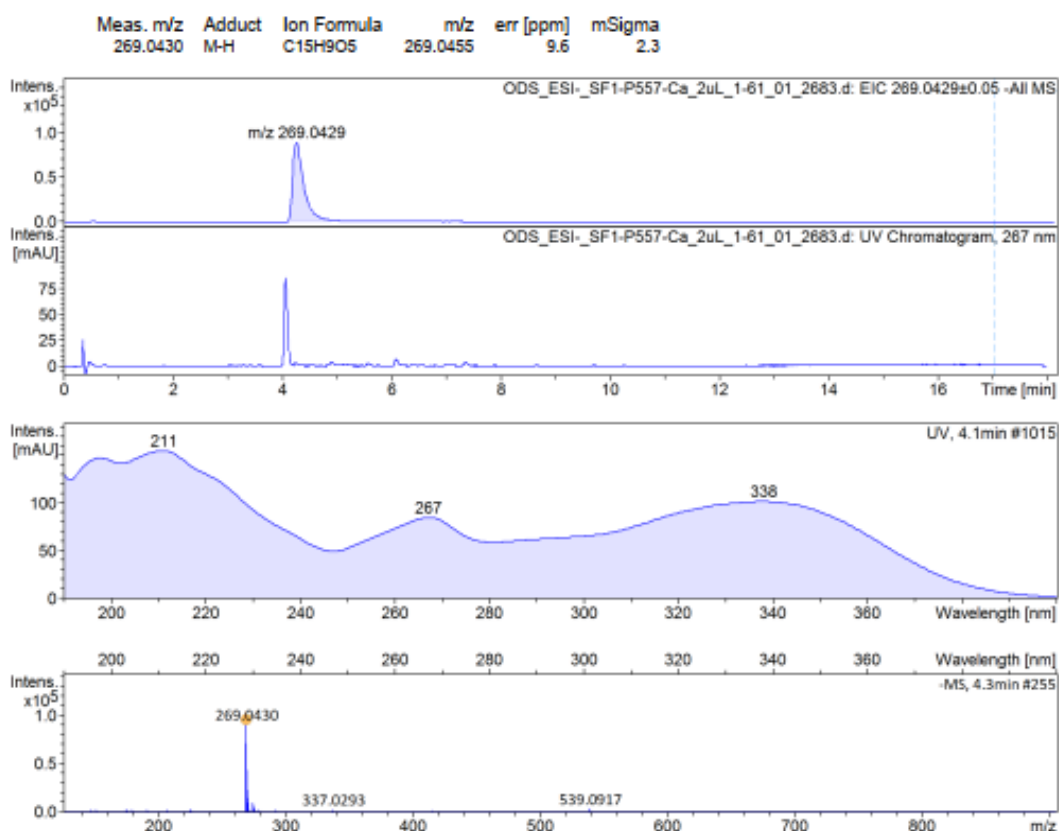


Figura 23: Espectro de massa molecular da substância 3.

Para essa molécula, foram observados dois dupletos na região de hidrogênios aromáticos em 7,73 ppm (d , $J = 8,0$ Hz) e 6,82 ppm (dd , $J = 8,0$ Hz), os quais deram valores de integral para 2H cada. Devido a constante de acoplamento, observou-se que os dois sinais eram de hidrogênios vizinhos, caracterizando o anel aromático substituído na posição p - onde

cada valor de deslocamento representa dois hidrogênios simétricos do anel aromático. A substância apresentou característica de flavonoide durante a CCDC e esses sinais foram designados como os sinais dos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B de um flavonoide (Fig. 24a). Observou-se também um singlete em 6,37 ppm característico do H-3 do anel C de uma flavona. Dois outros sinais parecidos com singletos (mal formados) em 5,87 ppm e 5,64 ppm mostraram deslocamentos similares a hidrogênios da posição H-8 e H-6 do anel A de um flavonoide. O último sinal em 12,95 ppm é referente ao hidrogênio da OH na posição 5 do anel A da flavona (25b).

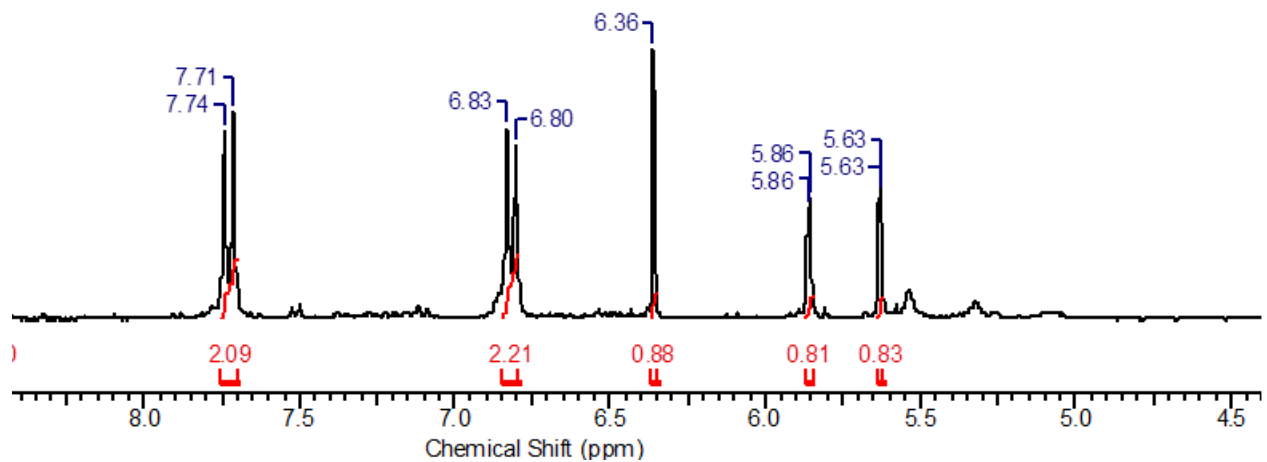


Figura 24a: Sinais dos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B de um flavonoide.

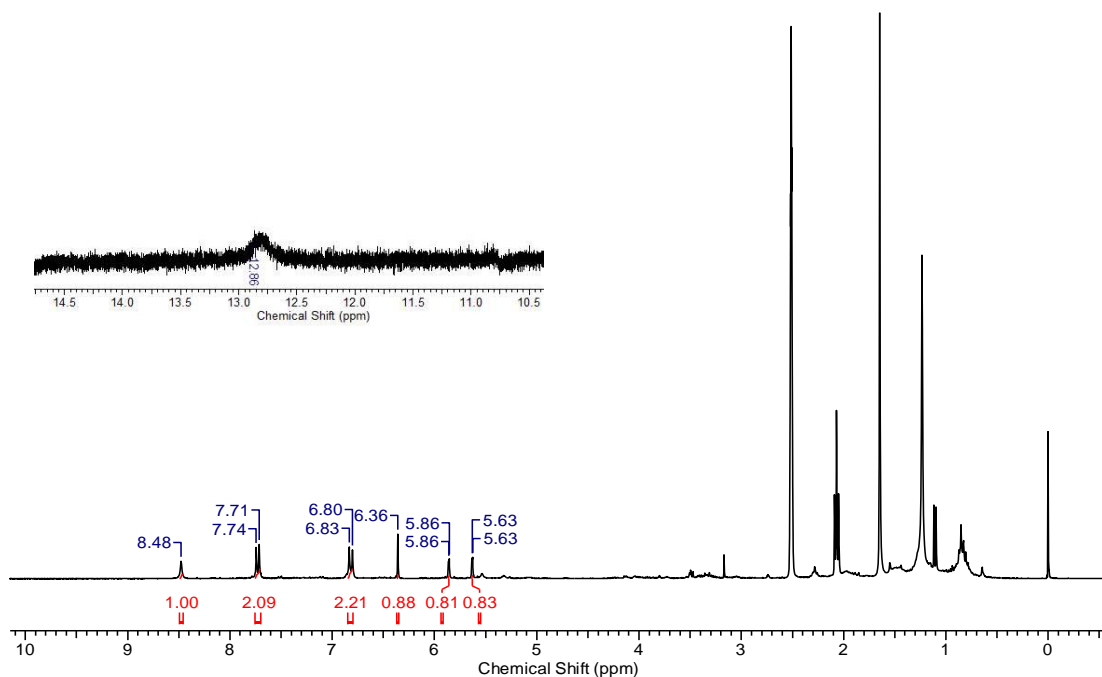


Figura 25: Espectro RMN de ^1H da apigenina em $\text{DMSO-}d_6$ (300 e 75 MHz).

O mapa de correlação HSQC (Fig. 26) da substância permitiu observar que o H em 7,73 ppm estava ligado ao C 127,5 ppm e o H em 6,82 ppm ligado ao C 116,3. Os H 5,87 e 5,64 ppm estavam ligados respectivamente aos C 95,75 ppm e 101,68 ppm. Por último, o H em 6,37 ppm apresentou ligação com C 101 ppm.

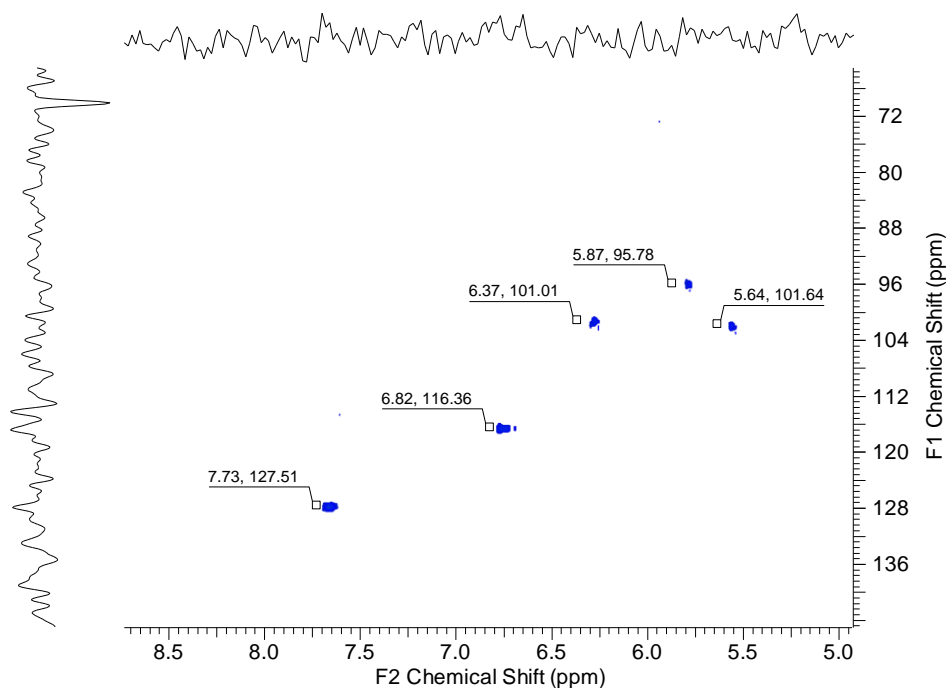


Figura 26: Mapa de correlação HSQC da substância 3 (DMSO *d*₆; 300 e 75 MHz).

O mapa de correlação HMBC, apontou que o hidrogênio em 7,73 ppm (H-2'/H-6') estava correlacionado com o carbono em 127,5 ppm (C-2'/C-6'), 162,88 ppm (C-4') e 161,35 (C-2). O hidrogênio 6,82 ppm (H-3'/H-5') mostrou correlação com os carbonos 116,35 ppm (C-3'/C-5'), 119,75 ppm (C-1') e 162,88 ppm (C-4'). O hidrogênio 6,37 ppm (H-3) mostrou correlação com os carbonos 98,8 ppm (C-10), 119,75 ppm (C-1'), 161,35 ppm (C-2) e 178,9 ppm (C-4). O hidrogênio 5,87 ppm (H-8) mostrou correlação com os carbonos 101,68 ppm (C-6), 98,8 ppm (C-10) e 157,79 ppm (C-9) e 157,75 ppm (C-7). O hidrogênio 5,64 ppm (H-6) mostrou correlação com os carbonos 95,75 ppm (C-8), 98,8 ppm (C-10) e 161,78 ppm (C-5) e 157,75 ppm (C-7). O hidrogênio 12,85 ppm (C-5-OH) mostrou correlação com os carbonos 101,68 ppm (C-6), 98,8 ppm (C-10) e 161,78 ppm (C-5) e 157,75 ppm (C-7). Os dados obtidos ao C-5 foram identificados e confirmados no espectro RMN de ¹³C, quando a apigenina foi novamente isolada e purificada na fase AcOEt do extrato metanólico de *C. comosa*.

O mapa de correlação COSY (Fig. 27) apontou apenas duas correlações. A primeira, entre os hidrogênios 7,73 ppm e 6,82 ppm e a segunda, entre os hidrogênios 5,87 ppm e 5,64 ppm.

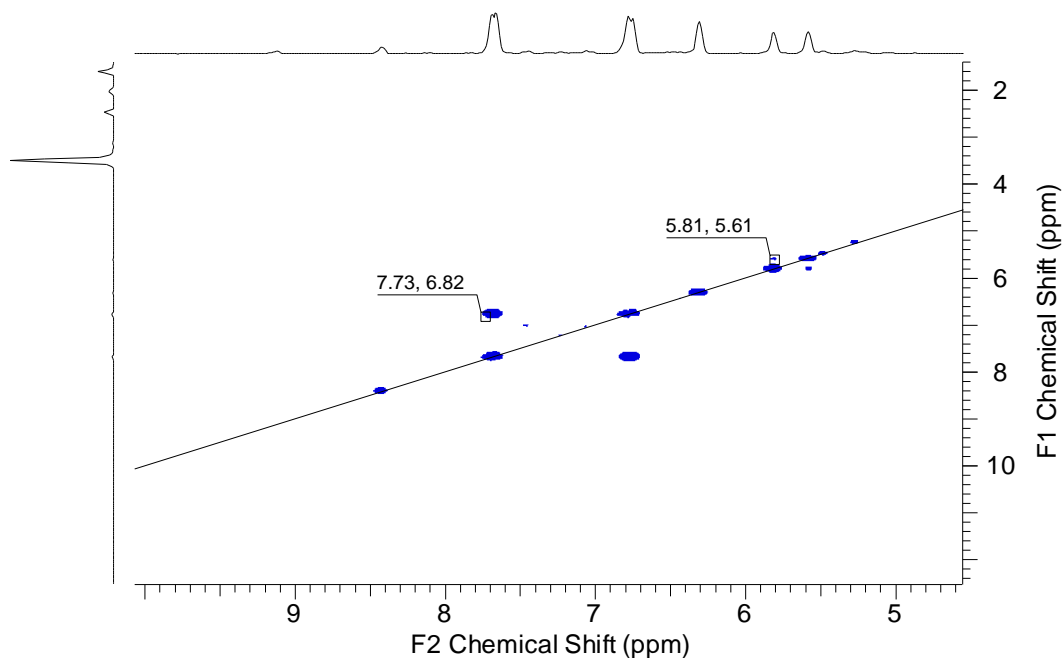


Figura 27: Mapa de correlação COSY da substância 3 (DMSO d_6 - 300 e 75 MHz).

A flavona bioativa, apigenina, encontra-se principalmente na forma de aglicona, glicosídeos e derivados metilados. O esqueleto básico de carbono da apigenina é um núcleo de flavona, com 15 carbonos dispostos em dois anéis aromáticos (anel A e B) e conectados a um anel heterocíclico C, formando um esqueleto de difenilpropano (C6-C3-C6). A apigenina é definida também como uma molécula de baixa toxicidade, que contribui na prospecção de diferentes atividades, principalmente relacionado a ensaios anticâncer (Madunic *et al.* 2018). Além disso, esse flavonoide é considerado um dos agentes biológicos e farmacológicos mais ativos e potentes (Zhou *et al.* 2017).

O espectro ^1H RMN do flavonoide apigenina encontra-se abaixo na figura 28.

