

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
YOHANS JOSÉ MARTÍNEZ MONCADA

ESTUDO MORFOANATOMICO, FITOQUÍMICO, ANTIMICROBIANO E
CITOTÓXICO DA ESPECIE *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (SAPINDACEAE)

CURITIBA
2022

YOHANS JOSÉ MARTÍNEZ MONCADA

ESTUDO MORFOANATOMICO, FITOQUÍMICO, ANTIMICROBIANO E
CITOTÓXICO DA ESPECIE *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (SAPINDACEAE)

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de doutor em Ciências
Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2022

Moncada, Yohans José Martínez

Estudo morfoanatomico, fitoquímico, antimicrobiano e citotóxico da espécie
Allophylus Semidentatus (Miq.) Radlk. (*Sapindaceae*) [recurso eletrônico] / Yohans
José Martínez Moncada. – Curitiba, 2022.

1 arquivo (109 p.) : PDF.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientadora : Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador : Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

1. *Sapindaceae*. 2. Alantoína. 3. Toxicidade. 4. Fitoterapia. 5. Neoplasias.
I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do
Paraná. IV. Título.

CDD 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **YOHANS JOSE MARTINEZ MONCADA** intitulada: "**ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO, ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DA ESPECIE *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (SAPINDACEAE)**", sob orientação da Profa. Dra. MARILIS DALLARMI MIGUEL, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Outubro de 2022.


MARILIS DALLARMI MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora


YANNA DANTAS RATTMANN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO INTERNACIONAL - UNINTER)


DEISE PREHS MONTRUCCHIO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, especialmente nos momentos mais difíceis da minha vida e me dar força suficiente para enfrentar as dificuldades e superá-las.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo COIMBRA de universidades brasileiras por me terem escolhido de um grupo de mais de 100.000 candidatos aos programas de pós-graduação em 2016.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela contribuição financeira.

À Universidade Federal do Paraná, Brasil, ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Brasil, pela oportunidade proporcionada, no aporte técnico, científico e intelectual.

Ao Instituto Universitário de Tecnologia "Dr. Federico Rivero Palacio" Região Capital e à Universidade Central da Venezuela, que graças a eles descobri um mundo inteiro, não só dentro das suas salas de aula, mas também dentro dos seus laboratórios, compartilhando histórias de vida, fazendo-me conhecer os meus pontos fortes e fracos, por me ter permitido conhecer muitos professores, estudantes, pessoal trabalhador, técnico e de serviço, que de alguma forma marcaram o meu coração, e por me dar o conhecimento para enfrentar esta vida profissional e vivê-la ao máximo.

À minha mãe "Nana", pela educação que me deu com muito esforço, sacrifício e ímpeto, por estar sempre no momento certo para estender a mão e apoiar-me incondicionalmente em tudo, por transformar maus passos em momentos de reflexão, por me ouvir e ter sempre uma palavra de encorajamento para mim, por sempre me emprestar o ombro para desabafar em lágrimas, e por ser a minha cúmplice em todas as anedotas da minha vida, e por me dar de comer muitas vezes primeiro do que o meu irmão Gabriel.

À minha filha Adriana por ter transformado a minha vida tão radicalmente, por me ter voltado a desenhar todos os dias um grande sorriso na minha cara.

À minha professora de orientadora, a Dra. Marilis Dallarmi Miguel, pela generosidade de compartilhar os seus conhecimentos e dar-me a oportunidade de fazer parte do seu grupo de investigação, também pela amizade, dedicação, confiança e, acima de tudo, pela paciência que teve comigo durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. Obdulio Gomes Miguel, que compartilhou comigo os seus conhecimentos e técnicas no laboratório de fitoquímica e, sobretudo, a consideração, paciência e confiança proporcionadas.

Agradeço aos Professores Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, Dra. Sandra Zanin, pelo compartilhamento de seus conhecimentos sempre com muita disposição e paciência.

A todos os professores do Programa pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, para os ensinamentos científicos.

Ao Instituto de Pesquisa Pequeno Príncipe, aos alunos e funcionários, em especial ao professor Dr. Sandro Bonatto por disponibilizar o laboratório e auxiliar na realização dos ensaios de citotoxicidade.

Ao professor Ciro de Oliveira Ribeiro do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo apoio e a colaboração prestada nas análises de citotoxicidade.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelos realização dos ensaios de Ressonância Magnética Nuclear e Raios-X.

Agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa em produtos naturais, em especial, Juliana Nadal, Amanda Migliorini Urban, Samantha Golin Pacheco, Camila Freitas de Oliveira, Elisiane, Cintia Anjos, pela ajuda prestada, e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Jessica Luz do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela ajuda e parceria nas análises de citotoxicidade.

Ao técnico Paulo Diniz, do laboratório de farmacotécnica para o apoio e disponibilidade, e à técnica Maria da Graça da Central Analítica, pelo apoio prestado.

Um agradecimento especial para meu amigo Alfredo Medri pelo apoio, por todos os conselhos úteis e as palavras motivacionais.

Aos meus amigos brasileiros, Wilk Cicero, Eduardo Martins, Matheus Konopka e Fabio Treglia pelos momentos de descontração e apoio.

Agradeço a minha namorada, Maria Cristina, que jamais me negou apoio, carinho e incentivo. Obrigado por me aguentar, obrigado por entender a minha ausência em diferentes momentos.

Para Sandra Guimarães, por ter aberto as portas da casa dela para mim e por ser uma grande amiga, ser a minha "mãe" aqui em Curitiba.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Las naciones marchan hacia su
grandeza al mismo paso que
avanza su educación”.

Simón Bolívar

RESUMO

O gênero *Allophylus* pertencente à família Sapindaceae, possui substâncias ativas como taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenos e cumarinas, sendo algumas espécies utilizadas na medicina popular. A espécie *Allophylus semidentatus* é nativa do Brasil, mas não endêmica. Este trabalho teve como objetivo realizar o estudo morfoanatômico, fitoquímico, antimicrobiano e citotóxico do extrato etanólico, frações e isolar compostos provenientes das folhas, galhos e casca da espécie *Allophylus semidentatus*. A análise morfoanatômica de folhas e caules mostraram características que podem auxiliar na identificação da espécie e na descrição do gênero *Allophylus* e da família Sapindaceae. O resultado histoquímico evidenciou a presença de compostos fenólicos, taninos condensados e alcaloides. As folhas, galhos e cascas foram submetidos aos ensaios farmacopeicos de determinação de umidade e cinzas totais os quais estavam dentro dos parâmetros permitidos pela Farmacopeia Brasileira. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas e obteve-se 0,75% de rendimento, sendo que os constituintes químicos majoritários encontrados, foram os sesquiterpenos Germacreno D, Bicyclgermacreno e δ -Cadineno. Os extratos hidroalcoólicos e aquosos foram submetidos a análise fitoquímica preliminar e algumas frações analisadas por cromatografia de camada delgada, onde observou-se a presença de taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenos e cumarinas. Os extratos etanólicos foram particionados obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. A fração clorofórmio dos galhos foi submetida à cromatografia em coluna aberta e compostos isolados foram identificados por ressonância magnética nuclear, como o campesterol e β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside. A fração acetato de etila dos galhos foi também submetida a cromatografia de coluna aberta e identificou-se, por difração de raios-X, o composto 2,5-dioxo-4-imidazolinil urea, conhecido como alantoína. A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e frações das folhas e galhos foi moderada frente a microrganismos como *S. aureus* e *C. albicans*. Os extratos etanólicos e frações das folhas, galhos e casca foram submetidos a ensaios de citotoxicidade por redução do MTT, vermelho neutro e cristal violeta frente às linhagens celulares H295R, B16F1 e B16F10, além de avaliar as atividades dos macrófagos RAW 264.7 frente aos extratos etanólico e frações. Também foram testados os extratos e frações frente a células CACO-2. As frações acetato de etila, extrato bruto e fração clorofórmica da casca, na concentração de 1000 μ g/mL foram as que apresentaram uma maior viabilidade celular frente à linhagem celular B16F10. O estudo *in vitro* demonstrou que a espécie *Allophylus semidentatus* tem efeitos citotóxicos contra as linhagens celulares de câncer testadas. Os resultados frente às células CACO-2 e os macrófagos RAW 264.7 demonstraram que as amostras testadas se mostraram menos tóxicas, sugerindo que as frações testadas poderiam ter compostos mais promissores no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Morfoanatomia, citotoxicidade, β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside, campesterol, Alantoína.

ABSTRACT

Allophylus belong to the family Sapindaceae, has active substances such as tannins, alkaloids, flavonoids, steroids, triterpenes and coumarins, with some species used in folk medicine. *Allophylus semidentatus* is native to Brazil, but not endemic. This work aimed to carry out a morphoanatomical, phytochemical, antimicrobial and cytotoxic study of the ethanol extract, fractions and to isolate compounds from the leaves, branches and bark of the species *Allophylus semidentatus*. Morphoanatomical analysis of leaves and stems showed characteristics that can help in the identification of the species and in the description of the genus *Allophylus* and the family Sapindaceae. Histochemical result showed the presence of phenolic compounds, condensed tannins and alkaloids. Leaves, branches and bark were submitted to pharmacopoeial assays for determination of moisture and total ash, which were within the parameters allowed by the Brazilian Pharmacopoeia. Essential oil was extracted from the fresh leaves and a yield of 0.75% was obtained, and the major chemical constituents found were the sesquiterpenes Germacrene D, Bicyclogermacrene and δ -Cadinene. Hydroalcoholic and aqueous extracts were submitted to preliminary phytochemical analysis and some fractions were analyzed by thin layer chromatography, where the presence of tannins, alkaloids, flavonoids, steroids, triterpenes and coumarins was observed. Ethanolic extracts were partitioned obtaining the hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic fractions. Chloroform fraction of the branches was submitted to open column chromatography and isolated compounds were identified by nuclear magnetic resonance, such as campesterol and β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside. Ethyl acetate fraction of the branches was also subjected to open column chromatography and the compound 2,5-dioxo-4-imidazoliny l urea, known as allantoin, was identified by X-ray diffraction. Antimicrobial activity of ethanolic extracts and fractions of leaves and branches was moderate against microorganisms such as *S. aureus* and *C. albicans*. Ethanolic extracts and fractions of leaves, branches and bark were submitted to cytotoxicity assays by MTT reduction, neutral red and crystal violet against H295R, B16F1 and B16F10 cell lines, in addition to evaluating the activities of RAW 264.7 macrophages against ethanolic extracts. and fractions. Extracts and fractions were also tested against CACO-2 cells. Ethyl acetate, crude extract and chloroform fraction of the bark, at a concentration of 1000 μ g/mL, were the ones that showed the highest cell viability against the B16F10 cell line. *In vitro* study demonstrated that the species *Allophylus semidentatus* has cytotoxic effects against the tested cancer cell lines. Results against CACO-2 cells and RAW 264.7 macrophages showed that the samples tested were less toxic, suggesting that the fractions tested could have more promising compounds in the treatment of cancer.

Keywords: Morphoanatomy, cytotoxicity, β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside, campesterol, Allantoin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Distribuição da espécie <i>Allophylus semidentatus</i> no Brasil	24
FIGURA 2 -	<i>Allophylus semidentatus</i> em seu habitat.....	25
FIGURA 3 -	Fluxograma de trabalho feito no mestrado e doutorado, nas folhas e casca da espécie <i>Allophylus semidentatus</i> (MIQ.) RALDK. (Sapindaceae).....	27
FIGURA 4 -	Fotografia da exsicata da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	28
FIGURA 5 -	Equipamento de Clevenger usado para a extração do óleo essencial das folhas da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	32
FIGURA 6 -	Equipamento soxhlet utilizado para a obtenção do extrato bruto .	42
FIGURA 7 -	Esquema de diluição seriada	45
FIGURA 8 -	Esquema de inoculação.....	46
FIGURA 9 -	Morfologia das partes vegetativas <i>Allophylus semidentatus</i>	58
FIGURA 10 -	Anatomia da <i>Allophylus semidentatus</i>	60
FIGURA 11 -	Histoquímica (I) da <i>Allophylus semidentatus</i>	62
FIGURA 12 -	Histoquímica (II) da <i>Allophylus semidentatus</i>	63
FIGURA 13 -	Cromatograma do óleo essencial das folhas da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	65
FIGURA 14 -	Estrutura molecular dos compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	68
FIGURA 15 -	Espectro de RMN ¹ H do β-sitosterol-3-o-β-d-glucósido e campesterol	75
FIGURA 16 -	Espectro de RMN ¹³ C do β-sitosterol-3-o-β-d-glucósido e campesterol.....	76
FIGURA 17 -	Estrutura química do campesterol	78
FIGURA 18 -	Estrutura química do β-sitosterol-3-o-β-d-glucoside	78
FIGURA 19 -	Estrutura química do 2,5-dioxo-4-imidazolidinil urea (alantoína)	80

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Perfil de degradação térmica (TG) de folhas e galhos secos de <i>Allophylus semidentatus</i> em atmosfera de nitrogênio.....	55
GRÁFICO 2 -	Viabilidade celular das células CACO-2 frente os extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	83
GRÁFICO 3 -	Atividade fagocítica (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	84
GRÁFICO 4 -	Atividade de adesão de macrófagos (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	85
GRÁFICO 5 -	Atividade de retenção de volume lisossomal (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	86
GRÁFICO 6 -	Atividade de produção de peróxido de hidrogênio (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	87
GRÁFICO 7 -	Atividade de produção de ânion superóxido (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	88
GRÁFICO 8 -	Viabilidade celular da linhagem B16F1 pelos métodos de MTT, vermelho neutro e cristal violeta com tempo de exposição de 24 e 48 hrs tratados com extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	90
GRÁFICO 9 -	Viabilidade celular da linhagem B16F10 pelos métodos de MTT, vermelho neutro e cristal violeta com tempo de exposição de 24 e 48 hrs tratados com extratos e frações da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	92

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Propriedades medicinais de algumas espécies da família Sapindaceae	22
QUADRO 2 -	Propriedades medicinais de algumas espécies do género <i>Allophylus</i>	23
QUADRO 3 -	Taxonomia da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>	24
QUADRO 4 -	Condições da análise cromatográfica do óleo essencial de <i>Allophylus semidentatus</i>	33
QUADRO 5 -	Constituição da fase móvel, do revelador e interpretação dos resultados para CCD.....	40
QUADRO 6 -	Controle da amicacina e fluconazol para as diferentes cepas	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Teor de umidade para as folhas, galhos e casca da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>54
TABELA 2 -	Resultados do teor de cinzas totais nas folhas e galhos da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>55
TABELA 3 -	Etapas de degradação térmica de folhas e galhos secos de <i>Allophylus semidentatus</i> em atmosfera de nitrogênio.....56
TABELA 4 -	Compostos químicos presentes no óleo essencial das folhas da espécie <i>Allophylus semidentatus</i> determinados pela cromatografia gasosa66
TABELA 5 -	Resultado do estudo fitoquímico do extrato hidroalcólico 20% ..69
TABELA 6 -	Composição fitoquímica do extrato aquoso 20% de <i>Allophylus semidentatus</i>70
TABELA 7 -	Metabólitos secundários identificados em folhas, galhos e casca da espécie <i>Allophylus semidentatus</i> , por análise por CCD71
TABELA 8 -	Rendimentos das frações das folhas, galhos e casca da espécie <i>Allophylus semidentatus</i>72
TABELA 9 -	Deslocamento químico no espectro de RMN 13C do β -sitosterol-3-o- β -d-glucósido e campesterol.....77
TABELA 10 -	Dados cristalográficos da estrutura do 2,5-dioxo-4-imididazolidinil urea.....80
TABELA 11 -	Distribuição das CIMs dos extratos e frações de <i>Allophylus semidentatus</i> testadas contra cepas de referência ATCC81

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	-	Absorbância
ATD	-	Análise térmica diferencial
BHT	-	Butilhidroxitolueno
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CG	-	Cromatografia gasosa
CG/EM-		Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas
CIM	-	Concentração inibitória mínima
CMH	-	Caldo Mueller-Hinton
cm	-	Centímetro
cm/s	-	Centímetro por segundo
DMSO-		Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH-		2,2-difenil-1-picrihidrazila
DRXM-		Difratometria de Raios X de Monocristal
EAG/g-		Equivalente de ácido gálico por grama
FAA	-	Solução de 90% de etanol 70%, 5% formaldeído 37% e 5% de ácido acético glacial
g	-	Grama
h	-	Hora
IC ₅₀	-	Concentração Inibitória 50%
IK	-	Índice de Kovats
J/g	-	Joule por grama
kPa	-	Quilo Pascal
kV	-	Quilo Voltio
L	-	Litro
MMT	-	Brometo de 3 (4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazole
MEV	-	Microscopia eletrônica de Varredura
MHz	-	Mega Hertz
MOPS-		Ácido 3-(N-morfolino)propano sulfônico
MQ	-	Água MilliQ®
mg	-	Miligrama
mg/mL-		Miligrama por mililitro

min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
mL/min	-	Mililitro por minuto
mm	-	Milímetro
N	-	Normal
NIST	-	National Institute of Standards and Technology
nm	-	Nanômetro
OE	-	Óleo essencial
PBS	-	Tampão salina fosfato
PEG	-	polietileno glicol
PF	-	Ponto de fusão
p/v	-	Peso por volume
qps	-	Quantidade suficiente para
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
SE	-	Solução estoque
SISGEN	-	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
TA	-	Análise térmica
TG	-	Termogravimétrico
U	-	Unidade
UFC/mL	-	Unidade formadora de colônia por mililitro
UV	-	Ultravioleta
v/v	-	volume/volume
μL	-	Microlitro
μm	-	Micrometro
μg/mL	-	Micrograma por mililitro
°C	-	Grau celsius
°GL	-	Grau Gay Lussac
%	-	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVO GERAL.....	19
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
1.3	JUSTIFICATIVA	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	FAMILIA SAPINDACEAE	21
2.2	GÊNERO <i>Allophylus</i> L.....	22
2.3	ESPÉCIE <i>Allophylus semidentatus</i> (Miq.) Ralbk	23
3	METODOLOGIA	27
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	27
3.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	28
3.2.1	Determinação da perda da umidade por dissecação	28
3.2.2	Determinação de cinzas totais.....	29
3.2.3	Análise térmica	29
3.3	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	30
3.3.1	Preparo das lâminas semipermanentes	30
3.3.2	Preparo das lâminas permanentes.....	30
3.3.3	Dissociação da epiderme	31
3.3.4	Ensaio microquímico.....	31
3.3.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
3.4	ÓLEO ESSENCIAL	31
3.4.1	Extração e determinação quantitativa do óleo essencial	31
3.4.2	Identificação dos compostos do óleo essencial.....	33
3.5	ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	34
3.5.1	Preparo do extrato aquoso a 20%	34
3.5.1.1	Pesquisa de heterosídeos antocianicos.....	34
3.5.1.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos.....	34
3.5.1.3	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	35
3.5.1.4	Pesquisa de taninos	35
3.5.1.5	Pesquisa de grupos amino	35
3.5.1.6	Pesquisa de ácidos fixos	35
3.5.2	Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%.....	36

3.5.2.1	Pesquisa de alcaloides.....	36
3.5.2.2	Pesquisa de leucoantocianidinas.....	37
3.5.2.3	Pesquisa de flavonoides.....	37
3.5.2.4	Pesquisa de cumarinas.....	38
3.5.2.5	Pesquisa substâncias iridoidais.....	38
3.5.2.6	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	39
3.5.2.7	Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos.....	39
3.6	SCREENING FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	40
3.7	PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....	41
3.7.1	Extrato bruto etanólico.....	41
3.7.2	Teor de sólidos	42
3.7.3	Partição dos extratos brutos etanólicos	42
3.8	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS	43
3.8.1	Isolamento do constituinte químico	43
3.8.2	Caracterização dos constituintes químicos isolados	43
3.9	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	44
3.9.1	Atividade antimicrobiana.....	44
3.9.1.1	Preparo do meio de cultura RPMI-1640 pH 7,0.....	44
3.9.1.2	Filtragem do meio.....	44
3.9.1.3	Solução Estoque (SE) e diluição dos extratos e frações	45
3.9.1.4	Microrganismos e inóculo microbiano	46
3.9.1.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	47
3.10.	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	48
3.10.1	Ensaio de redução do brometo de 3 (4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difeniltetrazole (MTT).....	48
3.10.2	Ensaio de retenção do corante vermelho neutro	49
3.10.3	Ensaio de retenção do corante cristal violeta	50
3.10.4	Citotoxicidade em macrófagos	50
3.10.4.1	Atividade imunomodulatória	50
3.10.4.2	Atividade fagocítica	51
3.10.4.3	Capacidade de adesão de macrófagos	51
3.10.4.4	Retenção de volume lisossomal.....	52

3.10.4.5	Produção de peróxido de hidrogênio.....	52
3.10.4.6	Produção de ânion superóxido.....	52
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	54
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	54
4.2.1	Determinação da perda de umidade por dessecação	54
4.2.2	Determinação de cinzas totais.....	54
4.2.3	Análise térmica	55
4.3	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	56
4.4	ÓLEO ESSENCIAL	64
4.4.1	Extração e determinação quantitativa do óleo essencial	64
4.4.2	Identificação dos compostos do óleo essencial.....	64
4.4	ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	69
4.5	SCREENING FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	70
4.6	PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....	71
4.6.1	Extrato bruto etanólico.....	71
4.6.2	Partição dos extratos brutos etanólicos.....	71
4.7	CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS.....	72
4.7.1	Compostos β -sitosterol-3-o- β -D-glucósido e campesterol.....	72
4.7.2	Composto 2,5-dioxo-4-imididazolidinil urea	78
4.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	80
4.9	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	81
4.9.1	Ensaio de redução do brometo de 3 (4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difeniltetrazole (MTT) em células da linhagem H295R	81
4.10	ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA.....	83
4.10.1	Atividade fagocítica	83
4.10.2	Capacidade de adesão de macrófagos	84
4.10.3	Retenção de volume lisossomal	85
4.10.4	Produção de peróxido de hidrogênio	86
4.10.5	Produção de ânion superóxido	87
4.14	LINHAGENS B16F1 E B16F10	88
5	CONCLUSÕES	94

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO.....	106

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com intuito de tratar várias doenças é algo explícito que faz parte da cultura humana. O conhecimento etnomedicinal é um recurso antigo valioso para o cuidado da saúde das pessoas, sendo, portanto, um saber milenar para futura sociedade no uso sustentável e sua conservação (RAJ et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% da população faz uso de plantas medicinais para fins de tratamento, cura e prevenção de doenças, contudo é importante lembrar que tais drogas vegetais não estão isentas de provocarem efeitos colaterais em seus usuários (MEYER et al., 2016).

Essa porcentagem faz com que pesquisas e estudos apresentem um maior compromisso em fornecer dados em relação ao princípio de produtividade das plantas e preparo dos fármacos. Estas vêm fornecendo ao longo dos anos uma grande contribuição para o desenvolvimento de diversos medicamentos, além do seu emprego na medicina popular com alvos terapêuticos (ATANASOV et al., 2015).

O aumento significativo da demanda de fitoterápicos que se observa em todo mundo é justificado, por exemplo, pela comprovação científica de sua eficácia, pela procura por boa parte da população por meios naturais de cuidar da saúde e pelo alto custo dos medicamentos convencionais. Apesar das limitações metodológicas, os fitoterápicos têm-se apresentado como um mercado promissor para investimentos (ALVES, 2018).

De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa (2014), a matéria-prima vegetal compreende a planta medicinal, a droga vegetal ou o derivado vegetal. Já o fitoterápico é definido como:

“[...] produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (Anvisa, 2014, art. 3º, inciso XI).”

Ficou estabelecido na RDC n.º 26 da Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2014, art. 2º, §§ 1º e 2º) que:

§1º São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade.

§4º Não se considera medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico aquele que inclua na sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas, sejam elas sintéticas, semissintéticas ou naturais e nem as associações dessas com outros extratos, sejam eles vegetais ou de outras fontes, como a animal.

Os resultados obtidos neste trabalho, irão contribuir ao conhecimento da espécie *Allophylus semidentatus*, com a busca de substâncias químicas com interesse no uso humano, tendo em vista a inexistência de estudos nesta espécie.

1.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com o estudo químico, biológico e citotóxico da espécie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (Sapindaceae).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar a espécie *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk. (Sapindaceae);
- Caracterizar morfoanatomicamente os elementos estruturais constituintes das folhas e galhos para caracterização farmacobotânica;
- Obter o extrato etanólico bruto e suas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica a partir das folhas, galhos e casca secos;
- Investigar a composição fitoquímica preliminar da espécie *Allophylus semidentatus*;
- Isolar os compostos presentes na fração clorofórmio e acetato de etila dos galhos por meio de técnicas cromatográficas;
- Determinar as estruturas químicas das substâncias isoladas por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- Realizar a extração do óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus*;
- Realizar a caracterização química do óleo essencial obtido das folhas;
- Investigar a atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e *Candida albicans* ATCC® 40175;
- Avaliar a atividade imunomodulatória dos macrófagos RAW. 267.4;
- Investigar a citotoxicidade do extrato etanólico e frações das folhas e cascas por redução do MTT, cristal violeta e vermelho neutro das linhagens celulares CACO-2, H295R, B16F1 e B16F10

1.3 JUSTIFICATIVA

Devido aos poucos estudos realizados até o presente, a espécie *Allophylus semidentatus* representa um grande potencial para exploração e, um campo promissor no desenvolvimento de agentes antineoplásicos. Os resultados promissores obtidos nos estudos realizados no mestrado, incentivaram a continuação deste estudo com intuito de isolar novos compostos. Portanto, este estudo contribuirá para a caracterização da espécie vegetal analisando e investigando sua morfoanatomia, fitoquímica, além de avaliar potenciais atividades citotóxicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMILIA SAPINDACEAE

A família Sapindaceae *stricto sensu* foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 (CRONQUIST, 1981). Posteriormente, recebeu a inclusão dos gêneros de Aceraceae e Hippocastanaceae e passou a ser referida como Sapindaceae *lato sensu* (HARRINGTON et al. 2005, JUDD et al. 2008, APG III 2009, BUERKI et al. 2009). Apesar das semelhanças moleculares entre essas famílias, a ocorrência de acentuadas diferenças morfológicas e biogeográficas tem justificado a sugestão de mantê-las como famílias distintas (BUERKI et al. 2010).

Sapindaceae *stricto sensu* possui cerca de 136 gêneros e 1900 espécies (BUERKI et al. 2012), dos quais 27 gêneros e 419 espécies ocorrem no Brasil e 12 gêneros e 63 espécies no estado do Paraná (SOMNER et al. 2014). Essa família apresenta distribuição nos trópicos e subtropicais (BUERKI et al. 2012) e, dentre suas espécies, algumas são mais conhecidas, como: *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), cujos frutos são utilizados na fabricação de sucos e refrigerantes e é endêmica da região amazônica; *Sapindus saponaria* L. (sabonete-de-soldado), nativa no Brasil, possui frutos com saponinas, substâncias que podem ser utilizadas como sabão; algumas espécies de *Paullinia* e *Serjania* são tóxicas e utilizadas pelos índios no envenenamento de flechas ou na pesca (JOLY, 2002). O nome de um dos gêneros, *Sapindus*, foi originado do latim sapo = sabão; indicus = indiano, devido às propriedades saponáceas dos frutos, utilizados na Índia para a lavagem de roupas fabricadas com o linho. Dentre outros usos pode-se citar o madeireiro, o medicinal, na produção de chás e medicamentos, e o ornamental, especialmente na arborização urbana (GUARIM NETO et al. 2000).

