

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIO PEDRI CAZURA

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE
Senegalia nitidifolia Speg. (FABACEAE MIMOSOIDEAE)

CURITIBA

2023

CASSIO PEDRI CAZURA

ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE
Senegalia nitidifolia Speg. (FABACEAE MIMOSOIDEAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Coorientadora: Profa. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2023

Cazura, Cassio Pedri

Análise fitoquímica e atividades biológicas da espécie *Senegalia nitidifolia* Speg. (Fabaceae Mimosoideae) [recurso eletrônico] / Cassio Pedri Cazura – Curitiba, 2023.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientador: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

1. Fabaceae. 2. Antioxidantes. 3. Anti-infecciosos. 4. Toxicidade. 5. Triterpenos. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.633



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CASSIO PEDRI CAZURA** intitulada: **ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Senegalia nitidifolia* Speg. (FABACEAE MIMOSOIDEAE)**, sob orientação do Prof. Dr. **OBDULIO GOMES MIGUEL**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

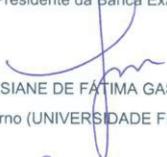
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Fevereiro de 2023.



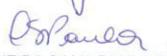
OBdulio GOMES MIGUEL

Presidente da Banca Examinadora



JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu Orientador Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel, por dedicar sua atenção e paciência acompanhando e auxiliando o desenvolvimento deste trabalho e por todo o conhecimento compartilhado que contribuiu na minha formação e levarei para a vida.

À minha Coorientador Marilis Dallarmi Miguel pelo auxílio e atenção no desenvolvimento deste trabalho e ao longo de todo o programa de mestrado.

À equipe de pesquisa incluindo colegas, professores e técnicos que estiveram sempre dispostos a me ajudar em todas as situações necessárias.

Ao CNPq.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

A minha mãe, irmãos e amigos que sempre me apoiaram.

A todos os trabalhadores e contribuintes brasileiros que com seus esforços e muito suor mantêm uma Universidade Pública como a UFPR e muitos outros setores públicos funcionando, apesar de tantas dificuldades enfrentadas no País.

A todos que, de alguma forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização desta pesquisa e de minha graduação.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.

O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso
passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

RESUMO

A espécie *Senegalia nitidifolia* Speg., nativa da América do Sul, pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, ocorre principalmente no bioma Mata Atlântica. Este trabalho tem como objetivo contribuir com o estudo fitoquímico inédito desta espécie. Foram preparados extratos etanólicos 80% dos galhos e folhas separadamente, na sequência esses extratos foram fracionados em solventes orgânicos de polaridade crescente, obtendo as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. Foram realizados ensaios preliminares para caracterização de metabólitos secundários, onde confirmou-se a presença de alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides e triterpenos. Na sequência, um composto foi isolado por Coluna Cromatográfica e identificado através do método de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o triterpeno friedelina foi isolado da fração hexano dos galhos. As atividades biológicas dos extratos e suas frações também foram analisadas. Para as propriedades antimicrobianas foi empregado o método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) observando a inibição do crescimento de *S. aureus* em 125,0 µg/mL para o extrato bruto e frações clorofórmio e remanescente das folhas e 62,5 µg/mL para fração acetato de etila das folhas, seguido de Concentração Bactericida Mínima (CBM) demonstrando ação bactericida os extratos de folha principalmente contra *S. aureus* na concentração de 250,0 µg/mL para todas as frações, exceto a fração hexano. A fração clorofórmio das folhas apresentou ação bactericida contra *P. aeruginosa* em 500,0 µg/mL. Também foi feito o doseamento de flavonoides e polifenóis totais, utilizando uma curva de calibração com os padrões catequina e ácido gálico, respectivamente, com teor de 69,81 mgEAG/g ± 0,60 de polifenóis e 50,0 mgECAT/g ± 0,34 de flavonoides para fração acetato de etila de folhas e 100,37 mgEAG/g ± 0,90 de polifenóis e 107,44 mgECAT/g ± 0,70 de flavonoides para fração acetato de etila de galhos. A análises de propriedade antioxidante de captura do radical ABTS, captura do radical DPPH e poder de redução de ferro partiu de uma curva de calibração do padrão trolox. As amostras de galhos apresentaram maior ação antioxidante. A espécie não apresentou toxicidade frente *Artemia salina*. O presente trabalho mostrou-se satisfatório no intuito de levantar novas informações a respeito da espécie estudada, resultando em um estudo promissor.

Palavras-chave: antioxidante. antimicrobiano. friedelina. *Senegalia nitidifolia*. toxicidade. triterpenos.

ABSTRACT

The species *Senegalia nitidifolia* Speg., native to South America, belongs to the Fabaceae family, Mimosoideae subfamily, and occurs mainly in the Atlantic Forest biome. This work aims to contribute to the unprecedented phytochemical study of this species. Ethanol extracts of 80% of the branches and leaves were prepared separately, then these extracts were fractionated in organic solvents of increasing polarity, obtaining the hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions. Preliminary tests were carried out for the characterization of secondary metabolites, where the presence of alkaloids, tannins, flavonoids, steroids and triterpenes was confirmed. In the sequence, a compound was isolated by Chromatographic Column and identified through the method of Nuclear Magnetic Resonance (NMR), the triterpene friedelin was isolated from the hexane fraction of the branches. The biological activities of the extracts and their fractions were also analyzed. For the antimicrobial properties, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method was used, observing the inhibition of the growth of *S. aureus* at 125.0 µg/mL for the crude extract and chloroform and remaining fractions of the leaves and 62.5 µg/mL for the acetate fraction of ethyl extract of leaves, followed by Minimum Bactericidal Concentration (MBC) demonstrating bactericidal action of leaf extracts mainly against *S. aureus* at a concentration of 250.0 µg/mL for all fractions, except for the hexane fraction. The chloroform fraction of the leaves showed bactericidal action against *P. aeruginosa* at 500.0 µg/mL. The dosage of flavonoids and total polyphenols was also performed, using a calibration curve with the catechin and gallic acid standards, respectively, with a content of 69.81 mgEAG/g ± 0.60 of polyphenols and 50.0 mgECAT/g ± 0.34 of flavonoids for ethyl acetate fraction of leaves and 100.37 mgEAG/g ± 0.90 of polyphenols and 107.44 mgECAT/g ± 0.70 of flavonoids for ethyl acetate fraction of twigs. The analysis of the antioxidant property of ABTS radical scavenging, DPPH radical scavenging and iron reducing power was based on a calibration curve of the trolox standard. The samples of branches showed greater antioxidant action. The species did not show toxicity against *Artemia salina*. The present work proved to be satisfactory in order to raise new information about the studied species, resulting in a promising study.

Keywords: antioxidant. antimicrobial. friedelin. *Senegalia nitidifolia*. toxicity. triterpenes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	DISTRIBUIÇÃO COSMOPOLITA DO GÊNERO <i>Acacieae</i>	21
FIGURA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DE <i>Senegalia nitidifolia</i> EM TERRITÓRIO BRASILEIRO	25
FIGURA 3 -	RAMOS, CASCA INTERNA E ACÚLEOS DE <i>Senegalia nitidifolia</i> ..	26
FIGURA 4 -	ESQUEMA DE ESTRUTURAS DE <i>Senegalia nitidifolia</i>	27
FIGURA 5 -	FLORES E VAGENS DE <i>Senegalia nitidifolia</i>	27
FIGURA 6 -	ORGANOGRAMA DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	28
FIGURA 7 -	LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS VEGETAIS.....	29
FIGURA 8 -	PLANTA <i>Senegalia nitidifolia</i> NO LOCAL DE COLETA DO MATERIAL VEGETAL (CAPÃO CIFLOMA).....	30
FIGURA 9 -	CARACTERÍSTICA DE DIFERENTES REGIÕES ANATÔMICAS DA ESPÉCIE <i>Senegalia nitidifolia</i>	31
FIGURA 10 -	MATERIAL VEGETAL COLETADO E SEPARADO EM GALHOS DE FOLHAS EM PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO	32
FIGURA 11 -	MOINHO DE FACAS E MARTELOS UTILIZADO NO PROCESSO DE MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL	33
FIGURA 12 -	EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS E GALHOS E SUAS FRAÇÕES ORGÂNICAS	36
FIGURA 13 -	APARELHO DE SOXHLET COM MATERIAL VEGETAL UTILIZADO NO PREPARO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>S. nitidifolia</i>	37
FIGURA 14 -	ELUIÇÃO DA AMOSTRA FHG EM COLUNA CROMATOGRÁFICA SIMPLES	40
FIGURA 15 -	MICROPLACAS DO ENSAIO DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	43
FIGURA 16 -	MICROPLACA DO ENSAIO DE FLAVONOIDES TOTAIS	44
FIGURA 17 -	MICROPLACAS DO ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH	46
FIGURA 18 -	MICROPLACAS DO ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS	47
FIGURA 19 -	MICROPLACAS DO ENSAIO DE PODER ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)	49
FIGURA 20 -	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA ALCALOIDES	55
FIGURA 21 -	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA TANINOS	56

FIGURA 22 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA FLAVONOIDES.....	57
FIGURA 23 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA ESTEROIDES E TRITERPENOS	58
FIGURA 24 - CARACTERISITCAS DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E GALHOS E SUAS FRAÇÕES ORGÂNICAS SECOS.....	59
FIGURA 25 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REVELANDO A PRESENÇA DO COMPOSTO FHG-08 NA FRAÇÃO HEXANO DOS GALHOS	62
FIGURA 26 - FRAÇÃO FHG-08 EM PROCESSO DE CRISTALIZAÇÃO E CCD DE CONFIRMAÇÃO	63
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO ISOLADO FHG-8...	64
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO ISOLADO FHG-8..	64
FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (AMPLIADA) DO COMPOSTO ISOLADO FHG-8	65
FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-OXO-FRIEDELANO	67
FIGURA 31 - BIOTRANSFORMAÇÃO DE 2,3-EPOXIESQUALENO A FRIEDELINA.....	68
FIGURA 32 - SEQUÊNCIA DE REARRANJOS E TRITERPENOS FORMADOS NA CICLIZAÇÃO CATALISADA POR OSCs	69

LISTA DE GRÁFICOS

- GRAFICO 1 - RESULTADOS DO DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS.....71
- GRAFICO 2 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DPPH, ABTS E FRAP DOS EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE *Senegalia nitidifolia*74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESCRITAS PARA ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Senegalia</i>	23
TABELA 2 -	CLASSIFICAÇÃO TAXONOMICA DA ESPÉCIE <i>Senegalia nitidifolia</i>	24
TABELA 3 -	CONDIÇÕES APLICADAS NO ENSAIO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS FITOQUÍMICOS.....	36
TABELA 4 -	SISTEMA DE ELUIÇÃO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES NA FRAÇÃO HEXANO DOS GALHOS (FHG)	41
TABELA 5 -	DILUIÇÕES UTILIZADAS PARA AS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS ANALISADAS NO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE <i>A. salina</i>	53
TABELA 6 -	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS PARA GALHOS E FOLHAS.....	54
TABELA 7 -	RESULTADO DAS ANÁLISE PRELIMINARES PARA GRUPOS FITOQUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	55
TABELA 8 -	RESULTADO DOS CÁLCULOS DE RENDIMENTO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FOLHAS E GALHOS DA ESPÉCIE <i>Senegalia nitidifolia</i>	60
TABELA 9 -	RESULTADO DOS CÁLCULOS DE RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE EXTRATO DE FOLHAS DA ESPÉCIE <i>Senegalia nitidifolia</i> EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO	61
TABELA 10 -	DOS CÁLCULOS DE RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE EXTRATO DE GALHOS DA ESPÉCIE <i>Senegalia nitidifolia</i> EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO	61
TABELA 11 -	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹³ C PARA O COMPOSTO ISOLADO FHG-08 COMPARADOS A DADOS DA LITERATURA PARA FRIEDELINA	65

TABELA 12 -	TEOR DE POLIFENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS DE FOLHAS E GALHOS DE <i>Senegalia nitidifolia</i>	71
TABELA 13 -	RESULTADOS DOS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE CAPTURA DOS RADICAIS DPPH E ABTS E CAPACIDADE DE REDUÇÃO DE FERRO (FRAP).....	73
TABELA 14 -	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>S. nitidifolia</i> FRENTE ÀS CEPAS BACTERIANAS TESTADAS	75
TABELA 15 -	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>S. nitidifolia</i> FRENTE ÀS CEPAS BACTERIANAS TESTADAS	76
TABELA 16 -	RESULTADOS DA ANÁLISE DE TOXICIDADE PRELIMINAR PELO MÉTODO UTILIZANDO <i>Artemia salina</i> COM AS FRAÇÕES DOS EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS E SUAS DILUIÇÕES ..	77

LISTA DE ABREVEATURAS E SIMBOLOS

°C	Graus Celsius
Abs	Absorbância
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIFLOMA	Ciências Florestais e da Madeira
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CL50	Concentração Letal média
CLED	Cistina-Lactose-Eletrólito-Deficiente
Cm	Centímetro
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalente ao Ácido Gálico
EB	Extrato Bruto
EBF	Extrato Bruto de Folhas
EBG	Extrato Bruto de Galhos
ECAT	Equivalente a Catequina
EFC	Herbário Floresta Escola
<i>et al</i>	“E outros”
FAF	Fração Acetato de etila de Folhas
FAG	Fração Acetato de etila de Galhos
FCF	Fração Clorofórmio de Folhas
FCG	Fração Clorofórmio de Galhos
FHF	Fração Hexano de Folhas
FHG	Fração Hexano de Galhos
FM	Fase Móvel

FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FRF	Fração Remanescente de Folhas
FRG	Fração Remanescente de Galhos
g	Gramas
GF	Grau farmacêutico
h	Horas
kg	Quilograma
m/m	Massa por massa
m/v	Massa por volume
mg	Micrograma
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mMol	Milimol
MV	Material Vegetal
NEU	Difenilboriloxietilamina 1% em metanol com polietilenoglicol-4000
nm	nanometro
OSC	Oxidoesqualeno ciclase
pH	Potencial de hidrogênio
R ²	Coeficiente de determinação
Rf	Índice de Retenção
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Speg.	Spegazine
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFC	Concentração total de flavonoides
TPC	concentração total de fenóis
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacromano-Ácido 2- carboxílico
TS	Total de sólidos
UV	Ultravioleta

v/v	Volume por volume
Vol	Volume
X ²	Qui quadrado
Δ	Deslocamento químico
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVO.....	19
1.1.1	Objetivo geral	19
1.1.2	Objetivos específicos.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	FAMÍLIA FABACEAE	20
2.2	SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE	20
2.3	TRIBO <i>Acacieae</i>	21
2.4	GÊNERO <i>Senegalia</i>	23
2.4.1	Atividades biológicas encontradas no gênero <i>Senegalia</i>	23
2.4.2	Compostos químicos encontrados no gênero <i>Senegalia</i>	24
2.5	ESPÉCIE <i>Senegalia nitidifolia</i> SPEG.	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	ETAPAS DA PESQUISA	28
3.2	MATERIAL VEGETAL	29
3.2.1	Coleta e identificação	29
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	33
3.3.1	Umidade	33
3.3.2	Cinzas totais	34
3.4	SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	34
3.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	37
3.5.1	Extratos brutos de folhas e galhos	37
3.5.1.1	Teor de sólidos dos extratos brutos.....	38
3.5.1.2	Rendimento do processo de preparo dos extratos brutos etanólicos	38
3.5.2	Particionamento dos extratos brutos de folhas e galhos	39
3.6	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.....	39
3.6.1	Isolamento dos constituintes químicos	39
3.6.2	Caracterização de constituintes químicos isolados	41
3.6.3	Polifenóis totais	42
3.6.4	Flavonoides totais.....	43
3.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	44
3.7.1	Propriedades antioxidantes	44