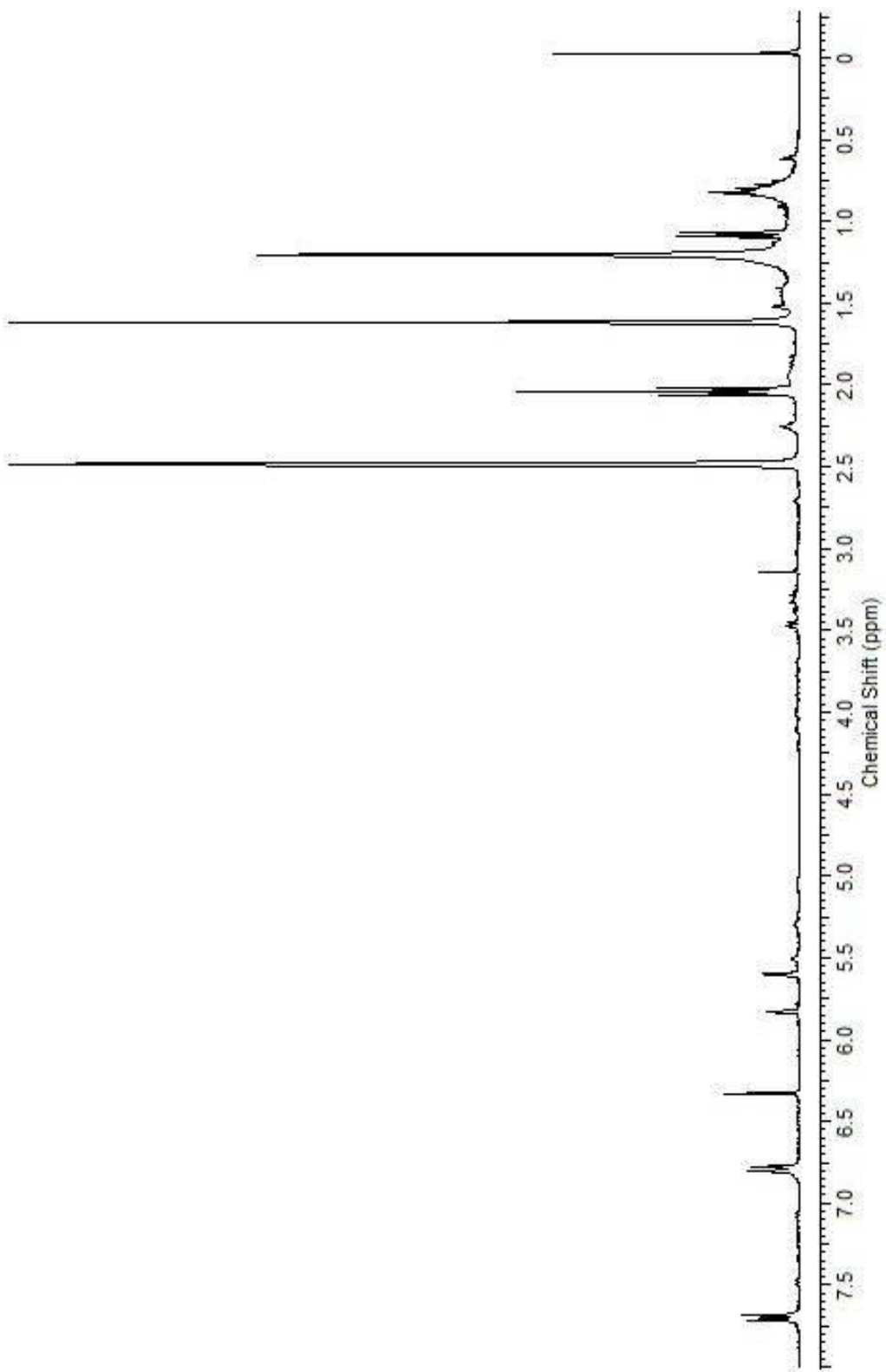


Figura 28 : Espectro de ^1H de RMN do flavonoide Apigenina ($\text{DMSO } d_6$ - 300 e 75 MHz)

A substância 3 (4',5,7-triidroxi-flavona) também foi isolada na fase DCM do extrato MeOH das cascas.

Substância 4

O espectro RMN de ^1H da fração 25-28 (CFA 5-6_25-28) é referente a substância 4 (3,5 mg; Rf: 0,6) e identificada como 7,4'-dihidroxi-flavona (Fig. 29), isolada da fase AcOEt do extrato metanólico das cascas. As informações obtidas através da análise de RMN de ^1H e ^{13}C também foram comparadas e confirmada com os dados de Yoo *et al.*, 2004.

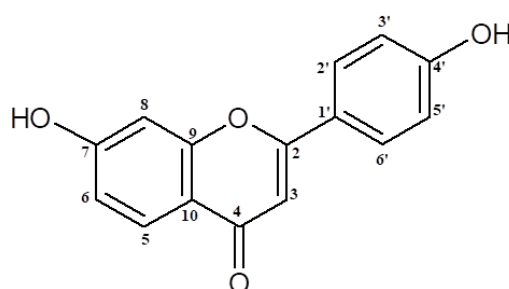


Figura 29: Estrutura molecular da 7,4'-dihidroxi-flavona.

Foi observado um duplete na região de hidrogênios aromáticos em 7,88 ppm (2H, *d*, $J = 8,85$ Hz) e outro em 6,91 ppm (2H, *d*, $J = 8,85$ Hz). A substância apresentou característica de flavonoide (revelada em NP/PEG) durante a CCDC e esses sinais em 7,88 ppm e 6,91 ppm foram caracterizados, respectivamente como os sinais dos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5' do anel B de um flavonoide (Fig. 30). Observou-se um singlete na região de 6,67 ppm, sugerindo a presença de um hidrogênio metínico, característico do H-3 do anel C de uma flavona. Constatou-se também um singlete em 6,89 ppm e dois dupletos em 6,85 ppm e 7,81 ppm, referentes respectivamente aos hidrogênios H-8, H-6 e H-5 do anel A de um flavonoide (Fig. 31).

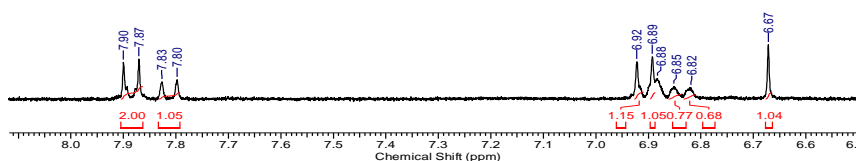


Figura 30: Sinais de hidrogênios em 7,88 e 6,91 ppm, característicos de flavonoides.

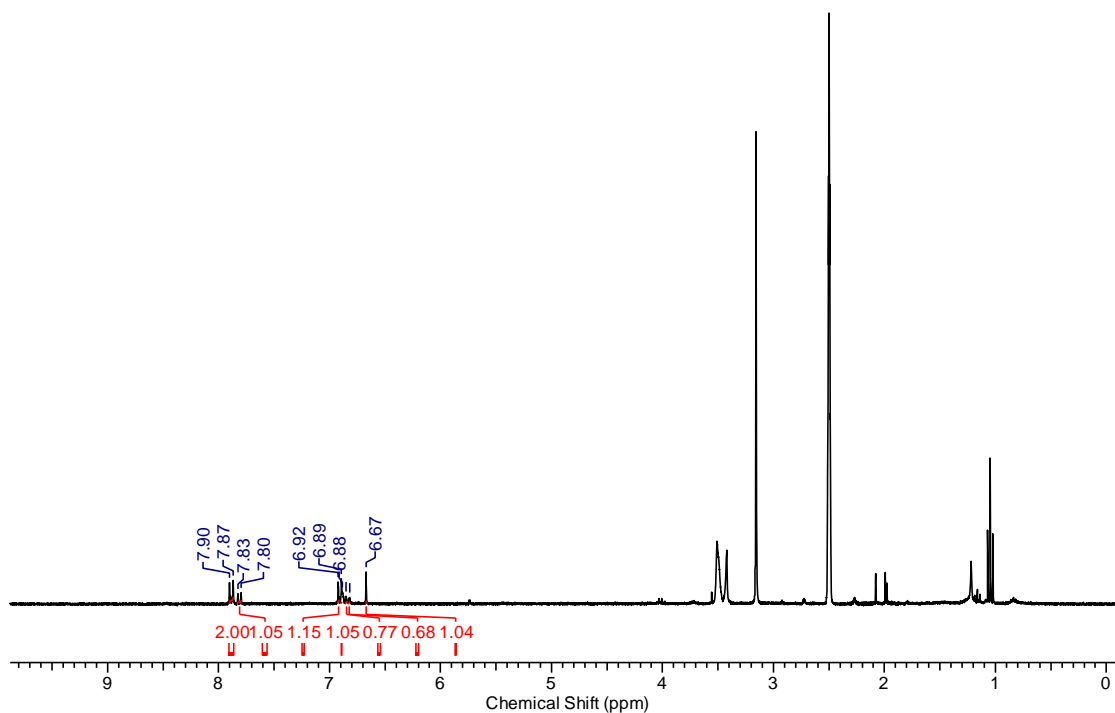


Figura 31: Espectro de RMN de ^1H de 7,4-dihidroxi flavona (DMSO- d_6 - 300 e 75 MHz).

O mapa de correlação HSQC (Fig. 32) da substância permitiu observar que os hidrogênios em 7,88 ppm estavam ligados aos carbonos 128,4 ppm e os hidrogênios em 7,81 ppm ligados aos carbonos 126,7 ppm. Assim como o H 6,91 ligado ao C 116,35, o H 6,89 ppm ligado ao C 102,83 ppm. Por último, os H em 6,85 ppm e 6,67 ppm estavam ligados, respectivamente com C 116,01 ppm e C 104,80 ppm.

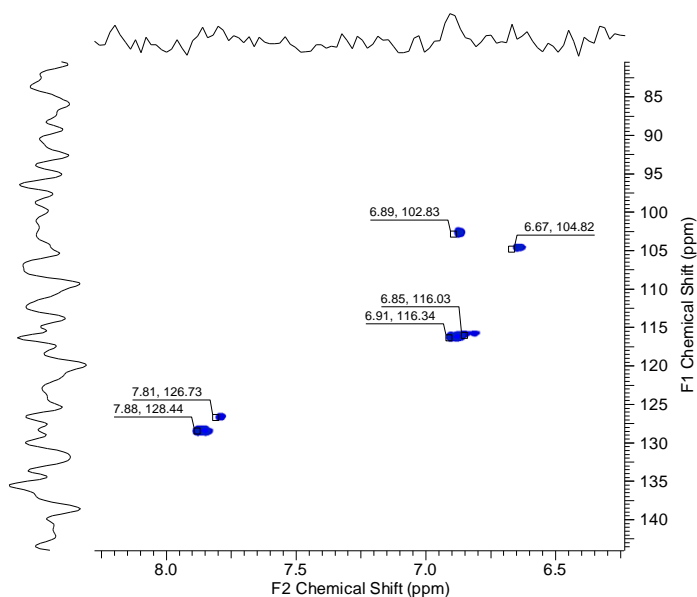


Figura 32: Mapa de contorno HSQC ^1H de 7,4-dihidroxi flavona (DMSO d_6 - 300 e 75 MHz).

O mapa de correlação HMBC (Fig. 33), mostrou que o hidrogênio em 7,88 ppm (H-2'/H-6') estava correlacionado aos carbonos em 128,43 ppm (C-2'/C-6'), 161,3 ppm (C-4'), 162,54 ppm (C-2). O hidrogênio 7,81 ppm (H-5) apresentou correlação com os carbonos 157,95 ppm (C-9), 164,45 ppm (C-7) e 176,64 ppm (C-4). O hidrogênio 6,91 ppm (H-3'/H5') mostrou correlação com os carbonos 116,35 ppm (C-6), 122,15 ppm (C-1'). O hidrogênio 6,85 ppm e 6,67 ppm (H-6/ H-3) apresentaram correlação com o carbono 115,58 ppm. O hidrogênio 6,67 ppm (H-3) também estava correlacionado com os carbonos 122,15 ppm (C-1') e 162,54 ppm (C-2).

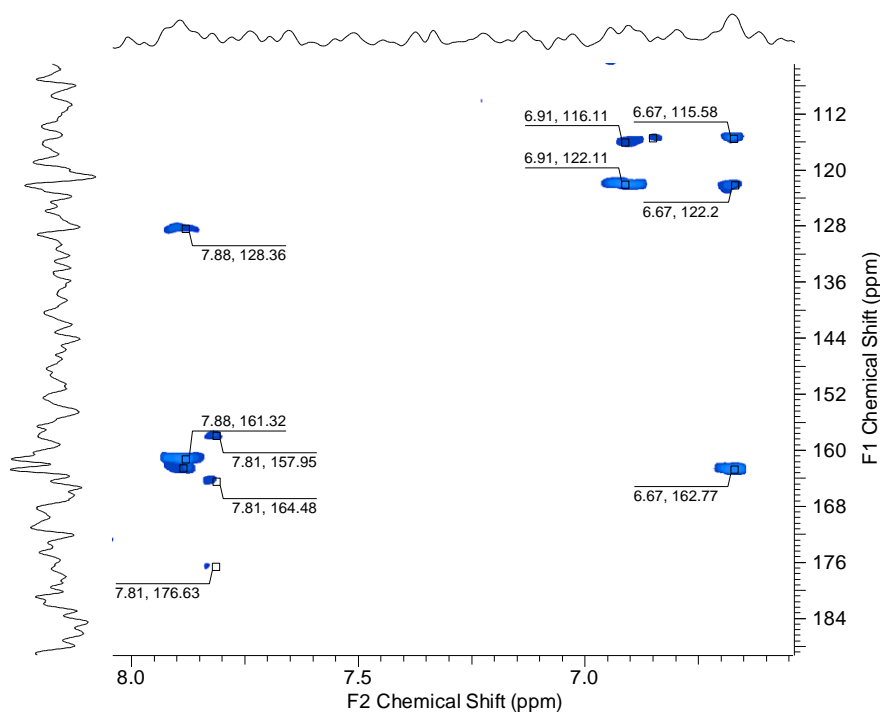


Figura 33: Mapa de correlação HMBC da 7,4-dihidroxiavona (DMSO d_6 - 300 e 75 MHz).

As correlações do mapa de correlação COSY (Fig. 34) apontaram a correlação entre os hidrogênios em 6,91 ppm (H-3') e 7,88 ppm (H-2'), assim como entre os hidrogênios em 6,85 ppm (H-6) e 7,81 ppm (H-5).

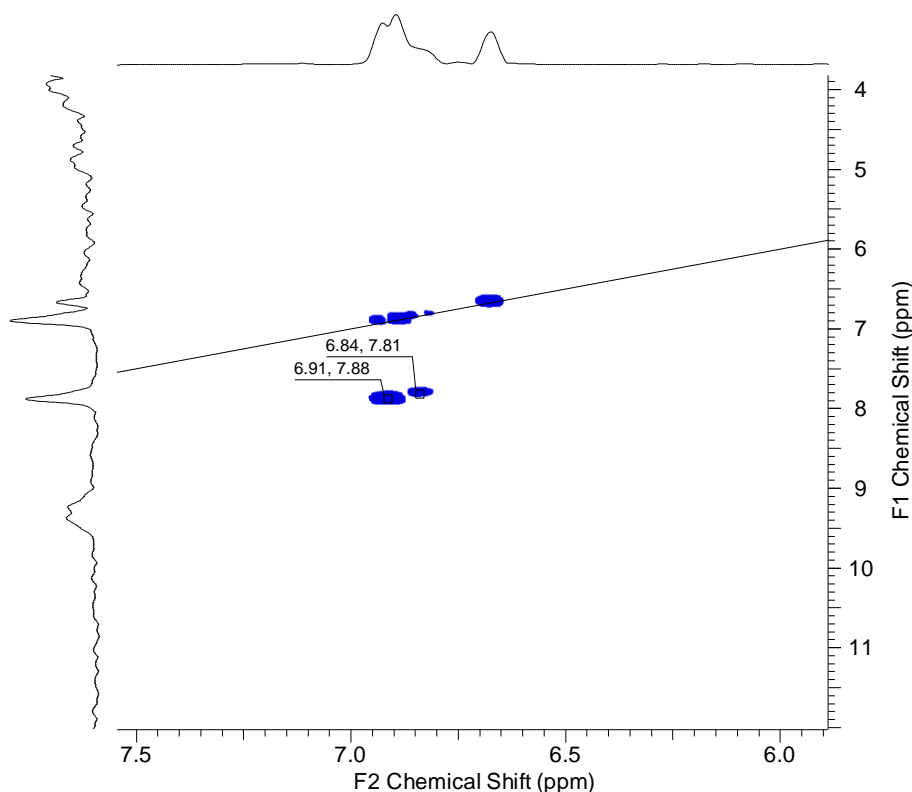


Figura 34: Mapa de correlação COSY da 7,4-dihidroxi-flavona (DMSO d_6 - 300 e 75 MHz).