Esta família pertence à ordem Sapindales que possui vinte diferentes famílias botânicas, algumas com grandes ocorrências no Brasil e na região amazônica, destacando-se nesta ordem, além da família Sapindaceae, as famílias Burseraceae, Anacardiaceae, Simaroubaceae, Meliaceae, Rutaceae, Oxalidaceae e Balsaminaceae (DI STASI, 2002).

A família Sapindaceae abriga arbustos, árvores e trepadeiras, herbáceas ou lenhosas, com folhas compostas alternas, imparipinadas; as flores são pequenas (geralmente menores que 5 mm de comprimento) e podem ser actinomorfas ou

zigomorfas; os frutos são variados, podendo ser esquizocarpos com mericarpos samarídeos ou cocos drupáceos, cápsulas loculicidas ou septífragas, ou bacáceos. Os táxons arbustivo-arbóreos geralmente possuem folíolo terminal abortivo enquanto as trepadeiras geralmente apresentam látex alvo e estípulas. No Quadro 1 foram catalogadas algumas espécies da família Sapindaceae, com suas propriedades medicinais (SOMNER, 2015).

Percebe-se o grande uso na medicina de diferentes espécies da família Sapindaceae. Por outro lado, a multiplicidade de usos de algumas das espécies catalogadas demonstra o etnoconhecimento de populações humanas distribuídas mundialmente e fornece indícios da transmissão desse conhecimento através das gerações. O resgate desse conhecimento propicia elementos fundamentais para a conservação da biodiversidade, para as alternativas de subsistência e mesmo para a manutenção da diversidade cultural (GUARIM NETO et al., 2000).

QUADRO 1 - Propriedades medicinais de algumas espécies da família Sapindaceae

ESPÉCIE	PARTES USADAS	USOS	COMPOSIÇÃO OU ESTRUTURA	FONTE
<i>Cupania cinerea</i>	Folhas	Febre, anti-inflamatório	Cupacinoxepino	GACHET, et al. 2011
<i>Cupania macrophylla</i>	Folhas	Antibiótico	Extrato etanólico	FOGLIANI, et al. 2005
<i>Dodonaea viscosa</i>	Folhas	Antiviral, anti-inflamatório	Dodovisnoid G	ZHANG, et al. 2016
<i>Matayba elaeagnoides</i>	Folhas	Anticancerígeno	Extrato alcoólico	ZANDONAI, et al. 2010
<i>Matayba guianensis</i>	Folhas	Antifúngico	Extrato alcoólico	ASSIS, et al., 2014
<i>Melicoccus bijugatus</i>	Fruto (pericarpio)	Antioxidante	Extrato metanólico	PADILLA, et al. 2008
<i>Serjania herteri</i>	Folhas	Antileishmania	Frações de hexano e diclorometano	PASSOS, et al. 2016

Fonte: O autor (2022)

2.2 GÊNERO *Allophylus* L

De acordo com Somner, o gênero *Allophylus* L. pertence à família Sapindaceae, compreende aproximadamente 100 espécies (SOMNER et al. 2015). No Brasil, este gênero ocorre em todos os estados, com a presença de aproximadamente 25 espécies nativas. Quanto ao hábito do gênero, pode apresentar-se como uma árvore, arbusto ou subarbusto, com folhas alternadas, compostos

imparipinados, trifoliado, unifoliado ou raramente pentifoliado, petiolado, frondoso com margem inteira ou serrilhada, pecíolos, estipulas ausentes. Os frutos são drupas indeiscentes, esquicárdico, mesocarpo carnudo, endocarpo lenhoso, ovóide ou sementes subesféricas, embrião curvo. O gênero possui dominância fitogeográfica na floresta amazônica, caatinga, cerrado, mata Atlântica e Pantanal (SOMNER et al. 2013).

De acordo com a literatura, verificou-se que a espécie *Allophylus serratus*, é usada no sistema médico indiano como um anti-inflamatório e carminativo, também tem sido usado em elefantíase, edema, ossos quebrados, vários distúrbios gastrointestinais incluindo dispepsia, anorexia e diarreia, de acordo com Poonam, et al. (2005).

A espécie *Allophylus Cobbe* L., é uma erva, que cresce selvagem na região montanhosa de Bangladesh. Possui atividade anti-inflamatória e é usada como um agente antidiarreico pelos profissionais de saúde da região Leste-Oeste de Bangladesh, segundo Torequi (2012).

No Quadro 2 estão listados o uso medicinal de algumas espécies do gênero.

QUADRO 2 -Propriedades medicinais de algumas espécies do gênero *Allophylus*

ESPECIE	PARTES USADAS	USOS	COMPOSIÇÃO OU ESTRUTURA	FONTE
<i>Allophylus africanus</i>	Partes aéreas	Antimalárico, conjuntivite, enxaqueca e diarreia	Sem estudos fitoquímicos realizados	OLADOSU, et al., 2015
<i>Allophylus cobbe</i>	Toda a planta	Antibacteriano e antifúngico	Extrato alcoólico	TOREQUI, et al., 2012
<i>Allophylus cominia</i>	Folhas	Antidiabético	Extrato aquoso e suas frações	SANCHEZ, et al., 2014
<i>Allophylus edulis</i>	Folhas	Antiinflamatório, antioxidante, Antituberculose	Viridiflorol	TREVIZAN, et al., 2016
<i>Allophylus serratus</i>	Folhas	Antiulcerogênico	Extrato alcoólico	POONAM, et al., 2005

Fonte: O autor (2022)

2.3 ESPÉCIE *Allophylus semidentatus* (Miq.) Raldk

A espécie *Allophylus semidentatus* é nativa do Brasil, mas não endêmica, tendo confirmada ocorrências nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Rondônia) Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará) centro-oeste (Goiás, Mato Grosso) sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e na região Sul (Paraná), apresentando domínio

fitogeográfico Amazonas, Cerrado e Bosque Atlântica, segundo Somner, et al. (2015). A taxonomia da espécie *Allophylus semidentatus* é mostrada na Quadro 3.

QUADRO 3 - Taxonomia da espécie *Allophylus semidentatus*

HIERARQUIA	TAXONOMIA
Reino	Plantae
Classe	Equisetopsida
Subclasse	Magnoliidae
Superordem	Rosanae
Ordem	Sapindales
Família	Sapindaceae
Gênero	<i>Allophylus</i> L.
Espécie	<i>Allophylus semidentatus</i>

Fonte: Trópicos (2017)

A Figura 1 mostra a distribuição da espécie *Allophylus semidentatus* no Brasil.

FIGURA 1 - Distribuição da espécie *Allophylus semidentatus* no Brasil



Fonte: Somner et al. (2015)

No estudo fitoquímico das folhas e caule da espécie *Allophylus semidentatus* foi utilizado o extrato hidroalcóolico e aquoso onde foram obtidas as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica. A análise fitoquímica apresentou resultado positivo para a presença de polifenóis, alcaloides, heterosídeos flavônicos, flavonoides, cumarinas, iridoides, esteroides e triterpenos (MONCADA, 2018).

Na Figura 2, a espécie *Allophylus semidentatus* é apresentada em seu habitat.

FIGURA 2 - *Allophylus semidentatus* em seu habitat



Fonte: O autor (2022)

Segundo (MONCADA, 2018) a análise físico-química da espécie *Allophylus semidentatus* apresentou teor de cinzas de $(7,27 \pm 0,12) \%$ para as folhas e $(3,20 \pm 0,14) \%$ para o caule; apresentou umidade de $(8,21 \pm 0,12) \%$ e $(5,83 \pm 0,20) \%$, respectivamente para as folhas e caules.

Foi determinada a porcentagem de rendimento das frações, onde a maior porcentagem foi apresentada pela fração remanescente do caule com valor de 2,73%. A extração do óleo essencial das folhas obteve um rendimento de 0,73%. A caracterização física do óleo essencial resultou em uma densidade relativa de $(0,921 \pm 0,006) \text{ g/mL}$, um índice de refração de 1,503 a uma temperatura de 28° C. O óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG/EM), obtendo-se como compostos majoritários γ -Muurolene (25,52%), Δ -Cadineno (7,64%) e Z- Cariofileno (6,49%). A cromatografia em coluna aberta foi realizada para a fração hexânica do caule, obtendo-se o isolado e identificando o

composto 3-oxo-friedelano (friedelina). O composto 2,5-dioxo-4-imidazolidinil ureia (alantoína) foi obtido no momento da realização do fracionamento com clorofórmio do caule (MONCADA, 2018).

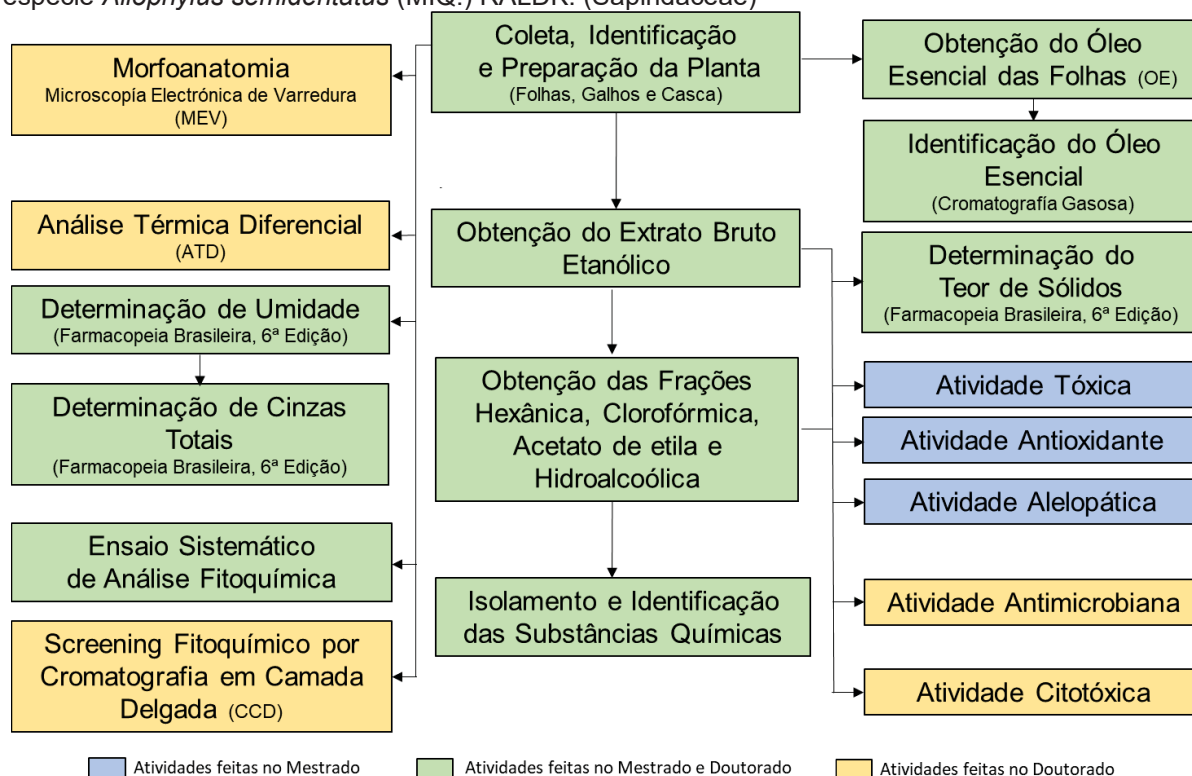
Na atividade tóxica *in vitro*, as frações hexânica (722,87 mg/mL) e acetato de etila (888,73 µg/mL), mostraram uma atividade levemente tóxica contra a *Artemia salina*. Quanto à atividade hemolítica dos extratos, frações e óleo essencial apenas a fração hexânica das folhas apresentou uma hemólise de cerca de 60%, em uma concentração de 1000 mg/mL. Em relação à atividade antioxidante através do método de formação do complexo fosfomolibdeno, o óleo essencial apresentou a maior atividade antioxidante em relação aos padrões de butilhidroxitolueno (BHT), rutina e vitamina C, seguido do acetato de etila fração do caule. Quanto ao método de redução do radical DPPH, a fração que apresentou um valor de IC₅₀ semelhante aos padrões utilizados foi novamente a fração do caule do acetato de etila, enquanto o valor de IC₅₀ do óleo essencial não foi possível calcular. Em relação ao ensaio de compostos fenólicos totais, a fração do caule de acetato de etila apresentou um valor alto (135,06 ± 0,44mg EAG/g), enquanto o óleo essencial apresentou um valor de (30,17 ± 0,29mg EAG/g) (MONCADA, 2018).

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Na Figura 3, apresenta-se o esquema de trabalho de forma resumida com as etapas e procedimentos aplicados na espécie estudada no mestrado e doutorado

FIGURA 3 - Fluxograma de trabalho feito no mestrado e doutorado, nas folhas, galhos e cascas da espécie *Allophylus semidentatus* (MIQ.) RALDK. (Sapindaceae)



Fonte: O autor (2022)

A espécie *Allophylus semidentatus* foi coletada no mês de agosto de 2018 no Capão do Cifloma, localizado no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, Município de Curitiba, Paraná, Brasil, nas coordenadas geográficas 25°26'57.9"S e 49°14'23.4"W e o material botânico foi coletado de três indivíduos diferentes. Uma amostra deste material vegetal foi identificada pelo botânico José Tadeu Weidlich Motta e depositado no Museu Botânico Municipal de Curitiba, sob o número de registro MBM 304886. Este estudo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob o protocolo AEE0D2F. Na Figura 4 está representada a exsicata depositada.

FIGURA 4 - Fotografia da exsicata da espécie *Allophylus semidentatus*

Fonte: Moncada (2018)

O processo de secagem do material vegetal foi realizado em caixas de papelão, na sombra e em local ventilado. Depois de estar completamente seco, o material foi triturado com ajuda de um moinho de facas e martelos, para a realização dos estudos descritos posteriormente.

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.2.1 Determinação da perda da umidade por dissecação

Para a verificação do teor de umidade da espécie *Allophylus semidentatus*, foram utilizados as folhas, galhos e casca triturados previamente em um triturador de

facas e martelos. Foi utilizado o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira 6° ed. (BRASIL, 2020). Os cadinhos com a amostra foram colocados em estufa a aproximadamente 100°C, por um período de 3 horas, até a obtenção de um peso constante. Após esse tempo foram retirados da estufa e colocados para resfriamento em um dessecador. Após este processo as amostras da espécie *Allophylus semidentatus* foram pesadas e realizado o seguinte cálculo (1) para a obtenção do teor da umidade da amostra:

$$\% \text{ umidade} = (P_a - P_s) / P_a \times 100 \quad (1)$$

Em que:

P_a = Peso do cadinho + peso da amostra

P_s = Peso do cadinho + peso da amostra seca

3.2.2 Determinação de cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas foi utilizado os resíduos de sólidos inorgânicos presentes na amostra seca do ensaio de teor de umidade, e estes foram incinerados a 600°C até o peso constante, por um período de 6 horas. Os cadinhos foram retirados da mufla e colocados no dessecador até esfriar. A seguir a amostra foi pesada rapidamente para determinação da % do teor das cinzas presentes na amostra. Foi realizado o seguinte cálculo (2) para a obtenção do teor da umidade da amostra:

$$\% \text{ de cinzas} = (P_a - P_i) / (P_a \times 100) \quad (2)$$

Em que:

P_a = Peso do cadinho + peso da amostra

P_i = Peso do cadinho + peso da amostra incinerada

3.2.3 Análise térmica

A análise térmica (TA) estuda a relação entre a propriedade de uma amostra em função da sua temperatura, podendo caracterizar o desempenho da amostra frente à variação de massa, estabilidade térmica, água livre e ligada, pureza, ponto de

fusão e ebulição e transições vítreas (SANTOS et al. 2004; MONTEIRO et al. 2011, FERNANDES et al. 2015).

A análise térmica de material vegetal pode ser utilizada em seu controle de qualidade no que se refere a perda de massa e as possíveis reações endotérmicas e exotérmicas dependentes de sua constituição química (WEST, 2017).

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas a partir de 10 mg de amostras de folhas e galhos secos, sendo aquecidas a uma taxa constante de 10°C/min, sendo obtidas no intervalo de temperatura entre 20 e 600 °C, sob fluxo de nitrogênio (20 mL/min), em célula calorimétrica de alumina aberta. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando Índio (In; PF: 156,6°C; $\Delta H_{\text{fusão}}$: 28,54 J/g) como padrão.

3.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Os estudos morfoanatômicos referentes à espécie *Allophylus semidentatus* foram efetuados com as folhas e galhos. O material vegetal foi fixado em uma solução de FAA (90% de etanol 70%, 5% de formaldeído 37% e 5% de ácido acético glacial) onde permaneceu nessa solução por 7 dias e depois foi estocado em uma solução de etanol 70% (v/v) até a realização das análises (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

3.3.1 Preparo das lâminas semipermanentes

O material vegetal foi submetido a cortes transversais e longitudinais para a montagem das lâminas semipermanentes. Utilizou-se o pecíolo e a parte inferior da folha. A coloração foi feita com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972). As lâminas foram montadas com glicerina 50% (v / v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e o esmalte incolor foi utilizado para a montagem. (BEÇAK; PAULETE, 1976). O material foi observado e fotografado no microscópio Olympus CX41.

3.3.2 Preparo das lâminas permanentes

Para a preparação das lâminas permanentes foram utilizadas as folhas e galhos da espécie *Allophylus semidentatus*, desidratado em série etanólica e incluído em polietileno glicol (PEG) 1500. Este bloco foi seccionado no plano transversal em micrótomo de rotação Olympus CUT 4055, obtendo-se cortes de 7 a 9µm. Os cortes

foram coloridos com azul de toluidina e Entellan® foi utilizado como meio de montagem (KRAUS; ARDUIN, 1998).

3.3.3 Dissociação da epiderme

Parte do material das folhas da *Allophylus semidentatus* foi tratada com solução de peróxido de hidrogênio 10% e ácido acético glacial 1:1 (v/v). As superfícies epidérmicas foram coloridas com safranina e verde malaquita (KRAUS; ARDUIN, 1998), utilizando glicerina 50% (v / v) como meio de montagem.

3.3.4 Ensaio microquímico

Com as folhas da espécie *Allophylus semidentatus*, foram realizados testes microquímicos em seções transversais do material fixado, realizados manualmente, utilizando os reagentes: cloridrato de floroglucina para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudam IV para substâncias lipofílicas (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), Lugol para o amido (BERLYN, MIKSCHE, 1976), Wagner para os alcaloides (FURR, MAHLBERG, 1981) e ácido sulfúrico para os cristais de cálcio (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991).

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise ultraestrutural da superfície (SOUZA, 1998), a lâmina foliar foi submetida a uma desidratação em crescente série etanólica até etanol PA, seguida do ponto crítico de CO₂ no equipamento Bal-Tec. CPD-030. Posteriormente, este material foi aderido ao suporte, metalizado com ouro no equipamento Balzers Union FL 9496, e foi submetido a alto vácuo e observado e fotografado no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV.

3.4 ÓLEO ESSENCIAL

3.4.1 Extração e determinação quantitativa do óleo essencial

O método utilizado para a extração do óleo essencial das folhas de *Allophylus semidentatus* foi a hidrodestilação por arrastre a vapor, realizada em equipamento de

Clevenger modificado por (WASICKY,1963) de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6° Ed. (2020). O óleo essencial foi extraído das folhas frescas trituradas a temperatura ambiente.

No procedimento as folhas foram trituradas e colocadas em um balão de fundo redondo de 6 L, adicionando um volume de 3,5 L de água destilada para cobrir o material vegetal e assim iniciar a extração, esse balão foi colocado em uma manta de aquecimento a uma temperatura próxima de 100 °C, por um período de 6 horas. Após esse tempo, o volume total de óleo obtido na leitura da escala do tubo que o continha foi registrado. O óleo obtido foi armazenado em um frasco adequado que foi colocado no freezer para testes de caracterização subsequentes.

Na Figura 5 pode-se observar o equipamento Clevenger usado para a extração do óleo essencial.

FIGURA 5 - Equipamento de Clevenger usado para a extração do óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus*



Fonte: <https://tecnal.com.br/pt-BR/produtos/detalhes/> (2022)

3.4.2 Identificação dos compostos do óleo essencial

As análises foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa modelo GC-2010 Plus, marca Shimadzu®, acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040, equipado com coluna capilar SH-RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A análise foi feita sob as condições do Quadro 4:

QUADRO 4 - Condições da análise cromatográfica do óleo essencial de *Allophylus semidentatus*

Temperatura da Coluna no Forno	60.0 °C
Temperatura de injeção	250.00 °C
Modalidade da injeção	Split
Volume injetado	10µL
Diluição	Sem diluição
Pressão	57.4 kPa
Fluxo total	84.0 mL/min
Column Flow	1.00 mL/min
Velocidade linear	36.5 cm/s
Fluxo de purga	3.0 mL/min
Relação dividida	80.0
Injeção de alta pressão	Desligado
Poupador de gás	Ligado
Relação da divisão da poupança do gás do portador	5.0
Tempo do portador do gás	1,00 min
Preensão do divisor	Desligado
Programa de temperatura do forno	
Taxa	Temperatura(°C)
-----	60.0
3.00	250
Tempo de espera (min)	
0.00	
0.00	
Condições do detector	GCMS-TQ8040
Temperatura da fonte do íon	200.00 °C
Temperatura da interface	300.00 °C
Tempo de corte do solvente	3.00 min
Modo de ganho do detector	Em relação ao resultado de ajuste
Ganho do detector	1.16 kV +0.00 kV
Limite	0
Velocidade de digitalização	1250
Começo m/z	40.00
Final m/z	400.00

Fonte: O autor (2022)

A identificação dos compostos do óleo essencial foi feita por comparação com dados da literatura de Adams (2007) e com os espectros da base de dados do sistema de bibliotecas do National Institute of Standards and Technology (NIST) 2008.

Os cálculos do índice de Kovats (IK) foram realizados para auxiliar na identificação de cada composto, comparando o tempo de retenção da amostra em relação aos padrões de uma série de n-alcanos. Essa taxa de retenção foi proposta por Kovats em 1958, como parâmetros de identificação (SKOOG, 2002).

3.5 ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

O estudo qualitativo dos grupos fitoquímicos das partes aéreas de *Allophylus semidentatus* foi realizado conforme descrito por Moreira (1979) e adaptado por Miguel (2003).

3.5.1 Preparo do extrato aquoso a 20%

Para o preparo do extrato aquoso utilizou-se 40 g do material vegetal seco e 200 mL de água destilada levado à maceração em banho-maria (60 °C) por 2 horas, com agitação manual ocasional.

3.5.1.1 Pesquisa de heterosídeos antocianicos

O extrato aquoso (5 mL) foi particionado em 3 tubos de ensaio. No primeiro adicionou-se ácido clorídrico 1 N até a atingir pH 1. No segundo, adicionou-se hidróxido de sódio 1% até atingir pH 10 e no terceiro, foi realizado o ajuste para neutralização do meio em pH 7. A reação foi considerada positiva em caso de formação da coloração avermelhada em meio ácido; azulada para o meio alcalino e violácea para meio neutro. Em caso de formação de coloração verde, a reação é considerada positiva para flavonoides.

3.5.1.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Os 3 tubos de ensaio utilizados no ensaio para heterosídeos antociânicos (item 3.5.1.1) foram agitados por 5 minutos e deixados em repouso por mais 30 minutos. A

ocorrência de espuma com característica persistente, maior ou igual a um centímetro, indica a presença de heterosídeos saponínicos.

3.5.1.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Nesta análise, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio, seguido da adição de 1 mL de ácido sulfúrico 1N. Posteriormente, suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico no tubo e este foi levado ao banho-maria (60 °C) por 30 minutos. O aparecimento de cor vermelha na tira de papel indica a presença de heterosídeos cianogênicos.

3.5.1.4 Pesquisa de taninos

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de extrato aquoso, seguido de 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. O aparecimento de coloração azul é sugestivo da presença de taninos hidrolisáveis, a cor verde pode indicar taninos condensados e a cor marrom a presença de polifenóis.

3.5.1.5 Pesquisa de grupos amino

Neste teste, 10 mL de extrato aquoso foram levados à concentração em banho-maria (60 °C) em cápsula de porcelana. Posteriormente em uma tira de papel de filtro, foram adicionadas 5 gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem do papel filtro, este foi nebulizado com solução de ninhidrina e levado à estufa à temperatura (100 °C) por um período de 15 minutos. A reação é considerada positiva, caso ocorra o aparecimento de coloração azul-violeta.

3.5.1.6 Pesquisa de ácidos fixos

Neste ensaio, adicionou-se 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N em um balão que foi deixado sob refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, a solução foi acidificada com H₂SO₄ 2N e extraídas 3 porções de 10 mL, com éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativo, filtrados e evaporados em banho-maria (50 °C) até a secura. O resíduo foi levado a estufa por 10 minutos e adicionado de 5 mL de NH₄OH 1N. O resíduo amoniacal foi impregnado em tira de

papel filtro em 2 pontos principais. O papel foi seco em estufa e posteriormente o reativo de Nessler foi gotejado em um dos pontos. O aparecimento de cor marrom indica a presença de ácidos fixos.

3.4.1.7 Pesquisa de ácidos voláteis

Neste ensaio, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio e acidificados com H_2SO_4 1N. Uma fita indicadora de pH foi suspensa no tubo e este levado ao banho maria (60 °C) por 30 minutos. O aparecimento de valores de pH abaixo de 7 indicam a presença desses ácidos.

3.5.2 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

Para o preparo do extrato hidroalcoólicos, 40 g das partes aéreas secas de *Allophylus semidentatus* foram maceradas em 200 mL de álcool etílico a 70% (v/v), em banho-maria (70 °C) por 1 hora. A partir deste extrato realizou-se extrações consecutivas utilizando-se solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila). O processo de fracionamento foi realizado agitando-se o solvente em funil de separação, por 10 vezes com volumes de 20 mL. Ao final de cada extração, completou-se as porções extraídas resultantes para o volume de 200 mL com etanol.

3.5.2.1 Pesquisa de alcaloides

Neste ensaio foram utilizados 50 mL de cada fração, levados à secar em banho-maria a 70 °C. Após a concentração, o extrato e frações foram ressobilizados em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Posteriormente, as soluções obtidas foram transferidas para tubos de ensaio e avaliadas quanto a presença de alcaloides, adicionando-se os seguintes reativos: Reativo de Mayer (precipitado ou turvação branca), Reativo de Dragendorff (precipitado cor vermelho-tijolo), Reativo de Bouchardat (precipitado alaranjado).

3.5.2.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Neste teste, 10 mL do extrato hidroalcoólico e frações foram transferidos para uma cápsula de porcelana e levados à secura em banho-maria (60 °C). O resíduo foi ressolubilizado em 5 mL de álcool etílico P.A., seguido da adição de 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e levados à ebulição. A reação caracteriza-se como positiva pelo aparecimento de coloração vermelha.