3.7.1.1 Radical DPPH	45
3.7.1.2 Captura do radical ABTS.....	46
3.7.1.3 Capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP).....	48
3.7.2 Atividade antimicrobiana	49
3.7.2.1 Preparo do inóculo	49
3.7.2.2 Preparo da solução estoque das amostras	50
3.7.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)	50
3.7.2.4 Concentração bactericida mínima (CBM).....	51
3.7.3 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	51
3.7.3.1 Preparo da solução salina	51
3.7.3.2 Eclosão dos cistos.....	52
3.7.3.3 Preparo das amostras e controles.....	52
3.7.3.4 Avaliação da toxicidade.....	53
3.7.3.5 Tratamento estatístico dos resultados.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	54
4.1.1 Teor de umidade e cinzas totais de galhos e folhas.....	54
4.2 SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	54
4.3 EXTRATOS BRUTOS E SUAS FRAÇÕES.....	59
4.3.1 Características dos extratos brutos e suas frações sólidas	59
4.3.2 Cálculo de rendimento dos extratos brutos	60
4.3.3 Cálculo de rendimento do processo de particionamento.....	60
4.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.....	62
4.4.1 Composto FHG-08	62
4.4.1.1 Identificação do composto FGH-08 por ressonância magnética nuclear (RMN).....	65
4.4.1.2 Biossíntese dos triterpenos friedelânicos	68
4.4.2 Polifenóis totais e flavonoides totais.....	70
4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	72
4.5.1 Propriedades antioxidantes	72
4.5.1.1 Captura do radical DPPH	72
4.5.1.2 Captura do radical ABTS.....	72
4.5.1.3 Capacidade de redução de ferro (FRAP)	72
4.5.2 Atividade antimicrobiana	74

4.5.2.1	Concentração inibitória mínima (CIM)	75
4.5.3	Toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	76
5	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática que acompanha o desenvolvimento humano desde os primórdios. É possível encontrar na natureza uma grande diversidade de substâncias com atividades biológicas que podem ser empregadas na alimentação e no tratamento de enfermidade (CORDELL, 2014; DOUGHARI, 2012).

O interesse em compostos ativos encontrados na natureza direciona o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, alimentícios e outros de importância industrial. Estes estudos geralmente partem da investigação de organismos encontrados na natureza, sendo as plantas os mais pesquisados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

As acácias pertencem a família Fabaceae, Subfamília Mimosoideae e agrupadas na Tribo *Acacieae*. Representantes desta família estão presentes em nossas vidas, sendo utilizadas na alimentação, indústria de madeira e fibras, na agronomia e na pecuária (AHMAD; ANWAR; HIRA, 2016; RIBEIRO; DE QUEIROZ; MORIM, 2016).

As acácias encontram-se divididas em cinco gêneros, sendo o de maior representação em territórios tropicais e subtropicais do mundo o gênero *Senegalia* com cerca de 217 espécies (VITAL, 2018). Diante do potencial apresentado para contribuição do desenvolvimento de produtos naturais por meio da pesquisa de elementos que compõem a biodiversidade brasileira, o gênero *Senegalia* destacou-se por incluir espécies descritas na literatura contendo metabólitos de interesse, como exemplo a goma arábica, produto obtido a partir da espécie *Senegalia senegal* (ANDRADE *et al.*, 2005).

Este trabalho busca realizar um estudo analisando os compostos presentes na espécie *Senegalia nitidifolia*, isolando e caracterizando alguns destes metabólitos, bem como conhecer suas atividades biológicas e relacioná-las aos constituintes químicos encontrados na espécie estudada, colaborando com o conhecimento da espécie e suas possíveis aplicações.

Poucos estudos sobre a *Senegalia nitidifolia* Speg. foram realizados até o momento e considerando a possibilidade de desenvolvimento de novas terapêuticas, o estudo fitoquímico e de atividades biológicas da espécie justificam a importância da pesquisa.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Contribuir com o conhecimento científico da espécie *Senegalia nitidifolia* Speg.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica abordando espécies do gênero *Senegalia* (FABACEAE MIMOSOIDEAE);
- Localizar, coletar, identificar espécie *Senegalia nitidifolia* e cadastrar no SISGEN;
- Realizar ensaios fitoquímicos preliminares (screening fitoquímico) através do método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD);
- Isolar metabólitos presentes no extrato bruto e frações orgânicas da espécie estudada utilizando o método de separação em Coluna Cromatográfica Aberta.
- Identificar os compostos isolados dos extratos com o método de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Realizar o doseamento de compostos fenólicos totais e flavonoides totais presentes na espécie estudada;
- Verificar a propriedade antioxidante do extrato bruto e frações orgânicas de folhas e galhos;
- Realizar testes *in vitro* de atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações orgânicas das folhas e galhos;
- Realizar análise de toxicidade do extrato bruto e frações orgânicas frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae encontra-se distribuída por todo o globo, de acordo com Lewis *et al.* (2005) existem cerca de 727 gêneros e 19.327 espécies reconhecidas.

Fabaceae é uma família agrupada no táxon das angiospermas, sendo considerada a maior família botânica do Brasil, com 2.826 espécies (RIBEIRO; LIMA, 2009), sendo a segunda família com maior diversidade no bioma Mata Atlântica, ficando atrás da família Orchidaceae (FORZZA *et al.*, 2010). Apresenta diversos representantes, desde grandes árvores a arbustos e pequenas ervas (LEWIS *et al.*, 2005).

É uma família de importância econômica, sendo utilizada no forrageamento, marcenaria, combustíveis, pesticidas, corantes, gomas, óleos, na medicina e ornamentação. Também apresenta importância alimentícia como fonte de proteína e micronutrientes (YAHARA *et al.*, 2013).

A família Fabaceae é agrupada dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (POLHILL; RAVEN, 1981).

2.2 SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE

Segunda maior subfamília das Fabaceae, com cerca de 3.270 espécies e 82 gêneros. Possui representantes distribuídos pelas regiões tropicais, subtropicais e zonas temperadas, com maior diversidade na América, África, Ásia e Austrália (TAMASHIRO; ESCOBAR, 2016).

Em território brasileiro encontra-se aproximadamente 824 espécies, sendo as tribos *Mimoseae* e *Ingeae* de maior distribuição.

A subfamília Mimosoideae é dividida em quatro tribos, *Mimoseae*, *Mimozyantheae*, *Acacieae* e *Ingeae*, com representantes de diferentes fenótipos, sendo árvores, arbustos, lianas e raramente plantas aquáticas (TAMASHIRO; ESCOBAR, 2016).

2.3 TRIBO *Acacieae*

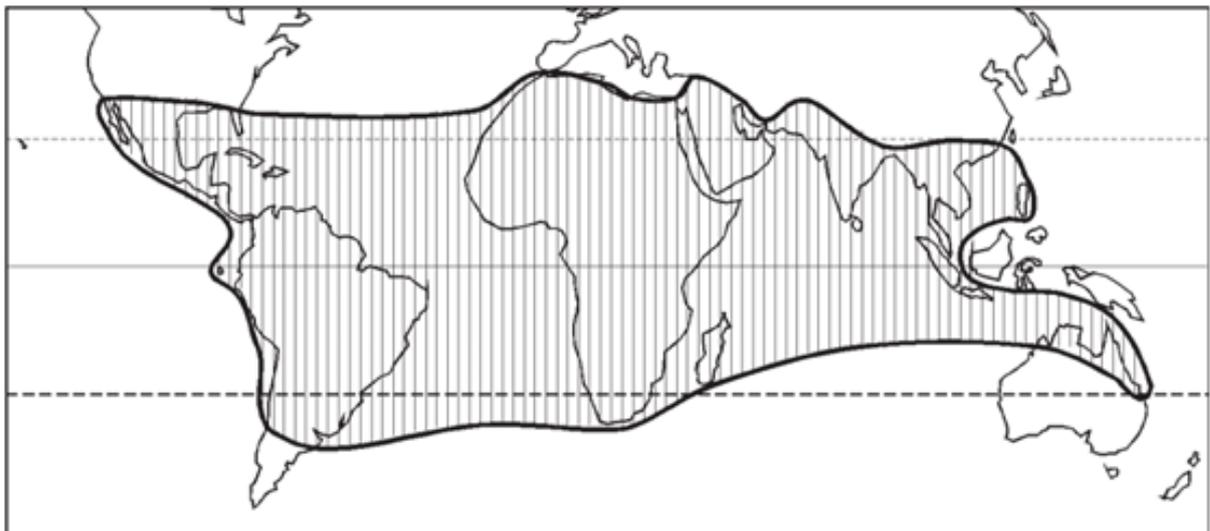
A tribo *Acacieae* é a segunda maior representante em número de indivíduos. É composta por 1350 espécies com distribuição cosmopolita (figura 1) (MASLIN; MILLER; SEIGLER, 2003).

O nome Acácia foi proposto em 1754 por Philip Miller e tem origem da palavra grega “*Akakia*” que significa espinhos. Também é o nome popular da espécie *A. nilotica* (ORCHARD; MASLIN, 2003).

Em 1978, Les Pedley após seu trabalho de revisão propôs o sistema de classificação onde o antigo gênero *Acacia* foi dividido em três subgêneros, sendo eles *Acacia*, *Aculeiferun* e *Phyllodineae*. Esses subgêneros também foram divididos em múltiplas secções (MASLIN; MILLER; SEIGLER, 2003).

Atualmente esse sistema foi desconsiderado e passou a ser utilizado o sistema proposto por Orchard e Maslin (2003) e adotado oficialmente no Congresso Oficial de Botânica de 2005. Assim, o gênero *Acacia* foi dividido em cinco novos gêneros: *Acacia*, *Acaciella*, *Mariosousa*, *Senegalia* e *Vachellia*. O nome do antigo gênero *Acacia* foi reservado para o antigo subgênero *Phyllodinae* que compreende a maioria das espécies australianas. Também é comum encontrar o termo *Acacia Sensu Lato* (*Acacia s. l.*) como referência a todas as espécies anteriormente agrupadas no gênero *Acacia* (BARROS; MORIM, 2014).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO COSMOPOLITA DO GÊNERO *Acacia*



FONTE: Maslin; Miller; Seigler (2003).

Existem registros históricos do uso de acácias desde o tempo do Egito antigo por meio de hieróglifos simbolizando a árvore (MURPHY *et al.*, 2003). Registros revelam o uso da goma arábica, mecanismo de defesa da planta, no embalsamento de múmias (SANCHEZ *et al.*, 2017).

Atualmente destaca-se o uso deste gênero com a produção da goma arábica, muito empregado na indústria alimentícia para controle da fluidez de materiais. Possui ação estabilizante, formadora de filmes, espessante, floculante e emulsificante (DAOUB *et al.*, 2016).

Esta goma é proveniente do exsudato excretado pela planta como mecanismo de proteção, presente principalmente nas espécies *Senegalia senegal* e *Senegalia seyal*, contra insetos e invasores. Isto ajuda na cicatrização de eventuais feridas geradas na planta (SANCHEZ *et al.*, 2017).

O uso desta espécie também se dá com fins paisagísticos para arborização de zonas urbanas e rurais bem como para recuperação de solos degradados (ANDRADE *et al.*, 1998; FARIA *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2004).

Algumas espécies são muito empregadas em plantios destinados à produção de lenha (LORENZI, 2009; SOUZA *et al.*, 2004), polpa para celulose, madeira para construção, movelaria, fibra de média densidade (MDF), aglomerados, compensados (SOUZA *et al.*, 2004; KAMO *et al.*, 2009) e produção de adesivos (LORENZI, 2009). Além disso, suas flores são melíferas, utilizadas por abelhas do gênero *Apis* sp. na produção de mel (BARBOSA, 2002).

Como uso tradicional, já foi relatado o uso de acácias em afecções bucais, diarreia, infecções urinárias, gastrite, tuberculose, asma e dores de cabeça. Destacam-se propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antimicrobiana, antiplaquetária, anti-hipertensiva, analgésica e anticancerígena. Estudos revelam que estas atividades estão relacionadas aos componentes químicos geralmente presentes em espécies do gênero, são eles ácidos fenólicos, alcaloides, terpenos, taninos e flavonoides (ANDRADE, 2007).

Muitas espécies que compõem esse gênero já foram pesquisadas e descritos seus constituintes fitoquímicos com relevante importância, bem como atividades biológicas de interesse medicinal (ANDRADE, 2007).

Foram demonstrados efeitos anti cáries e outras enfermidades bucais no estudo de Ebtihal Abdalla M. Mohieldin *et al.* (2017) apresentando ação antimicrobiana para extrato etanólico de cascas da espécie *Acacia seyal*, principalmente contra o

Streptococcus sobrinus. A ação antibacteriana de extrato etanólico das flores de *A. podalyriifolia* foi estudada como sendo eficaz contra as cepas gram-positivas. Triagens fitoquímicas identificaram a presença de fenóis e flavonoides nas flores (ANDRADE, 2007).

A ação anti-inflamatória e antinociceptiva de proteínas presentes nas sementes de *A. farnesiana*, apresentando redução de edemas induzidos em ratos (LEAL *et al.*, 2006). Atividade antioxidante descrita por Rakesh Kumar (2017) e larvicida contra larvas de *Coleoptera* (SELIM *et al.*, 2017).

Através de vários estudos, as espécies desta família vêm se apresentando como uma fonte promissora de diversos produtos de origem natural com valor agregado na indústria.

2.4 GÊNERO *Senegalia*

2.4.1 Atividades biológicas encontradas no gênero *Senegalia*

Atualmente é possível encontrar na literatura diversas aplicações de espécies do gênero na medicina popular como recurso para tratamento de diversas enfermidades, como diarreia, infecções do trato urinário, asma, tuberculose, gastrite, entre outras, algumas atividades relatadas estão descritas na tabela 1.

TABELA 1 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESCRITAS PARA ESPÉCIES DO GÊNERO *Senegalia*

Espécie	Atividade biológica	Referência
<i>S. catechu</i>	Antiviral, antifúngica, antibacteriana, antipirética, anticoncepcional	(ALAMBAYAN <i>et al.</i> , 2015)
<i>S. ferruginea</i>	Analgésica, antiinflamatória, antiúlcera, antitumoral, adstringente	(FAUJDAR <i>et al.</i> , 2016)
<i>S. hamulosa</i>	Antimicrobiana	(ALAJMI <i>et al.</i> , 2017)
<i>S. mellifera</i>	Anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antimicrobiana	(AUGUST <i>et al.</i> , 2017)
<i>S. seyal</i>	Infertilidade, câncer, dermatoses	(ABDLLHA <i>et al.</i> , 2016)

FONTE: O autor (2022).