Estudos fitoquímicos relatam o isolamento e a identificação da substância 7,4'-dihidroxi-flavona em espécies de Fabaceae, como *Medicago sativo*, *Trifolium repens*, *Crotalaria sessiflora*, *Acacia farnesiana* (Fabaceae), e excepcionalmente em uma espécie de Salicaceae, a *Salix matsudana* (Bickoff & Livingston, 1964; Yoo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008). Essa flavona é caracterizada como um potente inibidor da enzima ciclo oxigenase 2 (COX 2), envolvida pelo processo inflamatório no corpo humano e proteção gastrointestinal (Hilário, 2006; Li *et al.*, 2008). Porém foi definida como uma flavona de fraca atividade sequestradora do radical hidroxil (Montesinos *et al.*, 1995). Essa substância também foi reconhecida como inibidora na produção de células epiteliais das vias aéreas humanas, diminuindo o muco sem toxicidade (Liu *et al.*, 2015).

Substância 5

No espectro de RMN de ^1H da substância 5, que foi isolada na fração 1 (m:2,5 mg; Rf: 0,3) do extrato hexânico das folhas, foi possível identificar a substância como 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (Fig. 35).

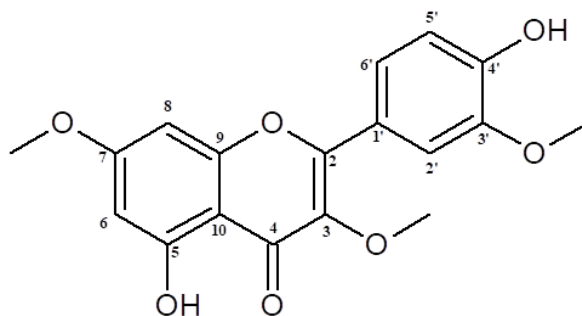


Figura 35: Estrutura molecular 3,7,4'-trimetóxi-quercetina

O espectro de RMN de ^1H possibilitou a identificação da substância 3,7,4'-trimetóxi-quercetina. As informações obtidas foram confirmadas e comparadas de acordo com Kristanti *et al.*, (2015). Os espectros dessa substância, mostrou sinais na região de hidrogênios aromáticos em 7,71ppm (d, $J=2,0$ Hz), 7,68 ppm (dd, $J=8,4$; 2,0 Hz) e 7,05 ppm (d, $J=8,4$ Hz). Esses sinais são característicos de um anel aromático com sistema ABX, onde os hidrogênios H-5' e H-6' (vizinhos) estão acoplando e gerando um duplete com $J=8,4$ Hz, assim como H-2' e H-6' (separados pelo C-1') estão acoplando com $J= 2,0$ Hz devido à distância de quatro ligações, formando um duplete. A substância apresentou características de flavonoide durante a CCDC, logo esses sinais podem ser os sinais de hidrogênios do anel B de um flavonoide. Também foi observado dois sinais em 6,45 ppm (d, $J=2,2$ Hz) e 6,36 ppm (d, $J=2,2$ Hz), ambos dupletos, com um valor de constante de acoplamento baixo, mostrando estarem separado por quatro ligações, característicos de hidrogênios H-8 e H-6 respectivamente, de anel A de um flavonoide. Não se observou singletos em 7,9 ppm e 8,5 ppm, descartando se tratar de um isoflavonoide.

Da mesma forma, não se observou singlete entre 6,3 ppm e 6,7 ppm nem sinais em 5 ppm e 3 ppm, os quais seriam de hidrogênios na posição 2 e 3 no anel C de um flavonoide, deixando claro a existência de substituição nessas posições. Os últimos três sinais observados foram singletos em 3,99 ppm, 3,88 ppm e 3,86 ppm característicos de metoxilas ligadas aos substituintes do esqueleto flavonoídico. Um sinal em 12,65 ppm evidenciou a presença de uma hidroxila na posição C-5 do anel A do flavonoide, pois o hidrogênio dessa hidroxila faz ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila C-4 do anel C do flavonoide. Um último sinal na forma de singlete foi observado em 6,01 ppm (Fig. 36). Esse sinal não pôde ser distinguido apenas com o espectro de hidrogênio, sendo necessária a análise dos bidimensionais.

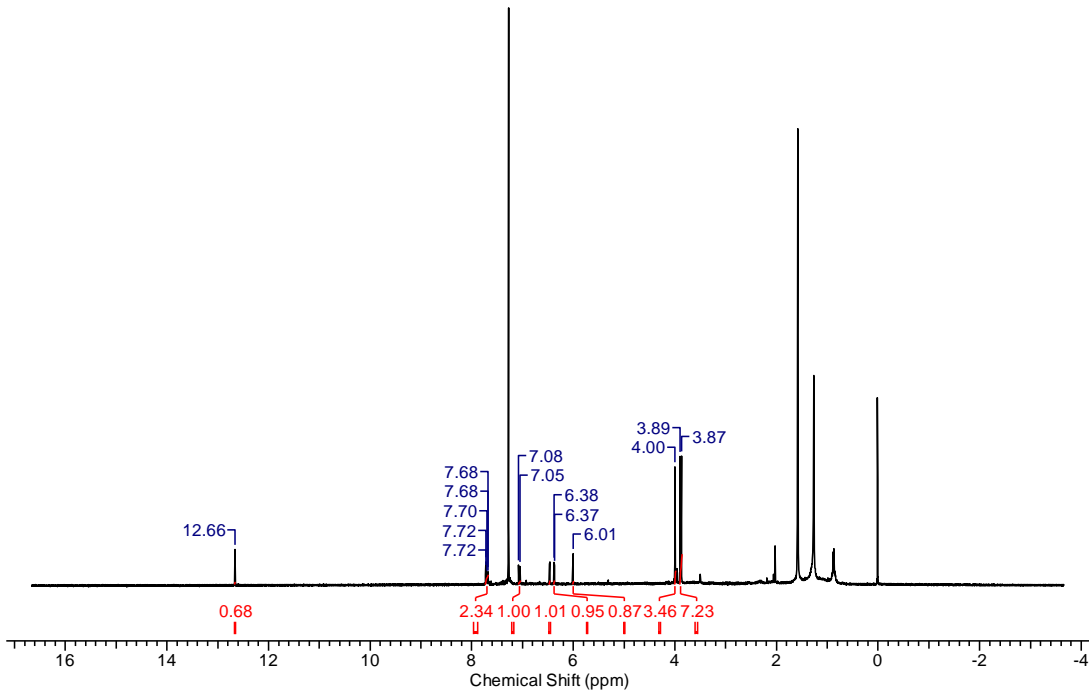


Figura 36: Espectro de ^1H de RMN do flavonoide 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (CDCl_3 - 300 e 75 MHz).

A análise das correlações HSQC (Fig. 37) mostrou que o hidrogênio com sinal em 7,71 ppm (H-2') estava ligado ao carbono 110,3 ppm (C-2'), 7,68 ppm (H-6') ligado ao 121,9 ppm (C-6'), 7,05 ppm (H-5') ligado ao 113,7 ppm (C-5'), 6,45 ppm (H-8) ligado ao 91,5 ppm (C-8) e 6,36 ppm (H-6) ligado ao 97,1 ppm (C-6). Os sinais referentes às metoxilas estavam correlacionado em 3,99 ppm com 55,4 ppm, 3,88 ppm com 55,1 ppm e 3,86 ppm com 59,4 ppm.

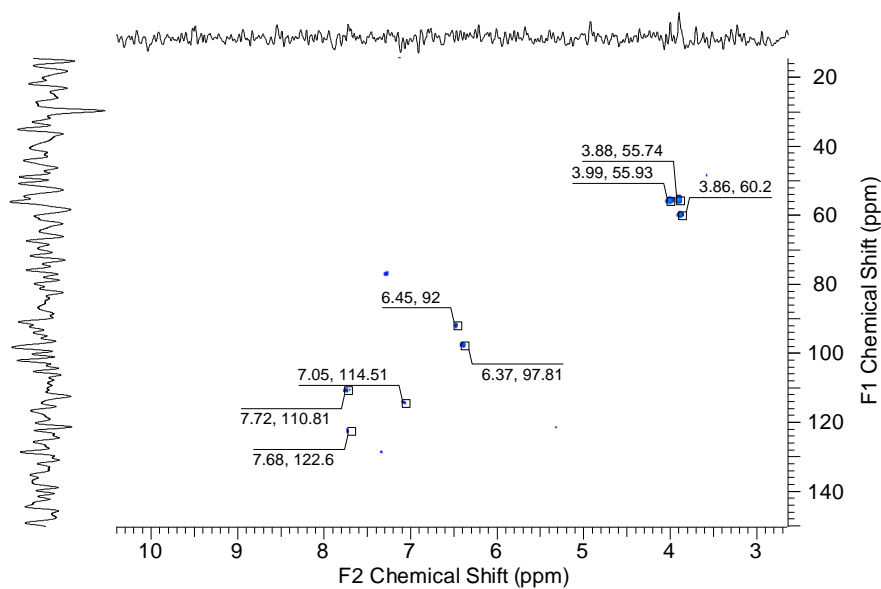


Figura 37: Mapa de correlação HSQC do flavonoide 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (CHCl_3 d - 300 e 75 MHz).

Foi possível distinguir as posições das metoxilas através do mapa de correlação HMBC (Fig. 38), o qual mostrou que o sinal em 3,99 ppm estava correlacionado com o carbono 146,4 ppm, valor esse que é característico do carbono da posição 3' do anel B do flavonoide substituído, pois o C-4' sob essas mesmas condições de substituição teria valor entre 148 e 150 ppm. No entanto, devido à baixa massa da substância não foi possível visualizar o sinal do C-4'. O sinal de hidrogênio em 3,88 ppm mostrou correlação com o carbono 165,4 ppm característico do carbono da posição C-7 do anel A do flavonoide. Em um esqueleto padrão de flavonoide com anéis A, B e C, além do C-7 apenas os carbonos na posição C-2 e C-5 alcançam valores acima de 164 ppm. No entanto, somente o carbono da posição 7 ultrapassa o valor de 165 ppm evidenciando a posição a qual a metoxila está ligada. A última metoxila apresentou correlação com carbono em 138,8 ppm, o qual tem valor característico de carbono da posição 3 de um flavonol. Sua posição é evidenciada na posição 3, pois de acordo com a análise do espectro de hidrogênio não foi possível observar hidrogênio característico da posição 2 e 3 do anel C do flavonoide. De acordo com o espectro de HSQC o sinal em 6,01 ppm não mostrou estar ligado com carbono. Logo, pode tratar-se da segunda hidroxila restante no anel B do flavonoide, localizada na posição C-4'.

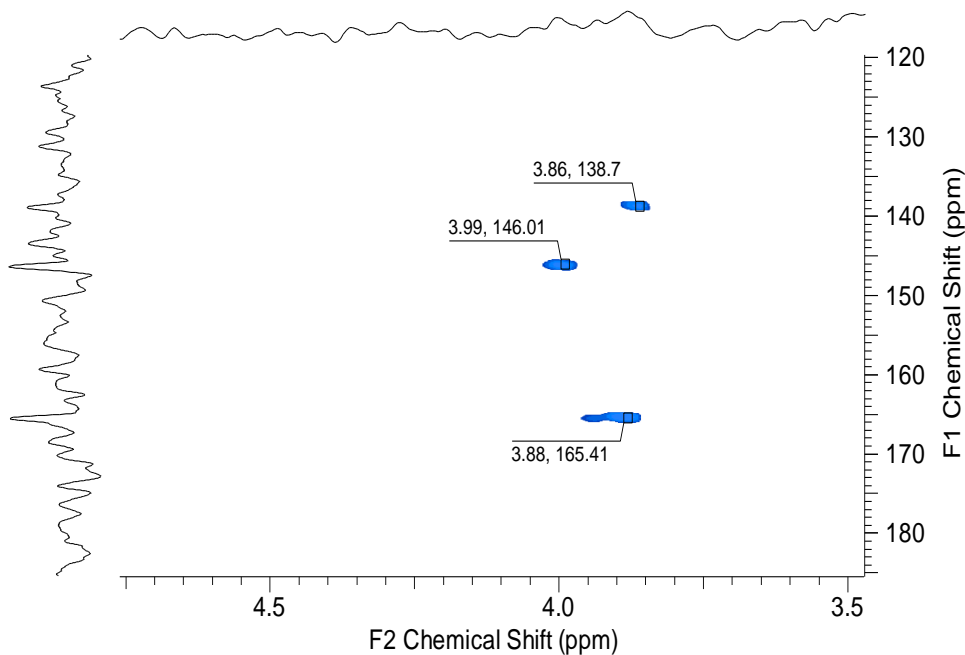


Figura 38: Mapa de correlação HMBC do flavonoide 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (CHCl_3 d - (300 e 75 MHz).

A substância quercetina 3,7,4'-trimetiléter já foi isolada e identificada em algumas espécies de plantas de diferentes famílias botânicas, como no extrato clorofórmico do caule de *Aframomum giganteum* (Zingiberaceae) e de *Ericameria diffusa* (Asteraceae) (Urbtsch *et al.*, 1976). A partir de um levantamento taxonômico em espécies de *Pelargonium* foi possível também a identificação desse flavonol no extrato acetônico da folha de *P. quercifolium* (Willians *et al.*, 1997), além do extrato metanólico da casca do tronco de *Saccopetalunhor fieldi* Benn (Kristanti *et al.*, 2015).

São incipientes as avaliações biológicas com essa substância, mas dentre algumas podemos citar o estudo realizado por Ikewuchi *et al.*, 2014, no qual foi avaliado o uso dos escleróides de *Pleutorus tuberreguim*, popularmente utilizado em regiões da África para o controle de hipertensão. O extrato aquoso dos escleróides foram analisados e identificados com grande proporção de substâncias derivadas da quercetina, como a quercetina- 3,7,4'-trimetiléter presente em pequena concentração (0,03%), mas que de acordo com os bioensaios executados colaboram com os demais flavonoides para a redução da hipertensão.

Outra propriedade biológica estudada, está relacionada a uma alta atividade antiviral da substância contra o vírus das manchas anelares do tomate (TomRSV), porém quando a quercetina 3,7,4' trimetiléter é comparada a quercetina, a mesma não apresentou efeitos significativos na inibição do vírus. (Malhotra *et al.*, 1996).

Conclusão

O presente estudo desenvolvido com *C. comosa* mostrou resultados inéditos com o isolamento e identificação principalmente de substâncias fenólicas e terpenoides. No extrato metanólico dentre as substâncias isoladas, a apigenina é uma substância de grande valor em função de suas propriedades biológicas. A mesma está em uma maior concentração, comparada as demais, pois também foi identificada na fase DCM do extrato MeOH das cascas. Além destas, o trabalho desenvolvido também possibilitou o isolamento de mais um flavonoide no extrato hexânico das folhas.

A espécie investigada apresenta de acordo com os dados obtidos, classes diferentes de substâncias no qual podemos inferir que se trata de uma espécie com potencial produção de metabólitos diversificados e importantes para ensaios biológicos e químico. Essas informações podem colaborar com futuros estudos e ampliar o conhecimento sobre *C. comosa*.

Referências

- Abubakar, R. A.; Haque, M. 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12: 1-10.
- Altemimi, A.; Lakhssassi, N.; Baharlouei, A.; Watson, D. G.; Lightfoot, D. A. 2017. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6: 1-23.
- Babu, S.; Jayaraman, S. 2020. An update on β -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131: 110702.
- Balandrim, F. M.; Klocke, J.A.; Wurtele, E. S.; Bollinger, Wm. H. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228: 1154-1160.
- Beserra, F. P.; Xue, M.; Maia, G. L. A.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H.; Jackson, C. J. 2018. Lupeol, a pentacyclic triterpene, promotes migration, wound closure, and contractile effect in vitro: possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK Pathways. *Molecules*, 23: 1-17.
- Bickoff, E. M.; Livingston, A. L.; Witt, S. C. 1964. Identification of 7,4'-dihydroxyflavone in forages. *Phytochemistry*, 4: 523-524.
- Braz-Filho, R. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, 33: 229-239.
- Campos, E. V. R.; Proença, P. L. F.; Oliveira, J. L.; Bakshi, Mansi.; Abhilash, P. C.; Fraceto, L. F. 2019. Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives. *Ecological Indicators*, 105: 483-495.
- Cayme, J-M. C.; Ragasa, C. Y. 2004. Structure elucidation of β -stigmasterol and β -sitosterol from *Sesbania grandiflora* (Linn.) Pers. and β -carotene from *Heliotropium indicum* Linn. By NMR spectroscopy. *Kimika*, 20: 5-12.
- Choi, J-S.; Han, S-T.; Park, Y-I.; Lee, S-K.; Kim, J-S.; Chung, M-H. 2002. Angiogenic activity of β -sitosterol in the ischaemia/ reperfusion-damaged brain of *Mongolian gerbil*. *Planta Medica*, 68: 330-335.
- Coskum, O. 2016. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, 3: 156-160.
- Das, K.; Tiwari, R. K. S.; Shrivastava, D.; Bilaspur, B. C. I. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plant Research*. 4: 104-111.
- Fathiazad, F.; Delazar, A.; Amiri, R.; Sarker, S. D. 2006. Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 5: 222-227.
- Hamburger, M.; Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30: 3864-3874.