3.5.2.3 Pesquisa de flavonoides

a) Heterosídeos flavónicos:

Neste teste 20 mL do extrato hidroalcoólico e frações foram levados à secura em banho-maria e ressolubilizados em 10 mL de etanol absoluto. As frações foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante. A reação foi considerada positiva para flavonas, em caso de formação da cor laranja. A formação da cor violeta indica a presença de flavanonas e a cor vermelha a presença de flavonois.

b) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock:

Em cápsula de porcelana, 10 mL de cada fração foram levados à secura em banho-maria (60 °C). Posteriormente, foram adicionados de 5 gotas de acetona (P.A), 30 mg de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) e a cápsula foi levado a secura novamente. Por fim, adicionou-se 5 mL de éter etílico. A reação foi considerada positiva para flavonois, quando observado sob lâmpada ultravioleta, o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada.

c) Ensaio de Pacheco

Neste teste, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura, adicionados de cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético. Em seguida foram adicionados 0,1 mL de HCl concentrado. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonois em caso de aparecimento da coloração roxa.

d) Ensaio com Zinco (Zn) em Ácido clorídrico (HCl)

Neste teste, 10 mL do extrato e frações foram levados à secura e ressolubilizados em 10 mL de etanol. Posteriormente, 5 mL da solução foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados de pastilhas de Zn seguido da adição de HCl concentrado. A reação foi considerada positiva para dihidroflavonois em caso de formação da coloração roxa violeta.

3.5.2.4 Pesquisa de cumarinas

Neste teste, 30 mL de cada extrato e frações, foram acidificadas com ácido clorídrico 2 N até atingir pH 1 e levados à banho-maria (60 °C), até a concentração de 5 mL. A fração hidroalcoólica foi transferida para um funil de separação, extraída duas vezes com 10 mL de éter etílico. Já a fração etérea resultante, foi levado diretamente à secura até a concentração de 5 mL. Os volumes obtidos foram transferidos para tubos de ensaio no volume e adicionados de 2 mL de hidróxido de sódio 1 N. Sob lâmpada ultravioleta (366 nm por 15 min) a formação de fluorescência de coloração azul ou verde-amarelada, torna a reação positiva para cumarinas. O extrato residual foi aplicado em papel filtro sob três pontos. A mancha 1 (coberta com papel alumínio) e mancha 2 (não coberta) foram tratadas com NaOH 1N. O papel filtro foi posto sob luz ultravioleta e a formação de fluorescência de cor azul ou verde-amarelada na mancha 2, também torna a reação positiva.

3.5.2.5 Pesquisa substâncias iridoidais

Foram transferidos 2 mL do extrato e frações, para três tubos de ensaio. No primeiro foram adicionados cristais de floroglucinol e 1 mL de HCl. A reação é considerada positiva em caso do aparecimento de coloração verde escura. No segundo tubo, foram adicionadas duas gotas de ácido sulfúrico e o aparecimento da coloração rosa violácea torna a reação positiva. No terceiro tubo, foram adicionados cristais de vanilina e duas gotas de ácido sulfúrico, em caso de reação positiva observa-se o aparecimento de coloração rosa cereja.

3.5.2.6 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Neste teste, 30 mL do extrato e frações foram transferidos para balões, adicionados de 5 mL de ácido sulfúrico a 10 % e deixados sob refluxo por 30 minutos. O volume final foi filtrado, adicionado de 30 mL de água destilada e a fração orgânica das frações foi extraída. O extrato hidroalcoólico foi extraído 2 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos resultantes foram concentrados em banho-maria (60 °C) até o volume de 5 mL e submetidos à reação de Bornträger, a qual adiciona-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio. O aparecimento da cor vermelha indica a reação positiva para naftoquinonas e/ou antraquinonas.

3.5.2.7 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

a) Reação de Liebermann-Bouchard:

Neste teste, 30 mL do extrato e frações foram levados à secar em banho-maria (60 °C) e ressolubilizados em 5 mL de clorofórmio, seguido de filtração. Os extratos obtidos foram transferidos para tubos de ensaio em diferentes volumes (0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL) completando-se para 2 mL com clorofórmio. Posteriormente, realizou-se a reação de Liebermann-Bouchard, adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de H₂SO₄ concentrado, na qual a formação de cor rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6. A formação de coloração verde indica a presença da função carbonila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6, e a formação da cor amarela, indica a existência de uma metila no C 14.

b) Reação de Keller Kiliani:

Neste teste, 2 mL do extrato e frações foram levados à secar em banho-maria (60 °C), adicionados de 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de cloreto férrico a 1%. Posteriormente, realizou-se a transferência para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A obtenção de cor na zona de contato dos sistemas líquidos e/ou coloração na fase acética, sugere a presença de desoxi açúcares, sendo azul indicativo de esteroides e verde para triterpenos.

3.6 SCREENING FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para o estudo fitoquímico por CCD, foram utilizadas as frações obtidas a partir do extrato bruto das folhas, galhos e casca. A fase móvel foi colocada no fundo da cuba cromatográfica e após foi fechada para a saturação da atmosfera interior. Para as análises em CCD, foram utilizadas cromatoplaças de sílica (Sílica-gel 60 F254 Merck® 0,063-0,200 mm), cortadas com 3 cm de largura por 5 cm de comprimento. As amostras foram aplicadas na cromatoplaças com um tubo capilar a 0,5 cm da borda inferior, de modo que no ponto de aplicação a fração ficasse concentrada em uma pequena área. Após a eluição da fase móvel pela cromatoplaça e a evaporação do solvente, foram utilizados diferentes reveladores específicos para cada grupo de metabolitos secundarios em análise (Quadro 5).

QUADRO 5 - Constituição da fase móvel, do revelador e interpretação dos resultados para CCD

GRUPO DE METABOLITO	FASE MÓVEL	REVELADORES ESPECÍFICOS	EVIDÊNCIAS	REFERÊNCIAS
Esteroides/ Terpenos	Tolueno/Acetato de Etila (93:7)	Anisaldeído Sulfúrico: - Anisaldeído 0,5 mL - Ácido acético glacial - 10 mL - Metanol - 85 mL - Ácido sulfúrico 5 mL	Coloração rosa/violácea após aquecimento em estufa 105 °C.	CARVALHO, 2001.
Alcaloides	Clorofórmio/Metanol (95:5) Universo de amônio em tubo de ensaio	Dragendorff: - Carbonato de bismuto – 5 g - Iodeto de potássio – 25 g - Ácido clorídrico concentrado – 12 mL Água destilada qsp. 100 mL	Coloração alaranjado forte na presença de alcaloides	OLIVEIRA et al., 2014.
Flavonoides	Acetato de Etila/Ácido fórmico/Ácido Acético glacial/Água destilada (100:11:11:26)	NEU : - Difenol boril oxi etil amino – 1 g - Metanol – 100 mL	Desenvolvimento de coloração amarela em luz UV.	CARVALHO, 2001.
Cumarinas	DCM/ Acetona (10:10)	Hidróxido de potássio 1% Hidróxido de potássio 1 g Etanol qsp 100 mL	Coloração azul ou verde quando expostas a luz UV.	AMARAL et al., 2009
Taninos	AcEt / Ácido fórmico/ Ácido Acético glacial/	Cloreto Férrico 2% Cloreto férrico – 2 g Metanol ou água qsp 100 mL Coloração	Coloração verde para taninos condensados. Coloração azul para	OLIVEIRA et al., 2014.

	Água destilada (100:11:11:26)	verde para taninos condensados.	taninos hidrolisáveis. Coloração marrom para compostos fenólicos.	
Antraquinonas	Acetato de Etila/Metanol/Água destilada (100:17:13)	Hidróxido de potássio 5% Hidróxido de potássio – 5g Etanol qsp 100 ml	Coloração vermelha	WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1996

Fonte: Adaptado de Oliveira (2014)

As cromatoplasmas foram visualizadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm), antes da revelação com os reagentes, verificando a fluorescência dos pontos na CCD. Nas técnicas para flavonoides e cumarinas, as placas também foram visualizadas no ultravioleta, analisando a mudança da coloração após a utilização do revelador.

3.7 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

3.7.1 Extrato bruto etanólico

O extrato bruto foi obtido por meio de extração em equipamento Soxhlet modificado (patente PI 06011703-7 A2). O material vegetal foi previamente triturado, pesado e colocado dentro do equipamento, que tem uma placa porosa onde o algodão foi colocado e, sobre isso, o material vegetal. Este equipamento foi acoplado a um condensador de bolas (na parte superior) um balão (na parte inferior) contendo 4 esferas de vidro. O solvente utilizado para realizar a extração foi etanol a 80 °GL. Este sistema é submetido a aquecimento, por meio de uma manta de aquecimento. Quando o refluxo iniciou, o material vegetal (folhas, galhos e casca) foi deixado por 12 períodos de 8 horas, a fim de obter o extrato etanólico. Na Figura 6 está o equipamento usado.

FIGURA 6 - Equipamento soxhlet utilizado para a obtenção do extrato bruto



Fonte: O autor (2022)

3.7.2 Teor de sólidos

O teste do teor de sólidos baseia-se na eliminação da fase líquida do extrato bruto, permitindo o cálculo do seu rendimento. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6^o Ed. edição 2020. Em três placas de Petri, previamente secas e taradas, foram colocados 10 mL do extrato bruto e as placas foram levadas a estufa a 100°C, até que todo o extrato evapore e as placas tenham peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia estabelece o teor de sólidos em 10mL de extrato bruto etanólico.

3.7.3 Partição dos extratos brutos etanólicos

O extrato bruto etanólico foi concentrado em um rotoevaporador até eliminação total álcool, após, a obtenção de frações foi realizada por um sistema de partição líquido-líquido. Foram utilizados solventes que possuem diferentes padrões e

polaridades analíticas, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Um equipamento Soxhlet modificado (PI 06011703-7 A2) foi usado para realizar o fracionamento. O equipamento contém o extrato bruto concentrado que é conectado a um condensador de bola e a um balão contendo esferas de vidro. O primeiro solvente (hexano) é colocado no balão e levado ao refluxo até que o solvente que fica em contato com o extrato seja translúcido. Este mesmo procedimento é repetido para o resto dos solventes. O extrato final foi chamado de fração hidroalcoólica. Este procedimento foi realizado para todo o material coletado (folhas, galhos e casca).

3.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

3.8.1 Isolamento do constituinte químico

A purificação foi realizada por meio de cromatografia em coluna gravimétrica por adsorção (de 3,5 cm de diâmetro e um comprimento de 60 cm), empacotada com fase estacionária em sílica gel (60 Merck 0,063 – 0,200 mm). A fração acetato de etila dos galhos, previamente se dissolveu com 15 mL de solvente (metanol) e adicionou-se 36 g de sílica gel, antes de ser colocada na coluna, foi evaporado completamente o solvente. A fase móvel utilizada foi específica para cada fração selecionada.

A fase móvel foi coletada em frascos de 10 mL e levadas à secura em temperatura ambiente para evaporação do solvente, onde posteriormente, foi avaliada a presença de substâncias isoladas e/ou misturas. Essas substâncias foram identificadas por espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono treze (RMN ^{13}C) e de hidrogênio (RMN ^1H) e difração de raios X.

3.8.2 Caracterização dos constituintes químicos isolados

Para a identificação dos compostos isolados, foi utilizado um equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker DPX 200), operado a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200 e 50MHz.

Para a identificação pela técnica de Difratometria de Raios X de Monocristal (DRXM) os dados de difração do cristal obtido a partir da cromatografia de coluna aberta, foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com detector de área Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de

Mo-KD($O = 0,7107 \text{ \AA}$) e Cu-KD ($O = 1,5418 \text{ \AA}$). Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre).

3.9 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.9.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2015) dos extratos e frações das folhas e galhos da espécie *Allophylus semidentatus*. O intervalo de concentração varia de 125 $\mu\text{g/mL}$ a 4000 $\mu\text{g/mL}$. Os volumes finais do teste foram de 200 μL (100 μL do extrato ou fração diluídos + 100 μL da suspensão microbiana).

3.9.1.1 Preparo do meio de cultura RPMI-1640 pH 7,0

O RPMI é um meio de cultura sintético, a base de aminoácidos e vitaminas, e composição completamente definida. Nunca deve ser autoclavado ou sujeito a temperaturas superiores a 40 °C, para evitar a desnaturação das reações químicas entre os aminoácidos. Deve-se filtrar o meio com 24 horas de antecedência do uso.

Material necessário para preparar 1 litro do meio RPMI-1640:

- 10,39g de meio RPMI;
- 34,32g de ácido 3-(N-morfolino)propano sulfônico (MOPS);
- 1L de água MilliQ® (MQ);
- Frasco Schott estéril de 1L.

Preparo do meio:

Em 800 mL de MQ, adicionar 10,39g de RPMI e agitar até dissolver. Adicionar em seguida, o MOPS e dissolver. Ajustar o pH para 7,0 com ajuda de um pHmetro. Se o pH estiver abaixo de 7,0, acrescentar gotas da solução NaOH. Caso o pH esteja acima de 7,0, acrescentar gotas da solução HCl. Ajustar o pH do meio até ficar neutro (coloração laranja). Adicionar água MQ ao meio até atingir um volume final de 1L. Filtrar o meio imediatamente após seu preparo, em câmara de fluxo laminar.

3.9.1.2 Filtragem do meio

Foram acopladas as 2 partes do filtro Millipore (membrana de 0,22 μm) – pode-se usar as duas partes do filtro se for preparado um volume até 500 mL do meio. Para volumes maiores, acoplar-se um frasco de vidro de 1 L com rosca na parte inferior do filtro.

Colocou-se o meio de cultura no compartimento superior do filtro e acoplar a bomba à vácuo. O meio foi filtrado e armazenado em geladeira por até máximo 3 meses.

3.9.1.3 Solução Estoque (SE) e diluição dos extratos e frações

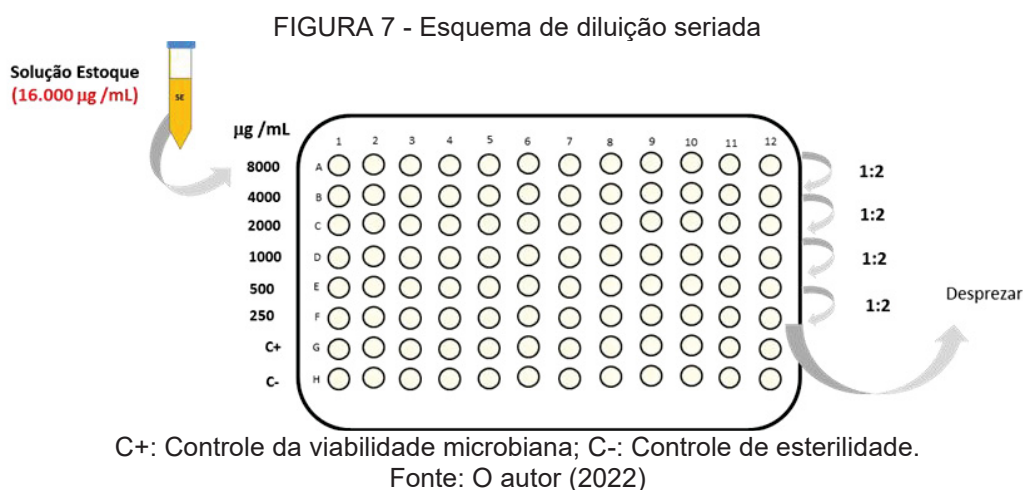
A SE dos extratos e frações foram preparadas com 4 vezes mais que a maior concentração a ser testada, 16000 $\mu\text{g/mL}$ e esterilizadas por filtração (membrana milipore 0,22 μm - TPP, Trasadingen, Suíça). Os solventes utilizados foram água destilada, metanol e DMSO de acordo com o extrato ou fração. Foi realizada diluição seriada em caldo Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Alemanha) distribuídos em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo chato conforme o esquema da Figura 7:

Adicionou-se 100 μL de caldo Mueller-Hinton (CMH) em todos os poços;

Adicionou-se 100 μL da SE em cada poço da linha A (pipetador automático de 8 canais);

Homogeneizou-se e se transferiu 100 μL da linha A para a linha B. Repetir o procedimento até a linha E descartar os últimos 100 μL ;

As linhas G e H devem conter somente caldo Mueller-Hinton para o controle positivo ou de viabilidade microbiana (C+) e o Controle negativo ou de esterilidade (C).



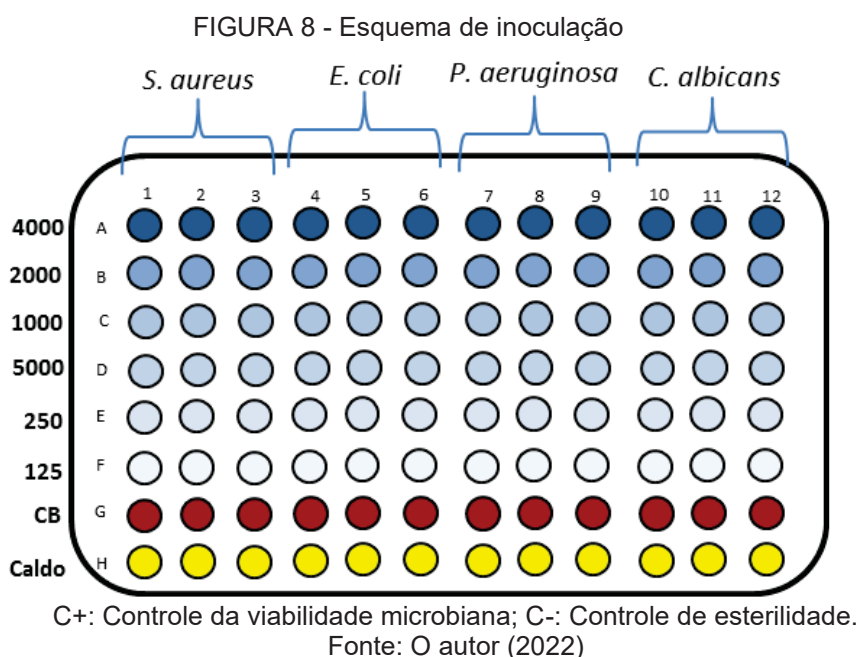
3.9.1.4 Microrganismos e inóculo microbiano

Os microrganismos utilizados foram as cepas de referência American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25913, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 40175.

A concentração final do inóculo microbiano preconizada para a técnica de microdiluição em caldo é de 10^4 UFC/mL e deve ser obtida de acordo com o volume final do teste. As suspensões microbianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0$ a 10^8 UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland. Em seguida, foram diluídas até a concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL em caldo Müller-Hinton (CMH) (por exemplo, $30 \mu\text{L}$ da suspensão microbiana + $5970 \mu\text{L}$ de CMH). Foram pipetados um volume de $100 \mu\text{L}$ nas cavidades, levando a uma concentração final de 10^4 UFC/mL.

Os testes foram realizados em triplicata conforme o esquema da Figura 8:

- Pipetou-se $100 \mu\text{L}$ do inóculo microbiano por coluna até o poço G, a concentração do extrato cai pela metade;
- Usou-se 3 colunas para cada bactéria teste (triplicata);
- Pipetou-se $100 \mu\text{L}$ de salina em todas as cavidades da linha H;
- Vedou-se bem a placa e incubar por 18-24 horas a 35°C .



Para evitar a interferência da cor e/ou turbidez decorrente da reação do extrato/fração com caldo foi realizada a diluição seriada e acrescentado 100 µL de salina (Branco da reação). O controle da atividade inibitória dos diluentes, metanol e DMSO foi realizado semelhante à diluição seriada dos extratos e frações mais 100 µL dos inoculos bacterianos. No Quadro 6 apresentam-se os controles da técnica da Concentração Mínima Inibitória (CIM) da amicacina para cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e fluconazol testado contra *Candida parapsilosis* ATCC 6258.

Após a incubação foi realizada a leitura da absorbância (comprimento de onda 625 nm) em leitora de ELISA (Mod. EL800; BioTek, Highland Park, Winooski, VT, EUA).

QUADRO 6 - Controle da amicacina e fluconazol para as diferentes cepas

MICROORGANISMO	ANTIMICROBIANO	FAIXA DE CIM ESPERADA (µg/mL)	BIBLIOGRAFIA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Amicacina	1,0-4,0	CLSI, M100-S27. 2017.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Amicacina	0,5-4,0	CLSI, M100-S27. 2017.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Amicacina	1,0-4,0	CLSI, M100-S27. 2017.
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 6258	Fluconazol	0,5-4,0	CLSI, M27-A, 200

Fonte: O autor (2022)

3.9.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que produz redução de crescimento microbiano de no mínimo 80% em relação ao controle positivo (HOLETZ, F. B. et al. 2002; LEMOS, J. A. et al. 2005; SANTOS et al. 2008). CIMs até 1000 µg/mL foram classificadas com potencial atividade inibitória e CIMs maiores que 1000 µg/mL sem atividade inibitória (SANTOS et al. 2008). A CIM foi determinada da seguinte forma (3) :

$$\text{Abs do Teste (AT)} = \text{Abs do Teste (AT)} - \text{Abs do Branco (AB) da reação} \quad (3)$$

Cálculo do Percentual de Inibição (PI) utilizando a fórmula (4):

$$PI = (mAT \cdot 100 / mAC) \times 100 \quad (4)$$

Em que:

mAT : Média das Abs do Teste;

mAC : Controle positivo

A atividade dos extratos foi classificada de acordo com Santos et al. (2008), é boa quando o valor da CIM vai até 100 µg/µL, quando a CIM vai de 100 a 500 g/µL é classificada como moderada, enquanto a CIM vai de 500 a 1000 g/µL é classificada como fraca é igual a 1000 g/µL ou superior é classificada como inativa.

3.10. ATIVIDADE CITOTÓXICA

3.10.1 Ensaio de redução do brometo de 3 (4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazole (MTT)

As células foram armazenadas sob condições estéreis em N₂ líquido (-190 °C). O período de exposição da substância de teste varia pode ser por curtos períodos (1-2 horas de tratamento) ou por um período de 24hrs.

A viabilidade de diferentes linhagens foi avaliada pelo método colorimétrico de morte por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) conforme (MOSMANN, 1983). As células de carcinoma adrenocortical (H295R) e células de melanoma murino (B16F1 e B16F10) e adenocarcinoma colorretal (CACO-2) foram adicionadas em placas de 96 poços em uma concentração de 8.10⁵ células por poço, as quais foram deixadas por 24 h para aderirem ao fundo dos mesmos. Após 24 h foram adicionados 180 µL de meio de cultura completo com 95% de meio Dulbecco's Modified Eagle's® (Sigma), 5% de Soro fetal bovino e 1% de antibiótico (10 U/mL estreptomicina e 20 U/mL penicilina) e 20 µL de amostra nas concentrações finais de 10, 100 e 1000 µg/mL. As células foram deixadas em contato com a amostra por 24 h. Então o meio foi retirado com uma micropipeta e adicionado 100 µL de MTT e incubados por 3 h.

Após esse período o MTT foi retirado com uma micropipeta e adicionado a placa DMSO, homogeneizado e determinado a absorbância em espectrofotômetro em

595 nm. A análise foi realizada em triplicata e por três dias distintos. Para avaliar a viabilidade das células foi utilizado a seguinte equação (5):

$$\%V = (Abs(a) - Abs(b)) \times 100 / (Abs(p) - Abs(b)) \quad (5)$$

Em que:

%V = Porcentagem de viabilidade celular

Abs(a) = Absorção da amostra

Abs(p) = Absorção do padrão (Células sem tratamento)

Abs(b) = Absorção do branco

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (células sem tratamento), para o qual foi atribuído 100%. O mitotano foi usado como controle positivo de morte celular.

A análise de variância foi avaliada pelo teste ANOVA e a diferença estatística foi pelos resultados obtidos pelo teste de Tukey, sendo que para os valores de $p < 0,05$, foram considerados significativos.

3.10.2 Ensaio de retenção do corante vermelho neutro

O ensaio de vermelho neutro foi baseado na metodologia de (REPETTO, et al. 2008) modificado. As células foram semeadas a densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço e incubadas para estabilização por 24 horas em estufa com CO_2 a 37 °C. Ao final do período de exposição, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas por 4 horas com a solução de vermelho neutro (40 µg/mL em PBS). Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, para remover o corante não incorporado nos lisossomos e, então, foram adicionados 150 µL de uma solução composta de 50% etanol, 49% água destilada e 1% ácido acético glacial a cada poço e homogeneizadas com auxílio de pipeta multicanal. A absorbância de cada amostra foi determinada em leitora de microplacas a 540 nm. O ensaio foi feito para 24 h e 48 h. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos).

3.10.3 Ensaio de retenção do corante cristal violeta

O teste de cristal violeta é utilizado para determinar a viabilidade celular por corar o DNA celular, e desta forma avaliar a densidade de células que após a lavagem do excesso de corante a absorbância equivale à quantidade de células no poço (KUENG et al., 1989).

Após 24 e 48 h e tratamentos das células, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com 300 µL PBS. Em seguida foi adicionado 200 µL de etanol 100% e deixando em repouso por 10 minutos. Após esse tempo, o metanol foi removido e adicionou-se 200 µL da solução cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 3 minutos. Em seguida o corante foi removido e a placa foi submersa em água deionizada, para retirar o excesso de corante. Por fim, acrescentou-se 200 µL da solução citrato de sódio 0,05 mol/L com etanol 50% durante 10 minutos. A absorbância de cada amostra foi determinada em leitora de microplacas a 540 nm.

3.10.4 Citotoxicidade em macrófagos

Células RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram mantidas em meio RPMI- 1640 suplementado com 10% (p/v) de soro bovino fetal, 1 U/mL de penicilina, a 37°C em 5% de CO₂. As células foram mantidas não mais do que vinte passagens. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1x10⁴ células/poço). Após 24 h, as células foram tratadas com 10, 100, 1000 µg/mL dos extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*, por 24 h. Uma solução de DMSO (1%) foi dissolvido no meio de cultura e foi usado como grupo controle. Uma solução de mitotano foi usado como controle positivo de morte. Após foram avaliados ou estudados diferentes testes como atividade fagocítica, capacidade de adesão de macrófagos, retenção de volume lisossomal, produção de peróxido de hidrogênio e produção de ânion superóxido.

3.10.4.1 Atividade imunomodulatória

A atividade macrofágica foi avaliada quanto à capacidade de adesão e fagocitose, volume de lisossomos e produção de íons (ânion superóxido, hidrogênio peróxido) e óxido nítrico com macrófagos da linhagem RAW 264.7. Empregou-se 100 µL da solução de macrófagos com 1x10⁶ células/mL em DMEN (Sigma) suplementado

com soro fetal bovino (10%) e 1% de antibiótico (10 U/mL estreptomicina e 20 U/mL penicilina), plaqueadas em placas de 96 poços.

Após 24 h foram adicionados os extratos e frações da espécie *A. semidentatus* nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, diluídas em água com 10% de DMSO e filtradas. Os extratos e as frações ficaram em contato com os macrófagos por 24 h até a realização das análises descritas a seguir. Todas as análises imunomodulatória foram realizadas em triplicata e por três dias distintos, para controle de todas as análises foi realizado branco, no qual foram incubadas somente as células com o meio sem nenhum tratamento.