2.4.2 Compostos químicos encontrados no gênero *Senegalia*

Uma série de metabólitos secundários já foram relatados de várias espécies, muitas vezes de constituintes químicos um tanto distintos. Dentre eles incluem alcaloides, glicosídeos cianogênicos, ciclitóis, ácidos graxos e óleos de sementes, fluoroacetato, gomas, aminoácidos não proteicos, terpenos (incluindo óleos essenciais, diterpenos, fitosterol, geninas e saponinas de triterpenos), taninos hidrolisáveis, flavonoides e taninos condensados. Os mais conhecidos são os polissacarídeos (gomas) e as substâncias fenólicas complexas (taninos condensados) (SEIGLER, 2002).

2.5 ESPÉCIE *Senegalia nitidifolia* Speg.

TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO TAXONOMICA DA ESPÉCIE *Senegalia nitidifolia*

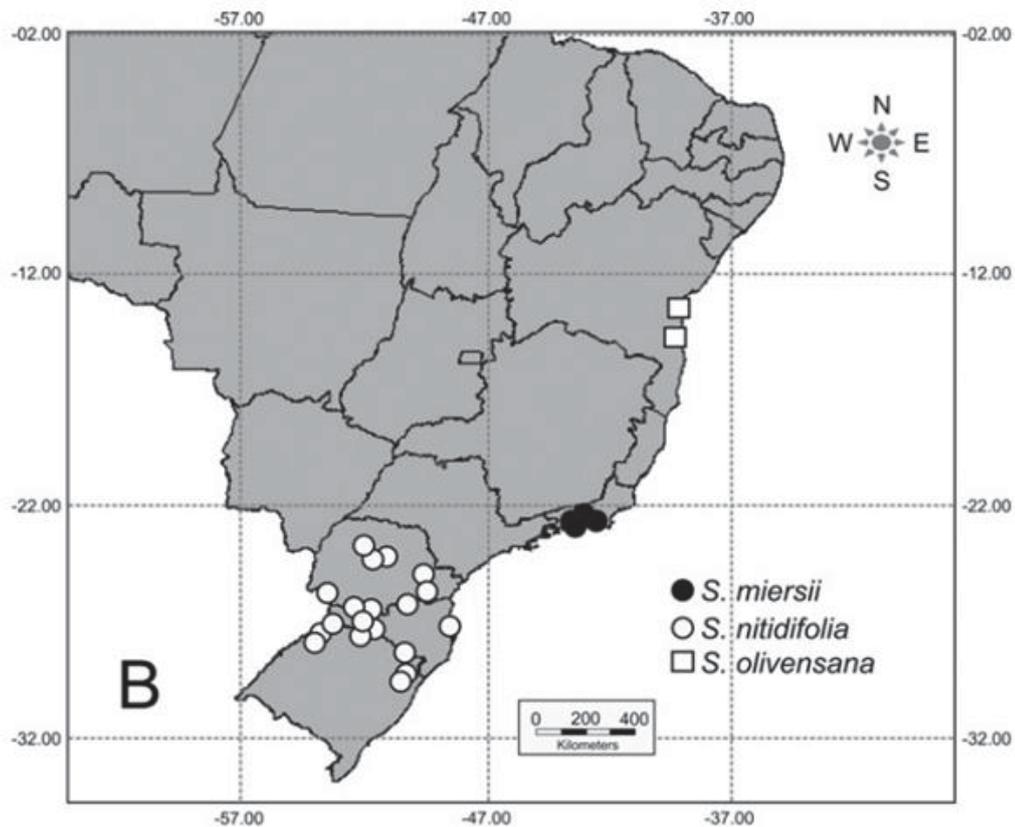
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Sub-Família	Mimosoideae
Tribo	Acacieae
Gênero	<i>Senegalia</i>
Espécie	<i>Senegalia nitidifolia</i>

FONTE: Vital (2018).

De acordo com os dados apresentados na base de dados REFLORA, a espécie *Senegalia nitidifolia* (Speg.) Seigler & Ebinger, possui como sinônimo o basônimo *Acacia nitidifolia* Speg., apresenta-se como liana (trepadeira) terrícola. De origem nativa brasileira, não endêmica, com ocorrências confirmadas na região sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) e Nordeste (Bahia), sendo encontrada nos biomas Caatinga, Mata Atlântica e Pampa. Possui os nomes vernáculos grapiá, unha-de-gato e vamos-junto (TERRA; MORIM, 2020). Também podendo ser encontrada em regiões do Paraguai (RICO-ARCE, 2007) e Argentina (CIALDELLA, 2018). Sua distribuição no território brasileiro está representada na figura 2.

É uma espécie heliófila (exposição ao sol) e higrófila seletiva, crescendo preferencialmente em solos úmidos de encostas e de lenta drenagem, beira de regatos ou em solos pedregosos no interior de matas maduras onde a vegetação arbórea é aberta (BURKART, 1979).

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE *Senegalia nitidifolia* EM TERRITÓRIO BRASILEIRO



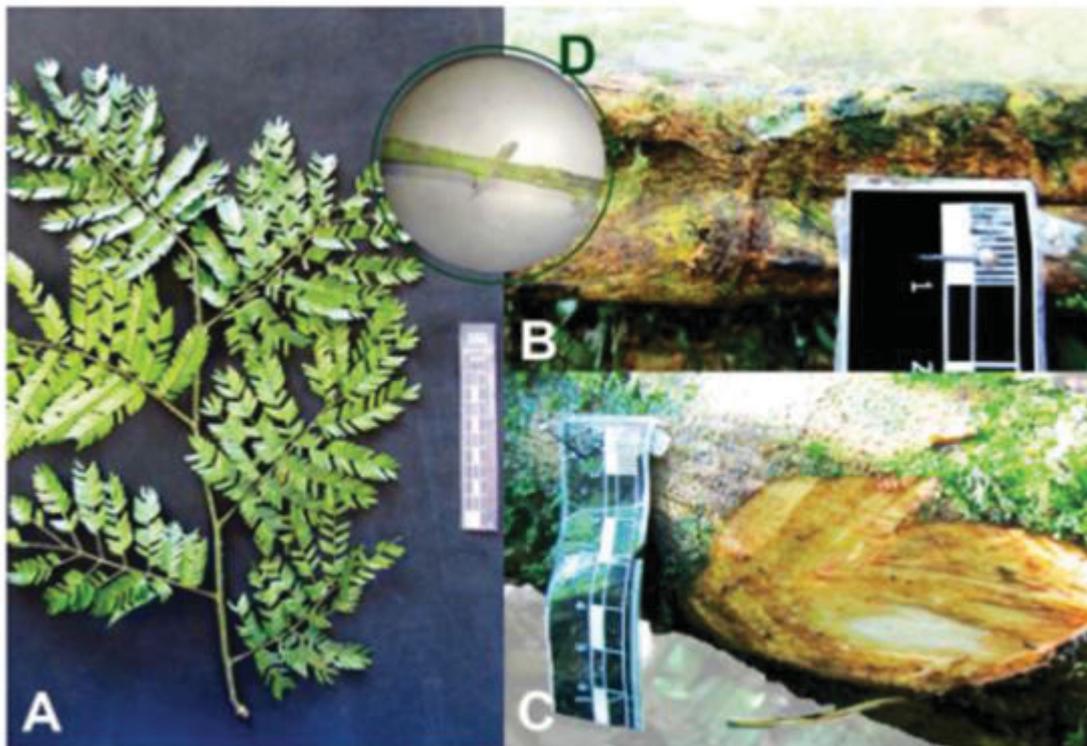
FONTE: Barros e Morim (2014).

Morfológicamente caracterizada como liana robusta e lenhosa, chegando a cerca de 15 metros de altura. Seu caule é inclinado, tortuoso, de base reta a digitada (figura 3b). Casca interna bege clara, macia ao corte e fibrosa (figura 3c). Ao ser ferida libera um exsudado pegajoso e incolor. Possui folhagem lustrosa e ramos em seções quadradas cobertos de acúleos recurvos de até 6 milímetros de comprimento (figura 3d). Suas folhas (figura 3a) são grandes, com comprimento entre 15 a 25 centímetros, bipinadas. As pinas de comprimento de 4 a 9 centímetros com 11 a 27 pares de folíolos oblongos. Suas flores em amplas panículas brancas amareladas (figura 5). As vagens retas, marginadas e transversais (figura 4b). Sementes ovais de cor castanha (figura 4c) (MARCHIORI, 1991; BARROS; MORIM, 2014; MILLER, 2015).

É morfologicamente relacionada a *S. tucumanensis*, sendo diferenciada pelas hastes quadrangulares na seção, ráquis com nectários extraflorais, folhetos maiores e ovário glabro (BARROS; MORIM, 2014).

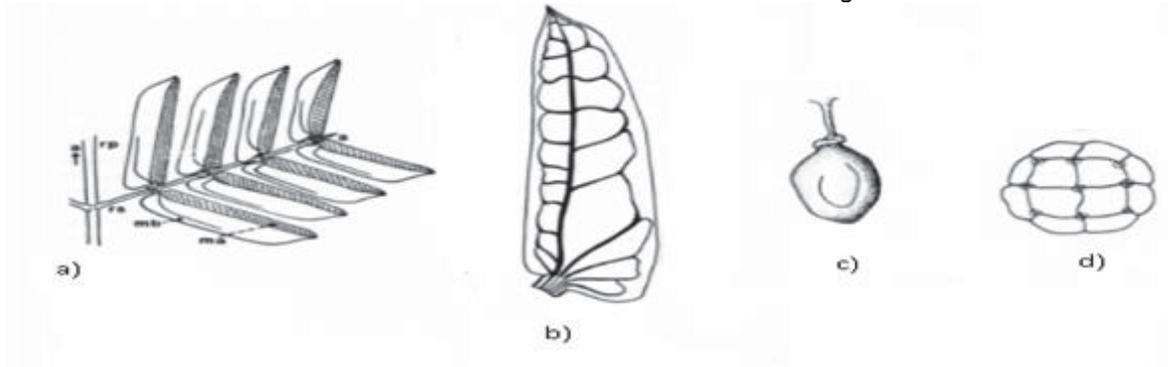
As características principais para identificação em campo são: Liana lenhosa armada, caule trilobado e folhas paripinadas com glândulas estipuladas (MILLER, 2015).

FIGURA 3 - RAMOS, CASCA INTERNA E ACÚLEOS DE *Senegalia nitidifolia*



FONTE: Miller (2015).

LEGENDA: A) ramos e folhas; B) caule; C) casca interna e D) acúleos.

FIGURA 4 - ESQUEMA DE ESTRUTURAS DE *Senegalia nitidifolia*

FONTE: Cialdella (2018). Modificado por: O autor (2020).

LEGENDA: a) Esquema de folha em pina com disposição dos folíolos secundários; b) Esquema de vascularização de primeira e segunda ordem de *S. nitidifolia*; c) Sementes e funículo de *S. nitidifolia*; d) Grão de pólen de *S. nitidifolia*.

FIGURA 5 - FLORES E VAGENS DE *Senegalia nitidifolia*

FONTE: The Field Museum (2020). Modificado por: O autor (2020).

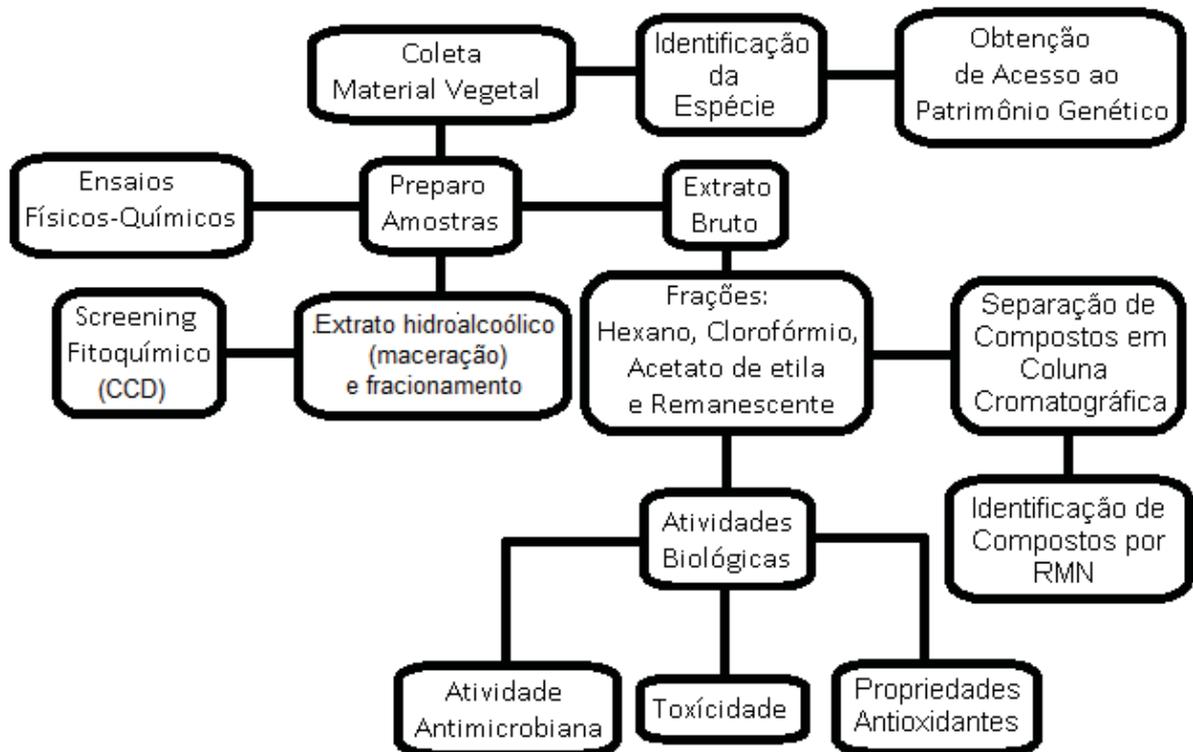
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ETAPAS DA PESQUISA

O desenvolvimento deste estudo seguiu as etapas descritas na figura 6. A princípio foi encontrado o local para coleta do material vegetal estudado, em seguida confirmado sua identidade e solicitado cadastro no SISGEN. Após a coleta o material foi seco, triturado, pesado e identificado para dar início as análises laboratoriais. Com as amostras secas e trituradas, foram realizadas análises de cinzas totais e de voláteis totais. Foram preparados extratos hidroalcoólicos e suas frações em solventes orgânicos para análises preliminares através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada.

O material vegetal foi utilizado no preparo de extratos hidroalcoólicos brutos e fracionado em solventes orgânicos de polaridade crescente utilizando aparelho Soxhlet. Os extratos e suas frações foram secos e direcionados a análises de atividades biológicas e análises de compostos químicos presentes nas amostras vegetais.

FIGURA 6 - ORGANOGRAMA DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS



Fonte: O autor (2020).