- Harvey, A. L. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery today*, 5: 294-300.
- Hilário, M. O. E.; Terreri, M. T.; Len, C. A. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Jornal de Pediatria*, 82: 208-212.
- Hostettmann, K.; Wolfender, J-L.; Rodriguez, S. 1996. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*, 63: 2-10.
- Kristanti, A. N.; Aminah, N. S.; Tanjung, M. 2015. Phenolic compounds from the stem bark of *Saccopetalum horsfieldii* Benn. *Der Pharmacia Lettre*, 7: 149-152.
- Li, X.; Liu, Z.; Zhang, X-f.; Wang, L-j.; Zheng, Y-n.; Yuan, C-c.; Sun, G-z. 2008. Isolation and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Salix matsudana*. *Molecules*, 13: 1530-1537.
- Lin, A-S.; Lin, C-R.; Du, Y-C.; Lübken, T.; Chiang, M. Y.; Chen, I-H.; Wu, C-C.; Hwang, T-S.; Chen, S-L.; Yen, M-H.; Chang, F-R.; Wu, Y-C. Acasiane A and B Farnesirane A and B, diterpene derivatives from the roots of *Acacia farnesiana*. *Planta Medica*, 75: 256-261.
- Liu, C.; Weir, D.; Busse, P.; Yang, N.; Zhou, Z.; Emala, C.; Li, X-M. 2015. The flavonoid 7,4'- dihydroxyflavone inhibits MUC5AC gene expression, production, and secretion via regulation of NF-kB, STAT6, and HDAC2. *Phytotherapy Research*, 29: 925-932.
- Madunic, J.; Madunic, I. V.; Gajski, G.; Popic, J. 2018. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer Letters*, 413: 11-22.
- Malhotra, B.; Onylagha, J. C.; Bohn, B. A.; Towers, G. H. N.; James, D.; Harbone, J. B.; French, C. J. 1996. Inhibition of tomato ringspot virus by flavonoids. *Phytochemistry*, 43: 1271-1276.
- Molinowska, M.; Mirosław, B.; Sikora, E.; Ogonowski, J.; Wojtkiewicz, A. M.; Szalencic, M.; Pasikowska-Piwko, E.; Eris, I. 2019. New lupeol esters as active substances in the treatment of skin damage. *Plos One*, 14 (3): 1-15.
- Montesinos, M. C.; Terencio, A. U. M. C.; Payá, M.; Alcaraz, M. J. 1995. Antioxidant profile of mono – and dihydroxylated flavone derivatives in free radical generating systems. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 50: 552-560.
- Novotny, L.; Abdel-Hamid, M.; Hunakova, L. 2017. Anticancer potential of β - Sitosterol. *International Journal of Clinical Pharmacology & Pharmacotherapy*, 2: 129.
- Oliveira, J. C. S.; David, J. M.; David, J. P. 2016. Composição química das cascas das raízes e flores de *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). *Química Nova*, 39: 189-193.
- Pandey, A.; Tripathi, S. 2014. Concept PF standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2: 115-119.
- Patil, P.; Soujanya, B.; Kiran Kumar A. 2018. A review on lupeol: superficial triterpenoid from horticulture crops. *International Journal of Chemical Studies*, 6: 3301-3305.

- Puebla, P.; Oshima-Franco, Y.; Franco, M. G. S.; Rubem-Mauro, L.; Feliciano, A. S. 2010. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, na Active Species Against *Bothrops jararacussu* Venom. *Molecules*, 15: 8193-8204.
- Rahuman, A. A.; Gopalakrishnan, G.; Venkatesan, P.; Geetha, K. 2008. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn.) Sweet. *Parasitology Research*, 102: 981-988.
- Rasul, M. G. 2018. Extraction, isolation and characterization of natural products from medicinal plants. *International Journal of Basic Science and Applied Computing*, 2: 1-6.
- Saeidnia, S.; Manayi, A.; Gohari, A. R.; Abdollahi, M. 2014. The story of beta-sitosterol – A Review. *European Journal of Medicinal Plants*, 4: 590-609.
- Shah, S. M.; Ullah, F.; Ayaz, M.; Sadiq, A.; Hussain, S.; Shah, A-H, A.; Shah, S. A. A.; Wadood, A.; Nadhman, A. 2019. β - Sitosterol from *Ifloga spicata* (Forssk.) Sch. Bip. as potential anti-leishmanial agent against *leishmania tropica*: Docking and molecular insights. *Steroids*, 148: 56-62.
- Siddique, R.; Saleem, M.; 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Sciences*, 88: 285-293.
- Silva, V. C.; Alves, A. N.; Santana, A.; Carvalho, M. G. 2006. Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira fraxinifolia* (Fabaceae). *Química Nova*, 29: 1184-1186.
- Thammana, M. 2016. A review on high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5: 22-28.
- Tiwari, P.; Kumar, B.; Kaur, M.; Kaur, G.; Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *International Pharmaceutical Sciencia*, 1: 98-106.
- Truong, D-H.; Nguyen, D. H.; Ta, N. T. A.; Bui, A. V.; Do, T. H.; Nguyen, H. C. 2019. Evaluation of the use different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 1: 1-9.
- Urbtsch, L. E.; Mabry, T. J.; Miyakado, M.; Ohno, N.; Yoshioka, H. 1976. Flavonol methyl ethers from *ericameria diffusa*. *Phytochemistry*, 15: 440-441.
- Williams, C. A.; Harbone, J. B.; Newman, M.; Greenham, J.; Eagles, J. 1997. Chrysin and other leaf exudate flavonoids in the genus *Pelargonium*. *Phytochemistry*, 46: 1349-1353.
- Wolfender, J-L.; Marti, G.; Queiroz, E. F. 2010. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. *Current Organic Chemistry*, 14: 1808-1832.
- Yoo, H. S.; Lee, J. S.; Kim, C. Y.; Kim, J. 2004. Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora*. *Archives of Pharmacal Research*, 27: 544-546.

Zhou, X.; Wang, F.; Zhou, R.; Song, X.; Xie, M. 2017. Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. *Journal of Food Biochemistry*, 41: e12376

CAPÍTULO 2

Avaliação das atividades tóxica, antiangiogênica, antioxidante e antimicrobiana de *Campsiandra comosa* Benth.

Introdução

A identificação de novas estruturas e catalogação de substâncias deve ser ampliada com investigações em diferentes áreas de pesquisa, aprofundando conhecimento e estimulando resultados mais completos. A diversidade estrutural de substâncias naturais destaca também princípios ativos que permitem evidenciar, como já identificados em plantas brasileiras, uma fonte renovável para o desenvolvimento de novos fármacos, além de outras aplicações adicionais (Braz-Filho, 2010). Além disso, motiva a compreensão na utilização de métodos apropriados que possibilitem a obtenção de substâncias bioativas, utilizando de forma adequada técnicas convencionais e aprimoradas (Azmir *et al.*, 2013).

A utilização de plantas com extratos promissores, dos quais consequentemente ocorre o isolamento de substâncias e relacionam-se suas propriedades biológicas, requer condições específicas a serem consideradas na realização dos ensaios, como: alvo, rendimento da amostra, seletividade, sensibilidade, número de falsos positivos e negativos, custos e considerações éticas (Hamburguer & Hostettmann, 1991). Ou seja, é essencial que haja uma seleção de ensaios, os quais devem preferencialmente ser objetivos, simples, sensíveis e reprodutíveis (Maciel *et al.*, 2002).

É importante enfatizar também que as moléculas de produtos naturais possuem propriedades biológicas bastantes seletivas e específicas de acordo com o mecanismo de ação (Cragg & Newman, 2013). A busca por essas substâncias promissoras pode ser avaliadas por diferentes técnicas, utilizando, por exemplo, microrganismos, microcrustáceos, enzimas, receptores, linhagem de células animais ou humanos, entre outros (Maciel *et al.*, 2002). Normalmente são realizados a princípio, ensaios mais simples e após essa triagem quando é possível a identificação das substâncias ativas, estas passam a ser analisadas em experimentos mais direcionados para posteriormente serem avaliados os mecanismos de ação biológica (Cechinel-Filho, 1997).

Como diferentes metabólitos secundários podem ser específicos em gêneros ou espécies vegetais de plantas, considera-se que há excelentes chances de substâncias com potencial bioativo, ainda desconhecido, serem desenvolvidas e utilizadas (Balandrim *et al.*, 1985). Portanto, com base em importantes informações através da investigação de extratos vegetais correlacionadas a pesquisa básica de bioativos, o capítulo a seguir contempla o estudo do potencial biológico e químico de *C. comosa* avaliando a capacidade dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas, ramos e cascas em apresentar toxicidade, propriedades antioxidante, antimicrobiana e antiangiogênica.

Material e métodos

Coleta e preparo do material vegetal

C. comosa foi coletada no Lago do Catalão (S 03 ° 09.396/ W 059 ° 55.217'), próximo à cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil (Fig. 2), e a exsicata foi depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA (nº 258668 e possui números de código de barras: INPA0030758 e INPA0030759). A coleta foi registrada no SISGEN sob o número AF9CA41. A coleta foi realizada no mês de agosto, no período de transição (chuvoso para o seco), e identificada com auxílio do parataxonomista, Lucas Mergulhão. O material coletado foi separado em suas partes (folhas, ramos e cascas do tronco), em seguida foram secos em estufa de circulação ventilada a <50 °C e posteriormente triturados em moinho de facas (Tecnal, modelo Willye TE-650, Brasil).

Obtenção dos extratos de *C. comosa*

O material vegetal seco foi submetido à extração com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano - Hex; metanol - MeOH e água - H₂O). Cada extração foi realizada por três vezes em banho de ultrassom (40 kHz), por 20 minutos para cada extração. Os extratos hexânicos e metanólicos foram concentrados em evaporador rotativo (Fisatom, Brasil), e os extratos aquosos concentrados em um liofilizador (Christ, Alemanha).

Para esta tese, serão apresentados os resultados equivalentes ao extrato hexânico e metanólico de *C. comosa*. As amostras foram abreviadas em códigos de acordo com a parte utilizada da planta e o solvente orgânico para descrição dos resultados a seguir (Tab. 18).

Tabela 18: Extratos e seus códigos utilizados para as amostras na avaliação dos ensaios realizados.

Solvente	Órgão da planta	Código
Hexano	Folhas	FOHex
	Ramos	RAHex
	Cascas	CSHex
Metanol	Folhas	FOMeOH
	Ramos	RAMeOH
	Cascas	CSMeOH

Os ensaios realizados a seguir foram executados de forma colaborativa e sob a supervisão da Dra. Nádia Cristina Falcão-Bücker (atividade antiangiogênica) e Dra. Maria Teresa Fachin-Espinar (antioxidante e antibacteriana). O teste de toxicidade foi realizado pela autora.

Avaliação da toxicidade dos extratos de *C. comosa* frente à *Artemia salina*

Para a avaliação de toxicidade dos extratos de *C. comosa* o ensaio foi realizado de acordo com metodologia de Meyer *et al.*, (1982). Foi realizada inicialmente uma triagem dos extratos na concentração de 1000 µg/mL, solubilizados em DMSO 25%. Após a avaliação da triagem, os extratos foram testados em diferentes concentrações: 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado a solução de DMSO 25% e água salina, e o controle positivo dicromato de potássio.

Para realização do ensaio, ovos de *A. salina* foram eclodidos em água do mar sintética (38 g/L de sal marinho) por 48 horas, sob temperatura de 27-30 °C e luz artificial. Em uma microplaca de 24 poços foram transferidos 10 náuplios em cada poço contendo a solução com os extratos e na solução controle com DMSO. Cada concentração foi analisada em triplicata. Após as placas serem mantidas por 24 h sob iluminação artificial foi realizado a contagem dos microcrustáceos nos extratos e controle, onde os microcrustáceos foram considerados mortos caso não apresentassem qualquer movimento ou debilidade na motilidade durante 10 segundos (Fig. 39). A toxicidade dos extratos foi determinada a partir da concentração letal (CL₅₀), onde extratos são considerados inativos com CL₅₀ > 1000 µg/mL, moderadamente ativos com CL₅₀ entre 100 e 900 µg/mL ou fortemente ativos com CL₅₀ abaixo de 100 µg/mL (Anderson *et al.*, 1991). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism 6.



Figura 39: Ilustração representativa do ensaio de toxicidade com *Artemia salina*.

Atividade antioxidante dos extratos de *C.comosa*

Foram utilizados dois métodos diferentes para análise antioxidante dos extratos, no qual foram realizados de acordo com metodologia de Martins *et al.*, 2014.

Método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

Para avaliar o potencial dos extratos, foi preparada uma solução solubilizando 2,8 mg do DPPH• em 1 mL de DCM e avolumado com MeOH até 100 mL. Utilizou-se 44 mg do ácido ascórbico (padrão antioxidante) dissolvido em 50 mL de água deionizada. A partir dessa solução foram preparadas diluições nas concentrações: 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. A solução de DPPH• utilizada foi na concentração de 28 µg/mL.

Para a preparação da curva do DPPH•, foram adicionados em 6 microtubos 990 µL da solução de DPPH e completado com 10 µL da solução de ácido ascórbico respectivamente a 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL e no último microtubo, somente 10 µL de água deionizada. Após 30 min., realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Para a avaliação dos extratos, foi adicionado 0,5 mg/mL de cada extrato nas soluções de DPPH. Logo em seguida, foram transferidos 10 µL da amostra de cada extrato para os microtubos e foi adicionado 990 µL da solução de DPPH. A mistura então foi homogeneizada e realizada a leitura da absorbância da amostra com auxílio de um espectrofotômetro no comprimento de onda 517 nm. Após 30 minutos de reação foi realizada uma nova leitura da absorbância nas mesmas condições.

Para o controle utilizado, as soluções foram preparadas da mesma forma, no entanto, substituindo a amostra por água deionizada. A variação da absorbância dos extratos foi comparada aos valores do padrão ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

Método Fe³⁺ em complexo com a fenantrolina

Para o ensaio com Fe³⁺/Fenantrolina preparou-se uma solução tampão com 4,7628 g de acetato de sódio (NaC₂H₃O₂.3H₂O) solubilizado em 950 mL de água deionizada em um balão volumétrico. Após a solubilização, adicionou-se 3,7 mL de ácido acético glacial (C₂H₄O₂) e completou-se o volume para 1 L (solução com pH 4,5). Preparada a solução de

acetato de sódio, solubilizou-se 0,25 g de 1,10- fenantrolina ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) com essa solução em balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com a solução tampão.

Em seguida, preparou-se em um balão volumétrico a solução de sulfato de ferro amoniacal $[NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$ solubilizando 8,6344 g do mesmo em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1% (v/v) o qual foi avolumada para 1 L com essa mesma solução. Utilizou-se para a curva analítica as mesmas concentrações e volume de soluções de ácido ascórbico (agente antioxidante) do teste com o radical DPPH. Porém, colocou-se nos tubos de ensaio, 10 μ L da solução de sulfato de ferro amoniacal com 980 μ L de solução de fenantrolina 0,25%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda 508 nm após o tempo de reação de 60 min.

Realizada a calibração da curva analítica, testou-se os extratos com alíquotas de 10 μ L, solubilizados com seus respectivos solventes a 500 μ g/mL. Essas alíquotas foram adicionadas aos tubos de ensaio com 10 μ L da solução de ferro amoniacal a 1 mg/mL e 980 μ L de fenantrolina 0,25%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 508 nm após o tempo de reação de 60 min (Fig. 40).

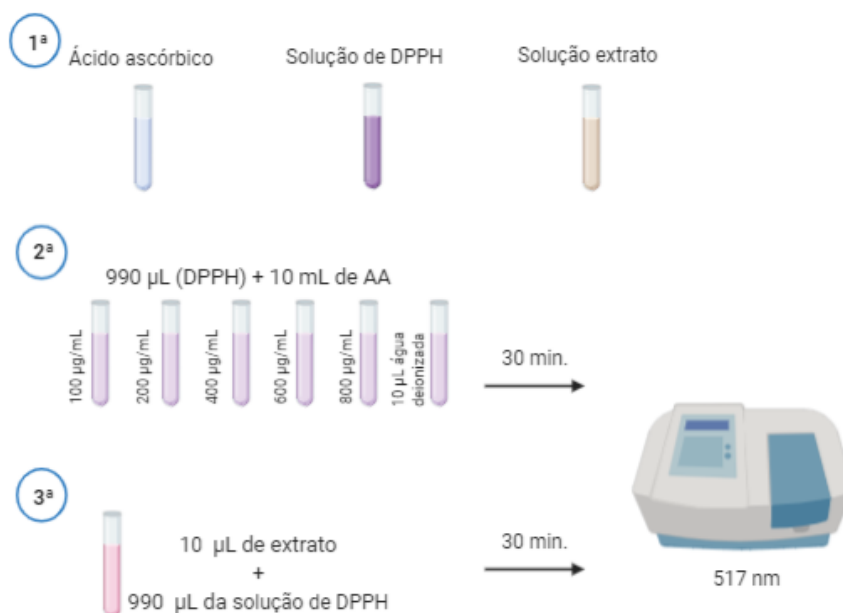


Figura 40: Ilustração representativa do ensaio antioxidante com DPPH e Fe^{3+} /Fenantrolina.