3.10.4.2 Atividade fagocítica

Foram adicionadas alíquotas de macrófagos (1×10^6 células/mL) aos poços de uma placa de cultura de 96 poços de fundo plano (Biofil®) e a capacidade dos fagocíticos foi avaliada de acordo com (PIPE et al. 1995) modificado por Bonatto et al. (2004). Após, foram adicionados a cada poço 10 µL de zimosan com coloração vermelho neutro (10^8 partículas/mL). Após a incubação (37 °C durante 30 minutos) os macrófagos foram fixados com Baker formol-cálcio (formaldeído a 4%, cloreto de sódio a 2% e acetato de cálcio a 1%) durante 30 minutos. A absorbância de cada poço foi lida num leitor de placas a 595 nm e os resultados foram expressos como absorbância (por 1×10^6 células/mL).

3.10.4.3 Capacidade de adesão de macrófagos

A capacidade de adesão dos macrófagos foi avaliada conforme descrito por (ROSEN, GORDON 1987) com modificações. As células aderidas à placa foram fixadas com 50% de metanol durante 10 minutos e após o sobrenadante foi rejeitado. Em seguida, adicionou-se 0,2% de solução de Giemsa e a placa foi incubada durante 40 minutos à temperatura ambiente. Então os poços foram cuidadosamente lavados três vezes com PBS e o corante aderido às células foi solubilizado com 50% de metanol durante 30 minutos. A absorbância foi lida a 595 nm e a capacidade de adesão foi expressa como absorbância (por 1×10^6 células/mL).

3.10.4.4 Retenção de volume lisossomal

A captação do corante catiônico vermelho neutro, que se concentra nos macrófagos, foi utilizada para avaliar o volume dos macrófagos segundo Pipe et al. (1995) modificado por Bonatto et al., (2004). Em cada poço, 20 µL de 2% de vermelho neutro foram adicionados a 100 µL de macrófagos por microplaca e incubados por 30 min. Após descartar o sobrenadante, solubilizou-se o vermelho neutro adicionando 100 µL de solução de extração (0,1 mL de solução de ácido acético a 10% mais etanol a 40%). A absorbância foi lida a 595 nm e o volume lisossômico foi expresso como absorbância (por 1×10^6 células/mL).

3.10.4.5 Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi baseada na conversão dependente de peroxidase de rábano de vermelho de fenol em um composto colorido por H_2O_2 (PICK, KEISARI, 1980). Os macrófagos (100 µL) foram incubados na presença de glicose (5 mM), solução de vermelho de fenol (0,56 mM) e peroxidase de rábano (8,5 U/mL) no escuro por 30 min a 37° °C. Em seguida, 10µL de NaOH 1M foram adicionados aos poços para interromper a reação. A absorbância foi lida a 620 nm e os resultados foram expressos como absorbância (por 1×10^6 células/mL).

3.10.4.6 Produção de ânion superóxido

A produção de ânion superóxido foi estimada pelo ensaio de redução do nitro azul tetrazólio (NBT - Sigma) de acordo com (CHOI et al. 2006). Macrófagos (100 µL) foram incubados a 37 °C na presença de 0,2% de NBT e Zimosan. Após 30 minutos o sobrenadante foi descartado, e os macrófagos foram fixados pela adição de 100 µL de metanol (50%) por 10 min. Depois, o sobrenadante foi descartado e a placa foi seca. Em seguida, 120 µL de KOH (2M) e 140 µL de dimetil sulfóxido foram adicionados aos poços. Após 30 min a redução do NBT resultou na formação de uma coloração azul. A absorbância foi lida a 595 nm e os resultados foram expressos como absorbância (por 1×10^6 células/mL).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação dos dados, utilizou-se o teste de variância *one-way* (ANOVA) seguido do *post-hoc* de Tukey para analisar as diferenças significativas entre o controle e os grupos ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Após secagem e trituração da planta foram obtidos 1378 gramas de folhas, enquanto os galhos, obtiveram-se a quantidade de 3782 gramas e 735 gramas de casca da espécie *Allophylus semidentatus*, previamente este material botânico foi seco à temperatura ambiente e protegido da luz solar até estar completamente seco. O propósito desta secagem é evitar as reações de hidrólise e contaminação microbiana que podem ocorrer quando a planta está fresca (SIMÕES, et al. 2007).

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1 Determinação da perda de umidade por dessecação

O teor de água ou umidade é importante, pois este é um parâmetro para o controle da qualidade da planta, permitindo assim ter um recurso de segurança para posterior análise, na preparação de extratos, rendimento e identificação dos constituintes de uma planta de acordo com Farias (2003) e controle microbiológico para armazenamento (FORD et al. 1989).

Na Tabela 1 apresenta-se o teor de umidade para as folhas, galhos e casca da espécie *Allophylus semidentatus*.

TABELA 1 - Teor de umidade para as folhas, galhos e casca da espécie *Allophylus semidentatus*

PARTE DA PLANTA	% UMIDADE $\pm$ DESV. PADRÃO
Folha	9,7 $\pm$ 0,1
Galhos	7,2 $\pm$ 0,1
Casca	6,8 $\pm$ 0,1

Fonte: O autor (2022)

4.2.2 Determinação de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas é um parâmetro que permite a verificação de impurezas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes no material vegetal segundo Farias (2003). Na Farmacopeia Brasileira (2020) é relatado que a porcentagem máxima de cinzas totais que deveriam ter o material vegetal deve ser

inferior a 9%, os resultados obtidos para a espécie *Allophylus semidentatus* foram inferiores a 9%, o que não contradiz outros limites estabelecido com a Farmacopeia Brasileira (2020).

Na Tabela 2, é apresentado o teor de cinzas para as folhas, galhos e casca da espécie *Allophylus semidentatus*.

TABELA 2 - Resultados do teor de cinzas totais nas folhas e galhos da espécie *Allophylus semidentatus*

PARTE DA PLANTA	% CINZAS $\pm$ DESV. PADRÃO
Folha	7,9 $\pm$ 0,1
Galhos	3,6 $\pm$ 0,1
Casca	3,1 $\pm$ 0,1

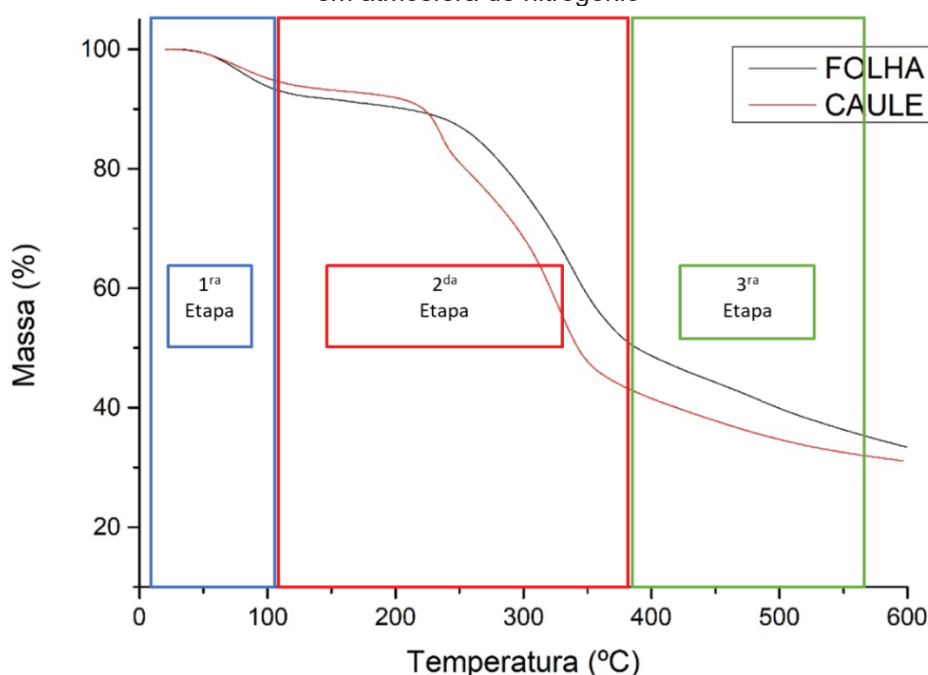
Fonte: O autor (2022)

4.2.3 Análise térmica

O objetivo desse estudo foi avaliar a degradação térmica de folhas e caules da espécie *Allophylus semidentatus* por meio das análises termogravimétrica (TG), estabelecendo suas relações com a degradação vegetal.

No Gráfico 1, pode-se observar a curva de degradação vegetal das folhas e galhos da espécie *Allophylus semidentatus*.

GRÁFICO 1 - Perfil de degradação térmica (TG) de folhas e galhos secos de *Allophylus semidentatus* em atmosfera de nitrogênio



Fonte: O autor (2022)

No Gráfico 1, pode-se observar que as linhas não se sobrepõem, o que indica que a composição de caules e folhas são diferentes, a decomposição do caule é mais acentuada do que da folha. Na Tabela 3, estão apresentadas as etapas de análise, nas quais foram observadas três degradações, a quarta etapa não acontece, pois, a atmosfera não é de ar sintético, senão de nitrogênio.

TABELA 3 - Etapas de degradação térmica de folhas e galhos secos de *Allophylus semidentatus* em atmosfera de nitrogênio

Atmosfera de N ₂						
Etapas		Folha	%	Galhos	%	Análise
1	TI (°C)	20	7,8	20	6,5	Umidade/Voláteis
	TF(°C)	131		134		
2	TI (°C)	118	44,5	120	48,3	Decomposição de compostos metabólicos secundários
	TF(°C)	408		362		
3	TI (°C)	408	14,1	362	14,2	Decomposição lenta de resíduos carbonados e polímeros.
	TF(°C)	600		600		
4	TI (°C)	600	33,5	600	31	Carbonização da matéria orgânica que não acontece pois não tem oxigênio só nitrogênio, logo esse é o chamado resíduo carbonífero
	TF(°C)					

TI: Temperatura inicial da etapa; TF: Temperatura final da etapa; %: percentual de massa degradada em cada etapa. Fonte: O autor (2022)

4.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A lâmina foliar, em vista frontal da *Allophylus semidentatus* apresenta células epidérmicas com paredes anticlinais sinuosas na face abaxial (Figura 9c,d) e ondeadas na face abaxial (Figura 9f,g). Estômatos anomocíticos são observados somente na face abaxial, portanto as folhas são caracterizadas como hipoestomáticas (Figura 9f,g).

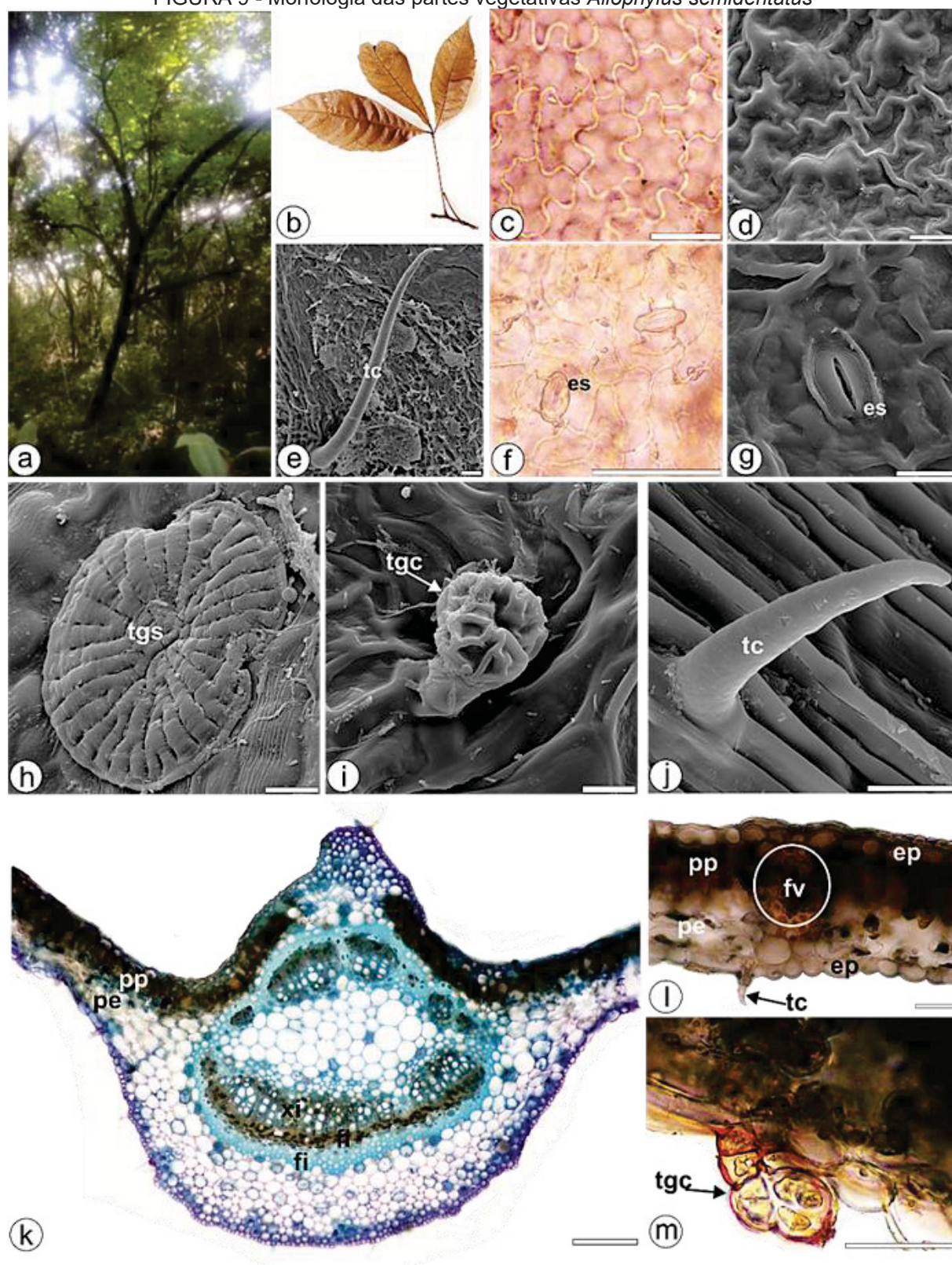
Dois tipos diferentes de tricomas glandulares são encontrados em *A. semidentatus*: a) tricoma glandular séssil, vistos somente na face adaxial da folha, sendo multicelular com disposição radial (Figura 9h); b) tricoma glandular capitado, formados por uma base uniseriada e cabeça oval com quatro células (Figura 9i,m).

Tricomas do tipo cônico são vistos na folha, sendo uniseriados e unicelular, curvados ou retos e variando em tamanho (Figura 9e,j,l).

A lâmina foliar mostra cutícula fina e lisa (Figura 9d,g,l). Na secção transversal a epiderme é uniseriada e o mesofilo apresenta organização dorsiventral, composto

por 1 camada de parênquima paliçádico e 3 camadas de parênquima esponjoso, ainda no mesofilo é possível visualizar feixes vasculares colaterais com calotas de fibras externamente ao floema (Figura 9l).

A nervura central em secção transversal apresenta forma biconvexa com uma convexidade proeminente na face adaxial (Figura 9k). O clorênquima é interrompido e substituído por oito camadas de colênquima angular na face abaxial e 3-4 camadas na face adaxial (Figura 9k). O feixe vascular é colateral e em arco aberto com 4-5 traços dorsais (Figura 9k).

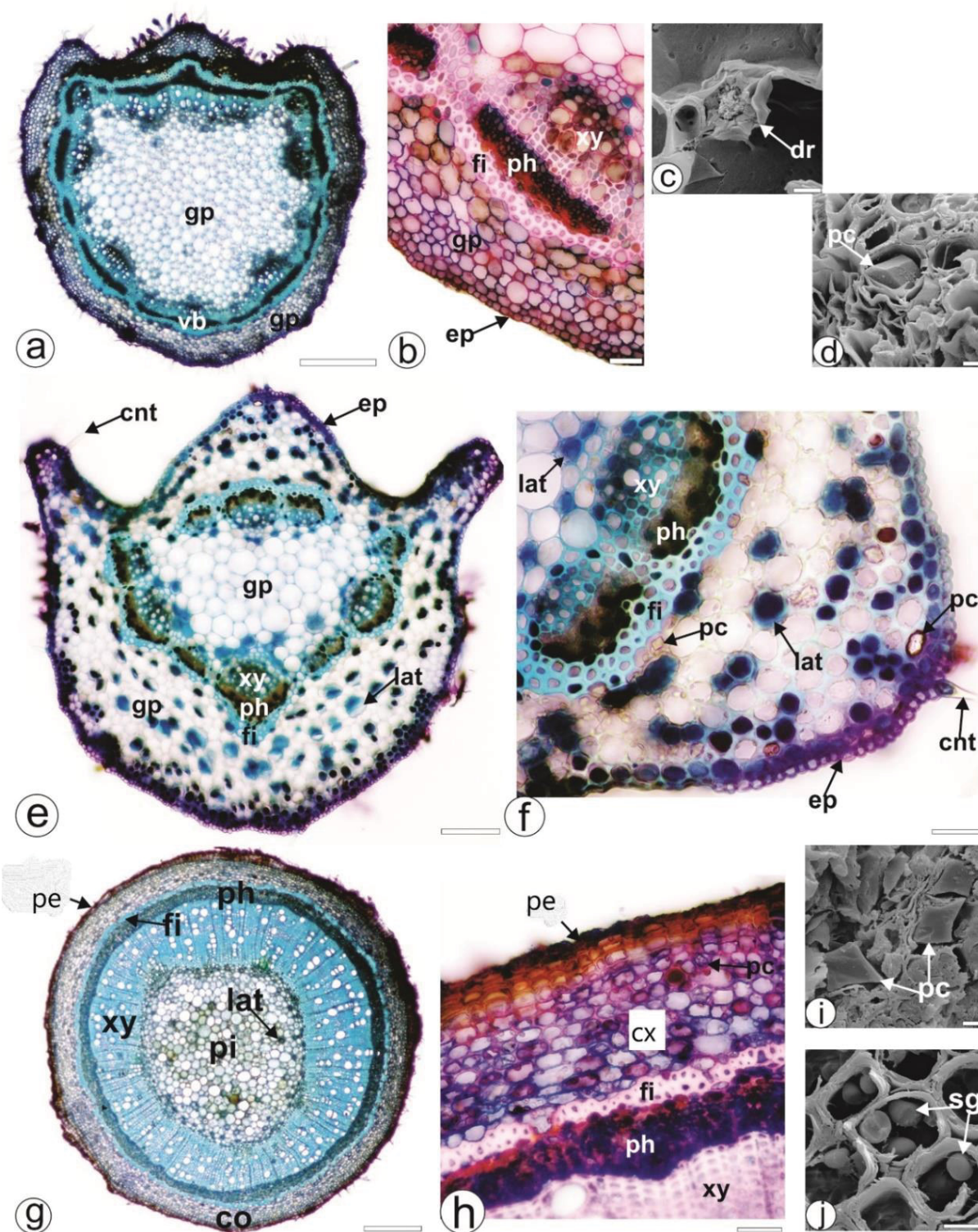
FIGURA 9 - Morfologia das partes vegetativas *Allophylus semidentatus*

Nota: *Allophylus semidentatus* no hábito (a). Morfologia das partes vegetativas aéreas de *Allophylus semidentatus* (b). Foliolo em microscopia de luz, coloração com azul de toluidina (k), safranina (c,f), sudan black (l) e sudan III (m). Foliolo em microscopia eletrônica de varredura (d,e,g,h,i,j). Barra de escala: g,h,i,j = 10 μ m; d = 20 μ m; c,e,f,l,m = 25 μ m; k = 100 μ m. Legenda: es: estômato; tgs: tricoma glandular sésseil; tgc: tricoma glândula capitado; tc: tricoma cônico; pe: periderme; pp: parênquima paliádico; fi: fibra; xi: xilema; fv: fibra vascular; ep: epiderme. Fonte: O autor (2022)

Na secção transversal, o pecíolo mostrou biconvexidade no lado adaxial e convexidade no lado abaxial (Figura 10a). O sistema vascular tinha onze pacotes vasculares colaterais livres, formando uma medula (Figura 10a). Um anel esclerenquido contínuo encerra o sistema vascular (Figura 10a,b, 11r). A epiderme tinha células menores e arredondadas do que a epiderme da lâmina do folheto (Figura 10b). Sob a epiderme, o colênquima angular foi formado por 4-6 camadas (Figura 10b). O colênquima descontínuo só foi observado no lado adaxial do pecíolo (Figura 10b). Os drusos e cristais prismáticos de oxalato de cálcio foram observados no pecíolo (Figura 10c,d).

O pecíolo mostrou forma biconvexidade em secção transversal com duas asas no lado abaxial (Figura 10e). O sistema vascular era semelhante ao pecíolo, mas com dez pacotes vasculares colaterais, formando uma medula (Figura 10e). As fibras esclerenquimatosas foram encontradas adjacentes ao floema (Figura 10f). A epiderme é sem camadas, formada por células arredondadas (Figura 10e,f). Perto das fibras e no parênquima do solo, foram encontrados cristais prismáticos (Figura 10f). O caule, no incipiente crescimento secundário, mostrou forma arredondada em secção transversal (Figura 10g). Esta forma de caule é comum em espécies de Sapindaceae (MUNDO & DUARTE, 2009; GEORGE & HARI, 2015; TIRLONI et al. 2018).

O periderme estava presente e o córtex foi formado por várias camadas (Figura 10g,h). O sistema vascular foi organizado pelo floema para fora e xilema para dentro (Figura 10g,h). Fibras lignificadas do floema formam um anel (Figura 10g,h). A medula ocupa uma porção média do caule, consiste numa fina parede (Figura 10g). Vários cristais prismáticos foram encontrados no córtex, principalmente ao lado das fibras (Figura 10i).

FIGURA 10 - Anatomia da *Allophylus semidentatus*

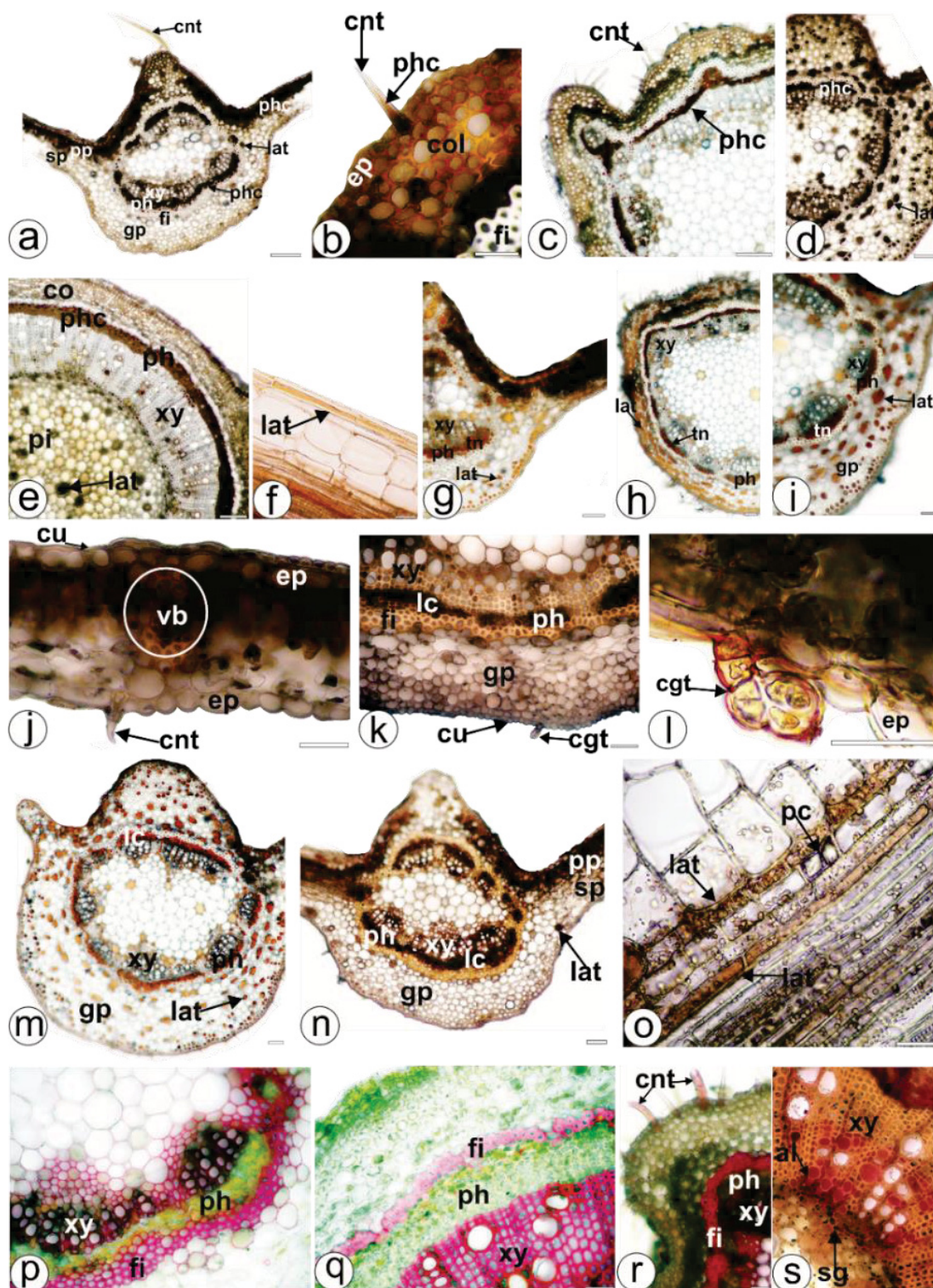
Nota: Anatomia de *Allophylus semidentatus* (a,b,e,f,g,h: microscopia de luz; c,d,i,j). Pecíolo (a-d), pecíolo (e,f) e caule (g-j) em cortes transversais. Coradas em azul Astra e fucsina básica (h); corado em azul de toluidina (a,b,e,f,g). cnt: tricoma cônico não glandular; ch: clorênquima; co: córtex; cu: cutícula; cx: córtex; dr: drusa; ep: epiderme; fi: fibras; gp: parênquima fundamental; lat: ductos laticíferos; pc: cristal prismático; pe: periderme; ph: floema; pi: medula; sg: grãos de amido; vb: feixe vascular; xy: xilema. Barra de escala: c,d,i,j = 5 μ m; b,f,h = 25 μ m; e = 100 μ m; a,g = 250 μ m. Fonte: O autor (2022)

A composição química dos cristais encontrados em *A. semidentatus* (prismático e drusa) foi realizada através do MEV (Figura 12i), mostrando picos de carbono (10,17%), cálcio (40,73%) e oxigênio (49,10%). Esta composição química sugeriu que os cristais foram formados por oxalato de cálcio. Drusas e cristais prismáticos são geralmente vistos em espécies da família Sapindaceae (METCALFE & CHALK, 1950; BAIZHONG et al. 1995; MUNDO & DUARTE, 2009). Também Metcalfe e Chalk (1950) relataram a presença de cristais estiloides em Sapindaceae. Como já foi reportado, para além das tricomas glandulares, existem outras estruturas secretoras comum na família Sapindaceae, como idioblastos e laticíferos (NETO et al. 2017; MEDINA et al. 2021). Foram encontrados os canais de laticíferas que contêm fenólicos, alcaloides, pectina, proteínas e compostos lipofílicos foram encontrados nas folhas e caules de *A. semidentatus* (FIGURA 11d-i, 11m-o).