3.2 MATERIAL VEGETAL

3.2.1 Coleta e identificação

A coleta do material vegetal foi realizada no município de Curitiba, Paraná, na região denominada Capão do CIFLOMA (Centro de Ciências Florestais e da Madeira) na UFPR, campus Jardim Botânico. As coordenadas do local de coleta são: Latitude -25.448678 de Longitude -49.238778 (figura 6). A coleta foi realizada no mês de abril de 2021, o espécime vegetal encontrado e o mostrado na figura 7. Foram obtidas para a pesquisa amostras de folhas e galhos da espécie *Senegalia nitidifolia* (figura 8). Foi solicitado acesso ao patrimônio genético sob cadastro SISGEN de código A6AC4AC. A identificação da espécie foi realizada por comparação no Museu Botânico Municipal de Curitiba com o número MBM305162.

FIGURA 7 - LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS VEGETAIS



FONTE: Google Maps (2021).

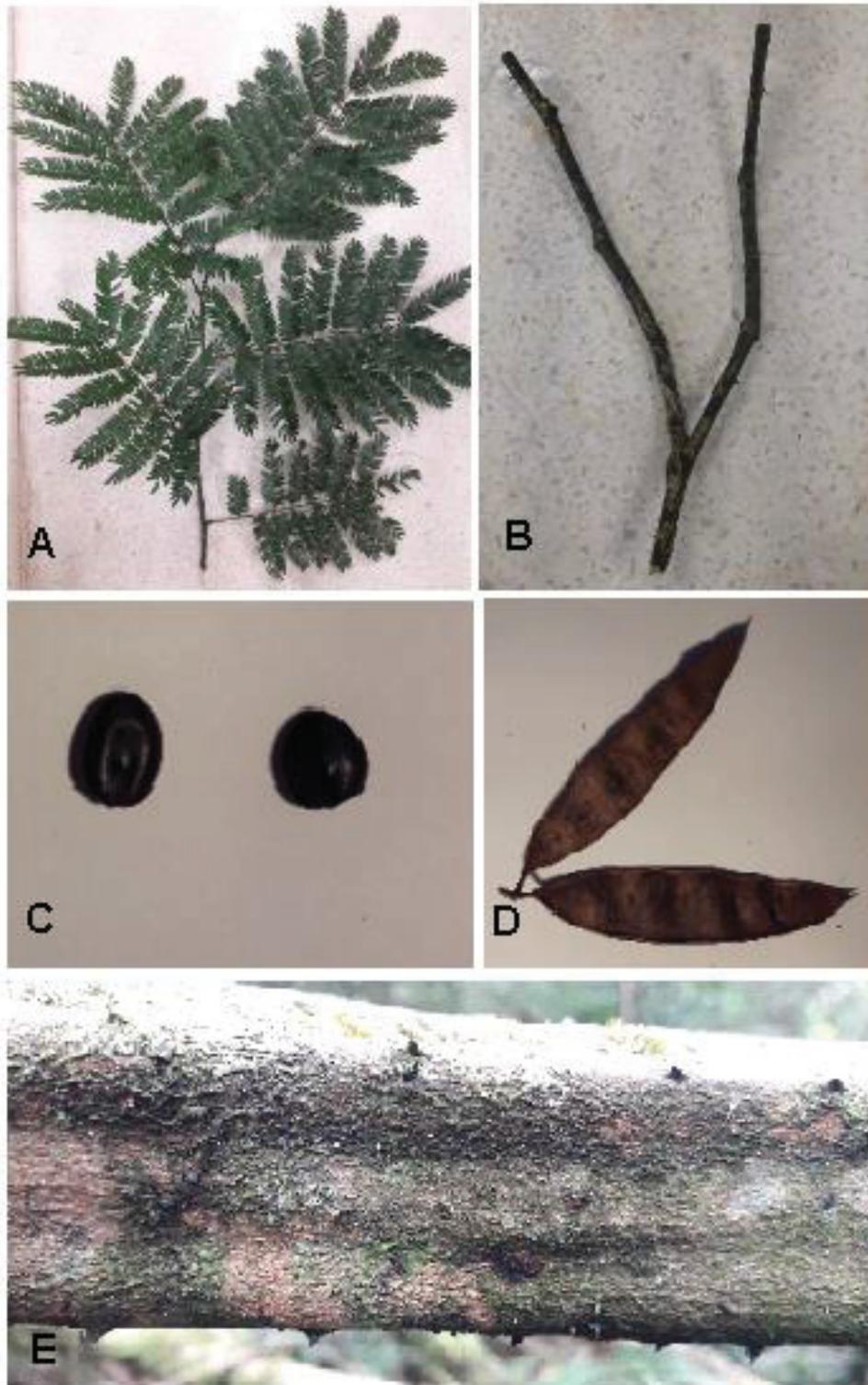
NOTA: Local de coleta representado com o ponto vermelho.

FIGURA 8 - PLANTA *Senegalia nitidifolia* NO LOCAL DE COLETA DO MATERIAL VEGETAL



FONTE: o autor (2021).

FIGURA 9 - CARACTERÍSTICA DE DIFERENTES REGIÕES ANATÔMICAS DA ESPÉCIE *Senegalia nitidifolia*



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: A) folhas; B) galhos; C) sementes; D) Vagens e E) Tronco com espinhos.

Para que fosse possível localizar a planta utilizou-se o trabalho de Miller (2019), onde apresenta as coordenadas (-25.2650 e -49.1433) e descreve a chave de

identificação da espécie *Senegalia nitidifolia* (figura 9). A planta foi inicialmente identificada por comparação com registros encontrados no Herbário Escola da Floresta Curitiba (EFC), o material foi identificado como sendo *Senegalia nitidifolia* Speg. Família Fabaceae e subfamília Mimosoideae.

3.2.2 Preparo do material vegetal

Após coleta, o material foi separado em porções de folhas e galhos (figura 10), o material foi seco em ambiente protegido da luz com ventilação constante, durante uma semana, com temperatura ambiente média de 23 °C.

As amostras secas foram trituradas em moinho de facas (figura 11), pesadas e armazenadas em vidros devidamente identificados e encaminhados para o preparo dos extratos brutos hidroalcoólicos de galhos e de folhas. Foram obtidos 658,2 g de amostras de folhas secas e 1136,0 g de amostra de galhos secos.

FIGURA 10 - MATERIAL VEGETAL COLETADO E SEPARADO EM GALHOS DE FOLHAS EM PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

FIGURA 11 - MOINHO DE FACAS E MARTELOS UTILIZADO NO PROCESSO DE MOAGEM DO MATERIAL VEGETAL ESTABILIZADO



FONTE: O autor (2021).

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.3.1 Umidade

A determinação do teor de umidade presente na droga vegetal foi realizada através do método descrito na Farmacopeia Brasileira 6^a Edição (2019).

Foram pesados em balança analítica de precisão 1,0 g de material vegetal seco e triturado. O material foi depositado em cadinhos previamente preparados e pesados e então levados à estufa a 100 °C até que a diferença entre as duas pesagens correspondeu a, no máximo, 0,5% do peso da amostra. Os valores obtidos foram anotados e utilizados na equação (1) para obter o teor de umidade.

Foram utilizadas amostras de folhas e galhos. As análises foram realizadas em quintuplicata.

$$Umidade (\%) = \frac{(P2 - P1)}{P3} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

P1= Peso do cadinho contendo amostra depois da secagem (g);

P2= Peso do cadinho contendo amostra antes da secagem (g);

P3= Peso da amostra (g).

3.3.2 Cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas totais foi utilizado o método descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019).

Partindo de uma alíquota de 1,0 g de cada amostra vegetal seca e pulverizada depositadas em cadinhos de porcelana previamente preparados e pesados, foram levadas a incineração em mufla por 90 minutos a 600 °C. Os valores de peso das cinzas foram anotados e utilizados no cálculo para obter o teor de cinzas totais através da equação (2).

Essa técnica é empregada para a determinar a quantidade de componentes inorgânicos presentes na amostra vegetal (BRASIL, 2019, p 112).

Foram utilizadas amostras de folhas e galhos. A análise foi realizada em quintuplicata.

$$Cinzas\ totais (\%) = \frac{(P2 - P1)}{P3} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

P1= Peso do cadinho depois da calcinação e resfriamento (g);

P2= Peso do cadinho com a amostra depois da calcinação e resfriamento (g);

P3= Peso da amostra (g).

3.4 SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Os ensaios preliminares foram realizados através de cromatografia em camada delgada (CCD), processo qualitativo fundamentado na separação de compostos presentes em uma amostra através da eluição de um solvente ou mistura com uma polaridade específica (fase móvel) que carrega a amostra sobre uma superfície contendo um composto de polaridade diferente (fase estacionária), neste caso a fase estacionária foram placas com sílica-gel GF 254 nm para todos os

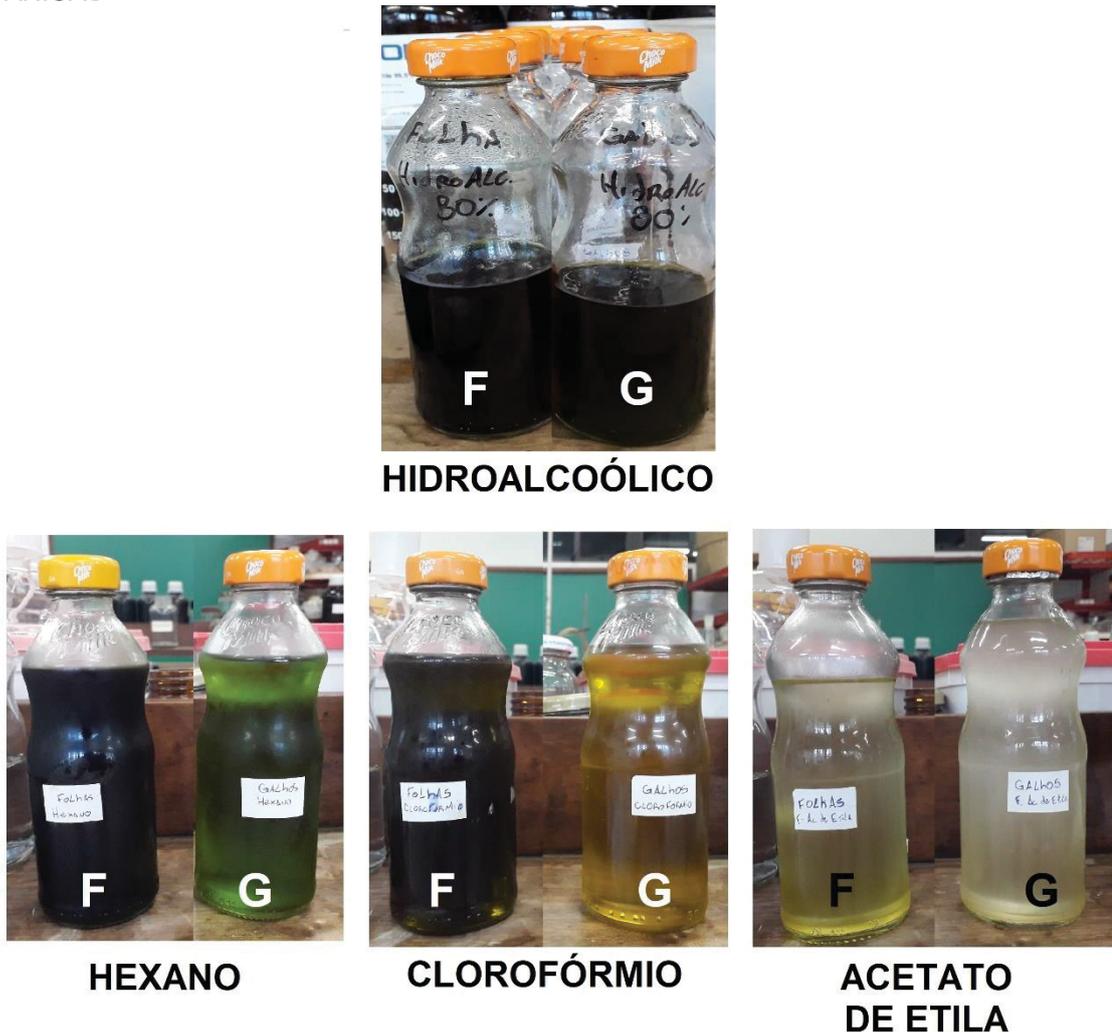
ensaios, conforme a fase móvel elui sobre a placa cromatográfica, ocorre a separação dos compostos por características físico-químicas, onde compostos de maior afinidade com a fase móvel em relação a estacionária apresentam um maior deslocamento comparado aos compostos de maior afinidade com a fase estacionária, que ficam mais retidos na placa. Ao final desta técnica temos uma separação de compostos gradual e observável através de métodos para revelação, podendo ser de natureza química ou física (PAVIA *et al.*, 2009).

Foram preparados extratos hidroalcoólicos com 200,0 mL de etanol 80%, de acordo com o método de maceração a quente descrito pela Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019), utilizando 40,0 g de cada amostra vegetal da espécie (folhas e galhos) em banho-maria (Nova Ética) a 70 °C por 1 h. Os extratos hidroalcoólicos foram concentrados e particionados com solventes de polaridade crescente, utilizando funil de separação. Ao final foram obtidas as frações hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila de cada amostra vegetal (figura 12).

As amostras utilizadas foram levadas à secura em banho maria e solubilizadas em 2,0 mL de metanol.

Para caracterização de cada grupo fitoquímico foram utilizados os métodos descritos na tabela 3.

FIGURA 12 - EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS E GALHOS E SUAS FRAÇÕES ORGÂNICAS



FONTE: O autor (2021).
 LEGENDA: F) Folhas e G) Galhos.

TABELA 3 - CONDIÇÕES APLICADAS NO ENSAIO DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS FITOQUÍMICOS

Grupo Fitoquímico	Fase Móvel	Revelador	Referência
Alcaloides	FM-1	Dragendorff	WAGNER, 1996
Flavonoides	FM-1	Reativo de NEU + Luz UV	WAGNER, 1996
Antraquinonas	FM-1	Dietilamina + calor	WAGNER, 1996
Cumarinas	FM-2	Hidróxido de potássio + calor	MIGUEL, 2003
Esteroides/triterpenos	FM-2	Vainillina sulfúrica 1% + calor	WAGNER, 1996
Iridoïdes	FM-2	Floroglucina + Ác. clorídrico + calor	MIGUEL, 2003
Taninos	FM-1	Cloreto férrico 5% Alcoólico	WAGNER, 1996

FONTE: O autor (2021).

NOTA: FM-1) Acetato de etila : ácido fórmico : ácido acético glacial : água (100:11:11:27);
 FM-2) Tolueno : acetato de etila (96:04).

3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

3.5.1 Extratos brutos de folhas e galhos

Foram preparados extratos brutos partindo do material vegetal seco e triturado das folhas e dos galhos da planta. O extrato foi obtido através do equipamento Soxhlet modificado (figura 13), em balão de vidro de 6000,0 mL em manta aquecedora, de acordo com Carvalho (2001), utilizando como solvente extrator etanol 80%.

Para o preparo dos extratos brutos de folhas e galhos foram adicionados ao aparelho Soxhlet, contendo pérolas de vidro, 658,2 g de material seco e triturado com 7300,0 mL de etanol 80% para o extrato de folhas e 1136,0 g de material seco e triturado com 7000,0 mL de etanol 80% para o extrato de galhos. O processo de extração foi realizado com dez ciclos de refluxo do aparelho. Os volumes obtidos foram de 6800,0 mL de extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *S. nitidifolia* e de 5100,0 mL de extrato bruto hidroalcoólico de galhos de *S. nitidifolia*.