As informações obtidas da quantificação do potencial antioxidante para as duas metodologias acima, foram comparadas ao padrão e definidas de acordo com a escala de interpretação descrita por *Martins et al.*, 2014 (Tab. 19).

Tabela 19: Escala de interpretação da atividade antioxidante (Martins *et al.*, 2014).

Atividade antioxidante (mg de extrato/mg de ácido ascórbico)	Escala (Martins <i>et al.</i> , 2014)
< 0,99	Muito ativo
Entre 1,0 - 1,99	Ativo
Entre 2,0 - 2,99	Moderado
>3,0	Inativo

Avaliação da Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, determinado por leitura em espectrofotômetro a 625 nm (FENTOM – Cirrus 80ST) segundo metodologia adaptada do CLSI, 2015. As cepas utilizadas (Tab. 20) foram cedidas pelo Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz.

Tabela 20: Cepas e suas respectivas identificações, utilizadas no ensaio antibacteriano.

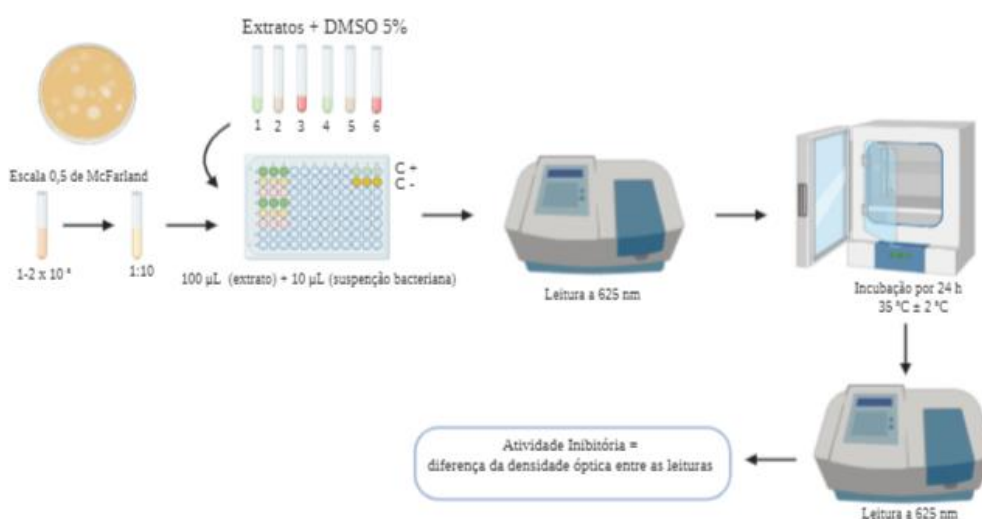
	Microrganismos	ATCC
Gram-negativa	<i>Aeromonas hydrophila</i>	IOC/FDA 110-36
	<i>Citrobacter freundii</i>	8090
	<i>Edwardsiella tarda</i>	15947
	<i>Escherichia coli</i>	11775
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13525
	<i>Serratia marcescens</i>	13880
	<i>Salmonella enteridis</i>	6951
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	9610
Gram-positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	12600

ATCC: American Type Culture Collection; IOC/FDA: Instituto Oswaldo Cruz – Food and Drug Administration.

Prepararam-se os inóculos com o auxílio de uma alça, onde colônias bacterianas provenientes de culturas puras foram inoculadas por 24 horas em caldo Mueller Hinton e homogeneizadas. Comparou-se e ajustou-se a turvação do inóculo 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 (UFC/mL).

Após o inóculo ter sido padronizado como descrito acima, diluiu-se a suspensão em caldo na proporção de 1:20, para que após a inoculação cada poço contivesse aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Efetuou-se a diluição das amostras em DMSO a 5% na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 100 μL de cada diluição dos extratos foram adicionados em cada poço da placa em triplicata, em seguida cada poço foi inoculado com 10 μL da suspensão bacteriana previamente preparada. Antes das placas serem levadas para incubação por 24 h a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ realizou-se uma primeira leitura da absorbância em espectrofotômetro (Thermo scientific, modelo: Multiskan GO) a 625 nm, e após o tempo de incubação foi realizada uma segunda leitura das placas no espectrofotômetro sob as mesmas condições da primeira leitura. A atividade inibitória foi obtida pela diferença das densidades ópticas entre essas duas leituras. Utilizou-se como controle positivo o antibiótico oxitetraciclina a 125 $\mu\text{g/mL}$ e como controle negativo, o próprio meio de cultura com DMSO a 5% (Fig. 41).



Figur 41. Ilustração representativa do ensaio antibacteriano.

Avaliação antiangiogênica pelo método CAM

A avaliação da atividade antiangiogênica, através do ensaio da membrana corioalantóica do embrião da galinha (HET-CAM) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Nguyen *et al.*, 1994.

Ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital (Chocmaster®), na posição horizontal, à temperatura de 37 °C e com umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação (idade embrionária E2), uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde a câmara de ar do ovo estava localizada e assim, uma quantidade de cerca de 5 mL de clara foi retirada com auxílio de uma seringa, afim de evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Após 72 h, outra janela foi aberta com aproximadamente 15 mm de diâmetro na região localizada acima da membrana corioalantóica. As aberturas foram vedadas com fita adesiva e isolante para minimizar a perda de umidade. Os embriões foram então incubados por mais 72 h para que alcançassem a fase embrionária de 6 dias (E6). Nesta fase, foram realizadas pequenas aberturas nos ovos e implantados os discos de metilcelulose adsorvidos com os extratos, exatamente no terço externo da membrana corioalantóica. Após implementação do disco, o espaço aberto foi novamente vedado e incubado por 48 h, até a fase embrionária, de 8 dias (E8) de experimento, para a avaliação da atividade antiangiogênica.

Os extratos hexânicos e metanólicos de *C. comosa* foram testados nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL e avaliados em triplicata. Utilizou-se uma proporção de 1 mL de álcool etílico para 1000 µg de extrato, para solubilização dos mesmos e como controle negativo. Para a análise da atividade antiangiogênica, utilizou-se uma câmera fotográfica para os registros de cada ovo em triplicata (Fig. 42). As imagens obtidas foram utilizadas para a contagem dos vasos sanguíneos que interceptou o disco e vasos presentes em uma área de 0,9 cm. Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio-padrão da média.

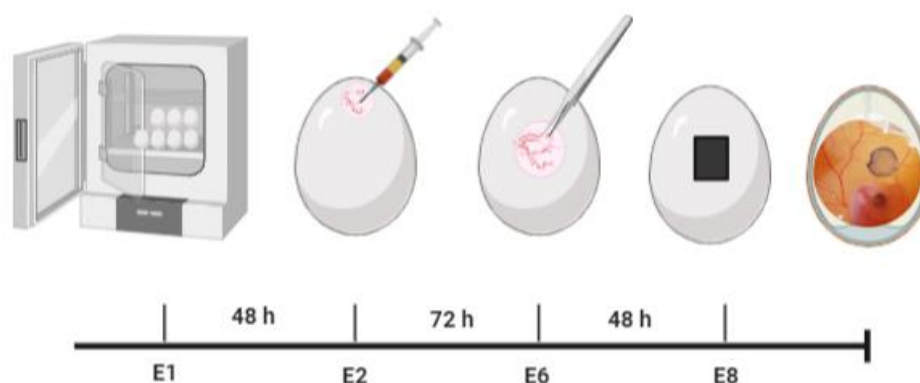


Figura 42: Ilustração representativa do ensaio antiangiogênico pelo método HET-CAM.

Resultados

Toxicidade frente à *Artemia salina*

Os extratos avaliados quanto à toxicidade de *C. comosa* apresentou uma $CL_{50} > 1000$ $\mu\text{g/mL}$, mostrando não haver toxicidade em nenhum dos extratos avaliados (Tab. 21).

Tabela 21: Taxa de sobrevivência de *A. salina* frente ao teste de toxicidade em diferentes concentrações dos extratos hexânicos e metanólicos de *C. comosa*.

Extratos	Concentração				
	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	62 $\mu\text{g/mL}$
FOMeOH	90%	80%	83%	97%	100%
RAMeOH	90%	100%	90%	97%	100%
CSMeOH	70%	87%	83%	90%	90%
FOHex	100%	97%	87%	93%	93%
RAHex	100%	100%	90%	96%	100%
CSHex	93%	87%	87%	100%	100%

Legenda: FOMeOH (folha metanol), RAMeOH (ramos metanol), CSMeOH (casca metanol), FOHex (folha hexano), RAHex (ramos hexano) e CSHex (casca hexano).

O ensaio com *A. salina* foi utilizado para avaliar preliminarmente a toxicidade da planta, além de sugerir possíveis propriedades biológicas. Extratos de plantas e derivados são considerados potencialmente ativos quanto maior for a sua toxicidade contra *A. salina* (Amarante *et al.*, 2011).

No entanto, como nos resultados obtidos neste ensaio mostrou que os extratos de *C. comosa* são atóxicos, esses dados podem ser correlacionados com a presença principalmente de flavonoides, entre outras classes, já demonstrado no estudo químico apresentado no cap. I. Os flavonoides, em sua maioria, são classificados como seguro para ingestão e com baixa toxicidade e, além disso, também podem ser ativos para diferentes propriedades biológicas (Tapas *et al.*, 2008; Akroum *et al.*, 2010).

A avaliação de toxicidade de *C. comosa* foi consideravelmente importante, pois alguns extratos da espécie foram ativos, como no ensaio antioxidante e antiangiogênico, que tem como finalidade identificar constituintes que possibilitem a substituição de produtos sintéticos danosos por um bioativo não tóxico. Isto porque, a toxicidade de extratos de plantas podem

ocasionar a curto ou longo prazo efeitos nocivos para o organismo, provenientes de substâncias ativas ou com associação de outras substâncias tóxicas (Khaleel *et al.* 2019). Dessa forma, a espécie em estudo deve ser direcionada para maiores investigações, entre outros testes, para a avaliação do início da pesquisa de um possível produto natural bioativo.

Atividade antioxidante pelos métodos DPPH e Fe³⁺/fenantrolina

Os resultados obtidos no teste antioxidante foram interpretados como muito ativo, ativo e atividade moderada, quando comparados ao padrão ácido ascórbico (AA) através da curva de calibração padrão (Fig. 43).

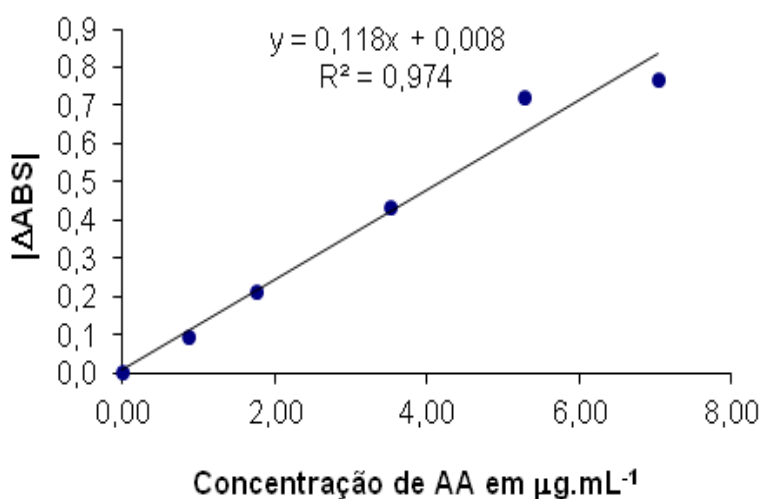


Figura 43: Curva de calibração do ácido ascórbico utilizado como padrão para o ensaio antioxidante.

Analisados pelo ensaio com DPPH, os extratos metanólicos de ramos e cascas apresentaram atividade moderada e ativa, respectivamente (Tab. 22). Para o ensaio com Fe³⁺/Fenantrolina os extratos metanólicos de folhas e ramos mostraram atividade moderada, enquanto o extrato metanólico das cascas foi ativo (Tab. 23). Já, os extratos hexânico e o metanólico das folhas (ensaio DPPH) não apresentaram atividade antioxidante. Logo, os resultados obtidos definem a atividade antioxidante nos extratos metanólicos principalmente para os extratos das cascas, possivelmente devido a presença de flavonoides.

Tabela 22: Atividade antioxidante dos extratos hexânicos e metanólicos de *C. comosa* frente ao DPPH.

Amostra	Método usando DPPH•							Atividade
	Valores médios			Desvios padrões				
	[DABS ₅₁₇]	[AA] _{eq}	Equiv.	DABS ₅₁₇	[AA] _{eq}	Equiv.		
Hexano	Folhas	0,006	-0,015	-102,877	0,004	0,034	418,845	NA
	Ramos	0,001	-0,058	-95,818	0,002	0,020	40,583	NA
	Cascas	0,004	-0,038	-179,379	0,003	0,027	102,768	NA
MeOH	Folhas	0,123	0,977	5,117	0,002	0,017	0,089	NA
	Ramos	0,209	1,709	2,933	0,012	0,103	0,171	MO
	Cascas	0,349	2,897	1,727	0,009	0,072	0,043	AT

Tabela 23: Atividade antioxidante dos extratos hexânicos e metanólicos de *C. comosa* frente ao Fe³⁺/fenantrolina

Amostra	Método usando Fe ³⁺ / fenantrolina							Atividade
	Valores médios			Desvios padrões				
	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv.	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv.		
Hexano	Folhas	0,0032	0,075	73,14	0,020	0,031	24,139	NA
	Ramos	0,000	0,123	41,84	0,016	0,024	9,254	NA
	Cascas	0,010	0,138	38,16	0,028	0,042	9,902	NA
MeOH	Folhas	1,051	1,707	2,93	0,024	0,036	0,061	MO
	Ramos	0,976	1,593	3,15	0,071	0,108	0,209	MO
	Cascas	1,715	2,707	1,85	0,032	0,049	0,033	AT

Como já mencionado, os extratos hexânicos não apresentaram atividade antioxidante. Desta forma, sugere-se que nesses extratos é obtida uma menor concentração de substâncias fenólicas. Logo, essa diferença na concentração de fenóis entre os extratos hexânicos e metanólicos é também definido pelo grupo de substâncias que se ligam ao solvente de acordo com sua polaridade (Vieira *et al.*, 2015).

Considerando que o extrato hexânico é mais apolar que o extrato metanólico, justifica-se a ação antioxidante dos extratos metanólicos de *C. comosa*. Pois, o conteúdo de substâncias fenólicas e atividades antioxidantes relacionam-se com a capacidade de extração de substâncias de acordo com a polaridade do solvente e da relação entre soluto e solvente. Dessa forma, é definida uma ação antioxidante maior em extratos obtidos com solventes mais polares (Turkmen *et al.*, 2006; Carvalho Jr. *et al.*, 2014; Settaraska *et al.*, 2014).

De acordo com os métodos utilizados, foi observada uma pequena diferença nos valores equivalentes para o extrato metanólico de folhas, no qual foi moderadamente ativo quando testado pelo método Fe^{3+} /Fenantrolina e inativo quando testado pelo método DPPH. Possivelmente o extrato FOMeOH foi ativo devido a metodologia com redução de ferro interagir melhor em fluídos biológicos e soluções aquosas, ou seja, mais apolares (Rufino *et al.*, 2006). Já a interação de um possível antioxidante com o DPPH, depende principalmente da sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxilas disponíveis (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Nos poucos estudos relatados com *C. comosa* na literatura, foi correlacionada à ação antioxidante das suas sementes pelo método do radical DPPH. Assim como nesse estudo com sementes e para os resultados obtidos nesta tese, é sugerido que a presença de substâncias fenólicas nas amostras exerça uma ação de ruptura em cadeias livres doando um átomo de hidrogênio, ou reagem como doadores de elétrons influenciando com seu potencial redutor (Padilla *et al.*, 2008).