A análise histoquímica nas plantas é uma ferramenta importante com o objetivo de localização, caracterização e concentração de grupos de metabolitos secundários ou compostos químicos dentro de tecidos biológicos e células. Neste estudo, os compostos fenólicos gerais foram evidenciados por soluções de cloreto férrico e de dicromato de potássio, sendo observados dentro das células de tricomas não-glandulares cónicos (Figura 11b), parênquima paliçádico (Figura 11a), floema da nervura central (Figura 11a), pecíolo (Figura 11c), peciólulo (Figura 11d) e caule (Figura 11e), e em condutos laticíferos (Figura 11f). Além disso, a solução de vanilina para taninos condensados foi utilizada e evidenciou este grupo químico no floema da nervura central (Figura 11g), pecíolo (Figura 11h), peciólulo (Figura 11i) e caule.

Os condutos laticíferos também reagiram com reagentes aos compostos fenólicos (Figura 11g-i). O Sudan III tingiu os lipídios em vermelho ou vermelho-laranja e o Sudan em preto os compostos lipofílicos nos testes histoquímicos. Os lipídios foram evidenciados na cutícula (Figura 11j,k), tricomas glandulares (Figura 11k,l), floema (Figura 11k,m,n) e nos ductos laticíferos (Figura 11m-o).

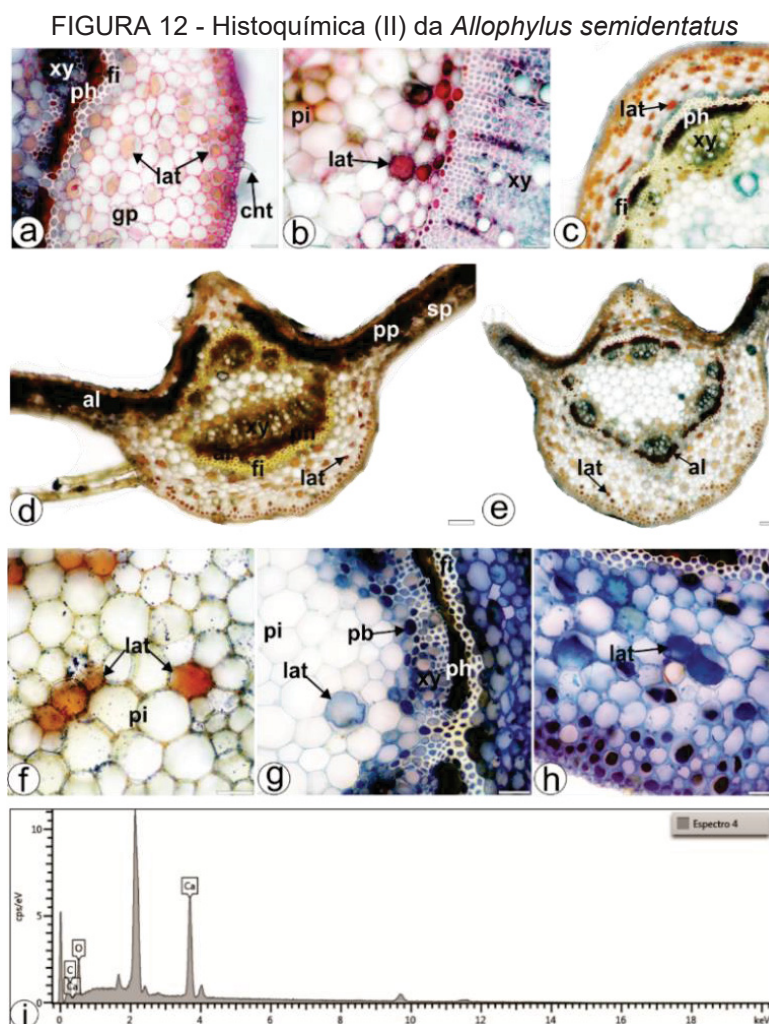
Floroglucinol-HCl cora a lignina presente nas paredes das células vegetais de rosa. Consequentemente, em *A. semidentatus* foram identificados elementos lignificados, como nas paredes celulares dos tricomas não glandulares (Figura 11r), nas fibras e xilema em todos os órgãos analisados (Figura 11p-r). Os grãos de amido foram identificados por solução de iodo e estavam presentes na região perimedular do caule (Figura 11s).

FIGURA 11 - Histoquímica (I) da *Allophylus semidentatus*

Nota: Histoquímica de *Allophylus semidentatus* - microscopia de luz. Seções transversais de folíolos (a,g,j,l,n,p), pecíolo (b,c,h,k,r), pecíolo (d,i,m,o) e caule (e,q,s). Cortes longitudinais de folíolos (f) e caule (o). Reação com cloreto férrico (a,d), dicromato de potássio (b,c,e,f), vanilina (g-i), negro de Sudão (j,k,n), Sudão III (m,l,o), floroglucinol-HCl (p-r) e solução de Dragendorff (s). al: alcalóides; cgt: tricoma glandular; cnt: tricoma cônico não glandular; co: córtex; col: colênquima; cu: cutícula; ep: epiderme; fi: fibras; gp: parênquima fundamental; lat: ductos laticíferos; lc: compostos lipofílicos; pc: cristal prismático; ph: floema; phc: compostos fenólicos; pi: medula; pp: parênquima paliçádico; sg: grãos de amido; sp: parênquima esponjoso; tn: taninos; vb: feixe vascular; xy: xilema. Barra de escala: b,f,j-l,o-s = 25 µm; g-i,m,n = 50 µm; a,c-e = 100 µm. Fonte: O autor (2022).

A solução vermelha de rutênio mancha a pectina de rosa a vermelho. Neste estudo, foram detectadas pectinas nos condutos da epiderme, floema (Figura 12a) e laticíferos (Figura 12a,b) de *A. semidentatus*. Os reagentes Dragendorff e Wagner mancham alcaloides em castanho-avermelhado. Os alcaloides foram evidenciados em parênquima paliçádico (Figura 12d), células ao lado do xilema (Figura 12c-e), floema (Figura 12c-e), no parênquima do pecíolo (Figura 4c), peciólulo (Figura 12e) e caule e em condutos laticíferos (Figura 12c-f).

O azul brilhante de Coomassie cora os corpos proteicos de azul. Em *A. semidentatus*, corpos proteicos foram encontrados em células ao lado do xilema e em tubos laticíferos no pecíolo e peciólulo (Figura 12g,h).



Nota: Histoquímica de *Allophylus semidentatus* (a-h: microscopia de luz; i: análise EDS de um cristal). Seções transversais de folíolos (d), pecíolo (c,g), pecíolo (a,e,h) e caule (b,f). Reação com vermelho de rutênio (a,b); reação com Wagner (c-e); Dragendorff (f); Azul brilhante de Coomassie (g,h). al: alcalóides; cnt: tricoma cônico não glandular; fi: fibras; gp: parênquima paliçádico; lat: tubos laticíferos; pb: corpos proteicos; ph: floema; pi: medula; pp: parênquima paliçádico; sp: parênquima esponjoso; xy: xilema. Barra de escala: a,b,f-h = 25 µm; d,e = 50 µm. Fonte: O autor (2022).

Os marcadores anatômicos e histoquímicos destacados podem ser empregados na identificação e caracterização da espécie. As características incluem a presença de três tipos de tricomas (sésseis e capitados glandulares e cônicos não glandulares), folhas hipoestomáticas, e as formas de folíolos, pecíolo e caule.

4.4 ÓLEO ESSENCIAL

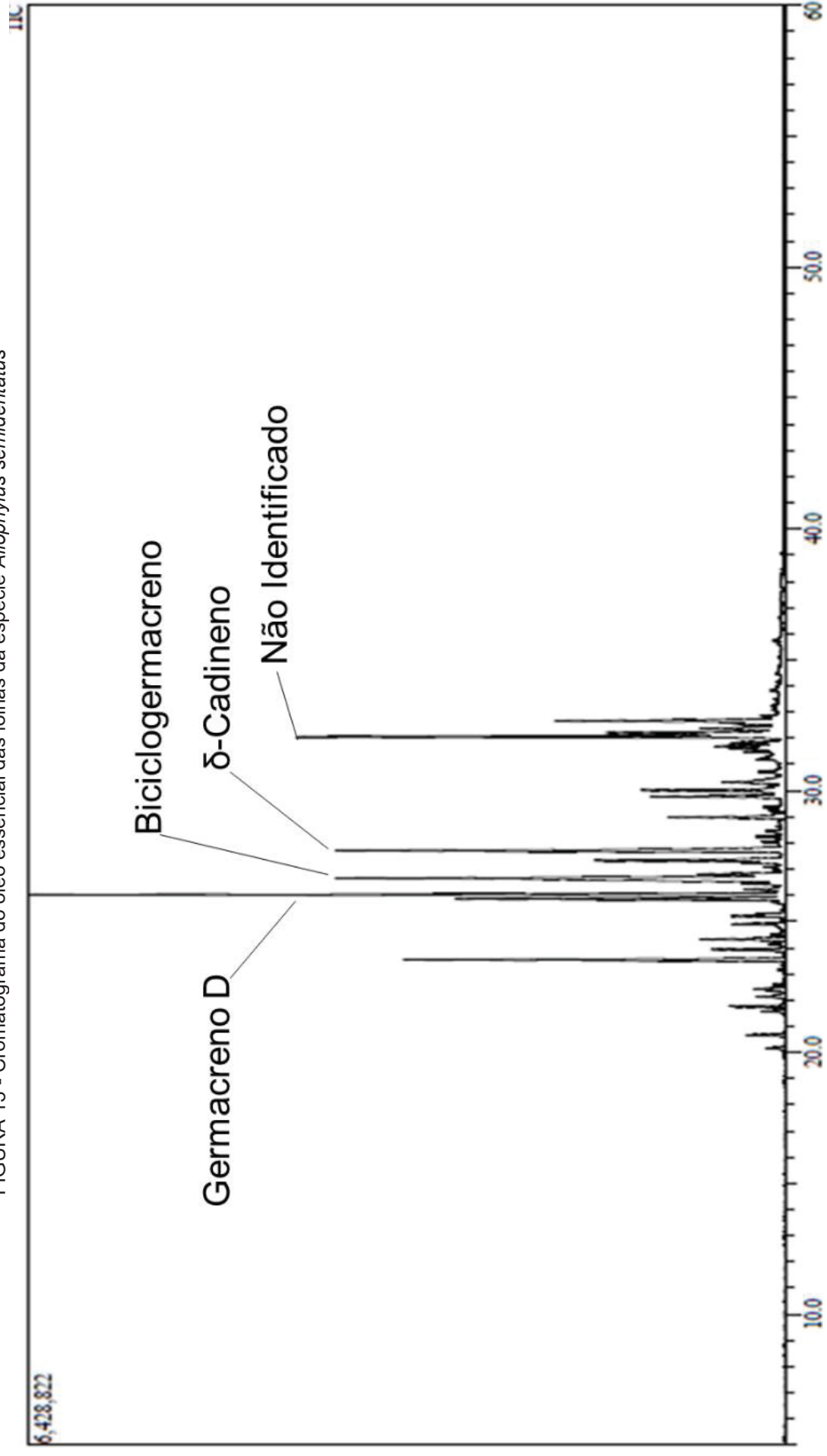
4.4.1 Extração e determinação quantitativa do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído das folhas frescas trituradas no mês de agosto 2018. Durante o processo de extração, observou-se que a maior quantidade de óleo essencial foi extraída durante as duas primeiras horas da hidrodestilação e nas quatro horas restantes o processo foi mantido, porém, em menor proporção.

O rendimento obtido na extração do óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus* foi de 0,75%. O óleo essencial extraído das folhas frescas e trituradas da espécie *Allophylus semidentatus* apresentou uma cor amarelada.

4.4.2 Identificação dos compostos do óleo essencial

A cromatografia é um método simples no qual são utilizadas colunas capilares, permitindo a análise de misturas de centenas de componentes. O óleo é solubilizado em um solvente, que é injetado em um cromatógrafo. A identificação dos compostos é feita comparando o tempo de retenção relativo das amostras com os padrões. A cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas permite obter informações completas sobre o peso molecular e a fragmentação dos constituintes e proporciona maior segurança na identificação de picos individuais e no controle da pureza de um pico cromatográfico. Usando esta metodologia, é possível separar os constituintes e fornecer um espectro de massa para cada pico, indicando massa molecular e padrão de fragmentação de acordo com (BRUNETON, 1991), (SIMÕES e SPITZER, 2010). O cromatograma do óleo essencial obtido das folhas da espécie *Allophylus semidentatus* é ilustrado na Figura 13.

FIGURA 13 - Cromatograma do óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus*

Fonte: O autor (2022)

A Tabela 4 mostra a maioria dos compostos químicos que constituem o óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus* analisados por cromatografia acoplada a um espectrômetro de massas, teste realizado pelo Departamento de Química da UFPR, da análise foram identificados 55,35% compostos alcenos sesquiterpenos, 23,21% álcoois sesquiterpenoides, 3,57% aromáticos sesquiterpenos e 19,64%. compostos não identificados.

TABELA 4 - Compostos químicos presentes no óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus* determinados pela cromatografia gasosa

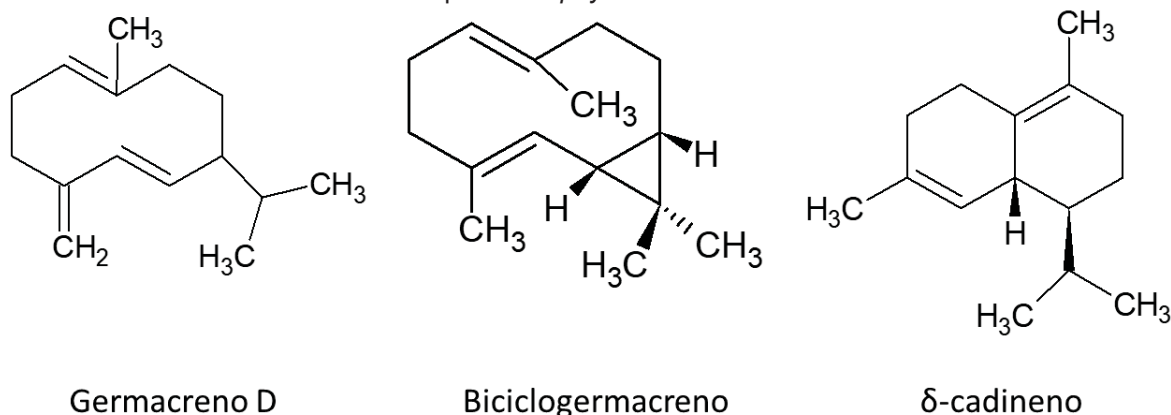
ID	T _R	AI	AI _{TEORICO}	Identidade	Área relativa	Classificação	m/z (1)	m/z (2)	m/z (3)
001	20,165	1338	1335	δ-elemeneno	0,30	Alceno - Sesquiterpeno	121	93	161
002	20,665	1350	1348	α-cubebeno	0,59	Alceno - Sesquiterpeno	105	161	119
003	21,570	1372	1373	α-ylangeno	0,40	Alceno - Sesquiterpeno	105	161	119
004	21,755	1377	1374	α-copaeno	0,81	Alceno - Sesquiterpeno	161	119	105
005	22,125	1386	1387	β-bourboneno	0,48	Alceno - Sesquiterpeno	81	123	80
006	22,205	1387	-	NI M: 204	0,15	-	105	120	119
007	22,350	1391	1387	β-cubebeno	0,31	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	91
008	22,430	1393	1389	β-elemeneno	0,51	Alceno - Sesquiterpeno	93	81	107
009	22,585	1397	-	NI PB: 204	0,19	-	161	105	119
010	23,150	1411	1409	α-gurjuneno	0,16	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
011	23,540	1420	1417	(E)-cariofileno	6,13	Alceno - Sesquiterpeno	133	93	91
012	23,930	1430	1430	β-copaeno	1,31	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	91
013	24,130	1435	1434	γ-elemeneno	0,43	Alceno - Sesquiterpeno	107	161	121
014	24,325	1440	1439	Aromadendreno	1,39	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	91
015	24,505	1444	-	NI M: 204	0,29	-	105	108	91
016	24,910	1454	1452	α-humuleno	0,90	Alceno - Sesquiterpeno	93	147	121
017	25,210	1462	1458	allo-aromadendreno	0,95	Alceno - Sesquiterpeno	105	161	91
018	25,290	1464	1465	cis-muurola-4(14),5-dieno	0,44	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
019	25,735	1475	1475	trans-cadina-1(6),4-dieno	0,25	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
020	25,860	1478	1478	γ-muuroleno	5,45	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
021	26,030	1482	1480	Germacreno D	12,53	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
022	26,225	1487	1489	β-selineno	0,77	Alceno - Sesquiterpeno	105	161	93
023	26,450	1493	1493	trans-muurola-4(14),5-dieno	0,81	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
024	26,590	1496	1495	γ-amorfeno	2,98	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
025	26,655	1498	1500	Biciclogermacreno	8,42	Alceno - Sesquiterpeno	121	93	107
026	26,805	1502	1500	α-muuroleno	1,53	Alceno - Sesquiterpeno	105	161	93
027	26,975	1506	-	NI	0,23	-	93	107	105
028	27,080	1509	1511	δ-amorfeno	0,41	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
029	27,235	1513		(+)-epi-Biciclosesquifelandreno	0,71	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119
030	27,335	1515	1513	γ-cadineno	3,75	Alceno - Sesquiterpeno	161	105	119

031	27,710	1525	1522	δ-cadineno	7,85	Alceno - Sesquiterpeno	161	119	105
032	27,785	1527	-	NI	0,76	-	93	79	55
033	28,045	1534	1533	trans-cadina-1,4-dieno	0,29	Alceno - Sesquiterpeno	119	105	161
034	28,250	1539	1537	α-cadineno	0,39	Alceno - Sesquiterpeno	105	161	119
035	28,455	1544	1544	α-calacoreno	0,35	Aromatico - Sesquiterpeno	157	142	93
036	28,985	1558	1559	Germacrene B	2,02	Alceno - Sesquiterpeno	121	93	105
037	29,080	1561	-	NI	0,22	Alcool - Sesquiterpenoide	109	161	82
038	29,245	1565	1564	β-calacorene (impuro)	0,33	Aromatico - Sesquiterpeno	157	69	93
039	29,365	1568	-	NI M: 222	0,54	-	161	105	81
040	29,775	1579	1577	Espatulanol	2,36	Alcool - Sesquiterpenoide	159	91	119
041	30,020	1585	1582	Globulol	3,03	Alcool - Sesquiterpenoide	161	107	105
042	30,320	1593	1600	Guaiol	1,28	Alcool - Sesquiterpenoide	161	105	107
043	30,710	1603	1600	Rosifoliol	0,85	Alcool - Sesquiterpenoide	149	108	59
044	31,200	1617	1618	1,10-di-epi-Cubenol	0,62	Alcool - Sesquiterpenoide	161	119	105
045	31,300	1619	1619	Junenol	0,42	Alcool - Sesquiterpenoide	109	161	204
046	31,485	1624	-	NI M:220	0,79	-	119	93	149
047	31,595	1627	-	NI M:220	0,97	-	95	135	69
048	31,695	1630	1627	1-epi-cubenol	1,46	Alcool - Sesquiterpenoide	119	161	105
049	31,835	1634	1635	cis-cadin-4-en-7-ol	1,08	Alcool - Sesquiterpenoide	161	179	119
050	32,060	1640	-	NI	8,04	-	119	91	93
051	32,205	1644	1638	epi-α-cadinol	4,37	Alcool - Sesquiterpenoide	161	95	121
052	32,370	1649	1640	epi-α-muurolol	2,05	Alcool - Sesquiterpenoide	161	119	105
053	32,570	1654	1644	α-muurolol	0,97	Alcool - Sesquiterpenoide	119	95	105
054	32,665	1657	1652	α-cadinol	4,40	Alcool - Sesquiterpenoide	95	121	161
055	32,860	1662	-	NI M: 238	0,62	-	157	95	111
056	33,240	1672	-	NI	0,36	-	81	93	107
100,00									

Legenda: T_R: tempo de retenção; Al: área de integração; NI: Não identificado. Fonte: O autor (2022)

A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massa e Índice de Kovats obtidos com os espectros obtidos por Adams (2007), através dos índices de retenção calculados em relação aos tempos de retenção de uma série de alcanos lineares (C8-C19) analisados nas mesmas condições descritas. A partir da análise cromatográfica, podemos determinar que os compostos majoritários são: Germacrene D (12,53%), Bicyclgermacreno (8,42%) e δ-cadineno (7,85%). As estruturas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus* são mostradas na Figura 14.

FIGURA 14 - Estrutura molecular dos compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas da espécie *Allophylus semidentatus*



Fonte: O autor (2022)

A atividade antimicrobiana do Germacreno D, já foi avaliada pelos métodos de difusão em ágar por (BIAVATTI, 2001) e microdiluição em caldo por (DEUSCHLE, 2003). Este composto apresentou-se inativo em concentrações de até 5000 µg / mL frente a diferentes microrganismos, entre eles *Escherichia coli* ATCC 25922. O germacreno D é um precursor da biossíntese de muitos outros compostos de estrutura sesquiterpenoide. No entanto, este constituinte não é adequado como marcador quimiotaxonômico, por não ser abundante no gênero (DE KRAKER, 1998). Dados de literatura indicam que altas temperaturas, como as utilizadas na extração dos óleos essenciais por hidrodestilação, podem levar à degradação do Germacreno D ou induzir um rearranjo molecular, originando outros compostos de natureza sesquiterpenoídica.

O composto biciclogermacreno é um sesquiterpenoide junto com outros terpenóides com atividade antifúngica têm sido identificados em extratos de outras espécies. A composição do óleo essencial da espécie *Piper cernuum* contém compostos como o biciclogermacreno que mostrou atividade antimicrobiana (CONSTANTIN et al. 2001).

Os resultados de um estudo realizado por (GRECCO, 2013), indicaram que o óleo das folhas de *Nectandra leucanta* apresenta expressiva atividade citotóxica que pode ser devida, pelo menos em parte, a presença de altas concentrações de germacreno D e biciclogermacreno.

4.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A composição fitoquímica preliminar qualitativa do extrato hidroalcólico 20% está apresentada na Tabela 5.

TABELA 5 - Resultado do estudo fitoquímico do extrato hidroalcólico 20%

GRUPOS FITOQUÍMICOS	FOLHAS				GALHOS				CASCA			
	FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR
Alcaloides	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heterosídeos Flavónicos	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Flavonoides	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Dihidroflavononois	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavononois	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Cumarinas	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Iridoides	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Esteroides/Triterpenos	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-

Nota: Símbolo + indicativo de reação positiva, símbolo – indicativo de reação negativa. FH: Fração de Hexano; FC: Fração de Clorofórmio; FAE: Fração Acetato de Etila; FR: Fração Hidroalcoólica.

Fonte: O autor (2022)

Na espécie *Allophylus semidentatus*, foi observada reação positiva para o reagente de Dragendorff, nas frações de clorofórmio tanto para folhas, galhos quanto a casca. Para verificar este resultado, foi realizado um contra teste consistindo em adicionar uma solução de ácido tartárico a 5% para dissolver o precipitado formado, obtendo sua dissolução total.

Em relação aos heterosídeos flavônicos, podemos dizer que a presença de uma flavona é possível, pois no acetato de etila e na fração hidroalcoólica houve mudança de cor de amarelo para vermelho, que é produzida pelo efeito batocrômico da Banda I dos derivados flavônicos e a redução da função cetona a 3,4-dióis monoméricos ou raramente 4-óis.

No teste de cumarina, observou-se o aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada no ultravioleta na mancha número 2 do teste na fração clorofórmio das folhas, galhos e casca. Essa fluorescência se deve ao fato de que quando irradiamos com luz ultravioleta, a forma cis migra para a forma trans, nesta conformação, a solução torna-se fluorescente após alguns minutos.

Para iridóides, foi positivo nas frações de acetato de etila e permaneceu com a coloração verde escura de floroglucinol e rosa cereja para a reação com ácido sulfúrico e vanilina.

Por fim, foi realizada a reação de Libermann Bouchard, que mostrou a presença de triterpenos na fração clorofórmica das folhas e na fração acetato de etila da casca. A cor verde entre os dois líquidos nesta fração indica a presença do grupo hidroxila na posição 3 e a dupla ligação entre 5 e 6 do anel aromático.

A composição fitoquímica preliminar qualitativa do extrato aquoso 20% está apresentada na Tabela 6.

TABELA 6 - Composição fitoquímica do extrato aquoso 20% de *Allophylus semidentatus*

GRUPOS FITOQUÍMICOS	FOLHAS	GALHOS	CASCA
Heterosídeos antociânicos	-	-	-
Heterosídeos saponínicos	-	-	-
Heterosídeos cianogênicos	-	-	-
Polifenóis	+	-	+
Flavonoides	-	+	+
Taninos	-	-	-
Grupos aminos	+	+	+
Ácidos voláteis	-	-	-

NOTA: Símbolo + é indicativo de reação positiva, símbolo - é indicativo de reação negativa.

Fonte: O autor (2022).

Para a determinação dos polifenóis, foi realizada a reação do sulfato de ferro amoniacal, onde o extrato aquoso do caule ficou marrom, o que indica uma reação positiva.

4.5 SCREENING FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise fitoquímica por CCD dos extratos de *Allophylus semidentatus* apresentou a presença de alguns grupos de substâncias como os esteroides/terpenos, flavonoides, taninos, alcaloides e cumarinas. Os resultados obtidos para as folhas foram similares aos resultados obtidos para os caules e casca, diferindo apenas quanto à presença de esteroides/terpenos que não foram observados na fração clorofórmica das folhas e sim na fração clorofórmica dos galhos. Igual aconteceu com os taninos, se observaram na fração acetato de etila dos galhos, enquanto não foram observadas na mesma fração das folhas. Os resultados obtidos através do screening fitoquímico por CCD estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 - Metabólitos secundários identificados em folhas, galhos e casca da espécie *Allophylus semidentatus*, por análise por CCD

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	FOLHAS				GALHOS				CASCA			
	FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR
Esteroides/Triter.	+				+	+	+		+	+	+	
Flavonoides		+	+				+	+			+	
Taninos							+				+	
Alcaloides		+				+				+		
Cumarinas		+				+				+		

Nota: FH: Fração de Hexano; FC: Fração de Clorofórmio; FAE: Fração Acetato de Etila; FR: Fração Hidroalcoólica. Fonte: O autor (2022)

4.6 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

4.6.1 Extrato bruto etanólico

Os extratos brutos das folhas e galhos da espécie *Allophylus semidentatus*, foram realizados com um equipamento Soxhlet modificado, utilizando etanol a 96 ° GL como solvente extrator. A extração das folhas foi realizada em duas partes, pois a quantidade de material vegetal triturado foi maior que a capacidade do Soxhlet. Após feitas todas as extrações, os extratos resultantes foram misturados e homogeneizados. Para o extrato bruto das folhas, foram utilizados 1200 gramas, obtendo-se 6,5 L de extrato, enquanto para o extrato bruto dos galhos foram utilizados 3600 g, obtendo-se 7,5 L de extrato e para o extrato bruto da casca foram utilizados 650 g obtendo-se 6,5 L. Esses extratos apresentaram uma cor esverdeada. A partir desses extratos brutos, procedeu-se ao cálculo do teor de sólidos, obtendo-se um resultado de $(0,039 \pm 0,002)$ g / mL para as folhas. Enquanto para os galhos um valor de $(0,046 \pm 0,006)$ g / mL foi obtido e para a casca $(0,0560 \pm 0,0004)$ g / mL. A partir desses valores, foi calculado o rendimento percentual, que foi $(16,85 \pm 0,54)\%$ para as folhas e $(9,22 \pm 0,48)\%$ para o caule e para a casca $(5,96 \pm 0,51)\%$. Após desta etapa, o equivalente a 5 g de cada extrato foi separado para as atividades biológicas e o restante de cada extrato foi concentrado em um evaporador rotatório para fracionamento.