FIGURA 13 - APARELHO DE SOXHLET COM MATERIAL VEGETAL UTILIZADO NO PREPARO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *S. nitidifolia*



FONTE: O autor (2021).

Ao final, uma alíquota de cada extrato foi retirada para cálculo de teor de sólidos e rendimento do processo de extração. Também foi separada um volume correspondente a 3,0 g de extrato seco de amostra (240,0 mL de extrato de galhos e 146,34 mL de extrato de folhas) a fim de serem utilizados nos ensaios posteriores para comparação dos resultados de suas frações orgânicas.

O extrato foi concentrado em aparelho de rota-evaporador e levado para particionamento em aparelho Soxhlet em solventes orgânicos de diferentes polaridades.

3.5.1.1 Teor de sólidos dos extratos brutos

Os cálculos de teor de sólidos presentes nos extratos brutos das folhas e dos galhos foram realizados utilizando uma alíquota de 2,0 mL de extrato em placas de petri previamente preparadas e pesadas. O procedimento foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Primeiramente as placas de petri foram lavadas com água e sabão, após secagem foram limpas com álcool e postas a secar em estufa (100 °C) até o peso constante. As placas foram então pesadas e anotado os valores para os cálculos.

Foram adicionados 2,0 mL dos extratos, utilizando pipetas volumétricas, e levadas à secura em estufa a 100 °C.

As placas contendo os extratos secos foram pesadas até o peso constante e os valores utilizados no cálculo para a determinação do teor de sólidos presente nos extratos brutos.

3.5.1.2 Rendimento do processo de preparo dos extratos brutos etanólicos

Os volumes dos extratos ao final do processo e os valores do teor de sólidos foram utilizados para o cálculo do valor do rendimento obtido no processo de extração através da equação (3).

$$\text{Rendimento Extrato Bruto (\%)} = \frac{(\text{Vol. EB} \times \text{TS})}{\text{MV}} \quad (3)$$

Onde:

Vol. EB = Volume de extrato bruto obtido (mL);

TS= Teor de sólidos do extrato bruto (%);

MV= Quantidade de material vegetal utilizado (g).

3.5.2 Particionamento dos extratos brutos de folhas e galhos

Os extratos brutos (644,03 mL de extrato bruto de folhas e 1082,73 mL de extrato bruto de galhos, considerando a retirada das amostras de extrato inicial) foram submetidos a um processo de particionamento em solventes orgânicos, em etapas onde estes ficaram em contato com solventes de polaridade crescente, sendo eles hexano, clorofórmio e acetato de etila. Este processo é conhecido como extração líquido-líquido e foi realizado segundo Carvalho (2001), onde uma parcela dos compostos presentes nos extratos brutos hidroalcoólicos são retirados deste líquido por conter propriedades físico-químicas que conferem maior afinidade com o solvente orgânico em contato.

Além das frações orgânicas também foram mantidas parcelas dos extratos hidroalcoólicos (extratos brutos) e os remanescentes dos extratos hidroalcoólicos após o particionamento (extrato hidroalcoólico com percentual de seus compostos removidos e presentes de forma fracionada nos solventes orgânicos).

Foram obtidas no final deste processo cinco amostras para cada material vegetal (folhas e galhos). As dez amostras foram transferidas para frascos de peso conhecido e levados a evaporação em banho-maria a 70 °C. As massas dos sólidos resultantes de cada fração foram pesadas para cálculo de rendimento, identificadas e armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz.

As amostras obtidas foram denominadas da seguinte forma: extrato bruto de folhas (EBF); fração hexano de folhas (FHF); fração clorofórmio de folhas (FCF); fração acetato de etila de folhas (FAF); fração remanescente de folhas (FRF); extrato bruto de galhos (EBG); fração hexano de galhos (FHG); fração clorofórmio de galhos (FCG); fração acetato de etila de galhos (FAG) e fração remanescente de galhos (FRG).

3.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

3.6.1 Isolamento dos constituintes químicos

Após analisar as frações dos extratos através do método de cromatografia em camada delgada para identificação dos grupos fitoquímicos presentes em cada

amostra, foram selecionadas algumas frações para separação e identificação dos compostos através do método de cromatografia em coluna aberta (figura 14).

FIGURA 14 - ELUIÇÃO DA AMOSTRA FHG EM COLUNA CROMATOGRÁFICA SIMPLE 14S



FONTE: O autor (2022).

Foram separadas 5,0 g da fração hexano do extrato de galhos e empacotada em uma pastilha de 75,0 g de sílica-gel 60 Merck® (0,063 - 0,200mm), na qual a amostra é eluída aplicando o método de graduação de fase móvel. A cápsula de amostra em sílica foi depositada no topo da coluna e eluída em misturas de solventes orgânicos com polaridade gradativa, alterando a mistura a cada 100,0 mL de fase móvel aplicada. Foram recolhidos frações de 5,0 mL em diferentes frascos numerados e relacionados a cada grupo de frações com a fase móvel utilizada, obtendo 118 frações no final, de acordo com a tabela 4.

TABELA 4 - SISTEMA DE ELUIÇÃO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES NA FRAÇÃO HEXANO DOS GALHOS (FHG)

Frações	Hexano %(v/v)	Acetato de etila %(v/v)	Metanol %(v/v)
01 ao 03	100	0	0
04 ao 08	95	5	0
09 ao 13	90	10	0
14 ao 18	85	15	0
19 ao 26	80	20	0
27 ao 34	75	25	0
35 ao 42	70	30	0
43 ao 49	65	35	0
50 ao 56	60	40	0
57 ao 65	55	45	0
66 ao 75	50	50	0
76 ao 85	45	55	0
86 ao 93	40	60	0
94 ao 105	65	35	0
106 ao 115	0	100	0
116 ao 118	0	0	100

FONTE: O autor (2022).

3.6.2 Caracterização de constituintes químicos isolados

Frações das amostras que apresentaram substâncias isoladas pelo processo em coluna cromatográfica foram encaminhadas para o Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, no Departamento de Química.

A amostra separada por Coluna Cromatográfica selecionada para a análise de RMN presente na fração hexano dos galhos (FHG) foi identificada como FHG-08. Foram realizados testes de solubilidade da amostra e em seguida suspendida em clorofórmio deuterado, foram solicitadas análises de RMN de ^1H e ^{13}C . Para essa análise foi utilizado o aparelho de Ressonância Magnética Nuclear Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H à 200,13 MHz e ^{13}C à 50,62 MHz.

A fração obtida na separação por coluna cromatográfica foi deixada em evaporação e, ao verificar a formação de cristais, foi lavada com éter de petróleo e separada para análises de caracterização por análise de Ressonância Magnética

Nuclear (RMN). Os espectros obtidos foram analisados para elucidação da fórmula molecular destes compostos orgânicos.

3.6.3 Polifenóis totais

A avaliação do conteúdo de polifenóis totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965). Para essa análise foram testadas amostras do extrato bruto e suas frações preparadas de galhos e de folhas, sendo dez amostras no total.

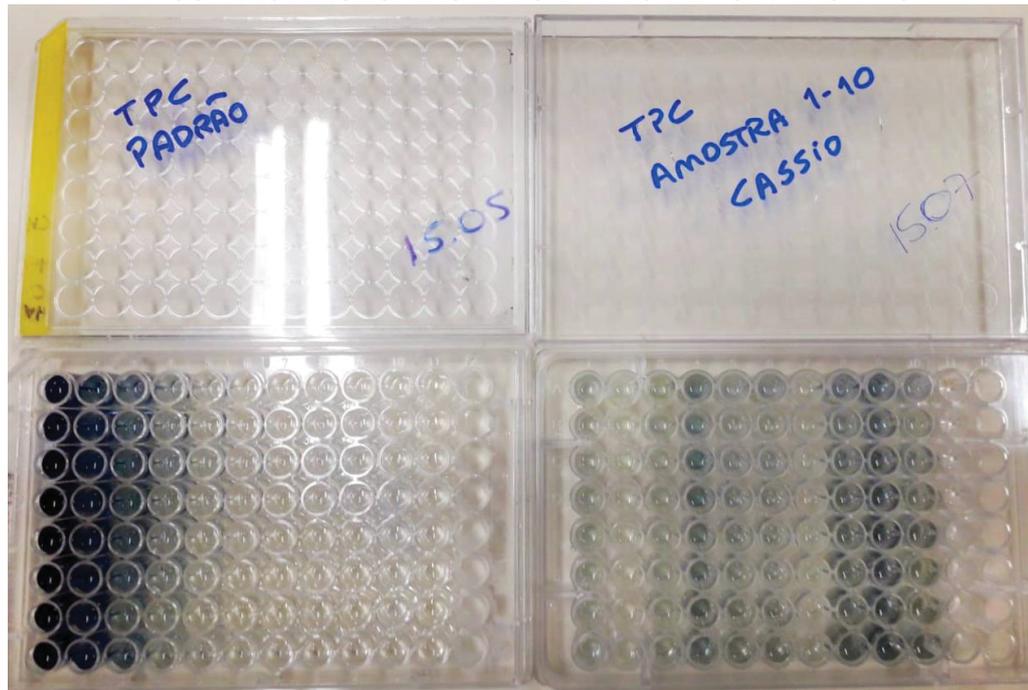
As amostras foram preparadas na concentração de 2,0 mg/mL partindo de 10,0 mg de extrato seco diluído em 5,0 mL de metanol 80%. Os tubos contendo a amostra foram agitados em vórtex e tratados em banho ultrassônico por 30 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas para a retirada do sobrenadante. O processo de extração foi repetido três vezes.

A partir da sequência de diluições de uma solução padrão de ácido gálico em metanol, foi construída uma curva de calibração em microplacas (figura 15) de 11 pontos (1,0; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003; 0,002 e 0,001 mg/mL) utilizada para determinar as concentrações de compostos fenólicos presentes nas amostras a partir do valor de absorbância demonstrado a 690 nm em aparelho espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601 PC.

A curva de calibração obtida apresentou um coeficiente de determinação $R^2=0,9989$ e equação da reta de $y = 0,5231x - 0,0216$.

Os resultados obtidos a partir de uma curva de calibração padrão de ácido gálico e expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g). As análises foram realizadas em triplicata.

FIGURA 15 - MICROPLACAS DO ENSAIO DE POLIFENÓIS TOTAIS



FONTE: O autor (2022).

3.6.4 Flavonoides totais

Para estes ensaios as amostras analisadas foram preparadas da mesma forma que no doseamento de polifenóis totais. A análise seguiu o método descrito por Zhishen *et al.*, (1999).

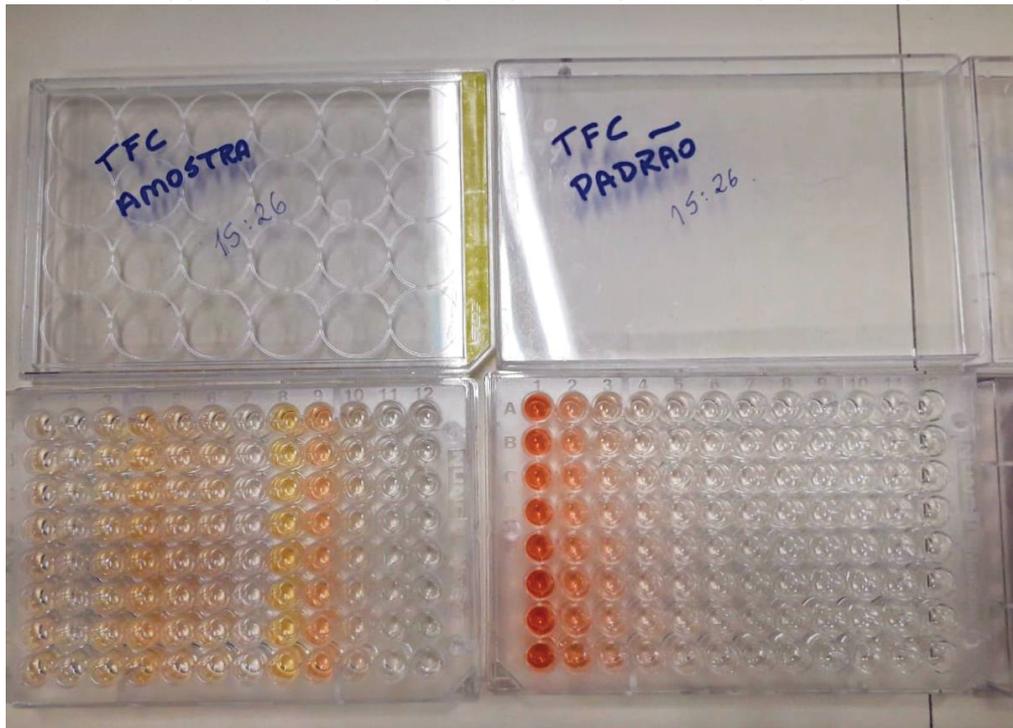
Foi construída uma curva de calibração de catequina em microplacas (figura 16) com 11 pontos (1,0; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003; 0,002 e 0,001 mg/mL) utilizada para determinar as concentrações de flavonoides totais pelo valor de absorbância a 540 nm em aparelho espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601 PC.

Os resultados são expressos em miligramas equivalentes a catequina por grama de extrato (mg ECAT/g).

A curva de calibração apresentou coeficiente de determinação $R^2=0,9997$ e equação da reta $y = 2,2362x - 0,0897$.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

FIGURA 16 - MICROPLACA DO ENSAIO DE FLAVONOIDES TOTAIS



FONTE: O autor (2022).

3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.7.1 Propriedades antioxidantes

Os ensaios realizados para avaliação da capacidade antioxidantes foram desenvolvidos com as mesmas soluções de amostras preparadas para os ensaios de polifenóis e flavonoides totais (2,0 mg/mL em metanol 80%). Foram realizados três testes laboratoriais, sendo estes a propriedade antioxidante de redução de ferro (FRAP), capacidade de captura do radical DPPH e capacidade de captura do radical ABTS.

Para os três ensaios foi utilizada uma curva de calibração em microplacas utilizando Trolox (6-hydroxy-2,5,7-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) como padrão, preparada utilizando 10 pontos (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 mMol/mL).

Os resultados para capacidade antioxidante foram representados por milimol equivalente ao Trolox (mMol TEAC/g).

3.7.1.1 Radical DPPH

O ensaio de captura do radical DPPH é um método de análise indireta, fundamentado na medida da capacidade antioxidante do extrato, que por sua vez, pode conter determinadas substâncias capazes de fornecer um átomo de hidrogênio para sequestrar o radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), formando hidrazina. Esta reação resulta na alteração da coloração de violeta para amarelo pálido. Método muito utilizado na determinação de atividade antioxidante de alimentos.

O DPPH reage com doadores de prótons, sendo reduzido. Essa reação pode ser facilmente acompanhada por espectroscopia. Quando a amostra apresenta capacidade de reduzir o DPPH evitando sua oxidação, a quantidade de DPPH restante no sistema é proporcional a capacidade antioxidante da amostra (SANCHEZ-MORENO, 2002; BONDET *et al.*, 1997).