A eficácia de substâncias antioxidantes são características de cumarinas e grupos de hidroxilas presentes em moléculas com anel aromático (Olszowy *et al.*, 2019). De acordo com a análise fitoquímica realizada (CAP 1), é ratificada a atividade antioxidante dos extratos MeOH de *C. comosa* pela presença de substâncias fenólicas, revelando manchas escuras em FeCl_3 e inflorescência amarelo intenso, em NP/PEG. Além disso, o isolamento dos flavonoides apigenina e quercetin-3,7,4'-trimethyleter, no qual a substância apigenina, já é descrita com alta atividade antioxidante (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Salehi *et al.*, 2019).

No geral, ensaios antioxidantes são constantemente aplicados em pesquisas, com o objetivo de utilizar substâncias naturais que substituam sintéticos nocivos ao organismo. Esses antioxidantes podem atuar como ferramentas essenciais para a prevenção do envelhecimento, doenças como câncer, catarata, diabetes, inflamações, infecções, cardiovasculares, hepáticas, nefropatias, neuropatias, entre outros (Neha *et al.*, 2019). Além disso, substâncias antioxidantes também são amplamente utilizadas pela indústria de alimentos, cosméticos e bebidas, tratando-se de uma alternativa promissora e de baixo custo (Bianchi & Antunes, 1999).

Dessa forma, considerando aplicações e a importância dos antioxidantes com os resultados obtidos para *C. comosa*, é conveniente explorar essa propriedade avaliando outros métodos, bem como dar continuidade na investigação de outras substâncias não identificadas/isoladas que também possam apresentar efeito antioxidante, tornando-a uma espécie ainda mais relevante.

Avaliação da Atividade Antibacteriana

Os resultados do ensaio antibacteriano pelo método de microdiluição foram expressos em porcentagem de inibição das amostras, comparado ao padrão antibiótico. As amostras foram avaliadas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, e de acordo com a leitura espectrofotométrica foi calculada a inibição no crescimento do microrganismo. Valores $\geq 80\%$ de inibição são considerados ativos, no entanto alguns extratos de *C. comosa* não apresentaram nenhuma porcentagem de inibição e outros inibiram apenas até 69% frente a algumas cepas gram-negativas. Como nenhum dos resultados apresentou inibição $\geq 80\%$, os extratos de folhas, ramos e cascas de *C. comosa* foram considerados inativos frente às cepas analisadas neste trabalho.

O extrato hexânico das folhas, ramos e cascas inibiram menos que 50% dos microrganismos gram-negativos testados. O extrato hexânico das folhas inibiu 16% frente à *S. enterica* e o extrato dos ramos inibiu 45% frente à *A. hydrophyla* e 27% frente a *S. marcescens*. Já o extrato hexânico das cascas, inibiu em 28% frente à *K. pneumoniae* e 11% frente à *S. marcescens*.

As maiores porcentagens foram alcançadas pelos extratos metanólicos de ramos e cascas, frente à *P. fluorescens*. Os mesmos apresentaram inibição no crescimento do microrganismo em 69% para os ramos e 52% para as cascas, não foi observada inibição a partir do extrato metanólico das folhas (Fig. 44).

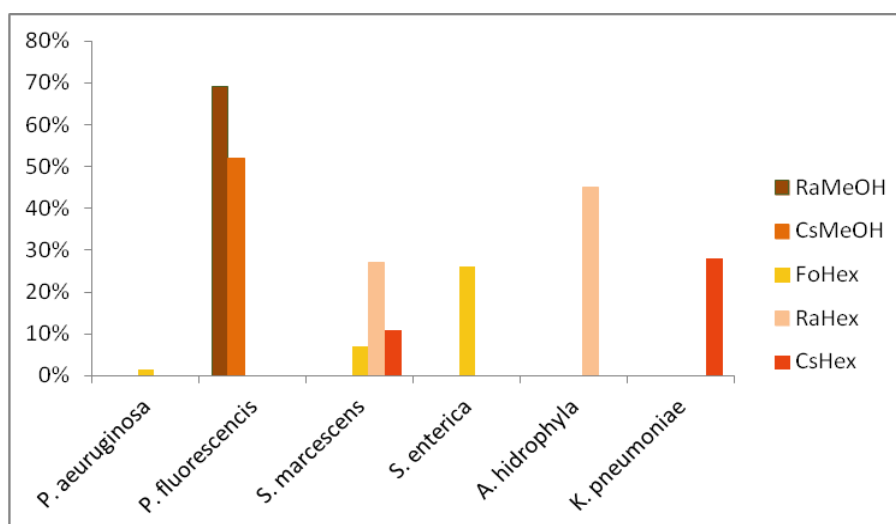


Figura 44: Percentual de inibição, obtidos pelos extratos de *C. comosa* frente às cepas gram-negativas. Legenda: RaMeOH (extrato metanólico dos ramos), CsMeOH (extrato metanólico das cascas), FoHex (extrato hexânico das folhas), RaHex (extrato hexânico dos ramos), CsHex (extrato hexânico das cascas). O padrão antibiótico utilizado para cada cepa apresentou porcentagem de inibição igual 99,6%.

De acordo com a pesquisa realizada por Webster *et al.*, 2008, deve ser considerado que extratos brutos apresentam uma mistura de substâncias ativas e não ativas, essas “misturas” por sua vez podem apresentar a concentração inibitória mínima mais alta. É sugerido também pelos autores que as substâncias antibacterianas podem estar entre os constituintes mais polares, corroborando com os resultados encontrados, os quais apenas os extratos metanólicos dos ramos e cascas apresentaram uma inibição maior quando comparado aos demais, ainda que não sejam considerados ativos.

De acordo com os resultados, sugere-se que a ação inibitória observada frente às cepas gram-negativas pode estar correlacionada ao perfil fitoquímico de *C. comosa*, já descrito neste trabalho (CAP. 1). As substâncias fenólicas, principalmente flavonoides presentes nos extratos devem ter atuado na tentativa de inibir o crescimento dos microrganismos. Essas mesmas substâncias são predominantes em espécies de Fabaceae, no qual *C. comosa* está inserida, e atuam como agente bactericida e bacteriostático interferindo na membrana celular e inibindo o ácido nucleico na metabolização de várias cepas (Khalid *et al.*, 2019). O extrato das cascas, sementes e folhas de *C. comosa* também já foi testado junto com 56 extratos vegetais contra três linhagens de *Mycobacterium tuberculosis*, no entanto não foi ativo (Carrion *et al.*, 2013).

Alguns flavonoides já isolados, como nobiletina, apigenina, catequina, miricetina, crisina, entre outros, estão disponíveis comercialmente e são considerados agentes antimicrobianos (Johann *et al.*, 2007; Srinivas & Reddy, 2012, Yanagawa *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2008; Cai & Wu, 1996; Babu *et al.*, 2006). Dessa forma, ressalta-se o potencial de *C. comosa* na produção de substâncias que atuam como antibacterianos, como a apigenina, identificada e isolada no extrato da espécie. Além disso, outras substâncias antibacterianas não identificadas podem estar presentes em outros extratos da planta ainda não explorados.

Ainda que inativos para as cepas testadas, devem ser considerados novos ensaios com outros tipos de microrganismos, principalmente gram-negativos. Pois, mesmo que em baixas porcentagens o extrato de *C. comosa* interceptou parcialmente o crescimento de cepas gram-negativas que apresentam uma camada extra de polissacarídeos e proteínas em sua parede celular, formando uma barreira maior de permeabilidade a agentes antimicrobianos através de suas células (Sikkema *et al.*, 1995).

Uma alternativa a ser explorada, trata-se da combinação de extratos de plantas com antibióticos, buscando proporcionar a potencialização da ação antibacteriana. As plantas produzem uma variedade de micromoléculas com potencial antibacteriano, conhecida como fitoalexinas. A maioria dessas moléculas possui uma atividade antibiótica fraca, quando

comparadas aos antibióticos provenientes de bactérias ou fungos. No entanto, mesmo que essas moléculas sejam menos ativas, as plantas conseguem eliminar infecções com sucesso, utilizando o sinergismo ao seu favor (Hemaiswarya *et al.*, 2008).

De acordo com Silva *et al.*, (2019), o extrato bruto de plantas pode potencializar a ação de diferentes antibióticos e reduzir a dose mínima necessária para uma atividade antibacteriana eficaz. Consequentemente, doses menores acarretam menos efeitos colaterais, assim como a redução no custo do tratamento. E para que o efeito combinatório seja satisfatório, é importante também a exploração do modo de ação dos extratos vegetais, tornado-se compreensível os mecanismos moleculares envolvidos nas interações. Dessa forma, os efeitos sinérgicos obtidos não agem apenas contra patógenos resistentes, mas apresentam-se como uma alternativa para redirecionar a ação de antibióticos.

Avaliação da atividade antiangiogênica

Os extratos de *C. comosa* demonstraram inibição no crescimento dos vasos sanguíneos no processo da angiogênese. Houve uma variação da inibição entre os extratos metanólicos e para os extratos hexânicos a inibição foi mais significativa na menor concentração e somente para o extrato das folhas. Possivelmente, os extratos hexânicos apresentam substâncias que conseguem inibir o crescimento dos vasos sanguíneos, no entanto devem ser analisados em menores concentrações.

O extrato FoMeOH foi ativo nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL, com inibição de 15, 75 e 85%, respectivamente. Para os extratos metanólicos dos ramos, foi possível observar uma atividade antiangiogênica menor nas concentrações de 100 e 500 µg/mL, com 15% de inibição cada uma e na concentração de 1000 µg/mL, uma inibição de 60% dos vasos. O extrato CsMeOH, não foi ativo na concentração de 100 µg/mL, porém apresentou inibição de novos vasos nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, com 10% e 30%, respectivamente (Fig. 45).

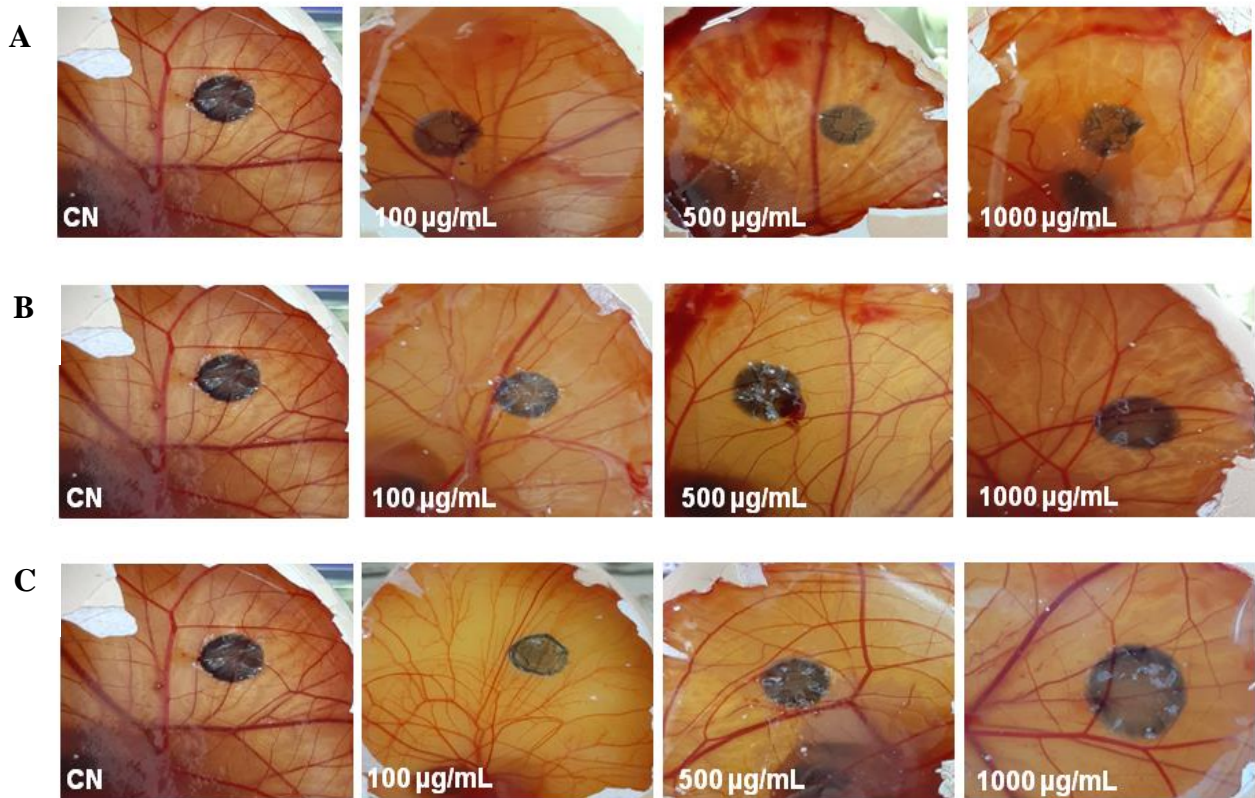


Figura 45: Imagens da rede vascular das membranas corioalantóicas, após o tratamento com o controle e o extrato metanólico das cascas de *C. comosa*, sendo (A) FoMeOH, (B) RaMeOH e (C) CsMeOH.

A atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelos extratos metanólicos de *C. comosa* foram expressos com diferença significativa $p < 0,0001$ comparada ao controle negativo (Fig. 46).

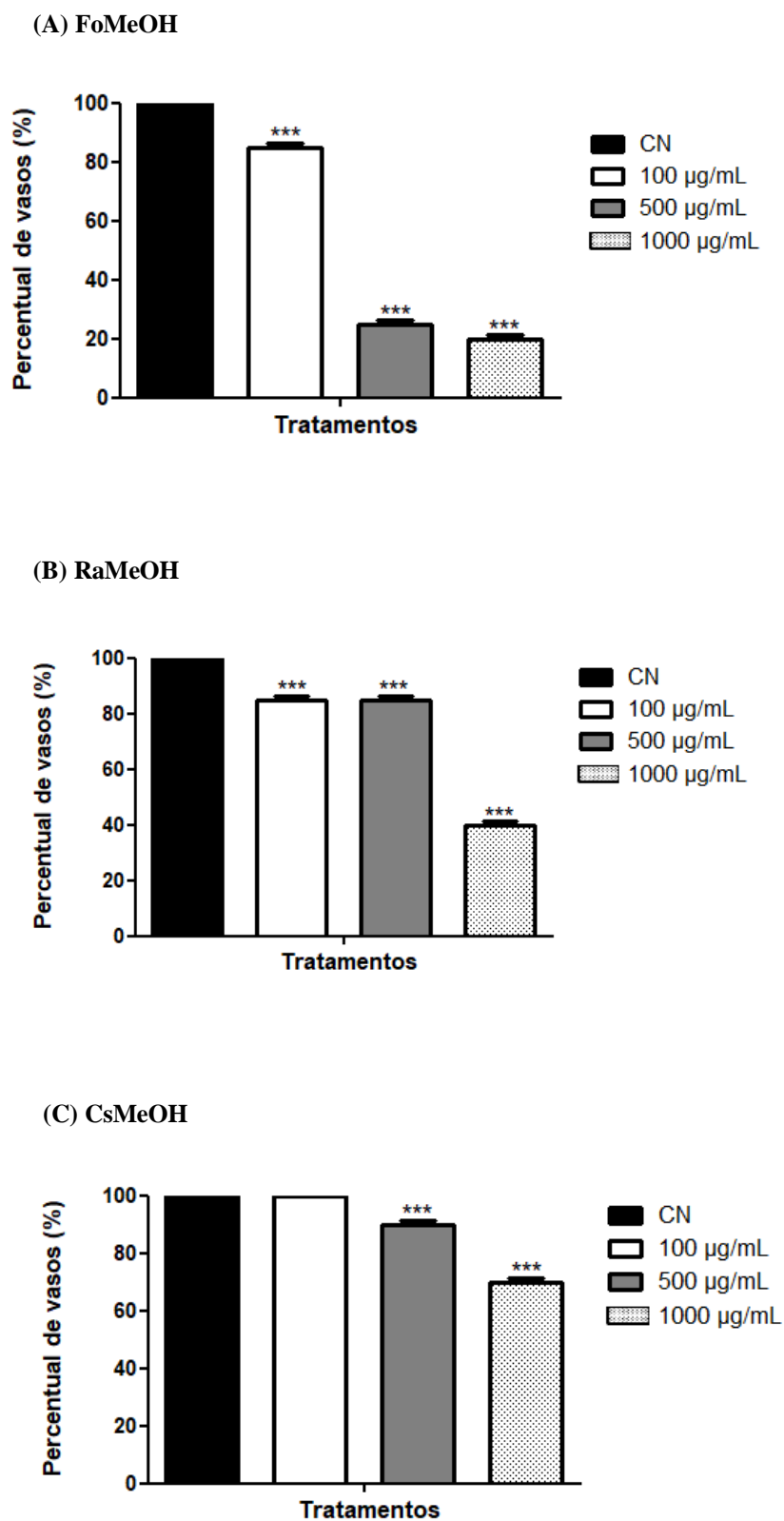


Figura 46: Percentual de vasos sanguíneos inibidos pelos extratos metanólicos de *C. comosa*. (A): folhas; (B): ramos; (C): cascas, em diferentes concentrações e comparado ao controle negativo (CN).