4.6.2 Partição dos extratos brutos etanólicos

Na Tabela 8, é apresentada a quantidade em gramas que foi obtida de cada fração, tanto para as folhas quanto para os galhos, também é apresentado o rendimento em porcentagem em relação à quantidade de planta coletada.

TABELA 8 - Rendimentos das frações das folhas, galhos e casca da espécie *Allophylus semidentatus*

FRAÇÃO	Rendimen. (g) Folhas	(%) Folhas	Rendimen. (g) Galhos	Galhos (%)	Rendimen. (g) Casca	Casca (%)
HEXANO	9,3036	0,78	16,6479	0,46	8,0541	1,23
CLOROFORMIO	21,5182	1,79	14,1276	0,39	4,0510	0,62
ACETATO DE ETILA	5,5964	0,47	11,0966	0,31	4,3213	0,66
HIDROALCOÓLICA	47,7200	3,98	61,2184	1,70	6,0439	10,07

Fonte: O autor (2022)

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS

4.7.1 Compostos β -sitosterol-3- α - β -D-glucósido e campesterol

A fração clorofórmio dos galhos foi utilizada para o isolamento dos compostos, onde previamente obteve-se uma pastilha, preparada com 75 gramas de sílica gel 60 Merck® e 6 gramas da fração a qual foi dissolvida com 8 mL de hexano, misturadas e levadas a secura em banho-maria.

A partir da pastilha de clorofórmio foi realizada a coluna cromatográfica gravimétrica, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200 mm), como fase móvel a mistura de solventes hexano e acetato de etila. Foram utilizados 100 mL de cada fase móvel, iniciando-se com 100% de hexano, com acréscimo de 5% de acetato de etila gradativamente, até chegar ao total de 100%. Posteriormente foram utilizados novamente 100 mL de cada fase móvel, iniciando-se com 100% de acetato de etila, com acréscimo de 5% de metanol gradativamente, até chegar ao total de 100%. Os eluatos foram coletados em 360 frascos com aproximadamente 10 mL e levados a secura, em temperatura ambiente para a cristalização dos compostos.

Após a secura foram selecionados para análises os frascos 243 até 248 (FC243248T) que apresentavam cristais, nestes foram adicionados éter de petróleo e levado ao freezer até completa precipitação dos cristais e retirada da clorofila.

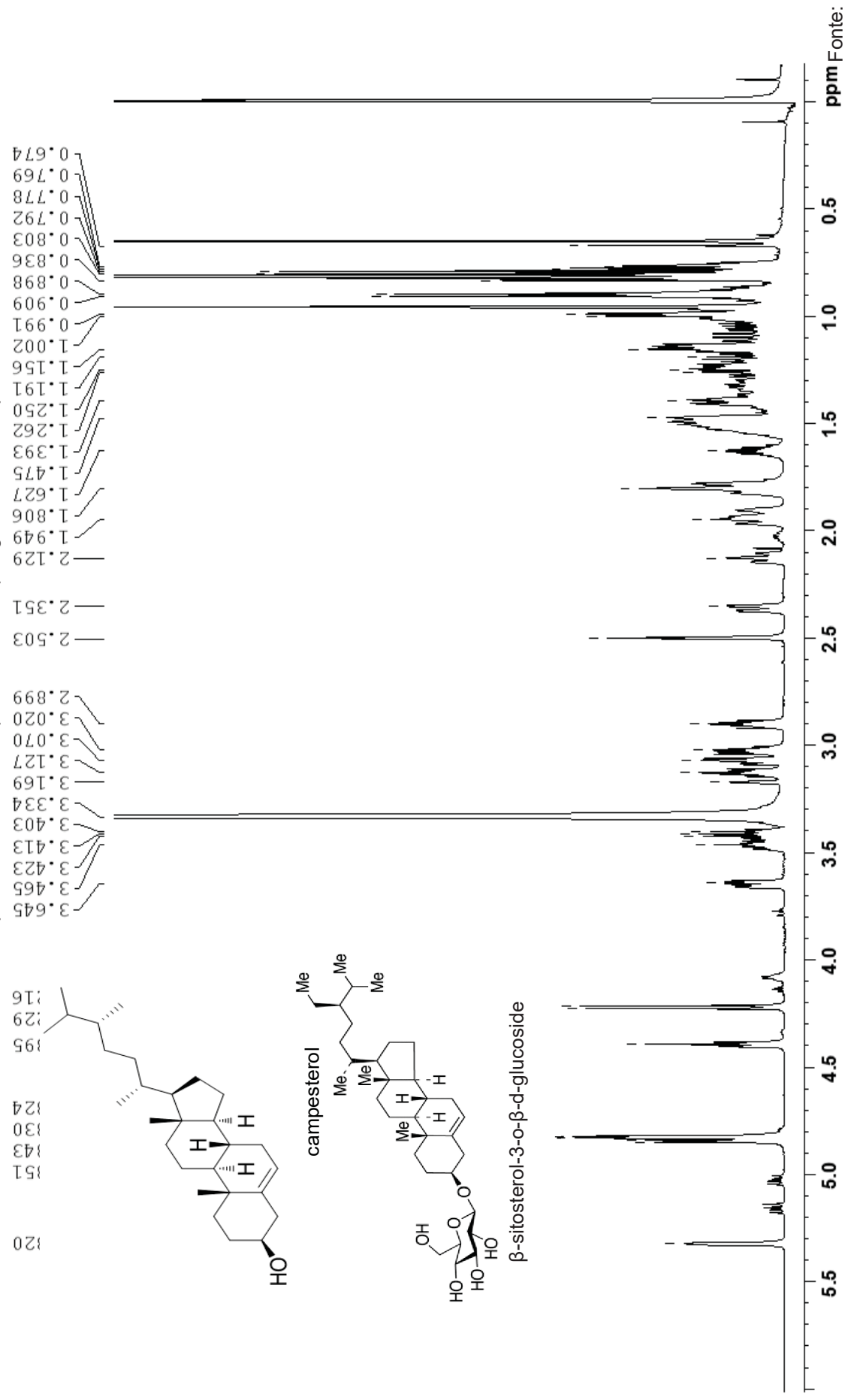
A substância isolada foi submetida a análise espectrométrica para determinação da estrutura, para isso realizou-se RMN de ^{13}C e ^1H , utilizando o aparelho RMN Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente. Essa análise foi realizada no Departamento de Química (UFPR), obtendo-se o espectro de RMN ^1H (Figura 12), enquanto o espectro de RMN ^{13}C está representado na Figura 13. Na Tabela 7 encontram-se os deslocamentos de ^{13}C das substâncias isoladas.

O espectro de ^1H NMR dos compostos β -sitosterol-3-o- β -D-glucósido e Campesterol mostraram uma mudança química no intervalo de 0,89-0,99 ppm, sugerindo a presença de prótons metílicos (12H, H-21,26,27,29). Um singlete observado a 0,67 ppm foi atribuído a prótons metílicos (H-18). Foi observado um próton ligado à ligação olefínica a 5,32 ppm. Os sinais observados em 0,83 e 0,89 ppm foram atribuídos a prótons metil de porção isopropenil. Próton metílico (H-21) foram observadas a 0,99 ppm com constante de acoplamento $J = 6,5$ Hz. O próton da glicose foi observado em 2,89-3,64 ppm como um multiplete. O próton do grupo de glicosídeo foi observado em 4,21 ppm. O próton H-3 foi observado a 2,90 ppm. Os prótons hidroxila da porção açúcar (β -sitosterol-3-o- β -d-glucoside) mostrou ressonância a 3,46-3,64 ppm ($J = 4,5$ Hz) e foram atribuídos a C-2', C-3' C-4' e C-6' respectivamente.

O espectro de ^{13}C RMN do composto indicou 35 sinais de carbono, dos quais seis foram para a porção de açúcar e 29 foram atribuídos à porção da aglicona. Os sinais de carbono do açúcar fração observada em 61,06 (C-6'), 70,08 (C-4'), 73,41 (C-2'), 76,66 (C-5'), 76,72 (C-3') e 100,75 (C-1') ppm foram bem consistentes com os da porção glicose. A porção da aglicona foram observados sinais em 140,41 (C-5), 121,10 (C-6), 76,90 (C-3), 56,11 (C-14), 55,38 (C-17), 49,56 (C-9), 45,10 (C-24), 41,79 (C-13), 39,28 (C-4), 38,26 (C-12), 36,76 (C-1), 36,15 (C-10), 35,40 (C-20), 33,30 (C-22), 31,36 (C-7), 31,30 (C-8), 29,20 (C-2), 28,67 (C-25), 27,69 (C-16), 25,43 (C-23), 23,77 (C-15), 22,56 (C-28), 20,82 (C-11), 19,61 (C-26), 19,01 (C-19), 18,87 (C-27), 18,54 (C-21), 11,70 (C-29) e 11,70 (C-18) ppm. Esses dados confirmaram que o composto FC243248T é uma mistura do β -sitosterol-3-o- β -D-glucósido e o campesterol (Figura 15).

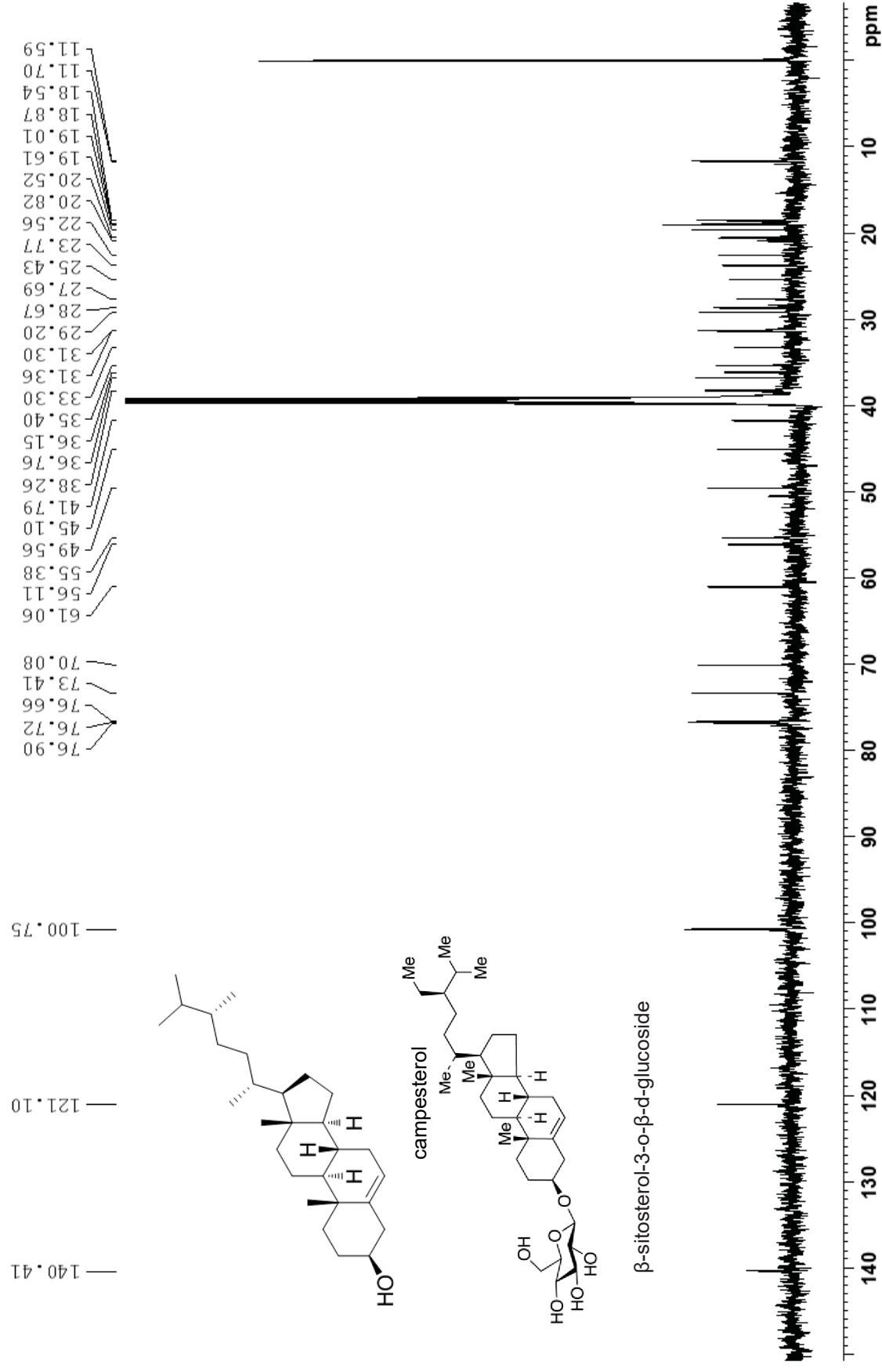
O desvio químico de 19,61 e 18,87 ppm foi atribuído a dois grupos metil. Os sinais observados nos campos 11,70, 19,01 e 18,54 ppm foram atribuídos ao grupo metil angular porção ligada em C-18, C-19 e C-21. Os sinais em 140,41, 36,15 e 41,79 ppm foram atribuídos ao carbono quaternário no ponto C-5, C-10 e C-13. Os sinais observados em 31,30, 49,56 e 56,11 ppm foram atribuídos a prótons em C-8, C-9 e C-14, respectivamente. A mudança química em 36,76, 29,20, 38,26, 31,36, 49,56, 20,52, 38,26, 56,11, 23,77, 27,69 e 55,38 ppm foram atribuídos ao ciclohexil e ciclopentil dos anéis A, B, C e D. O carbono de articulação cíclica articulada à cadeia lateral foi observado em 35,40 ppm. O carbono anomérico 100,73 (C-1') e de próton (H-1') em 4,21 com 76,90 ppm, respectivamente, confirmaram a porção glicêmica na

posição 3 (Figura 16). A Tabela 9 apresenta uma comparação dos deslocamentos dos carbonos da mistura do β -sitosterol-3-o- β -D-glucósido e o campesterol com os encontrados na literatura.

FIGURA 15 - Espectro de RMN ^1H do β -sitosterol-3-o- β -d-glucósido e campesterol

Fonte: O autor (2022)

FIGURA 16 - Espectro de RMN ^{13}C do β -sitosterol-3-o- β -d-glucósido e campesterol



Fonte: O autor (2022)

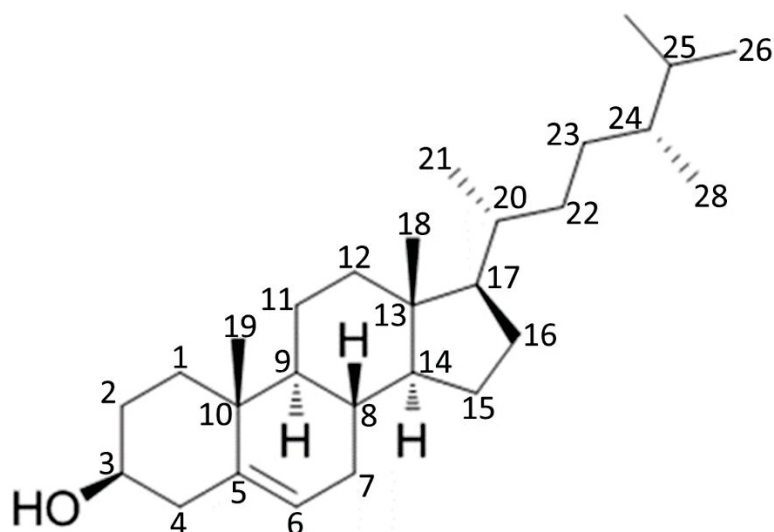
TABELA 9 - Deslocamento químico no espectro de RMN ¹³C do β-sitosterol-3-o-β-d-glucósido e campesterol

Carbono	Campesterol (ANDRADE, 2003)	Campesterol FC243248T	β-sitosterol-3-O-β- D-glucoside (PESHIN, 2017)	β-sitosterol-3-O-β- D-glucoside FC243248T
1	37,3	36,8	36,8	36,8
2	31,7	31,3	29,2	31,3
3	71,8	70,1	76,9	70,1
4	42,3	41,8	39,3	41,8
5	140,8	140,4	140,4	140,4
6	121,7	121,1	121,2	121,1
7	31,9	31,4	31,4	31,4
8	31,9	31,4	31,3	31,4
9	50,2	49,6	49,6	49,6
10	36,5	36,1	36,2	36,1
11	21,1	20,8	20,6	20,8
12	39,8	38,2	38,3	38,2
13	42,3	41,8	41,8	41,8
14	56,8	56,1	56,1	56,1
15	24,3	23,8	23,8	23,8
16	28,3	28,7	27,8	28,7
17	56,1	55,4	55,4	55,4
18	11,9	11,6	11,6	11,6
19	19,4	19,0	19,1	19,0
20	36,2	35,4	35,5	35,4
21	19,4	18,9	18,9	18,9
22	34,0	33,3	33,3	31,4
23	26,1	29,2	25,4	29,2
24	45,9	45,1	45,1	38,2
25	29,2	31,3	28,6	31,3
26	18,8	18,8	19,7	20,5
27	19,4	19,6	18,9	19,6
28	23,1	23,8	22,1	18,5
29	---	---	11,8	11,7
1'	---	---	100,7	100,7
2'	---	---	73,4	73,4
3'	---	---	76,9	76,9
4'	---	---	70,0	70,1
5'	---	---	76,7	76,7
6'	---	---	62,9	61,0

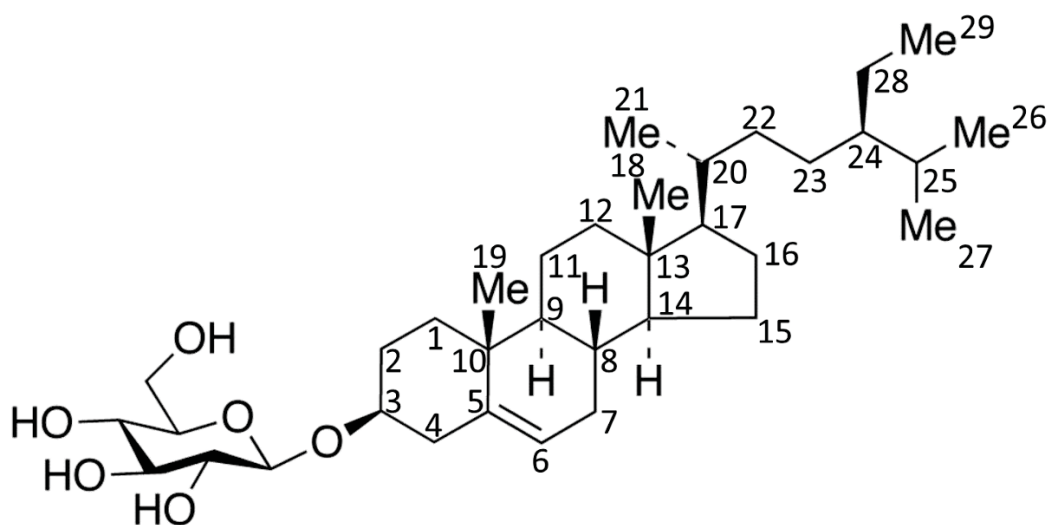
Fonte: O autor (2022)

As Figuras 17 e 18 representam as estruturas químicas das substâncias campesterol e β-sitosterol-3-O-β-D-glucoside, respectivamente.

FIGURA 17 - Estrutura química do campesterol



Fonte: O autor (2022)

FIGURA 18 - Estrutura química do β -sitosterol-3-o- β -d-glucoside

Fonte: O autor (2022)

4.7.2 Composto 2,5-dioxo-4-imididazolidinil urea

A partir da fração acetato de etila dos galhos, foram obtidos cristais os quais foram analisados por difração de raios-X. A estrutura dos cristais foi determinada usando cristais simples e foi refinada pelo método dos mínimos quadrados para dar um índice R final $R1 = 3,2\%$. A estrutura molecular é apresentada claramente na FIGURA 19, conforme determinado por análise de difração de raios-X. A molécula

consiste em um anel de cinco membros e os comprimentos e ângulos de ligação selecionados observam-se na TABELA 8. Os dados de cristal da alantoína natural isolada da espécie *Allophylus semidentatus* foram quase idênticos aos da estrutura cristalina da R, S-alantoína (produzida por oxidação com ácido úrico) obtidos por análise de difração de raios X (MOOTZ, 1965), na qual o cristal encontrado pertence ao grupo espacial P21 / C ($a=8,024$, $b=5,153$, $c=14,797$ Å= $611,00$, $\beta=93,01$), com quatro moléculas na célula unitária, exibindo uma intrincada rede tridimensional de ligação H na qual os três carbonil participam oxigênios, três imidos e dois aminoácidos de hidrogênio. Verificou-se que a unidade monomérica no cristal tem o eixo C4-N10-C11-O14 na conformação cis e uma conformação em torno da ligação C4-N10 que direciona o átomo O14 acima do anel heterocíclico (MOOTZ, 1965).

O composto 2,5-dioxo-4-imididazolidinil urea ocorre amplamente na natureza, onde surge da oxidação do ácido úrico, enquanto o ácido úrico é criado quando o organismo quebra os nucleotídeos da purina. Nos seres humanos, o ácido úrico é o produto da oxidação do metabolismo da purina e é excretado na urina. Na maioria dos outros mamíferos, plantas e microrganismos, a enzima urato oxidase (uricase) oxida o ácido úrico em 5-hidroxiisourato, este último é ainda mais oxidado em alantoína pela enzima 5-hidroxiisourato hidrolase (HIUase) (MOTOJIMA, 1988).

O composto 2,5-dioxo-4-imididazolidinil urea desempenha um papel essencial na assimilação, metabolismo, transporte e armazenamento de nitrogênio nas plantas; suas implicações ecológicas são desconhecidas. Alguns estudos mostraram que a alantoína pode atuar como um agente participante de interações químicas entre plantas e outras espécies (WANG, 2007). Alantoína foi encontrada em inúmeras espécies de plantas (MAKSIMOVIC, 2004). A alantoína quimicamente sintetizada é amplamente aplicada nos setores cosmético e farmacêutico; no entanto, a alantoína natural de origem biológica possui qualidades muito mais altas para uso na indústria cosmética e farmacêutica.

Na Tabela 10, encontram-se os dados reportados por (PARVEEN, 2016) e os dados obtidos do composto.

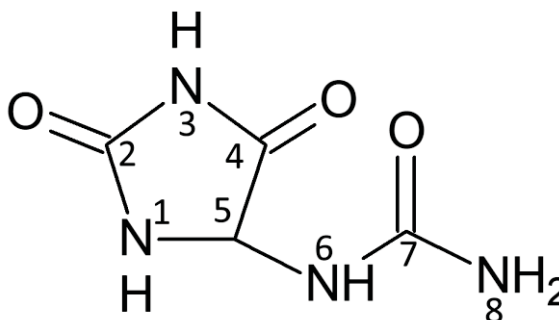
TABELA 10 - Dados cristalográficos da estrutura do 2,5-dioxo-4-imidazolidinil urea

Fórmula empírica	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ (PARVEEN, 2016)	FAE140T (O autor, 2022)
Temperature (K)	293	300
a (Å)	8.0205	8.024
b (Å)	5.14940	5.153
c (Å)	14.7807	14,797
α (deg.)	90.00	90.00
β (deg.)	93.0687	93.01
γ (deg.)	90.00	90.00
Volume (Å ³)	609.58	611.00

Fonte: Parveen (2016)

A Figura 19 representa a estrutura química da substância isolada e identificada.

FIGURA 19 - Estrutura química do 2,5-dioxo-4-imidazolidinil urea (alantoína)



Fonte: O autor (2022)

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Segundo o item 3.9.1.5 a classificação utilizada por (SANTOS et al. 2008) a FAE dos galhos apresentou atividade promissora contra a bactéria *S. aureus* (125 µg.mL⁻¹), enquanto as FH e FC dos galhos e as FAE e FC das folhas apresentaram atividade moderada (250 µg.mL⁻¹) para a mesma bactéria. Em relação à *P. aeruginosa* o EB e a FC dos galhos apresentaram atividade fraca (500 µg.mL⁻¹), assim como as FC e FAE das folhas (500 µg.mL⁻¹). O EB, FH, FC e FAE do caule apresentaram atividade moderada frente à levedura *C. albicans* (250 µg.mL⁻¹), assim mesmo foi a atividade das FC, FAE e FR das folhas (250 µg.mL⁻¹). Esses resultados estão na Tabela 11.

Esses resultados podem estar relacionados com a presença de triterpenos, esteroides e compostos fenólicos observados no perfil químico por CCD, assim como

os metabólitos isolados da planta, os quais apresentam atividade antimicrobiana comprovada em diversos estudos (SOUZA et al. 2014).

TABELA 11 - Distribuição das CIMs dos extratos e frações de *Allophylus semidentatus* testadas contra cepas de referência ATCC

MICROORGANISMO	CIM (mg/mL) EXTRATOS E FRAÇÕES (FOLHA)					CIM (mg/mL) EXTRATOS E FRAÇÕES (GALHOS)				
	EB	FH	FC	FAE	FR	EB	FH	FC	FAE	FR
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	> 1000	> 1000	250	250	> 1000	500	250	250	≤ 125	>1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 1000	> 1000	500	>1000	> 1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1000	> 1000	500	500	> 1000	500	500	>1000	>1000	>1000
<i>C. albicans</i> ATCC 40175	> 1000	500	250	250	250	250	250	250	250	>1000

CIM: concentração inibitória mínima; FH: fração hexânica; FAE: fração acetato etila; EB: extrato bruto; FC: fração clorofórmica; FR: fração remanescente. Fonte: O autor (2022)

O mecanismo antimicrobiano dos triterpenos ainda não está completamente elucidado, mas provavelmente esteja ligado com a ruptura da membrana plasmática, o que ocasiona a morte celular do microrganismo (SALEEM et al. 2010).

4.9 ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.9.1 Ensaio de redução do brometo de 3 (4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazole (MTT) em células da linhagem H295R

Este método é simples e é usado para determinar a viabilidade celular, dado pelo número de células presentes na cultura que é capaz de ser medido pela formação de um composto colorido, devido a uma reação que ocorre nas mitocôndrias das células viáveis (SHAYNE, 1999). O MTT (brometo de 3 (4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difeniltetrazole) é capturado pelas células e reduzido pela enzima mitocôndrica succínica desidrogenase à sua forma insolúvel. O produto da reação é retido nas células e pode ser liberado pela sua solubilização. Desse modo, quantifica-se a quantidade de MTT reduzida por um método colorimétrico, pois ocorre uma mudança na coloração de amarelo para azul como consequência da reação (EISENBRAND, 2002).