A avaliação da propriedade antioxidante foi realizada através do método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) segundo Blois (1958), modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Foram testadas 10 frações do extrato, sendo cinco frações do extrato bruto de galhos e cinco de extrato bruto de folhas (hidroalcoólico, hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração remanescente).

Para a realização foi preparada a solução de DPPH pensando 0,0024 g e, com auxílio de um balão volumétrico âmbar, diluída em 50,0 mL de metanol (0,10 mMol/L).

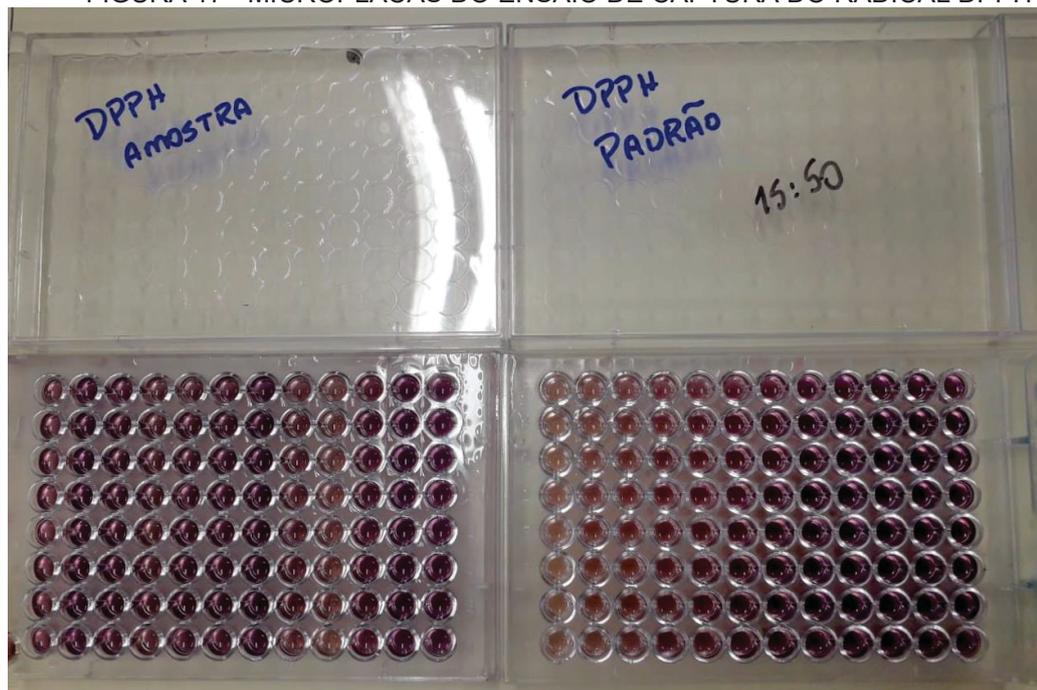
O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços (figura 17), em cada poço foi adicionado 190,0 µL de DPPH e 10 µL de cada amostra.

A curva de calibração apresentou coeficiente de determinação $R^2=0,9983$ e equação da reta $y = -2,1377x + 2,372$.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após 30min de reação em repouso no escuro as absorbâncias foram medidas em 540nm por aparelho espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601 PC.

FIGURA 17 - MICROPLACAS DO ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH



FONTE: O autor (2022).

3.7.1.2 Captura do radical ABTS

Para essa análise foi utilizado o método descrito por Re *et al* (1999).

A técnica de análise de captura do radical ABTS é um ensaio utilizado para conhecer a atividade antioxidante de compostos, tanto hidrofílicos como lipofílicos, como por exemplo os flavonoides, hidroxicinamatos e carotenóides. É fundamentado na pré-formação inicial do mono cátion radical ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico, formado pela reação de oxidação do ABTS com persulfato de potássio, com a redução subsequente deste radical por compostos presentes doadores de hidrogênio.

A formação do cátion radical é observada pela formação de coloração e sua neutralização pode ser acompanhada pela descoloração ao longo do tempo, após a adição do antioxidante (STRATIL *et al.*, 2006; SURVESWARAN *et al.*, 2007; PICCINELLI *et al.*, 2004).

Os diferenciais deste método estão nos fatos de que não a formação de intermediário durante a formação do radical, a atividade antioxidante é observada por descoloração após a adição do composto analisado, sendo assim o radical é formado livre da presença do composto estudado e por ser um ensaio aplicável em sistemas lipofílicos e aquosos (RE *et al.* 1999).

A solução de ABTS foi preparada com a adição de 192,0 mg de ABTS em água destilada e completada em balão volumétrico para 50,0 mL, a solução foi transferida para frasco âmbar e armazenado sob refrigeração.

Para o preparo da solução de persulfato de potássio a 140,0 nM, foi utilizado 378,4 mg do sal para 10,0 mL de água destilada em balão volumétrico, a solução foi transferida para frasco âmbar e armazenada à temperatura ambiente.

Após o preparo dos reagentes, o radical ABTS foi obtido através da reação de 5,0 mL da solução de ABTS com 88,0 μ L da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida é ajustada a coloração com adição de água destilada até apresentar absorvância de 734 nm.

As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços (figura 18) com a adição de 290,0 μ L de ABTS e 10,0 μ L de cada amostra, assim como de branco e padrão, após 30 minutos em repouso foi medida a absorvância em 690 nm por aparelho espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601 PC.

A curva de calibração apresentou coeficiente de determinação $R^2=0,9921$ e equação da reta $y = -2,0198x + 1,7875$.

A análise foi realizada em triplicata.

FIGURA 18 - MICROPLACAS DO ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS



FONTE: O autor (2022).

3.7.1.3 Capacidade antioxidante de redução do ferro (FRAP)

A metodologia utilizada nesta análise foi descrita por Benzie e Strain (1996).

A avaliação de capacidade de redução de ferro está fundamentada na atividade dos compostos presentes nos extratos de reduzirem o íon Fe^{3+} (íon férrico) presente no complexo 2,4,6-tripiril-s-triazina (TPTZ), para a forma Fe^{2+} (íon ferroso). Esta reação pode ser acompanhada observando a mudança de coloração de roxo claro para um roxo intenso, a medida é realizada através da absorbância da solução, em aparelho espectrofotômetro. O aumento da absorbância é diretamente proporcional ao potencial oxidante (URREA-VICTORIA *et al.*, 2016).

A solução de cloreto férrico 20 mM foi preparada pesando 0,135 g de FeCl_3 e diluída em balão volumétrico de 25,0 mL com água destilada.

Solução de TPTZ 10mM preparado pesando 0,03212 g de TPTZ e diluído em 10,0 mL de HCl.

A solução de ácido clorídrico (PM 36,46) foi preparada partindo de 3,31 mL de HCl concentrado diluído e ajustado para o volume de 1,0 L em balão volumétrico com água destilada.

Tampão acetato 300 mM (pH 3,63) preparado adicionando 1,87 g de acetato de sódio anidro com 16,0 mL de ácido acético glacial com o volume ajustado para 1,0 L, em balão volumétrico com água destilada.

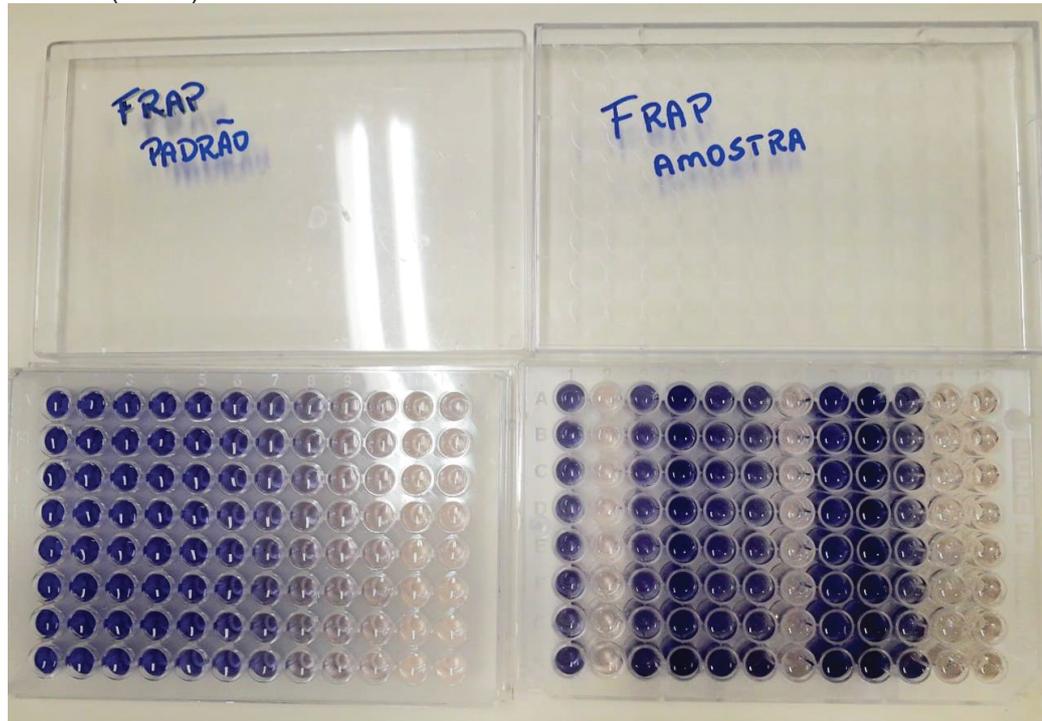
Solução de FRAP preparada no momento da análise, em erlenmeyer coberto com papel alumínio.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços (figura 19). O volume de 290,0 μL de solução FRAP foi adicionado ao poço, em seguida 10,0 μL da amostra foi adicionado e deixado reagir por 30 min em repouso no escuro e medida a absorbância em 570 nm por aparelho espectrofotômetro Shimadzu®, modelo UV-1601 PC.

A curva de calibração apresentou coeficiente de determinação $R^2=0,9965$ e equação da reta $y = 1,2307x - 0,1727$.

A análise foi realizada em triplicata.

FIGURA 19 - MICROPLACAS DO ENSAIO DE PODER ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)



FONTE: O autor (2022).

3.7.2 Atividade antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas segundo o método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo, conforme CLSI e padronizado por Veiga *et al.* (2019).

3.7.2.1 Preparo do inóculo

As cepas bacterianas testadas foram semeadas em placas de petri com ágar CLED como meio de cultura 24 horas antes do ensaio e mantidas em estufa a 37 °C.

No dia seguinte a suspensão bacteriana foi preparada transferindo a colônia bacteriana para 1,0 mL de solução fisiológica (solução salina 0,9%) e agitando até apresentar turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland ($\sim 1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida a suspensão foi diluída em proporção 1:20 ($\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL).

As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

3.7.2.2 Preparo da solução estoque das amostras

Foram preparadas soluções estoque das amostras na concentração de 20,0 mg/mL em 1,0 mL de solução salina 0,9% estéril com DMSO 10%. O processo de solubilização foi realizado com agitação em vórtex e posteriormente banho ultrassônico a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos para separação de partículas em suspensão.

3.7.2.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

Utilizando microplacas de 96 poços com fundo em “U” foram preparadas as amostras, controle positivo e controle negativo.

As amostras foram diluídas caldo Mueller Hinton. No primeiro poço foi adicionado 190,0 µL de caldo e 10,0 µL das soluções estoque das amostras, totalizando 200,0 µL de amostra, em seguida foram realizadas diluições seriadas transferindo 100,0 µL do primeiro poço para outro poço contendo 100,0 µL de caldo, esse procedimento foi repetido até a obtenção das concentrações 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,62 µg/mL e 7,8 µg/mL. Ao final foram adicionadas 10,0 µL da suspensão bacteriana para cada concentração (COCKERILL *et al.*, 2012).

Para confirmar a não interferência do líquido diluente nos resultados foram preparados 10,0 µL do mesmo (solução salina com 10% de DMSO) com 90,0 µL de caldo e 10,0 µL de suspensão bacteriana.

Como controle positivo, o agente antimicrobiano gentamicina (100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,56 µg/mL; 0,78 µg/mL; 0,390 µg/mL; 0,195 µg/mL; 0,097 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,02 µg/mL) foi adicionado aos poços.

Os controles negativos foram 100,0 µL de caldo com 10,0 µL de suspensão bacteriana.

As microplacas foram então mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas até a realização da leitura dos resultados. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A determinação das concentrações que apresentaram inibição total do crescimento bacteriano foi realizada a olho nu e expressas em microgramas por mililitro (µg/mL) referente ao antibiótico gentamicina.

As atividades de inibição do crescimento bacteriano apresentadas pelos extratos foram classificadas de acordo com Pessini *et al.* (2003), onde CIM menor que 100 µg/mL é considerado bom, de 100,0 a 500,0 µg/mL moderado, de 500 a 1000 µg/mL fraco e acima de 1000 µg/mL é considerado inativo.

3.7.2.4 Concentração bactericida mínima (CBM)

Na sequência dos resultados observados pelo método de CIM as concentrações que apresentaram inibição do crescimento bacteriano foram semeadas (10,0 µL) em ágar CLED e mantidas em estufa à 37 °C por 24 horas com o intuito de verificar as concentrações que apresentaram ação bacteriostática (inibição do crescimento) e as de ação bactericida (eliminação das bactérias).

O valor da concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada pela menor concentração que não apresentou crescimento de colônias bacterianas na superfície do meio de cultura e duas concentrações acima. As razões CBM/CIM também foram avaliadas para verificação de tolerância.

3.7.3 Toxicidade frente à *Artemia salina*

A toxicidade preliminar foi avaliada conforme a metodologia de Meyer (1982), com adaptações. Este ensaio é baseado no uso de diferentes concentrações das amostras em um meio onde se desenvolve o microcrustáceo *Artemia salina*, um organismo usado como controle para analisar o grau de letalidade de uma substância.

Diluições da amostra foram preparadas e adicionadas a um sistema onde uma quantidade conhecida de *A. salina* se desenvolve, após o intervalo de 24 horas foram verificados os números de náuplios mortos e vivos que estiveram em contato com as substâncias analisadas. Os dados foram tratados através de métodos estatísticos para estabelecer o valor da CL₅₀, substâncias que apresentam valores de CL₅₀ menores que 1000 µg/mL são consideradas potencialmente tóxicas.

3.7.3.1 Preparo da solução salina

Para simular o ambiente natural de desenvolvimento de *A. salina* foi preparado uma solução salina de "água do mar artificial" utilizando 14,13 g de sal marinho (Instant

Ocean Sea Salt) em 400,0 mL de água destilada. O pH foi mantido entre 8-10, ajustado com carbonato de sódio, caso necessário. A solução foi aerada por 30 minutos com compressor de ar.

3.7.3.2 Eclosão dos cistos

Foram pesados 200,0 mg de cistos de *A. salina* e adicionado aos 400,0 mL da solução salina preparada anteriormente. Em um béquer de 1000 mL, foram mantidos em agitação leve sob iluminação de 20 Watts por 48 horas, para induzir a eclosão dos cistos.