Para os extratos hexânicos, as folhas apresentaram uma alta atividade antiangiogênica. Houve inibição na concentração de 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, diminuindo respectivamente, a 80% e 100% de novos vasos sanguíneos, porém a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ foi considerada elevada. E para a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o extrato foi considerado tóxico. Os demais extratos hexânicos, de ramos e cascas foram tóxicos já na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 47 e 48). Esses resultados corroboram com diferentes pesquisas que demonstram que substâncias provenientes de plantas, apresentam um extraordinário potencial a tratamentos de patologias relacionadas à angiogênese (Ribeiro *et al.*, 2018).

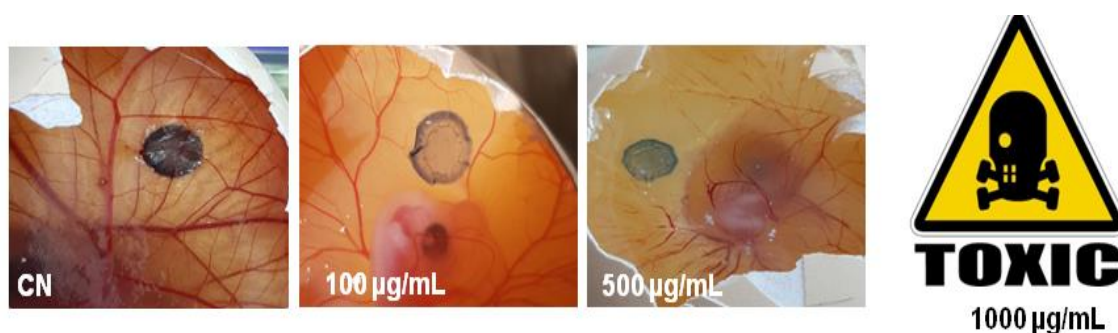


Figura 47: Imagens da rede vascular das membranas corioalantóicas, após o tratamento com o controle (CN) e o extrato hexânico das folhas de *C. comosa*.

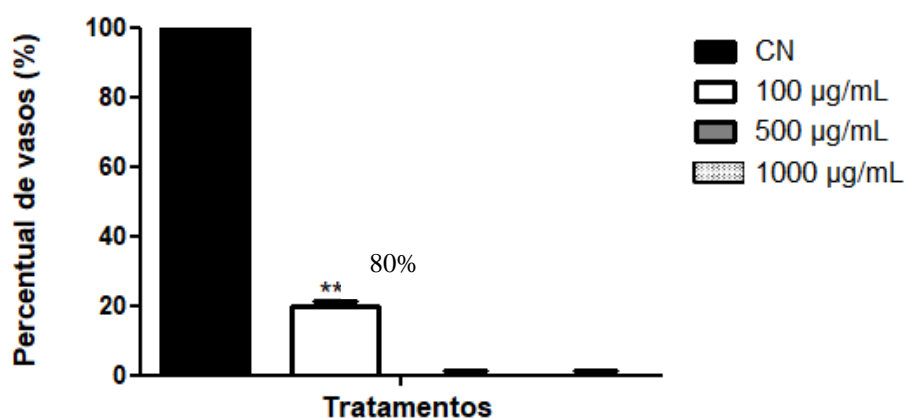


Figura 48: Percentual de vasos sanguíneos inibidos pelos extratos hexânico das folhas de *C. comosa*.

Várias substâncias naturais, como fenólicas e terpenoides, apresentam significativos efeitos antiangiogênicos, com diferentes mecanismos de ação, sendo consideradas opções promissoras para o desenvolvimento de estratégias ou medicamentos visando a angiogênese

patológica (Ribeiro *et al.*, 2018; Lewandowska *et al.*, 2014). Entre as substâncias isoladas de *C. comosa* descritas neste trabalho (CAP 1), a apigenina e o lupeol são caracterizados com diferentes propriedades farmacológicas importantes, dentre elas como potentes inibidores da angiogênese (Fang *et al.*, 2007; Siddique & Saleem, 2011; Soares *et al.*, 2017).

A apigenina apresenta efeitos inibitórios no RNAm do fator de crescimento endotelial vascular induzido por hipóxia (VEGF), frente à artéria umbilical endotelial humana (HUVEC), células cancerígenas da próstata humana (PC-3, DU 145, LNCaP), do cólon (HCT-8), da mama (MCF-7), do pâncreas, entre outros (Osada *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2007; Melstron *et al.*, 2011). Dessa forma, sugere-se que a apigenina poderá se tornar um futuro fármaco quimiopreventivo contra o câncer (Kashyap *et al.*, 2018).

O lupeol também apresenta potencial antiangiogênico, confirmado em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Essa substância terpênica é eficaz contra células do melanoma humano (SK-MEL-2), carcinoma do pulmão (A549) e melanoma murino (B16-F10) (You *et al.*, 2003). No ensaio *in vivo* pelo método HET-CAM, o lupeol promoveu a inibição dos vasos sanguíneos em 100 µg/mL (39,41%) e 250 µg/mL (44,12%), o qual também foi mais ativo que o medicamento antiangiogênico bevacizumabe (Avastin®) na concentração de 250 µg/mL com inibição de 24,62% dos vasos. O lupeol é capaz de inibir a formação dos novos vasos sanguíneos e a desregulação de genes angiogênicos como a MMP-2 e 9, VEGFa, fkt-1 e HIF-1a que estão associadas a capacidade de formar tumores (Vijay Avin *et al.*, 2014).

Outras substâncias não isoladas ou identificadas, e seus possíveis efeitos sinérgicos podem estar correlacionados com a atividade antiangiogênica dos extratos de *C. comosa*. Alguns estudos já enfatizam para a avaliação do efeito na combinação de substâncias que podem atuar contra a angiogênese patológica. Mertens-Talcott *et al.*, 2003, observaram que o efeito sinérgico da quercetina e do ácido elágico atuam na redução da proliferação, viabilidade e apoptose de células leucêmicas. Além disso, a combinação e associação de substâncias naturais antiangiogênicas, também diminui a resistência de drogas sintéticas aumentando seu potencial terapêutico para várias doenças tumorais (Ribeiro *et al.*, 2018).

Embora a angiogênese seja um alvo relevante para a prevenção e o tratamento de muitas doenças, as pesquisas atualmente estão focadas na angiogênese tumoral (Ribeiro *et al.*, 2018). Dessa forma, a busca por substâncias naturais atuantes como inibidores angiogênicos, tem se tornado muito importante para o tratamento de vários tipos de câncer. Esses possíveis medicamentos irão atuar interferindo na oxigenação e nutrição de células tumorais, impedindo a formação de novos vasos sanguíneos e por consequência bloqueando o crescimento do tumor (Quintieri *et al.*, 2014).

Este é o primeiro relato da investigação do potencial antiangiogênico de *C. comosa*, do qual obteve-se informações promissoras sobre a espécie em função também das moléculas isoladas que podem inibir ou reverter não só a carcinogênese, como também doenças inflamatórias, oculares, entre outras. No entanto, a formação ou não de novos vasos sanguíneos podem definir dois tipos de resultados importantes: a estimulação da angiogênese, por exemplo, em cardiopatias e doenças periféricas arteriais e a inibição dos vasos que é essencial em patologias como o câncer (Ribeiro *et al.*, 2018).

A pesquisa com a angiogênese também propõe desvendar principalmente os mecanismos envolvidos na sua formação, visto que as patologias associadas podem ser desencadeadas pela exacerbação do processo angiogênico ou pela sua insuficiência (Fechine-Jamacaru *et al.*, 2005). Além disso, drogas desenvolvidas para atuar na inibição da angiogênese podem causar outras complicações, o que prioriza pesquisas de mediadores a base de plantas identificando substâncias bioativas que atuem na angiogênese, com resultados significativos e com menores efeitos colaterais e maior seletividade (Saravanan *et al.*, 2019).

Conclusão

Associada às propriedades biológicas e químicas, *Campsiandra comosa* ampliou ainda mais o espectro de atividades antioxidante e antiangiogênica, o qual é característica de outras espécies pertencentes à família Fabaceae. Para atividade antibacteriana, o percentual inibitório não foi satisfatório para o ensaio realizado, no entanto, considera-se realizar novas análises, a partir de outros microrganismos. E quanto a sua atoxicidade, *C. comosa* apresenta uma planta com boas perspectivas para produção de bioativos, obviamente com a confirmação em testes com células animais.

Os resultados alcançados podem direcionar a outras pesquisas através da continuidade na avaliação química e biológica não abordada nesta tese. E principalmente ser associada a outras áreas de conhecimento, visto que as espécies do gênero *Campsiandra* apresentam características semelhantes a outras espécies do grupo e pouco conhecidas, valorizando também uma abordagem multidisciplinar na pesquisa em prol do conhecimento da nossa Flora.

Referências

- Akroum, S.; Bendjeddou, D.; Satta, D.; Lalaoui, K. 2010. Antibacterial, antioxidant and acute toxicity tests on flavonoids extracted from some medicinal plants. *International Journal of Green Pharmacy*, 4: 165-169.
- Amarante, C. B.; Müller, A. H.; Póvoa, M. M.; Dolabela, M. F. 2011. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta amazônica*, 41(3): 431-434.
- Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J.L. 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, 2: 107-111.
- Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. A.; Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 137: 426-436.
- Babu, K. S.; Babu, T. H.; Srinivas, P. V.; Kishore, K. H.; Murthy, U. S. N.; Rao, J. M. 2006. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 221-224.
- Balandrin, M. F.; Klocke, J. A. Wurtele, E. S.; Bollinger, W. H. 1985. Produtos químicos naturais para plantas: fontes de materiais industriais e medicinais. *Science*, 228: 1154-1160.
- Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G. 1999. Radicais livres e principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12: 123-130.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Braz-Filho, R. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, 33: 229-239.
- Cai, L.; Wu, C. D. 1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, 59: 987-990.
- Carrion, L. L.; Ramos, D. F.; Martins, D.; Osório, M. I. C.; Cursino, L. M. C. C.; Mesquita, D. W. O.; Nunez, C. V.; Silva, P. E. A. 2013. Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. *International Journal of Phytomedicine*, 5: 479-485.
- Carvalho Júnior, A. R.; Gomes, G. A.; Ferreira, R. O.; Carvalho, M. G. 2014. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae).

- Cechinel-Filho, V. 1997. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade. *Química Nova*, 21: 99-105.
- CLSI, 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Tenth Edition . M07 A10. 35: 1-87.
- Cragg, G.M. e Newman, D.J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 3670-3695.
- Fang, J.; Zhou, Q.; Liu, L.; Xia, C.; Hu, X.; Shi, X.; Jiang, B. 2007. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogenesis*, 28: 858-864.
- Fechine-Jamacaru, F. V.; Fechine Júnior, J. U.; Filho, M. O. M. 2005. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 20: 64-73.
- Hamburguer, M.; Hostettman, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30: 3864-3874.
- Hemaiswayra, S.; Kruthiventi, A. K.; Doble, M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639-652.
- Johann, S.; Oliveira, V. L.; Pizzolatti, M. G.; Schripsema, J.; Braz-Filho, R.; Branco, A.; Smânia Jr, A. 2007. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 681-685.
- Kashyap, D.; Sharma, A.; Tuli, H. S.; Sak, K.; Garg, V. K.; Buttar, H. S.; Stezer, W. N.; Sethi, G. 2018. Apigenin: a natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function. *Journal of functional foods*, 48: 457-471.
- Khaleel, R. I. 2019. Bio-toxicity study of some selected plant by *Artemia salina* (leach) test. *Plant Archives*, 19: 2847-2850.
- Khalid, M.; Rahman, S.; Bilal, M.; Dan-Feng, H. 2019. Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens – A Review. *Journal of Integrative Agriculture*, 18: 211-230.
- Lewandowska, U.; Gorlach, S.; Owczarek, K.; Hrabec, E.; Szewczyk, K. 2014. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 68: 528-540.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr, V. F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25: 429-438.
- Martins, D.; fachim-espinar, M.T.; Oliveira, T.A.; Lima, C.S.K.; Cavalcanti, M. R.; Teles, R.B.; Nunez, C.V. 2014. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades

- biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 6: 158-171.
- Melstrom, L. G.; Salabat, M. R.; Ding, X-Z.; Strouch, M. J.; Grippo, P. J.; Mirzoeva, S.; Pelling, J. C.; Bentrem, D. J. 2011. Apigenin down-regulates the hypoxia response genes: HIF-1 α , GLUT-1, and VEGF in human pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Research*, 167: 173-181.
- Mertens-Talcott, S. U.; Talcott, S. T., Percival, S. S. 2003. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells. *Journal nutrition and câncer*, 133: 2669-2674.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnan, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McL Aughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45: 31-34.
- Neha, K.; Haider, M. R.; Pathak, A.; Yar, M. S. 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178: 687-704.
- Nguyen, M.; Shing, Y.; Folkman J. 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvascular research*, 47: 31-40.
- Olszowy, M. 2019. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144: 135-143.
- Osada, M.; Imaoka, S.; Funae, Y. 2004. Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1 α protein. *FEBS Letters*, 575: 59-63.
- Padilla, F.; Rincón, A.; Bou-Rached, Y. L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de várias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 58: 303-308.
- Park, M.; Bae, J.; Lee, D-S. 2008. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from Ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytotherapy Research*, 22: 1446-1449.
- Quintieri, L.; Selmy, M.; Indraccolo, S. 2014. Metabolic effects of antiangiogenic drugs in tumors: therapeutic implications. *Biochemical Pharmacology*, 89: 162-170.
- Ribeiro, A.; Abreu, R. M. V., Dias, M. M.; Barreiro, M. F. 2018. Antiangiogenic compounds: well-established drugs versus emerging natural molecules. *Cancer Letters*, 415: 86-105.
- Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G. 2006. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Embrapa Comunicado Técnico on-line nº 125.
- Salehi, B.; Venditti, A.; Sharifi-Rad, M.; Kregiel, D.; Sharifi-Rad, Durazzo, A.; Lucarini, M.; Santini, A.; Souto, E. B.; Novellino, E.; Antolak, H.; Azzini, E.; Setzer, W.; N. Martins,