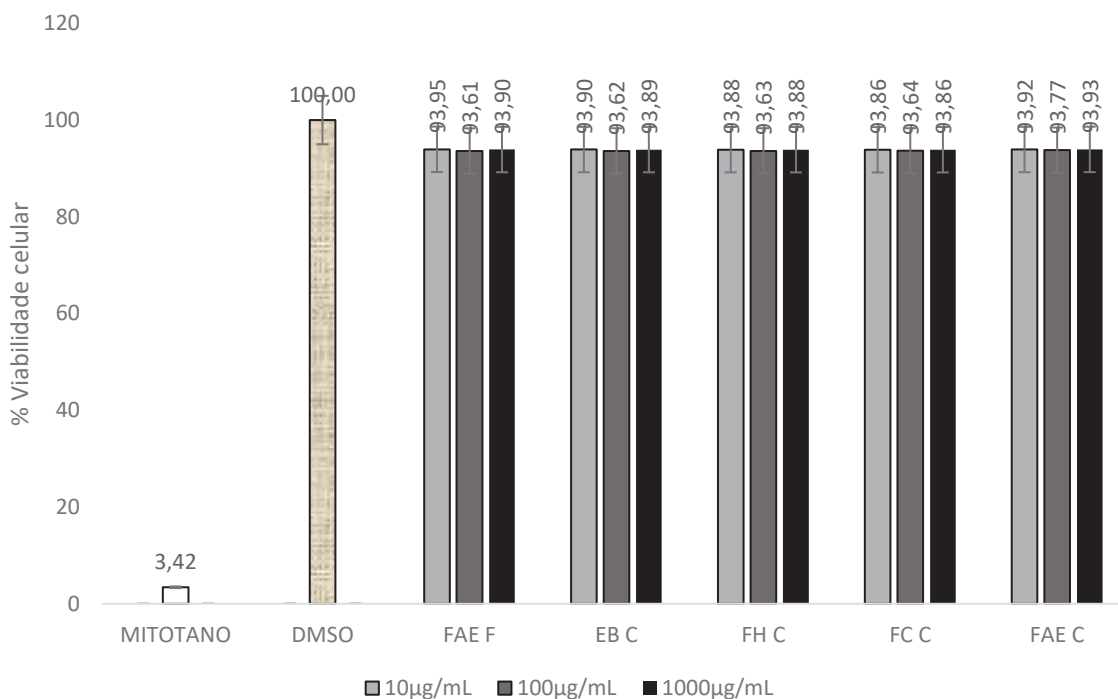
A capacidade das células para reduzir MTT é um indicador da integridade das mitocôndrias e sua atividade funcional é interpretada como uma medida de viabilidade celular. A determinação da capacidade das células para reduzir o MTT para formar após a sua exposição a um composto permite obter informações sobre a toxicidade do composto a ser avaliado (JIMÉNEZ et al. 2007).

A análise antitumoral foi realizada com o FAE das folhas e EB, FH, FC e FAE do caule devido a que nessas frações se encontravam os principais metabólitos com possível atividade antitumoral (flavonoides, esteroides e triterpenos).

O Gráfico 2 mostra a proliferação de células H295R na presença dos extratos e frações testados, quantificando o MTT reduzido por um método colorimétrico (EISENBRAND, 2002). Em concentrações de 100 $\mu\text{L/mL}$ e 1000 $\mu\text{L/mL}$, observou-se uma inibição do crescimento ao redor do 35%, com exceção da fração hexânica dos galhos, esses resultados foram observados às 24 horas de incubação. A maior citotoxicidade de inibição foi de 56,15% e 60,81% para uma concentração de 1000 $\mu\text{L/mL}$ para as frações de acetato de etila e clorofórmica dos galhos, respectivamente.

A presença de esteroides e triterpenos nas FC e FAE dos galhos, como sugerido por CCD, pode apresentar impacto na viabilidade celular de diversas células tumorais (PATOCKA, 2003). Numerosos esteroides têm sido descritos referente a atividade antitumoral, acredita-se que essa atividade esteja ligada a inibição da aromatase, esses inibidores bloqueiam a conversão de andrógeno a estrógeno o qual pode induzir a produção de células tumorais (INÁCIO, 2012). Os triterpenos parecem atuar na inibição de enzimas do DNA o que ocasiona apoptose celular (VECHIA et al. 2009).

GRÁFICO 2 - Viabilidade celular das células CACO-2 frente os extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*



FAE F: Fração Acetato de Etila Folha; EB G: Extrato Bruto Galho; FH G: Fração Hexânica Galho; FCG: Fração Clorofórmio Galho; FAE G: Fração Acetato de Etila Galho. Fonte: O autor (2022)

4.10 ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA

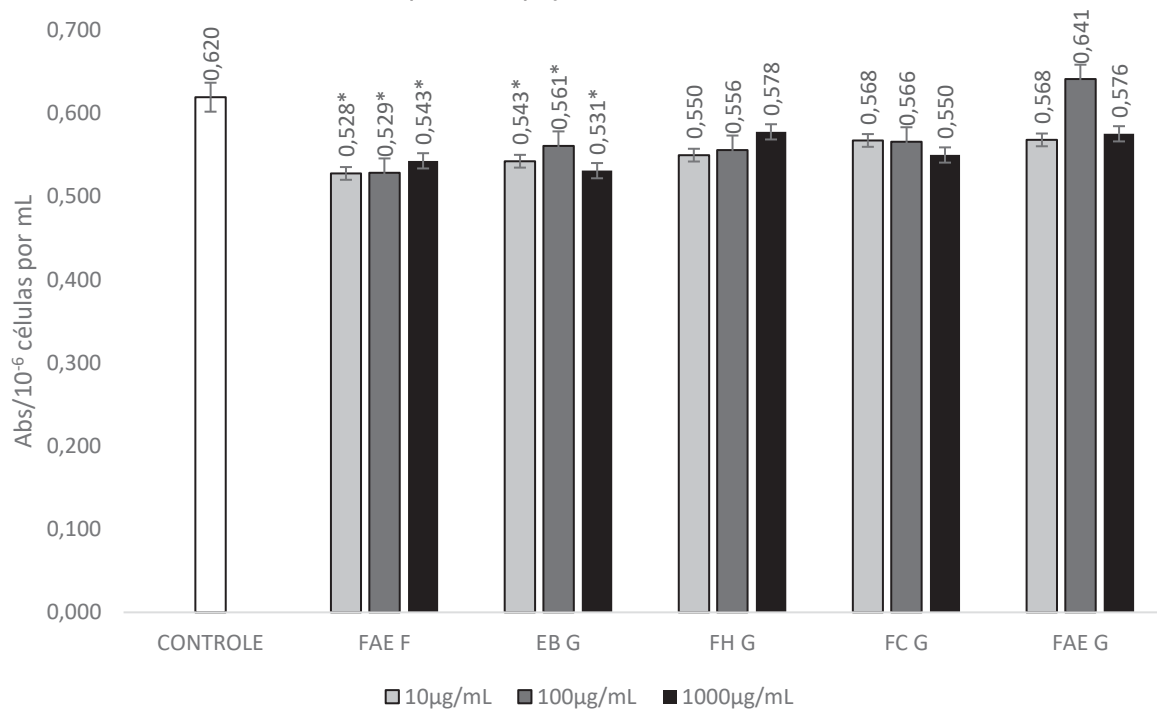
Os macrófagos foram avaliados pela atividade metabólica (peróxido de hidrogênio e ânion superóxido) e indicadores morfológicos, como volume lisossômico, capacidade fagocítica e de adesão.

4.10.1 Atividade fagocítica

A internalização dos compostos presentes nos extratos e frações pelas células fagocíticas ocorre devido a diferentes mecanismos que podem ser divididos em fagocitose (maior que 100 nm), pinocitose (menor que 100 nm) e endocitose mediada por receptor (partícula revestida com um grupo funcional específico) (YEN et al. 2009; ZHAO et al. 2011). O zimosan ativa os receptores tipo TOLL dessas células, causando a internalização das partículas reagentes, demonstrada pelos diferentes valores de absorbância com a presença do corante na solução. A análise de fagocitose dos macrófagos apresentou uma diminuição, estatisticamente significativa, em todos os

extratos e frações quando comparados com o controle positivo, o que representa uma diminuição da resposta imune do tipo 1 gerada classicamente pelos macrófagos ativos (M1). (Gráfico 3).

GRÁFICO 3 - Atividade fagocítica (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*



DM/BC: DMSO/Células; FAE F: Fração Acetato de Etila Folha; EB G: Extrato Bruto Galho; FH G: Fração Hexânica Galho; FC G: Fração Clorofórmio Galho; FAE G: Fração Acetato de Etila Galho.

Fonte: O autor (2022).

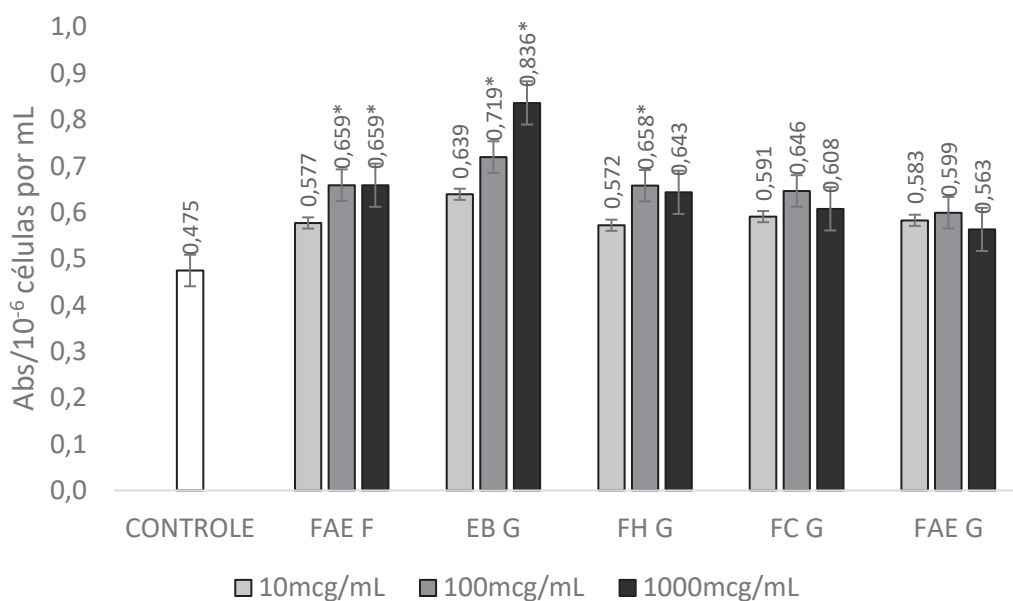
4.10.2 Capacidade de adesão de macrófagos

O Gráfico 4 mostra a atividade de adesão de macrófagos quando foram testados com os extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*. Quando foram testadas o extrato e as diferentes frações evidenciou-se um aumento na capacidade de adesão dos macrófagos quando comparadas com o branco. Os compostos fenólicos presentes na análise sistemático fitoquímico e no perfil químico por CCD, são conhecidos por possuir atividade antitumoral, estes podem atuar na adesão celular, migração e angiogênese das células (ANDROUTSOPOULOS et al., 2010; WENG; YEN, 2012). Os compostos fenólicos também são conhecidos por prevenir danos ao DNA, pelo combate aos radicais livres e diminuição do risco de iniciação do câncer (SCHROETER et al., 2002; CAMARGO et al., 2014).

As frações que apresentaram um maior aumento foram a FAE das folhas e o EB dos galhos na concentração de 1000µg/mL. Nas outras frações foram ligeiramente maiores dos controles.

Os macrófagos são uma fonte importante de citocinas inflamatórias que induzem a expressão de selectinas endoteliais, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no endotélio que se liga às integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$ expressas nos leucócitos. A ausência de IL6 nos macrófagos reduziu significativamente a indução da expressão de VCAM-1 e P-selectina (ZHANG et al. 2011). Segundo Yen (2009) relata que a expressão gênica pró-inflamatória da interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) pode ser sub-regulada por exposição a longo prazo de algumas substâncias (24 a 72h) em macrófagos J774 A1, o que pode explicar o aumento na capacidade de adesão de macrófagos.

GRÁFICO 4 - Atividade de adesão de macrófagos (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*



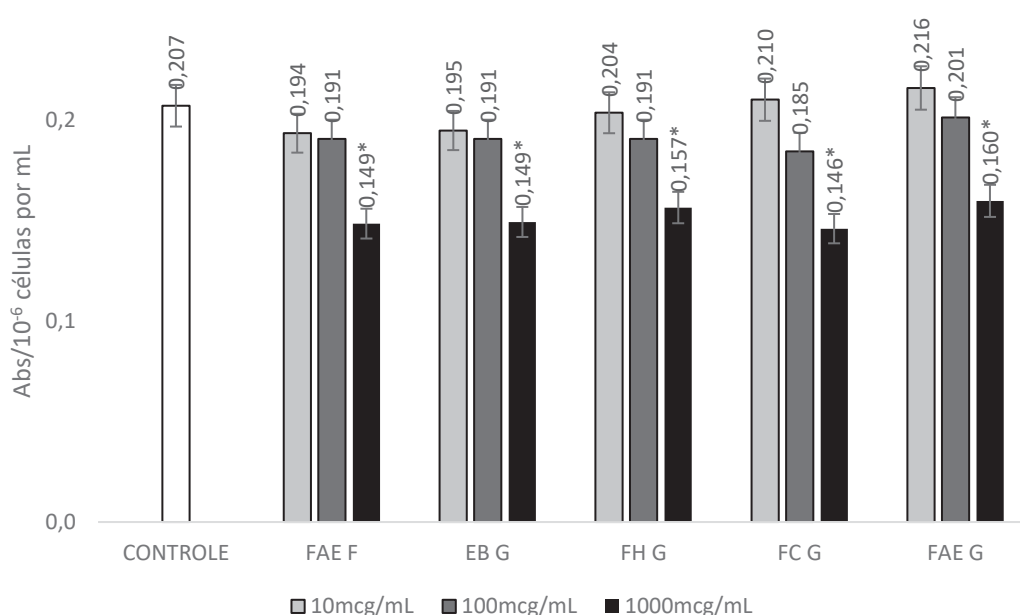
Controle DM/BC: DMSO/Células; FAE F: Fração Acetato de Etila Folha; EB G: Extrato Bruto Galho; FH G: Fração Hexânica Galho; FC G: Fração Clorofórmio Galho; FAE G: Fração Acetato de Etila Galho.
Fonte: O autor (2022).

4.10.3 Retenção de volume lisossomal

A análise da retenção lisossomal mostrou que apenas nas concentrações de 1000 µg/mL apresentaram uma redução ao redor do 20% (Gráfico 5). Uma diminuição do volume lisossomal significa que o substrato está sendo digerido mais rapidamente que o controle, que se traduz como um aumento na atividade lisossomal. Alguns

estudos descobriram que compostos com prata foram encontrados em lisossomos como aglomerados e altos níveis de íons Ag são liberados na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode explicar o mecanismo de toxicidade em células de mamíferos, como células de macrófagos de camundongos (BAIZHONG et al. 2015; HSIAO et al. 2015). A captação do corante catiônico vermelho neutro, que se concentra nos macrófagos, foi utilizada para avaliar o volume dos macrófagos segundo Pipe et al. (1995) modificado por Bonatto et al. (2004).

GRÁFICO 5 - Atividade de retenção de volume lisossomal (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*



DM/BC: DMSO/Células; FAE F: Fração Acetato de Etila Folha; EB G: Extrato Bruto Galho; FH G: Fração Hexânica Galho; FC G: Fração Clorofórmio Galho; FAE G: Fração Acetato de Etila Galho.
Fonte: O autor (2022).

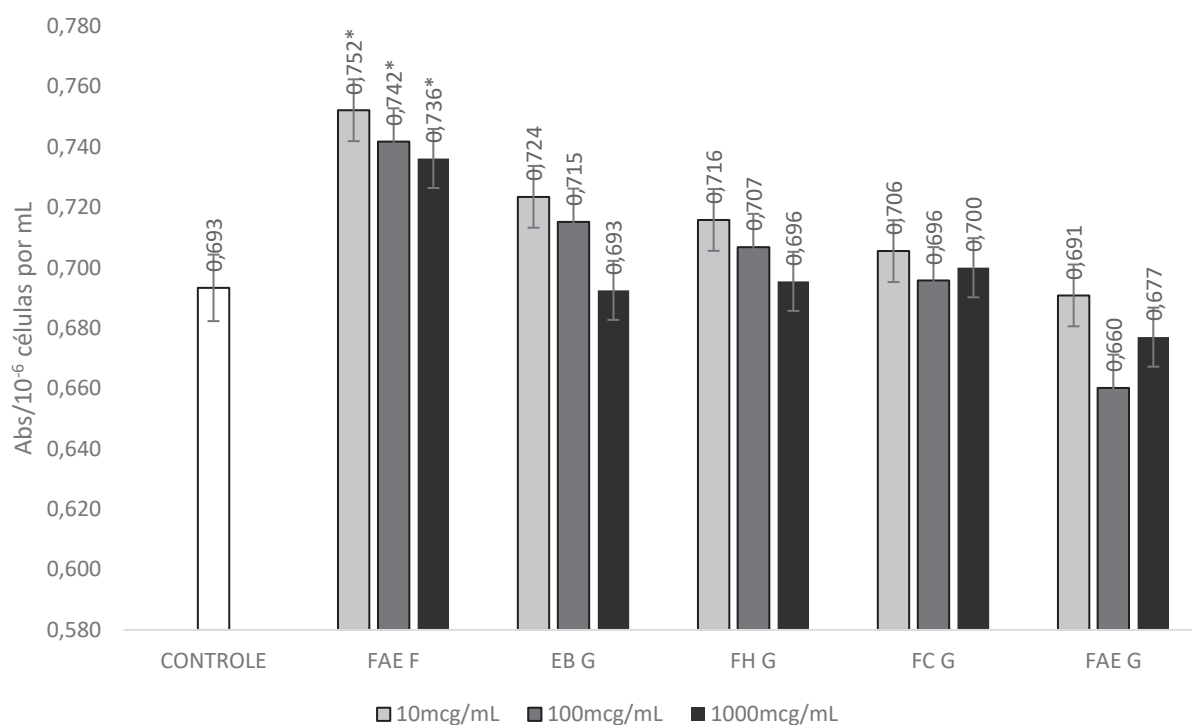
4.10.4 Produção de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O_2^-) são importantes espécies reativas de oxigênio (ROS) envolvidas na resposta à inflamação e têm sido relatados como um dos mecanismos de toxicidade (CHAIRUANGKITTI et al. 2013; WANG et al. 2017).

Os resultados do ensaio de produção de peróxido de hidrogênio mostraram um aumento na produção de peróxido de hidrogênio, com exceção da fração acetato de etila dos galhos, porém, a fração de acetato de etila das folhas mostrou o maior aumento (10 e 20%), como pode-se observar no Gráfico 6. Uma redução interessante

ocorreu na concentração de 1000 µg/mL para a fração acetato de etila dos galhos, e pode estar relacionada com o início de efeitos citotóxicos (KLOET et al. 2016).

GRÁFICO 6 - Atividade de produção de peróxido de hidrogênio (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*



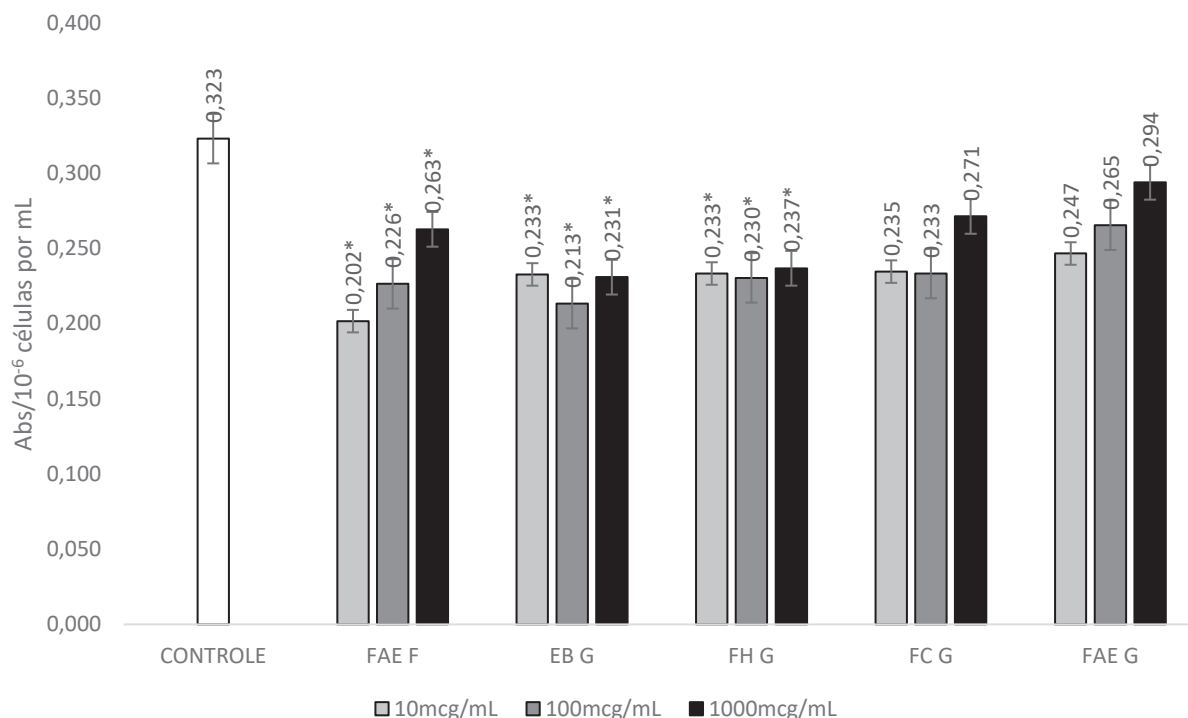
DM/BC: DMSO/Células; FAE F: Fração Acetato de Etila Folha; EB G: Extrato Bruto Galho; FH G: Fração Hexânica Galho; FC G: Fração Clorofórmio Galho; FAE G: Fração Acetato de Etila Galho.
Fonte: O autor (2022).

4.10.5 Produção de ânion superóxido

A análise da produção de ânion superóxido pelos macrófagos resultou em resultados significativos quando as células foram tratadas com os extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus* (Gráfico 7). Todas as frações tiveram uma diminuição estatisticamente significativo a produção de ânion superóxido em comparação com o controle.

Kloet et al. (2016) relataram uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio quando células (RAW 264,7) foram tratadas com nanopartículas de prata (50 nm) de 10 a 200 µg/mL por 24 h. Os autores sugeriram que provavelmente processos citotóxicos iniciaram ou progrediram mais rapidamente que a geração de espécies reativas de oxigênio, o que poderia explicar os resultados.

GRÁFICO 7 - Atividade de produção de ânion superóxido (linha celular RAW 267.4) tratados com extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*



DM/BC: DMSO/Células; FAE F: Fração Acetato de Etila Folha; EB G: Extrato Bruto Galho; FH G: Fração Hexânica Galho; FC G: Fração Clorofórmio Galho; FAE G: Fração Acetato de Etila Galho.
Fonte: O autor (2022).

4.14 LINHAGENS B16F1 E B16F10

Foi avaliada a viabilidade celular das células B16F1 com os extratos e frações da espécie *A. semidentatus* mediante os métodos de MTT, vermelho neutro e cristal violeta, com tempos de exposição de 24 e 48hrs.

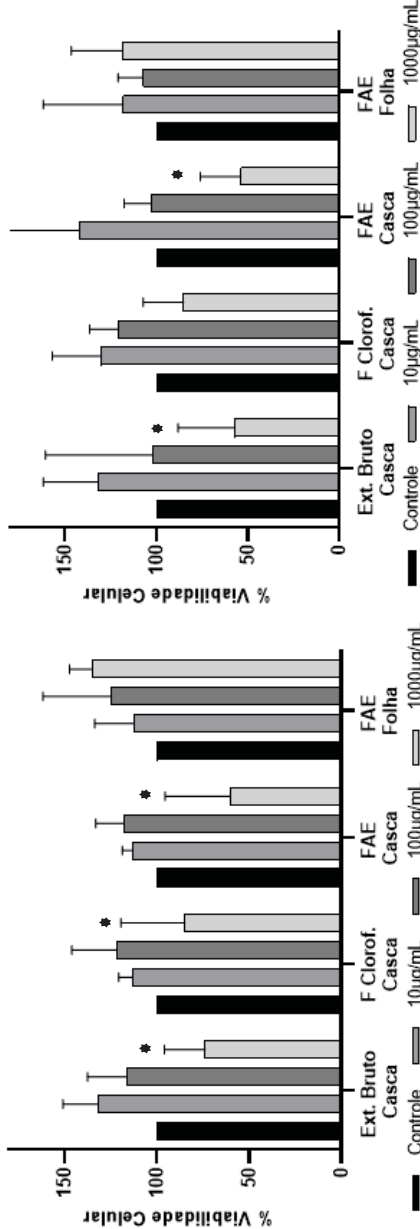
No Gráfico 8, na avaliação da viabilidade celular da linhagem B16F1 pelo método de MTT a um tempo de exposição de 24hrs observou-se que as FAE, o EB e FC da casca, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, foram as que apresentaram uma maior diminuição da viabilidade (entre 25 e 50%) quando comparadas com o controle. Porém, quando observamos o mesmo experimento a um tempo de exposição de 48hrs, as viabilidades celulares dessas mesmas frações diminuíram em valores do 50 até 20%. Isso pode ser devido a que o tempo de exposição do extrato e frações foi maior aumentando a interação com as células. Essa diminuição também pode-se dever ao resultado obtido na análise por CCD, onde a FAE da casca deu reação positiva para esteroides e triterpenos. Alguns estudos atribuem ao composto friedelina atividade citotóxica e ter efeito antiinflamatório (MIRANDA, 2015).

Segundo ROSA, et al. (2014) a imunossupressão é desejável no tratamento de doenças autoimunes, inflamatórias e crônicas. Os macrófagos são células que participam diretamente da inflamação local, estudos demonstram que a inibição ou estimulação da fagocitose, capacidade de adesão, retenção lisossomal, ânion peróxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico podem alterar as respostas inflamatórias. As substâncias que atuam na inibição desses fatores podem atuar como anti-inflamatórias (WANG et al., 2017; LIU et al., 2018).