3.7.3.3 Preparo das amostras e controles

Soluções estoques das amostras foram preparadas com 100,0 mg das amostras solubilizadas em 1,0 mL de DMSO e completando com solução salina, em balão volumétrico, até 100,0 mL, resultando na concentração de 1000 µg/mL em solução salina com DMSO 1,0%.

Partindo das soluções estoque, as amostras foram preparadas nas concentrações 10 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL; 750 µg/mL e 1000 µg/mL, conforme a tabela 5. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

O preparo do controle positivo foi realizado da mesma forma que as amostras utilizando sulfato de quinidina, em soluções com as mesmas concentrações.

Como controle negativo foi utilizado solução de DMSO 1,0 % em solução salina.

TABELA 5 - DILUIÇÕES PARA UTILIZADAS PARA AS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS ANALISADAS NO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE *A. salina*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Volume Solução Estoque (μL)	Volume Solução Salina (μL)
1000	5000	-
750	3750	1250
500	2500	2500
250	1250	3750
100	500	4500
50	250	4750
10	50	4950

FONTE: O autor (2022).

3.7.3.4 Avaliação da toxicidade

Foram transferidos 10 náuplios de *A. salina* para frascos de penicilina contendo o volume de 5,0 mL para cada concentração preparada das amostras, em quintuplicata. Após 24 horas em local aberto e temperatura ambiente foram realizadas as contagens de náuplios mortos e vivos.

3.7.3.5 Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados foram analisados através do programa estatístico SPSS Software, versão 23.0. A determinação dos valores de CL_{50} foram realizadas pelo método probit (FINNEY, 1971), com intervalo de confiança de 95% e valores de X^2 .

Resultados de CL_{50} maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ indicam não toxicidade das amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.1.1 Teor de umidade e cinzas totais de galhos e folhas

Os resultados para o teor de umidade para as amostras de galhos e folhas secas e trituradas da espécie *Senegalia nitidifolia* estão descritos na tabela 6.

TABELA 6 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS PARA GALHOS E FOLHAS

Amostra	Umidade (%)	Cinzas totais (%)
Galhos	6,13%	3,37%
Folhas	6,00%	7,43%

FONTE: O autor (2021).

As amostras vegetais secas e trituradas de folhas de *S. nitidifolia* apresentaram um teor de umidade de 6,0% e teor de cinzas totais igual a 7,43%, enquanto as amostras de galhos secos e triturados apresentaram teor de umidade de 6,13% e de cinzas 3,37%.

4.2 SCREENING POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Os resultados obtidos nas análises preliminares para caracterização de grupos fitoquímicos presentes na espécie estão apresentados na tabela 7.

TABELA 7 - RESULTADO DAS ANÁLISE PRELIMINARES PARA GRUPOS FITOQUÍMICOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Amostra	Esteroides/Triterpenos						
	Alcaloides	Taninos	Flavonoides	penos	Cumarinas	Antraquinonas	Iridoides
HAF	+	+	+	-	-	-	-
FHF	-	-	-	+	-	-	-
FCF	+	-	+	-	-	-	-
FAF	-	-	+	-	-	-	-
HAG	+	+	+	-	-	-	-
FHG	-	-	-	+	-	-	-
FCG	-	-	+	-	-	-	-
FAG	-	-	+	-	-	-	-

FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: HAF) Hidroalcoólico de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas; HAG) Hidroalcoólico de galhos; FHG) Fração hexano de galhos; FCG) Fração clorofórmio de galhos e FAG) Fração acetato de etila de galhos.

FIGURA 20 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA ALCALOIDES



FONTE: O autor (2021).

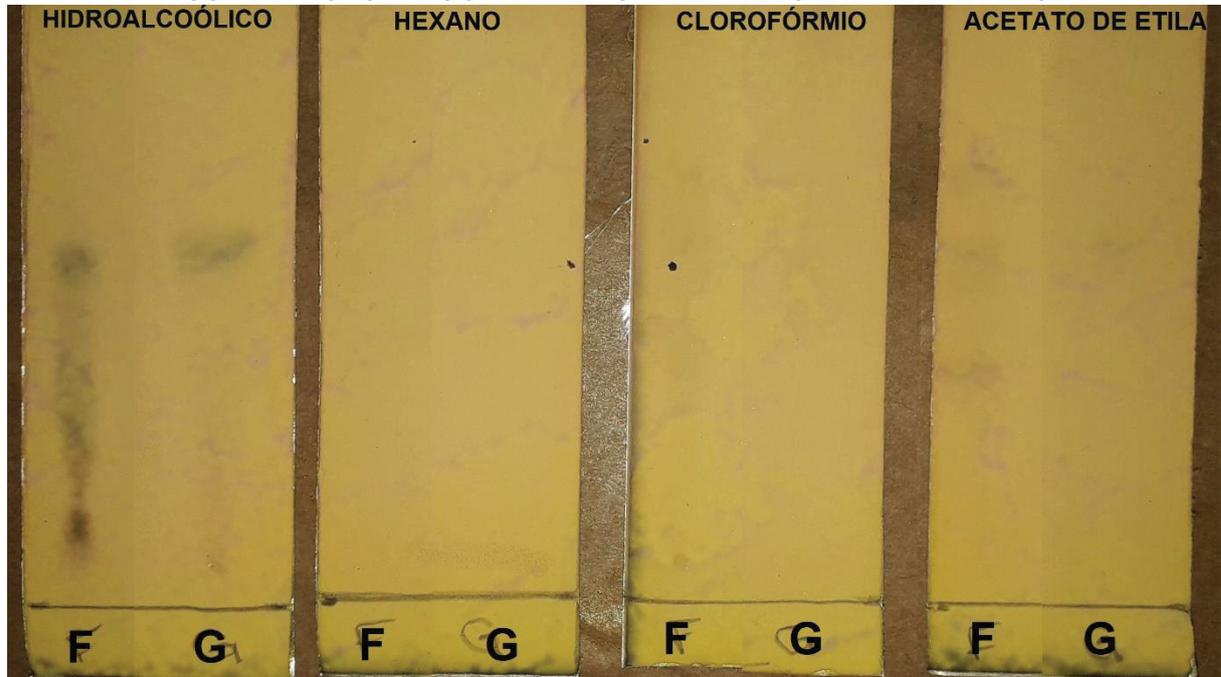
LEGENDA: F) Folhas e G) Galhos.

Os resultados obtidos na análise de alcaloides por CCD (figura 20) confirmou a presença de alcaloides com reação positiva para o reagente de Dragendorff, porém a fase móvel demonstrou não ser a ideal para a separação dos compostos analisados.

Na literatura atualmente já existem relatos da presença de alcaloides adrenérgicos como N-metil-beta-fenetilamina, N-metiltiramina, beta-fenetilamina

(Camp e Lyman, 1956; Camp e Norvell, 1966; Camp *et al.*, 1965; Evans *et al.*, 1977; Forbes *et al.*, 1995), sendo alguns desses considerados responsáveis por efeitos tóxicos em cabras e ovelhas (FORBES *et al.*, 1995; CLEMENT *et al.*, 1997).

FIGURA 21 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA TANINOS



FONTE: O autor (2021).

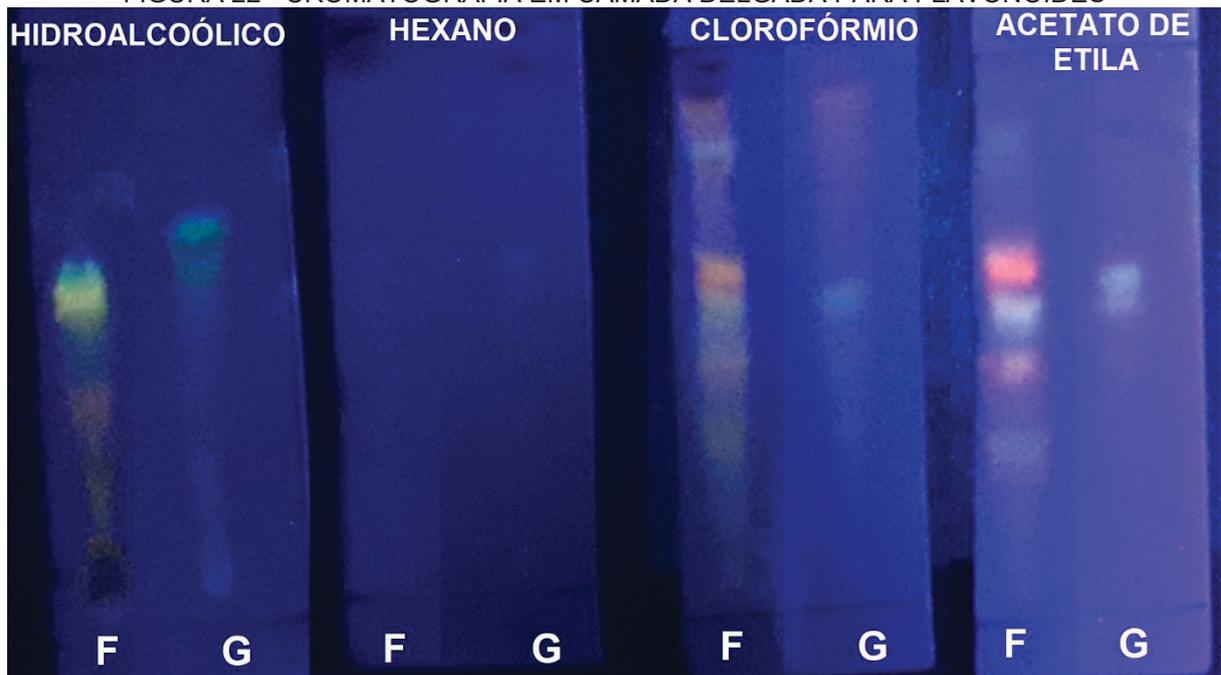
LEGENDA: F) Folhas e G) Galhos.

Na análise de CCD para taninos (figura 21) foi revelada a presença de taninos condensados nas folhas e galhos, observada apenas na fração hidroalcoólica. A reação com cloreto férrico 1% permite diferenciar taninos condensados de taninos hidrolisados pela coloração das bandas após a revelação.

Os compostos secundários mais relatados em estudos de espécies do gênero são os taninos condensados, espécies como *S. seyal* apresentam em média 13,3% de taninos na casca de *S. melífera* 19,3%. A espécie de maior quantidade de taninos já descrita no gênero é a *S. senegal* com 25,1% (MUGEDO; WATERMAN, 1992).

Os principais compostos encontrados em estudos até o momento são as proantocianidinas e constituem um importante produto comercial, sendo considerado um alimento importante na dieta animal (SMITH *et al.*, 2001).

FIGURA 22 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA FLAVONOIDES



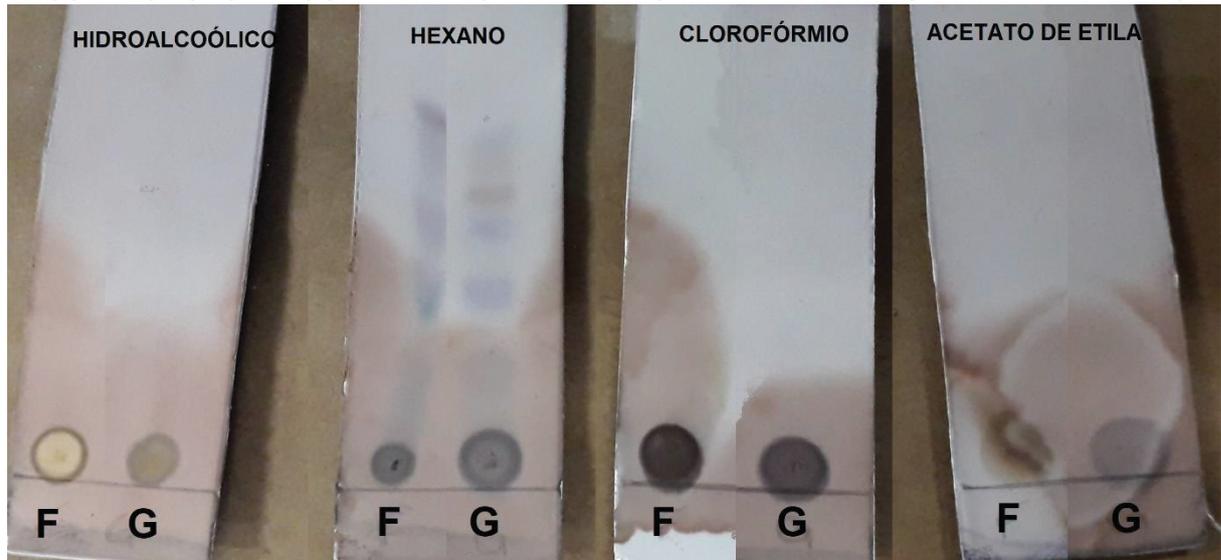
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: F) Folhas e G) Galhos.

A presença de flavonoides foi detectada nas amostras vegetais de folhas e galhos (figura 22), sendo negativa para apenas na fração hexano, isso pode ser explicado pela característica dos flavonoides, pois são compostos fenólicos de alta polaridade e não possuem afinidade com o hexano, um solvente de baixa polaridade.

As amostras de folhas apresentaram um número maior de bandas, com coloração e Rf diferentes, pelo menos cinco compostos desse grupo podem ser observados pela revelação com reagente de NEU ao ser exposto a radiação UVb. Comparando os valores de Rf e as colorações das bandas com dados encontrados na literatura, assim como informações obtidas na revisão de literatura de espécies do gênero, é possível supor que os flavonoides presentes na planta são pertencentes ao grupo das catequinas por ser o composto flavônico mais descrito no gênero (MALAN, 1991), sendo necessário mais estudos para caracterização destes compostos.

FIGURA 23 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA ESTEROIDES E TRITERPENOS



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: F) Folhas e G) Galhos.

A CCD para esteroides e triterpenos (figura 23) apresentou resultados positivos para as amostras vegetais, sendo detectada apenas na fração hexano. Compostos de características esteroidais possuem baixa polaridade, e assim, são facilmente extraídos por solventes orgânicos como hexano ou éter de petróleo. A reação com vanilina sulfúrica 1% revelou diversas bandas com diferentes R_fs demonstrando a presença de diversos compostos destes grupos.

As bandas que não sofreram deslocamento com a ação da fase móvel utilizada podem estar relacionadas com compostos saponínicos, pois também reagem com o revelador utilizado, porém, como a fase móvel utilizada foi direcionada a compostos de baixa polaridade não deslocam compostos de alta polaridade como as saponinas.

Fitoesteróis já relatados em uma série de espécies do gênero são espinasterol, estigmastenol, estigmasterol e beta-sitosterol (CLARK-LEWIS; DAINIS, 1967). Já foram avaliadas atividades antitumorais de uma variedade de triterpenos presentes em espécies de *Senegalia* (HARIDAS *et al.*, 2001; HARIAUSEK *et al.*, 2001).