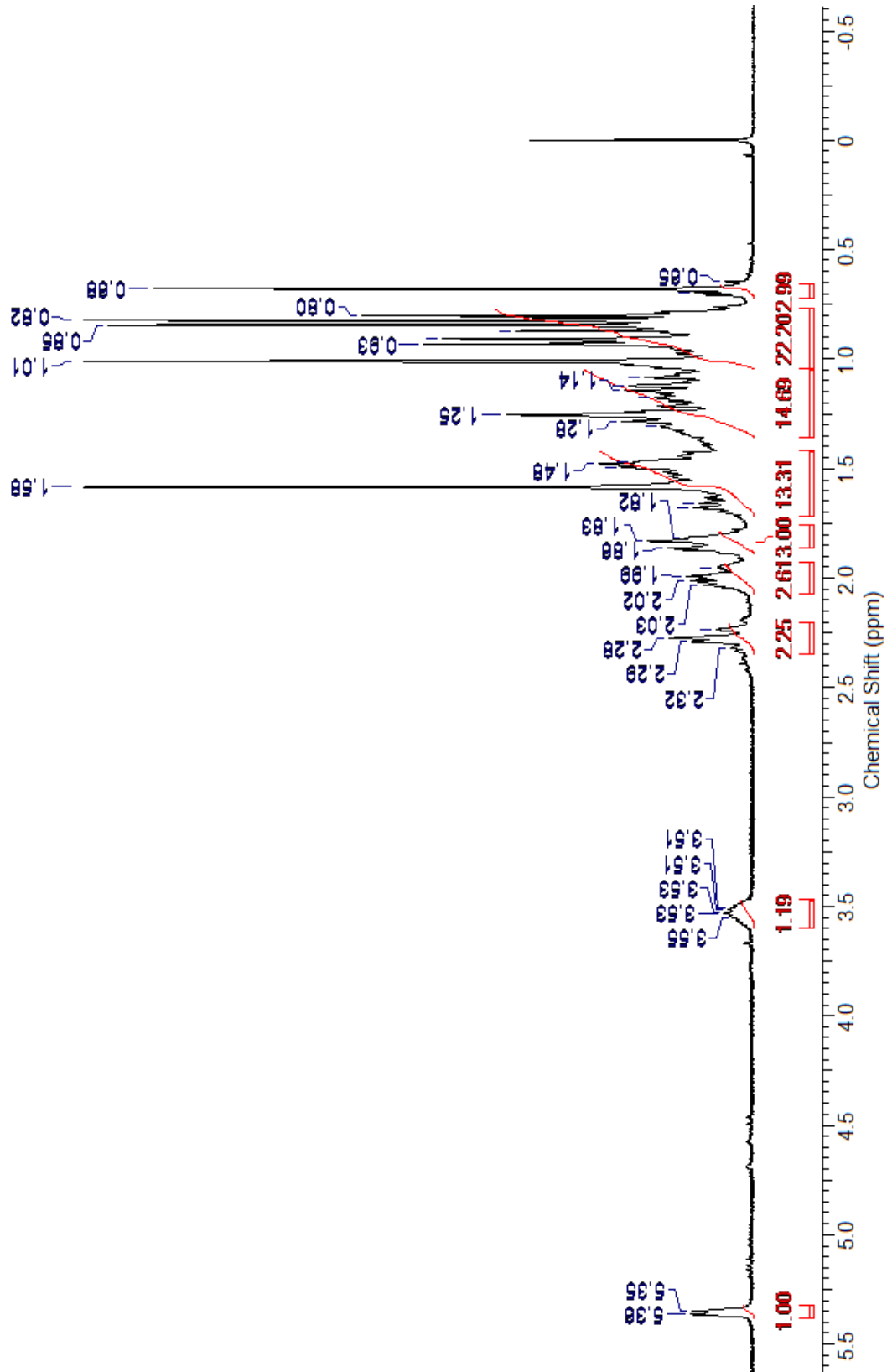
- N. 2019. The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 1305.
- Saravanan, M. Senthilkumar, P.; Chinnadurai, V.; Sakthivel, K. M.; Rajeshkumar, R.; Pugazhendhi. 2019. Antiangiogenic, anti-inflammatory and their antioxidant activities of *Turnera subulata* Sm. (Turneraceae). *Process Biochemistry*, 89: 71-80.
- Settharaksa, S.; Madaka, F.; Sueree, L.; Kittiwisut, S.; Sakunpak, A.; Moton, C.; Charoenchai, L. 2014. Effect os solvent on phenolic, flavonoid contents and anioxidant activities of *Syzygium gratum* (Wight) S.N. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6: 114-116.
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of functional foods*, 18: 820-897.
- Siddique, R.; Saleem, M.; 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Sciences*, 88: 285-293.
- Sikkema, J.; Bont, J. A. M.; Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59: 201-222.
- Silva, D. M.; Costa, P. A.; Ribon, A. O. B.; Purgato, G. A.; Diaz-Muñoz, G.; Diaz, M. A. N. 2019. Plant Extracts Display Synergism with Different Classes of Antibiotics. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 91: e20180117.
- Soares, D. C. F.; Oliveira, D. C. P.; Barcelos, L. S.; Barbosa, A. S.; Vieira, L. C.; Townsend, D. M.; Rubello, D.; Barros, A. L. B.; Duarte, P. L.; Silva-Cunha, A. 2017. Antiangiogenic acitivity of PLGA-Lupeol implants for potential intravitreal applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92: 394-402.
- Srinivas, P.; Reddy, S. R. 2012. Screening for antibacterial principle and activity of *Aerva javanica* (Burm, f) Juss, ex Schult. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2: 838-845.
- Tapas A. R.; Sakarkar, D. M.; Kakde, R. B. 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3): 1089-1099.
- Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, S. Y. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of Black and Black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99: 835-841.
- Vieira, L. M.; Castro, C. F. S.; Dias, A. L. B.; Silva, A. R. 2015. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodouon urundeuva* Fr. All (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*, 17: 521-527.
- Vijay Avin, B. R.; Prabhu, T., Ramesh, C. K.; Vigneshwaran, V.; Riaz, M.; Jayashree, K.; Prabhakar, B. T. 2014. New role of lupeol in reticence of angiogenesis, the cellular

parameter of neoplastic progression in tumorigenesis models through altered gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48: 139-144.

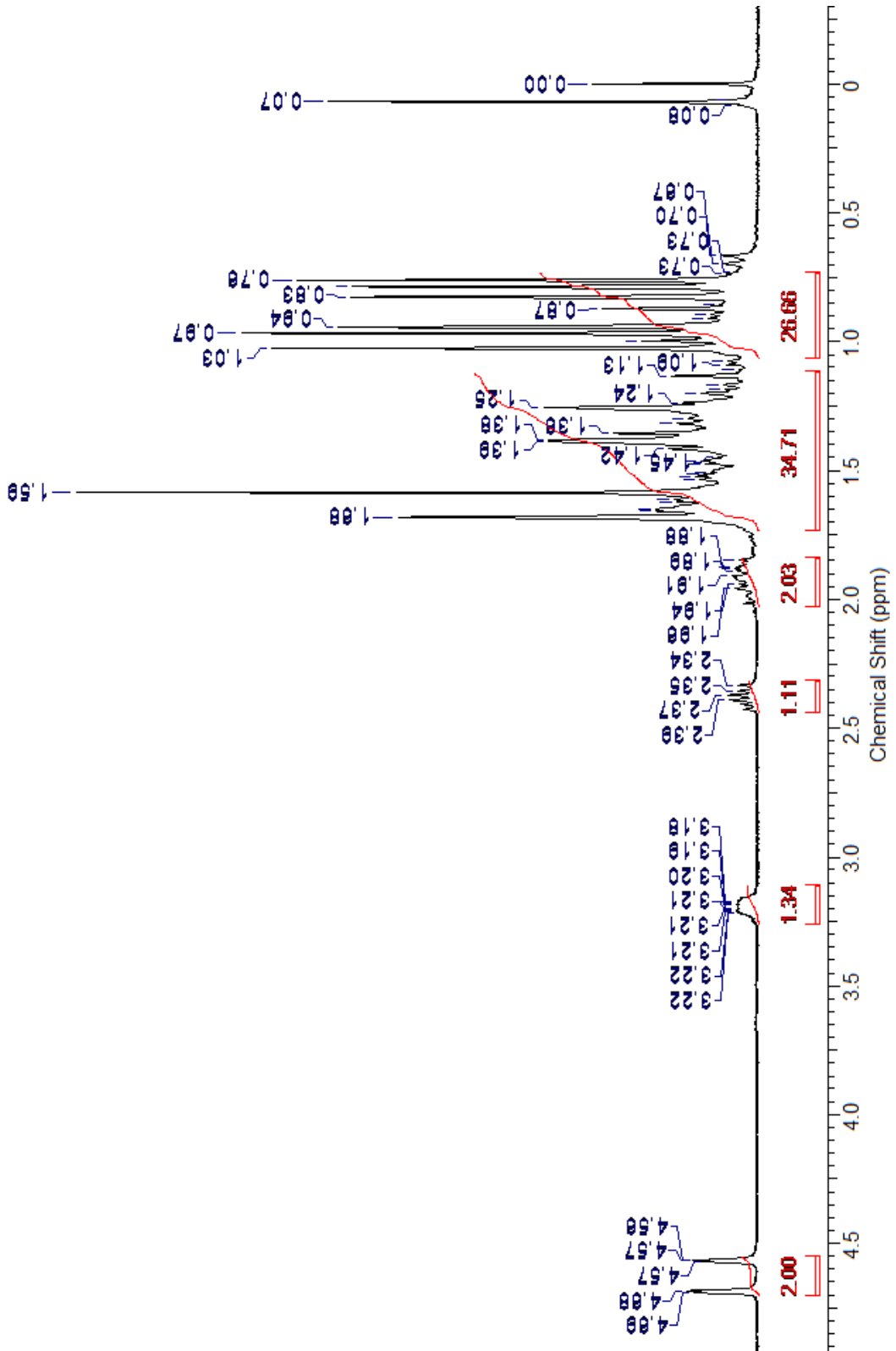
- Webster, D.; Taschereau, P.; Belland, R. J.; Sand, C.; Rennie, R. P. 2008. Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts; Preliminary Screening Studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 140-146.
- Yanagawa, Y.; Yamamoto, Y.; Hara, Y.; Shimamura, T. 2003. A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of Green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. *Current Microbiology*, 47: 244-249.
- You, Y-J.; Nam, N-H.; Kim, Y.; Bae, K-H.; Ahn, B-Z. 2003. Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytoterapy Research*, 17: 341-344.

ANEXOS

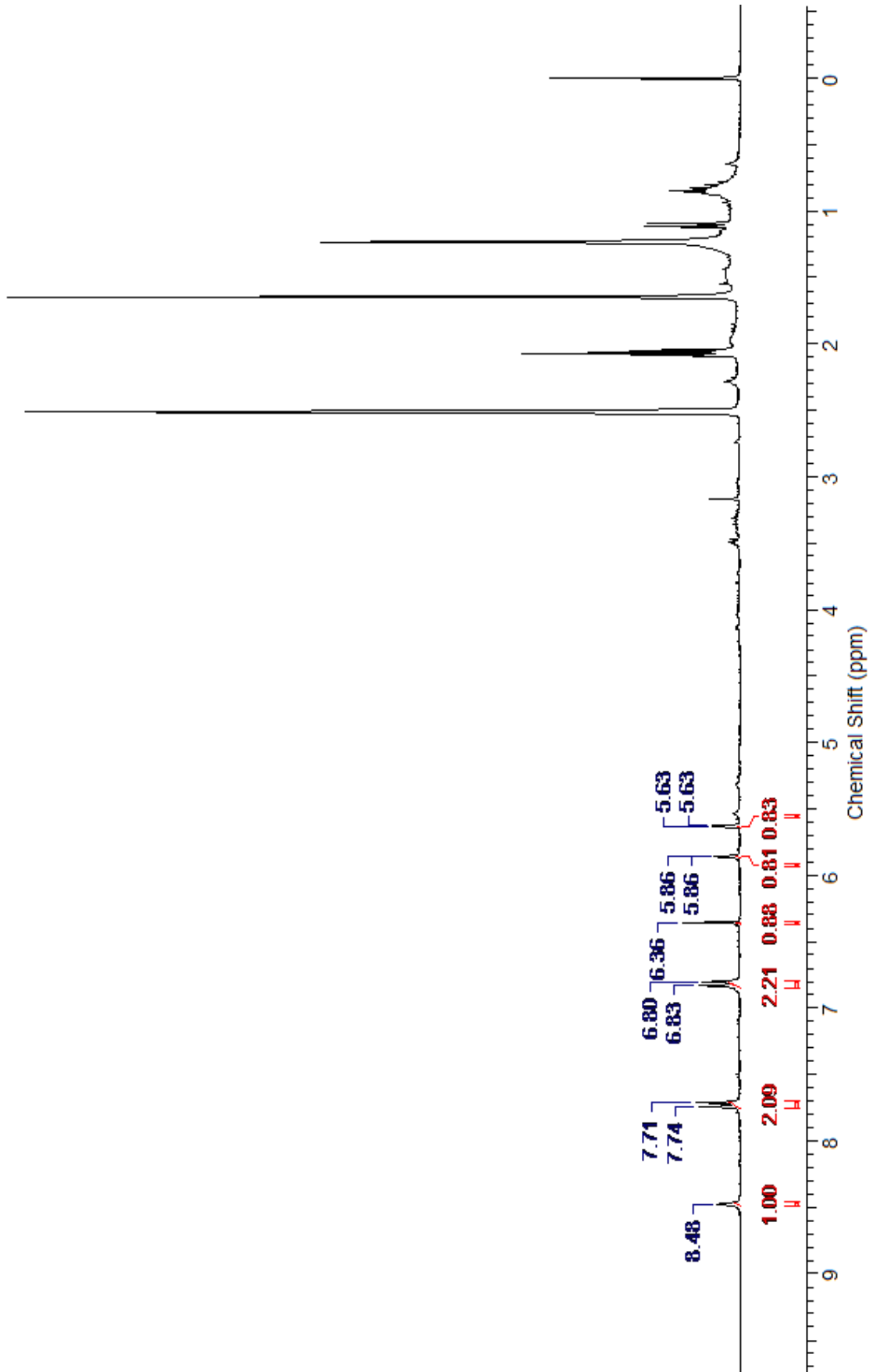
Espectro de RMN de ^1H da substância 1, β -sitosterol (CDCl_3 , 300 MHz).



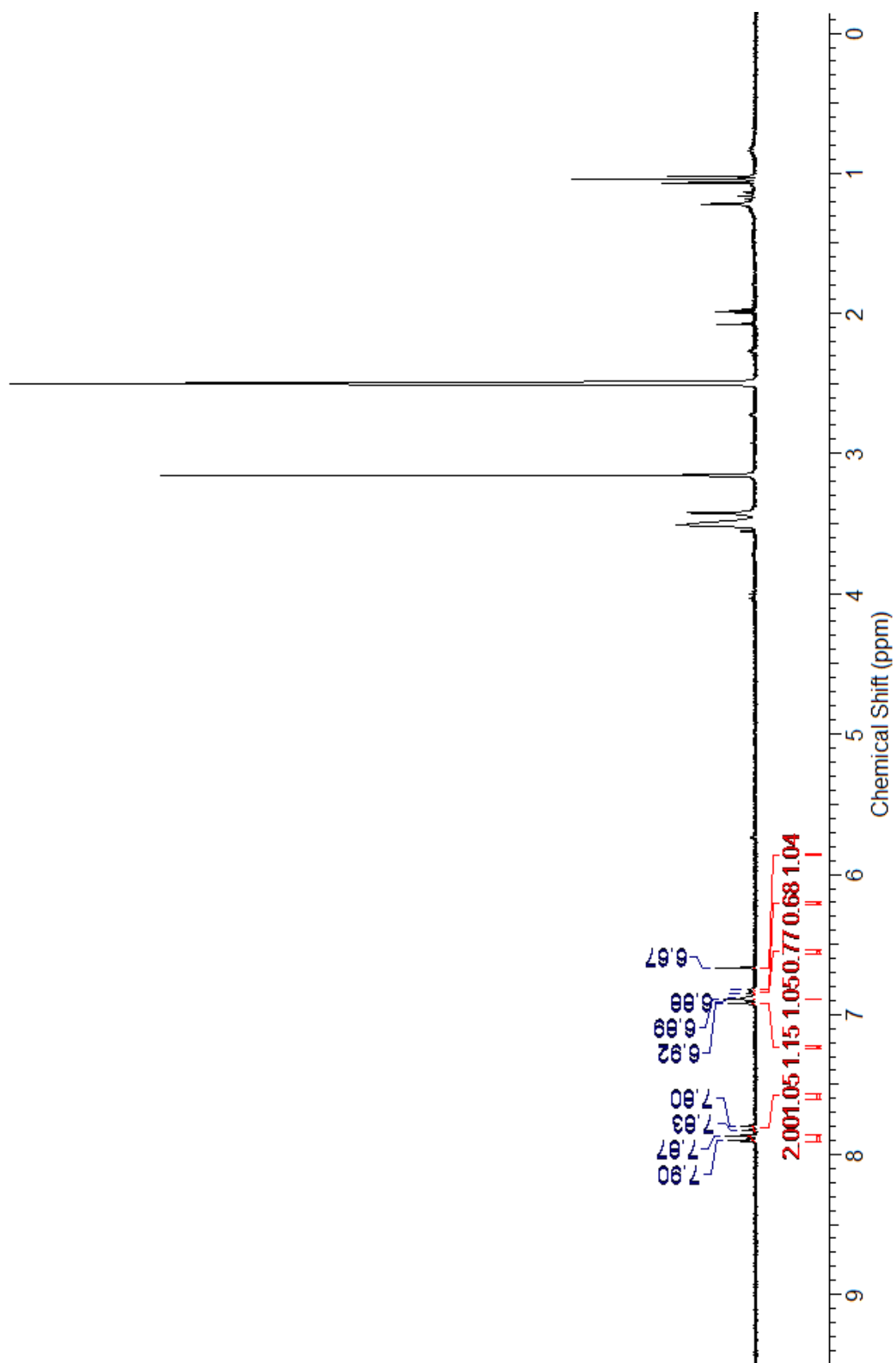
Espectro de RMN de ^1H da substância 2, lupeol (CDCl_3 , 300 MHz).



Espectro RMN de ^1H da apigenina em $\text{DMSO-}d_6$ (300 e 75 MHz).



Espectro de RMN de ^1H de 7,4-dihidroxiavona (DMSO- d_6 - 300 e 75 MHz).



Espectro de ^1H de RMN do flavonoide 3,7,4'-trimetóxi-quercetina (CDCl_3 - 300 e 75 MHz).