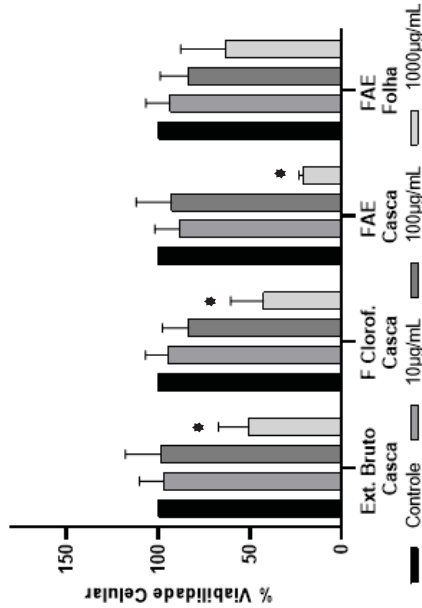
GRÁFICO 8 - Viabilidade celular da linhagem B16F1 pelos métodos de MTT, vermelho neutro e cristal violeta com tempo de exposição de 24 e 48 hrs tratados com extratos e frações da espécie *Allophylus semidentatus*

*

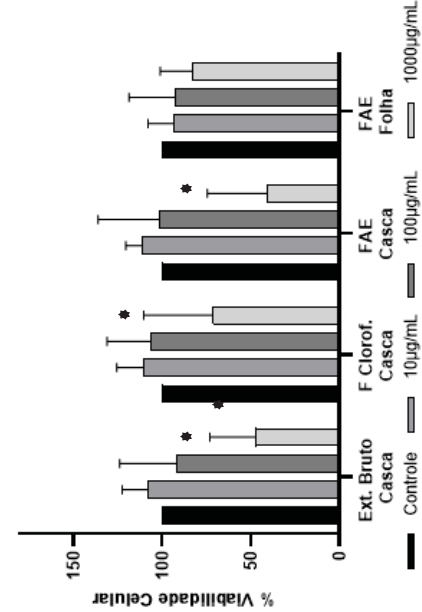
% Viabilidade celular da linhagem B16F1 pelo método de MTT com tempo de exposição de 24h
Vermelho neutro com tempo de exposição de 24h
Cristal violeta com tempo de exposição de 24h



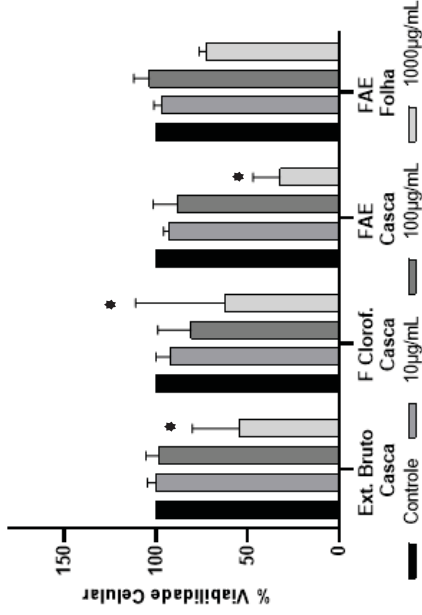
% Viabilidade celular da linhagem B16F1 pelo método de MTT com tempo de exposição de 48h



% Viabilidade celular da linhagem B16F1 pelo método Vermelho neutro com tempo de exposição de 48h



% Viabilidade celular da linhagem B16F1 pelo método Cristal violeta com tempo de exposição de 48h



Fonte: O autor (2022)

Quando observamos os resultados da viabilidade celular das células B16F1 pelo método vermelho neutro, os extratos e frações que apresentaram uma maior diminuição da viabilidade celular foram as FAE, EB e FC da casca, na concentração de 1000 µg/mL, ao redor de um 50% em um tempo de exposição de 24hrs. Porém, ao observar o mesmo experimento em um tempo de exposição de 48hrs não houve uma diferença estatisticamente significativa (em relação a FAE, EB e FC da casca, na concentração de 1000µg/mL). Por último, quando analisamos os resultados do método do cristal violeta, no tempo de exposição de 24hrs, não houve diminuição da viabilidade celular, pelo contrário teve um aumento na proliferação de células, porém, o mesmo experimento com um tempo de exposição de 48hrs mostrou um resultado similar aos outros dois métodos, onde a FAE, EB e FC da casca, na concentração de 1000µg/mL foram as que apresentaram uma maior viabilidade celular quando comparados com os controles.

Também foi avaliada a viabilidade celular das células B16F10 com os extratos e frações da espécie *A. semidentatus* mediante com os métodos de MTT, vermelho neutro e cristal violeta, com tempos de exposição de 24 e 48hrs (Gráfico 9).

Na avaliação da viabilidade celular da linhagem B16F10 pelo método de MTT a um tempo de exposição de 24hrs observou-se que as FAE, o EB e FC da casca, (ao igual que na linhagem B16F1) na concentração de 1000 µg/mL, foram as que apresentaram uma maior diminuição da viabilidade (entre 25 e 70%) quando comparadas com o controle. Porém, quando observamos o mesmo experimento a um tempo de exposição de 48hrs, as viabilidades celulares dessas mesmas frações diminuíram em valores inferiores ao 30%.

Os resultados da viabilidade celular das células B16F10 pelo método vermelho neutro, os extratos e frações que apresentaram uma maior diminuição da viabilidade celular foram as FAE e EB da casca, na concentração de 1000 µg/mL, ao redor de um 75% em um tempo de exposição de 24hrs. Porém, ao observar o mesmo experimento em um tempo de exposição de 48hrs houve uma diferença significativa na concentração de 1000 µg/mL para as mesmas frações, chegando a valores perto ao 10% no caso da FAE da casca.

Por último, os resultados do método do cristal violeta, no tempo de exposição de 24hrs, não houve diminuição da viabilidade celular, pelo contrário teve um aumento na proliferação de células, porém, o mesmo experimento com um tempo de exposição de 48hrs mostrou um resultado similar aos outros dois métodos, onde a FAE, EB e FC da casca, na concentração de 1000 µg/mL foram as que apresentaram uma maior viabilidade celular quando comparados com os controles.

5 CONCLUSÕES

O material vegetal seco das partes aéreas de *Allophylus semidentatus*, apresentou o teor de umidade e cinzas dentro dos limites permitidos pela farmacopeia brasileira. No ensaio de termogravimetria, observou-se que o processo de decomposição de compostos metabólicos secundários iniciou-se a 120 °C.

É a primeira vez que se estuda a morfoanatomia e histoquímica de *Allophylus semidentatus*. Estudos semelhantes a este são necessários para outras espécies de *Allophylus*, a fim de desenvolver uma descrição botânica das espécies do gênero e família.

A partir das partes aéreas de *Allophylus semidentatus*, obteve-se também, o extrato etanólico bruto (EB), fração hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e residual (FR). No estudo fitoquímico preliminar dos extratos e frações, confirmou-se a presença de **taninos, alcaloides, flavonoides, esteroides, triterpenos e cumarinas**. Enquanto, a análise da composição fitoquímica realizada através da técnica de CCD confirmou a presença de esses metabolitos.

Em coluna cromatográfica aberta, da FAE da casca, foi possível isolar dois compostos, identificados por RMN ¹H e RMN ¹³C, conhecidos como **campesterol e β-sitosterol-3-O-β-D-glucoside**, classificado como esteroides. Também se isolou outro composto da FAE dos galhos que foi possível identificar por difração de raios-X, conhecido como **alantoína**. Resultados que concordam com as análises fitoquímicos preliminares onde se confirmou a presença de triterpenos e esteroides.

A partir do material vegetal seco, obteve-se 0,75% de rendimento de óleo essencial, o qual apresentou predominância de sesquiterpenos em sua composição química, sendo que os constituintes químicos majoritários encontrados, foram os sesquiterpenos **Germacreno D, Bicyclgermacreno e δ-Cadineno**.

No ensaio antimicrobiano, os extratos e frações demonstraram atividade antibacteriana moderada frente a microrganismos como **S. aureus e C. albicans**. Entretanto os extratos e frações não demonstraram atividade antibacteriana contra cepas de **E. coli**. Mesmo que esses resultados sejam moderados, mas tendo verificado através do estudo fitoquímico preliminar e CCD a presença de compostos antioxidantes como os flavonoides, eles podem ser direcionados para estudos *in vivo*, onde essas características podem ser testadas.

As FAEF, EBG, FHG, FCG e FAEG não apresentaram atividade de imunossupressão dos macrófagos (RAW 264.7) nas diferentes concentrações testadas. **Não houve estimulação da produção de óxido nítrico** com nenhuma das frações nem extratos testados, o que caracteriza como **não imunoestimulação**.

A viabilidade celular pelo método de MTT das células **H295R foi reduzida** por todos os extratos testados em diferentes concentrações, com destaque para a FAE e FC dos galhos. Enquanto, a viabilidade celular das células B16F1 e **B16F10 foi reduzida** principalmente pelo EB, FAE e FC da casca. Todos os extratos testados não apresentaram atividade significativa frente a linhagem CACO-2.

O estudo *in vitro* demonstrou que a espécie *Allophylus semidentatus* tem efeitos citotóxicos contra as linhas celulares de câncer testadas (H295R, B16F1 e B16F10). A diminuição do número de células, alterações nas características morfológicas, pode sugerir que o mecanismo envolvido nesse efeito possa estar relacionado à apoptose. Os resultados frente às células CACO-2 e os macrófagos RAW 264.7 demonstraram que as amostras testadas se mostraram menos tóxicas, sugerindo que as frações testadas poderiam ter compostos mais promissores no tratamento do câncer.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por tratar-se de um trabalho realizado com uma espécie pouco estudada, *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk., os resultados obtidos são preliminares e necessitam de estudos complementares, mas acreditamos que os extratos e frações da *Allophylus semidentatus* (Miq.) Radlk., apresentam grande potencial terapêutico, e que o estudo contribui para estimular novas investigações e futuras descobertas.

Esta pesquisa pode incentivar outros pesquisadores a estudar este gênero na busca por novas substâncias, que apresentem atividades biológicas e possam ter interesse na área científica. Mais estudos, especialmente experimentos *in vivo*, são necessários para provar que esta planta pode ser um agente promissor para fortalecer as terapias antineoplásicas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass spectrometry. 4. ed. **Carol stream IL: Allured Publishing**, 2007.
- ALVES, L.F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v.5, p.450-513, 2018.
- AMARAL, M.P.H.; VIEIRA, F.P.; LEITE, M.N.; AMARAL, L.H.; PINHEIRO, L.C.; FONSECA, B.G.; PEREIRA, M.C.S.; VAREJÃO, E.V. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. SciElo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.19, n. 2b, p. 607-611. 2009. ISSN 1981-528X.
- ANDRADE, M. R. **Alcaloides de Rutaceae: química e atividade biológica**. Tese de Doutorado. UFSCar. São Carlos, 2003.
- ANDROUTSOPOULOS, V. P.; PAPAKYRIAKOU, A.; VOURLOUMIS, D.; TSATSAKIS, A. M.; SPANDIDOS, D. A. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 9–20, 2010.
- APG III – ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the order and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 161: 105-221. 2009.
- ARAI, Y.; MIYAYAMA, T.; HIRANO, S. Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages. **Toxicology**, v. 328, p. 84-92, 2015.
- ASSIS, P., THEODORO, P., PAULA, J., ARAÚJO, A. Antifungal ether diglycosides from *Matayba guianensis* Aublet. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 24. P. 1414–1416. 2014.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- BAIZHONG, L., WELLE, B.J.H. & KLAASSEN, R.K.W.M. Wood anatomy of trees and shrubs from China VII. Sapindaceae. **IAWA Journal** 16, 191–215. 1995.
- BARBOSA, C.V.O., COELHO, R.L.G. & VIANA, P.L. (2018). **Flora das cangas da Serra dos Carajás**, Pará, Brasil: Sapindaceae. *Rodriguésia*, 69, 229–239. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869121> Acesso em: 11 ago. 2021.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, p. 121–276, 1976.

BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ALBUQUERQUE, S.; MAGALHÃES, C. M. I.; PAGNOCCA, F. C.; **Phytomedicine**, 8, 121. 2001.

BONATTO, S. J. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular immunology**, v. 231, n. 1, p. 56-62, 2004.

BUERKI, S.; FOREST, F.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; CALLMANDER, M.W.; NYLADER, J.A.; HARRINGTON, M.; SANMARTÍN, I.; KÜPFER, P. & ALVAREZ, N. Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at sub-familial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 51: 238-258. 2009.

BUERKI, S.; LOWRY II, P.P.; ALVAREZ, N.; RAZAFIMANDIMBISON, S.G.; KÜPFER, P. & CALLMANDER, M.W.. Phylogeny and circumscription of Sapindaceae revisited: molecular sequence data, morphology and biogeography support recognition of a new family, Xanthoceraceae. **Plant Ecology and Evolution**, 143(2): 148-159. 2010.

BUERKI, S.; FOREST, F.; CALLMANDER, M.W.; LOWRY II, P.P.; DEVEY, D.S. & MUNZINGER, J. Phylogenetic inference of New Caledonian lineages of Sapindaceae: molecular evidence requires a reassessment of generic circumscriptions. **Taxon**, 61(1): 109-119. 2012.

CAMARGO, A. DE; D'ARCE, M.; BIASOTO, A.; SHAHIDI, F. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, 2014.

CARVALHO, J.L.S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do Nasturtium officinale R. BR., BRASSICACEAE**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2001.

CHAIRUANGKITTI, P. et al. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 1, p. 330-338, 2013.

CHOI, H. et al. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 27, n. 1, p. 31-44. 2006.

CLSI. M07-A10: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne, PA, USA Clinical and Laboratory Standards Institute - Twenty-Third Informational Supplement, 2015.

CLSI. M100-S27: **Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th ed; CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute - Twenty-Third Informational Supplement; 2017.

CONSTANTIN MB, SARTORELLI P, LIMBERGER R, HENRIQUES AT, STEPPE M, FERREIRA MJP, OHARA MT, EMERENCIANO VP, KATO MJ. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. **Planta Med** 63: 771-773. 2001.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. 1262 p. 1981.

CUNHA NETO, I.L., MARTINS, F.M., SOMNER, G.V. & TAMAIO, N. Secretory structures in stems of five lianas of Paullinieae (Sapindaceae): Morphology and histochemistry. **Flora** 235, 29–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2017.09.001>. 2017.

DE KRAKER, J. –W.; FRANSSEN, M. C. R.; DE GROOT, A.; KÖNIG W. A.; BOUWMEESTER, H.; J. **Plant Physiol.**, 117, 1381. 1998.

DEUSCHLE, R. A. N.; **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2003.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. Ed. São Paulo; ed. UNESP, 2002.

EISENBRAND G, POOL-ZOBEL B, BAKER V, BALLS M, BLAAUBOER B.J, BOOBIS A. Methods of in vitro toxicology. **Food Chem Toxicol**; 40(2):193-236. 2002.

Farmacopeia Brasileira. 6a Edição, Volume 1. Agência Nacional de Vigilância. Brasil 2020

FERNANDES, M., DE SIQUEIRA, G., LAZZAROTTO, S., CARVALHO, M., LACERDA, L., LAZZAROTTO, , M., QUEIROZ, D., MIGUEL., O. **Avaliação termoanalítica de óleos essenciais de eucalyptus spp suscetíveis e resistentes ao psilídeo-de concha**. VII SiAT – Simpósio de Análise Térmica Unesp - Bauru/SP, p209- 212. 2015.

FOGLIANI, B., RAHARIVELOMANANA, P., BIANCHINI, J. Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. **Phytochemistry** 66 P. 241–247. 2005.

GACHET, M., KAISER, M., BRUN, R., ZEHL, M., KELLER, W., **Antiparasitic Compounds from *Cupania cinerea* with activities against *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei* Rhodesiense**. 74, p. 559–566. 2011.

GEORGE, M.V. & HARI, N. (2020). Morpho-anatomical study of leaf and stem of *Sapindus trifoliatus* L., as a taxonomical identification tool. **Life Sciences International Research Journal** 7, 39–45.

GUARIM NETO, G. & SANTANA, S.R. **A família Sapindaceae para a flora do estado do Mato Grosso do Sul**. In: III Simpósio Sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal: Os Desafios do Novo Milênio: Anais...:1-46. Corumbá, MS. 2000.

HARRINGTON, M.G.; EDWARDS, K.J.; JOHNSON, S.A.; CHASE, M.W. & GADEK, P.A.. Phylogenetic inference in Sapindaceae sensu lato using plastid matk and rbcL DNA sequences. **Systematic Botany**, 30(2): 366-382. 2005.

HOLETZ, F. B. et al. **Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(7): 1027-1031, October 2002.

HSIAO, I.-L. et al. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra-and extracellular silver speciation analysis. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 6, p. 3813-3821, 2015.

INÁCIO, J. P. F. **Esteróides antitumorais : a funcionalização seletiva do anel D de esteróides da série pregnano no desenvolvimento de potenciais agentes anticancerígenos**, Dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior., 2012.

JIMÉNEZ N, GONZÁLEZ M, FERNÁNDEZ C, LÓPEZ J. Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina. **Biomecánica**; 15 (1):63-71. 2007.

JOHANSEN, D.A. (1940). **Plant microtechnique**. New York, USA: McGraw Hill Book.

JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: **Companhia Editora Nacional**. 777 p. 2002.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**. 612 p. 2008.

KLOET, S. K. **In vitro assays for hazard identification of nanoparticles**. Wageningen University 2016.

KRAUS, J. E., SOUSA, H. C., REZENDE, M. H., CASTRO, N. M., VECCHI, C., & LUQUE, R. (1998). Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechnic & Histochemistry**, 73, 235–243. <https://doi.org/10.3109/10520299809141117>. Acesso em: 11 ago. 2019.

KUENG W., SILBER E., EPPENBERGERU. Quantification of cells cultured on 96 well plates. **Anal Biochem**. 1989; (1):16-9

LEMOES, J. A. et al. **Antifungal activity from Ocimum gratissimum L. towards Cryptococcus neoformans**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(1): 55-58, February 2005.

LIU, R.-T.; ZHANG, M.; YANG, C.-L.; et al. Enhanced glycolysis contributes to the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis. **Journal of neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 51, 2018.

MAKSIMOVIC, Z.; MALENOVIC, A.; JANCIC, B.; KOVACEVIC, N. Quantification of allantoin in various *Zea mays* L. hybrids by RP-HPLC with UV detection. **Pharmazie**, 59, 524–527. 2004.

MEDINA, M.C., SOUSA-BAENA, M.S., PRADO, E., ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P., DIAS, P. & DEMARCO, D. Laticifers in Sapindaceae: Structure, Evolution and Phylogenetic Importance. **Frontiers in Plant Science** 11, 612985. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.612985>. 2021.

METCALFE, C.R. & CHALK, L.. Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy. Oxford, England: **Clarendon Press**. 1950.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy. Oxford, England: **Clarendon Press**. 1950.

MEYER ALBIERO AL, PEREIRA AV DE G. **A importância das plantas medicinais na atenção básica: oficinas de aprendizagem**. arqmudi [Internet]. 13º de junho de 2016 [citado 28º de setembro de 2022];19(2-3):23-2. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/30055>

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIRANDA, M. A. *Solanum cernuum* Vell: **Estudo fitoquímico, avaliação das atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e obtenção do extrato seco por spray dryer**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

MONCADA, Y., **Estudio fitoquímico, actividades biológicas y antioxidantes de las hojas, tallo y del aceite esencial de la especie Allophylus semidentatus (miq.) Radlk. (Sapindaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2018.

MONTEIRO OS, SOUZA AG, SOLEDADE LEB, QUEIROZ N, SOUZA AL, FILHO MOUCHREK VE, VASCONCELOS AFF. Chemical evaluation and thermal analysis of the essential oil from the fruits of the vegetable species *Pimenta dioica* Lindl. **J Therm Anal Calorim**. 106:595–600. 2011.

MOREIRA, E. A. **Marcha sistemática de análise em fitoquímica**. Tribuna Farmacêutica, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOTOJIMA, K.; GOTO, S.; KANAYA, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat liver uricase. **J. Biol. Chem**. 263, 16677–16681. 1988.

MOOTZ, D. The crystal structure of DL-allantoin. **Acta Cryst.**, 19, 726–734. 1965.

MUNDO, S.R. & DUARTE, M.R. Caracteres morfoanatômicos de folha e caule de *Cupania vernalis* Cambess., Sapindaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19, 599–606. 2009.

OLADOSU, I. A., BALOGUN, S. O., ADEMOWO G. O., **Phytochemical screening, antimalarial and histopathological studies of *Allophylus africanus* and *Tragia benthamii***, Chinese Journal of Natural Medicines, p. 371-376. 2013

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M., PAULA, C.S.; VERDAM, M.C.; CAMPOS, R.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Evaluation of antioxidant potential against lipid oxidation and preliminary toxicity of extract and fractions obtained from the fronds of *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.17, n.4, p.614-621, 2014.

PADILLA, F., RINCÓN, A., BOU-RACHED, L. **Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 58 N° 3, 2008.

PASSOS, C.; RODRIGUEZ, R.; FERREIRE, C.; SOARES, D.; SOMNER, G.; Anti-Leishmania amazonensis activity of Serjania lethalis A. St.-Hil. **Parasitology International**, Vol. 66, p. 940-947, 2017.

PATOCKA, J. **Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification**. 2003.

PESHIN, T.; KAR, H. Isolation and Characterization of β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside from the Extract of the Flowers of *Viola odorata*. **British Journal of Pharmaceutical Research**. 16(4): 1-8, 2017.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.

PIPE, R.; COLES, J.; FARLEY, S. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech Fish Immunol**, v. 4, p. 93-100, 1995.

POONAM, D., PUSHPESH, K. M., RAKESH, M. VINAY, S. C., GAUTAM, P., *Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity. **Journal Ethno-Pharmacology**. p. 361-366. 2005.

RAJ, A. J. et al. Indigenous uses of ethnomedicinal plants among forest-dependent communities of Northern Bengal, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1–28, 2018.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, de 13 de maio de 2014.Ministério da Saúde

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, jun. 2008.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 6, p. 1685-1701. 2008.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 2, p. 238–254, 2010.

SANTOS, N. DE Q. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64–70, 2004.

SANTOS AS, ALVES SM, FIGUEIREDO FJC. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico 99. 2006.

SANTOS, A. O. et al. **Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, maio 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SONMER, G. V., **Sapindaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico de Rio de Janeiro. 2013

SOMNER, G. V., FERRUCCI, M. S., ACEVEDO-RODRIGUEZ, P., COEHLO, R. L. G. 2015. ***Allophylus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20875> Acesso: Outubro 2018.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 861–880, 2002.

SOMNER, G.V., FERRUCCI, M.S., ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P., COELHO, R.L.G. & PERDIZ, R. 2014. **Sapindaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em:<<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB216>>. Acesso em: Junho 2014.

SHAYNE G.C. Alternatives to *in vivo* studies in toxicology. In: Balantyne B, Marrs T, Syversen T. **General and applied toxicology**, vol 1. USA: Grove's dictionaries Inc;. p.178-182. 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; SINGER. O. **Camomila**. Monografia. Curso de Especialização em Ciências. 2007.

SOUZA, A. MARIA; ARMSTRONG, L.; MERINO, F. J. Z.; et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862–867, 2014.

TOREQUI, I., *In vitro* antimicrobial and brine shrimp lethality of *Allophylus cobbe* L. 2012. Disponível em: <http://www.ayujournal.org>. Visitado: 06/08/2019.

TREVIZAN, L.N., NASCIMENTO, K., SANTOS, J., KASSUYA, C., CARDOSO, C. **Anti-inflammatory, antioxidante and anti-Mycobacterium tuberculosis activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk.** Journal of Ethnopharmacology 192 p. 510–515. 2016. TROPICOS Disponível em: <http://www.tropicos>.

TIRLONI, C.A.S., SILVA, A.O., PALOZI, R.A.C., VASCONCELOS, P.C.P., SOUZA, R.I.C., SANTOS, A.C., ALMEIDA, V.P., BUDEL, J.M., SOUZA, L.M. & GASPAROTTO JUNIOR, A. (2018). Biological Characterization of an Edible Species from Brazilian Biodiversity: From Pharmacognostic Data to Ethnopharmacological Investigation. **Journal of Medicinal Food** 21, 1276–1287. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0010>.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova*, v. 32, n. 5, p. 1245–1252, 2009.

VENTRELLA, M.C., ALMEIDA, A.L., NERY, L. & COELHO, V.P.M. (2013). Métodos histoquímicos aplicados às sementes. **Viçosa**, BR: UFV

WANG, L. et al. Characterization of silver nanoparticles biosynthesized using crude polysaccharides of *Psidium guajava* L. leaf and their bioactivities. **Materials Letters**, 2017.

WANG, P.; KONG, C.H.; HU, F.; XU, X.H. Allantoin involved in species interactions with rice and other organisms in paddy soil. **Plant Soil**, 296, 43–51. 2007.

WENG, C.-J.; YEN, G.-C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 1, p. 76–87, 2012.

WEST ANTHONY R., Basic Solid State Chemistry, 2nd Edition, Wiley, London, 2001, pp. 203-210.
<http://tetra.simtech.a-tar.edu.sg/afbsUpload/FactSheet/ICES/TA%20Analyzer.pdf>

WIPO. World Intellectual Property Organization. **World Intellectual Property Indicators**. 2013. (WIPO Publication nº 941E/2013). Disponível em: . Acesso em: 15 agosto 2022.

YEN, H. J.; HSU, S. H.; TSAI, C. L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. **Small**, v. 5, n. 13, p. 1553-1561, 2009.

ZANDONAI, R., COELHO, F., FERREIRA, J., MENDES, A. Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 46, n. 2. 2010.

ZHANG, L., LIAO, H., ZHU, H., LEI, C. Antiviral clerodane diterpenoids from *Dodonaea viscosa*. **Tetrahedron** 72 P. 8036-8041. 2016.

ZHAO, F.; ZHANG, S.; WANG, S. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials., v. 7, n. 10, p. 1322-1337, 2011.

APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 12, Issue, 09, pp. 58670-58675, September, 2022

<https://doi.org/10.37118/ijdr.25312.09.2022>

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF SECONDARY METABOLITES FROM *ALLOPHYLUS SEMIDENTATUS* OF THE EXTRACTS AND THEIR ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY

Yohans José Martínez Moncada*, Josiane de Fátima Gaspari Dias, Luciane Dalarmi, Deise Prehs Montrucchio, Obdulio Gomes Miguel and Marilis Dallarmi Miguel

Laboratory of Pharmacotechnic, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 09th July, 2022

Received in revised form

27th July, 2022Accepted 24th August, 2022Published online 20th September, 2022

Key Words:

Allophylus Semidentatus, Phytochemistry, Metabolites, Biological Activity.

*Corresponding author:

Yohans José Martínez Moncada

ABSTRACT

Some Sapindaceae plants are used in folk medicine, food and also in the pharmaceutical field. *Allophylus semidentatus* (Sapindaceae) is a wild plant that is being studied for the first time. In this investigation, the metabolites were extracted by using polar solvent as methanol, hexane, chloroform and ethyl acetate. Chromatographic and spectroscopic techniques were used for the isolation and identification of compounds. Extracts from the branches revealed the presence of steroids/triterpenes, flavonoids, alkaloids and coumarins. Metabolites were isolated by chromatography. The results of ¹HNMR and ¹³CNMR showed the presence of four compounds: allantoin, friedelin, campesterol and β-sitosterol. These compounds have been isolated from this plant for the first time. The anticancer, biological and antimicrobial activity of the extracts were also studied. This study highlights the bioactive potential of *Allophylus semidentatus* fractions which can lead to the development of drugs intended for the treatment of cancer.

Copyright © 2022, Yohans José Martínez Moncada et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Yohans José Martínez Moncada, Josiane de Fátima Gaspari Dias, Luciane Dalarmi, Deise Prehs Montrucchio, Obdulio Gomes Miguel and Marilis Dallarmi Miguel et al. "Isolation and structural elucidation of secondary metabolites from *Allophylus semidentatus* of the extracts and their antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity", *International Journal of Development Research*, 12, (09), 58670-58675.

INTRODUCTION

Thus, the present study describes the isolation and structural elucidation of allantoin, friedelin, campesterol and β-sitosterol.