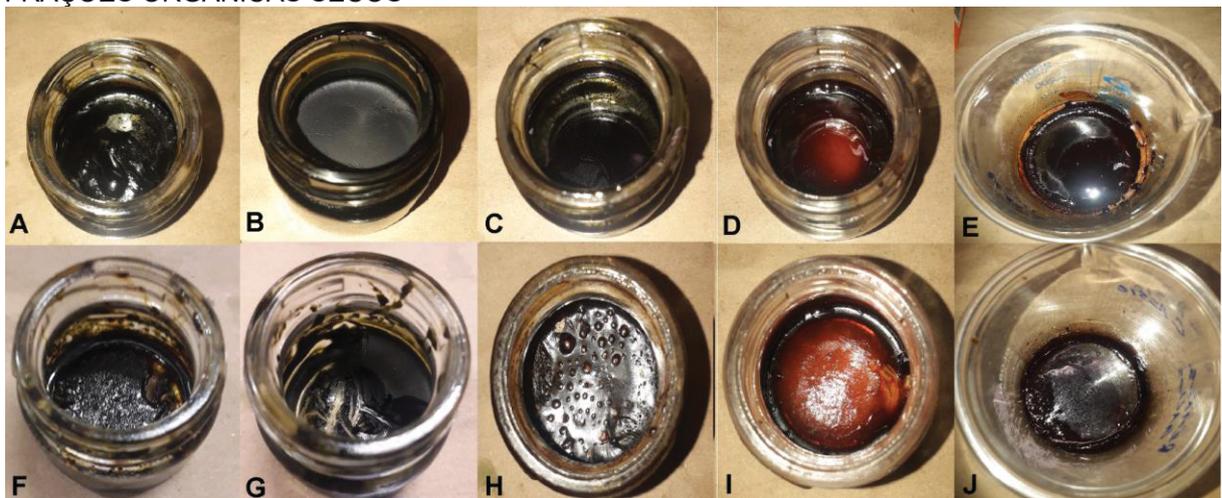
4.3 EXTRATOS BRUTOS E SUAS FRAÇÕES

4.3.1 Características dos extratos brutos e suas frações sólidas

Os extratos e suas frações após serem secos apresentaram aspectos físicos característicos, para os extratos de folhas o extrato bruto demonstrou coloração castanho escuro e textura viscosa (figura 24 a), a fração hexano coloração verde escuro e aspecto de graxa (figura 24 b), a fração clorofórmio apresentou coloração idêntica ao extrato bruto com maior fluidez, demonstrando reter água na sua mistura (figura 24 c), a fração acetato de etila teve a coloração castanho claro e a mais rígida (figura 24 d), sendo quebradiça e a fração remanescente de coloração mais escura que o extrato bruto, sendo também levemente fluídica.

O extrato bruto de galhos também apresentou coloração castanho escuro e viscoso (figura 24 f), a fração hexano com coloração verde escura e aspecto de cera (figura 24 g), fração clorofórmio muito semelhante ao extrato bruto (figura 24 h), fração acetato de etila dos galhos e a fração remanescente demonstraram as mesmas características das respectivas frações das folhas (figura 24 i e j).

FIGURA 24 - CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E GALHOS E SUAS FRAÇÕES ORGÂNICAS SECOS



FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: A) EBF; B) FHF; C) FCF; D) FAF; E) FRF; F) EBG; G) FHG; H) FCG; I) FAG e J) FRG.

4.3.2 Cálculo de rendimento dos extratos brutos

Os extratos brutos resultantes do processo apresentaram um volume de 6800,0 mL para amostra de folhas e 5100,0 mL para amostra de galhos, os extratos foram homogeneizados e avaliados os valores de teor de sólidos, sendo de 2,05% para o extrato de folhas e 1,25% para o extrato de galhos.

Partindo dos valores de volume e teor de sólidos foi possível calcular o rendimento do processo de extração, sendo de 21,18% para o extrato bruto de folhas e 5,61% para o extrato bruto de galhos. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

TABELA 8 - RESULTADO DOS CÁLCULOS DE RENDIMENTO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FOLHAS E GALHOS DA ESPÉCIE *Senegalia nitidifolia*

Amostra vegetal	Droga vegetal (g)	Volume extrato bruto (mL)	Teor de sólidos (% m/v)	Rendimento (% m/m)
Folhas	658,2	6800,0	2,05	21,18
Galhos	1136,0	5100,0	1,25	5,61

FONTE: O autor (2021).

4.3.3 Cálculo de rendimento do processo de particionamento

Após separação de parte dos extratos brutos (referente a 3,0 g de sólido) destinada a análises posteriores, os extratos foram submetidos ao processo de fracionamento por partição líquido-líquido em solventes de diferentes polaridades, obtendo as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólico. As frações foram levadas a secar e com a massa resultante de extrato seco de cada uma, foi possível calcular o rendimento do processo e a proporção de extrato equivalente a droga vegetal.

As frações clorofórmio e remanescente das folhas resultaram em um extrato fluídico, com retenção de água. Para que os valores calculados pudessem representar o mais próximo da realidade estas frações tiveram alíquotas submetidas a uma pequena análise de teor de umidade em triplicata para ser desconsiderado o valor correspondente a quantidade de líquido retido.

Os resultados dos cálculos estão apresentados na tabela 9 e 10.

TABELA 9 - RESULTADO DOS CÁLCULOS DE RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE EXTRATO DE FOLHAS DA ESPÉCIE *Senegalia nitidifolia* EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO

Fração	Extrato líquido (mL)	Extrato seco (g)	Droga vegetal (g)	Rendimento (% m/m)
EBF	146,3400	3,0000	14,1650	2,15
FHF	521,0192	10,6810	50,4297	7,66
FCF	1053,4285	21,5955	101,9667	15,48
FAF	222,4417	4,5601	21,5302	3,27
FRF	4828,4249	98,9837	467,3677	70,94
Total	6771,6500	138,8203	655,4592	99,48

FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas e FRF) Fração remanescente de folhas.

TABELA 10 - RESULTADO DOS CÁLCULOS DE RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE EXTRATO DE GALHOS DA ESPÉCIE *Senegalia nitidifolia* EM RELAÇÃO AO EXTRATO BRUTO

Fração	Extrato líquido (mL)	Extrato seco (g)	Droga vegetal (g)	Rendimento (% m/m)
EBG	240,0000	3,0000	53,4759	4,71
FHG	668,5200	8,3565	148,9572	13,11
FCG	772,6000	9,6575	172,1480	15,15
FAG	169,3440	2,1168	37,7326	3,32
FRG	3223,4400	40,2930	718,5490	63,22
Total	5073,9090	63,4238	1130,5490	99,52

FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: EBG) Extrato bruto de galhos; FHG) Fração hexano de galhos; FCG) Fração clorofórmio de galhos; FAG) Fração acetato de etila de galhos e FRG) Fração remanescente de galhos.

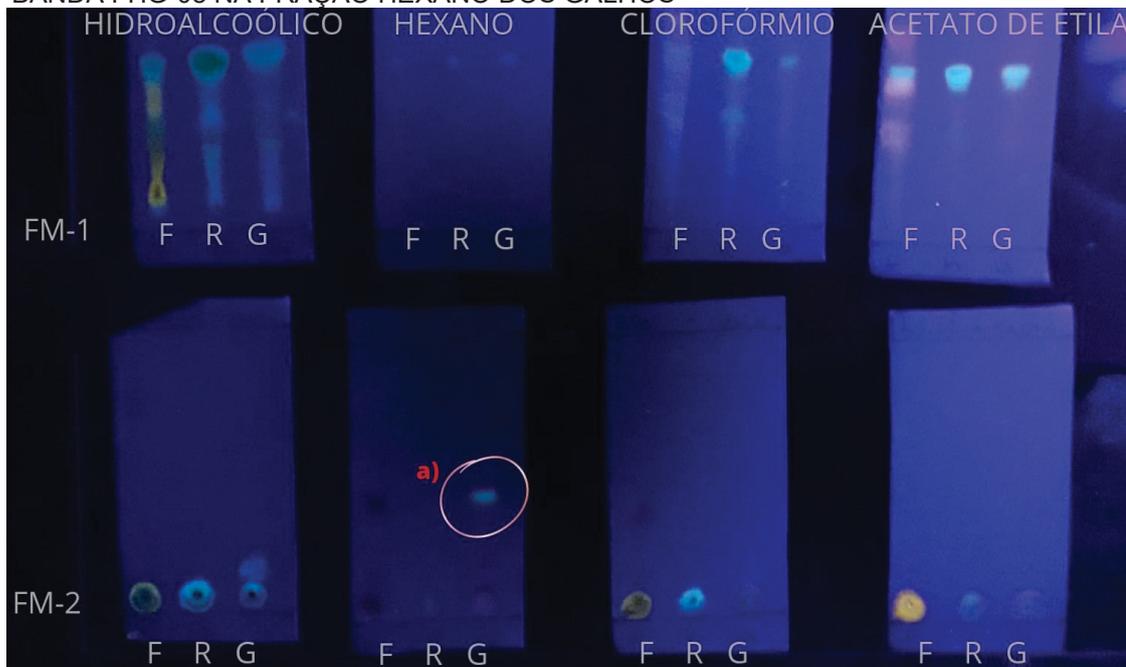
O processo de extração e particionamento resultou em um rendimento de 99,48% para as folhas e 99,52% para os galhos, sendo a perda de material durante o procedimento de 0,52% na extração das folhas e 0,48% na extração dos galhos.

4.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

4.4.1 Composto FHG-08

Ao realizar as análises cromatográficas no screening fitoquímico foi observada a presença de uma banda presente apenas na fração hexano da amostra vegetal de galhos (figura 25), voltando a atenção do estudo químico para esta banda em específico, a partir da separação dos compostos presentes na fração hexano dos galhos (FHG) na coluna cromatográfica (figura 26) e CCD, foi possível localizar e isolar um composto, sendo este denominado de FHG-08, como demonstrado na figura 26.

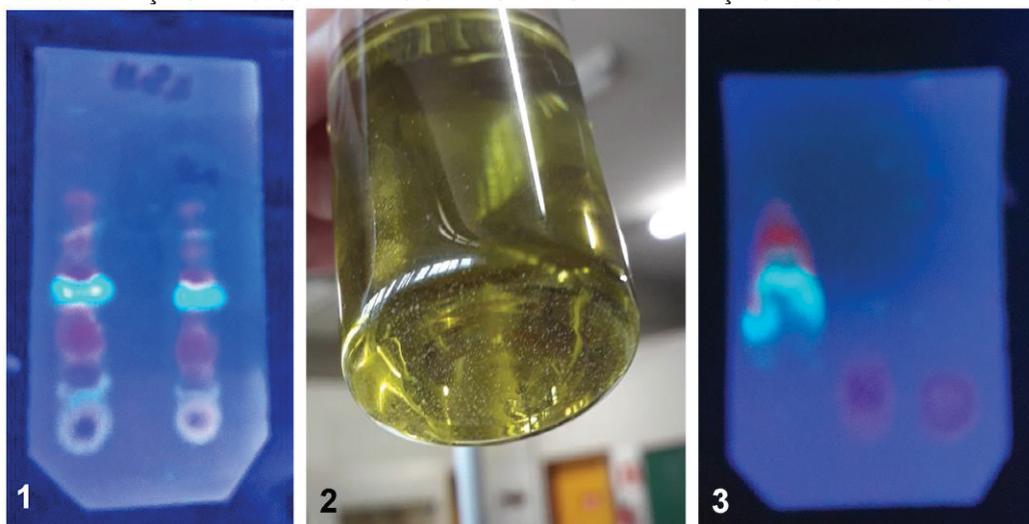
FIGURA 25 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REVELANDO A PRESENÇA DA BANDA FHG-08 NA FRAÇÃO HEXANO DOS GALHOS



FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: a) Banda de interesse; FHG-08; F) Folhas; R) Raízes; G) Galhos; FM-1: Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:27); FM-2: Tolueno:acetato de etila (96:04).

FIGURA 26 - FRAÇÃO FHG-08 EM PROCESSO DE CRISTALIZAÇÃO E CCD DE CONFIRMAÇÃO



FONTE: O autor (2022).

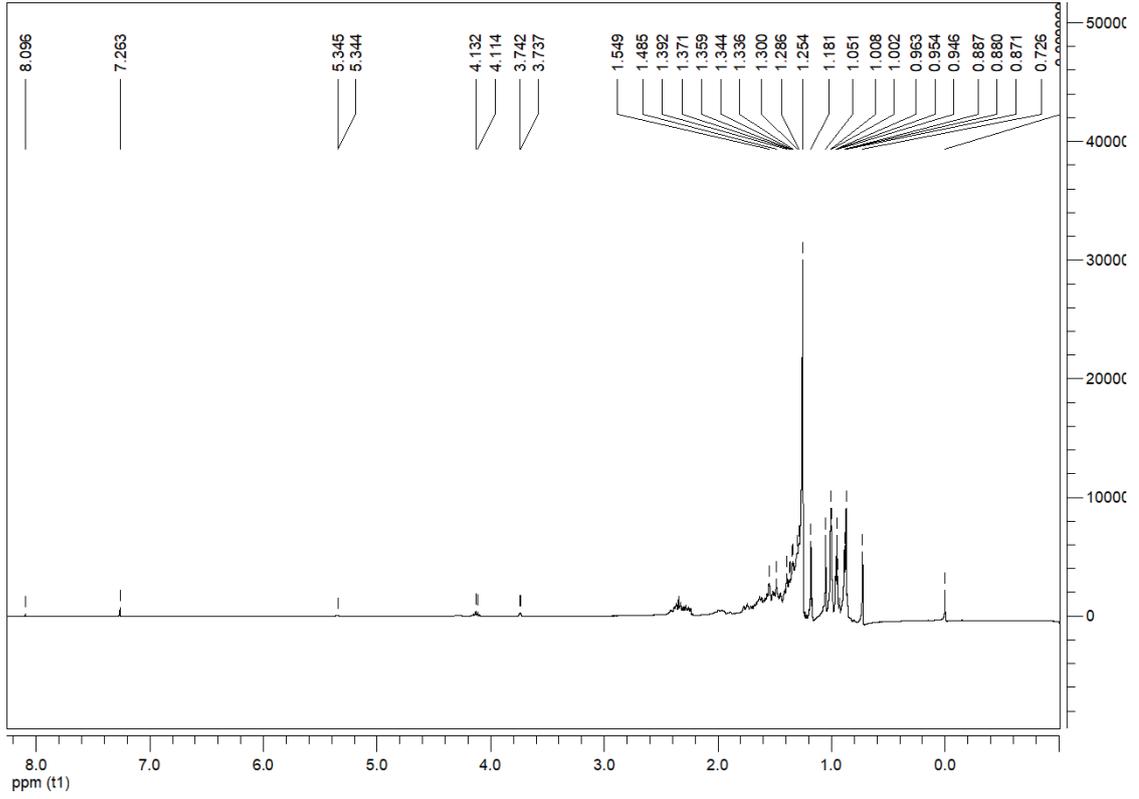
NOTA: Fase móvel utilizada = Tolueno : acetato de etila (96:04).

LEGENDA: 1) CCD da fração FHG antes da separação por coluna cromatográfica; 2) Fração número 08 da separação de bandas da fração FHG por coluna cromatográfica com precipitação de cristais e 3) CCD confirmando presença da banda FHG-08.

A fração isolada cristalizou rapidamente com a evaporação do solvente, formando precipitados cristalinos no fundo do frasco, com isso foi possível separar o composto purificado e encaminhar para análise de RMN de ^1H e ^{13}C no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear no Departamento de Química da UFPR.

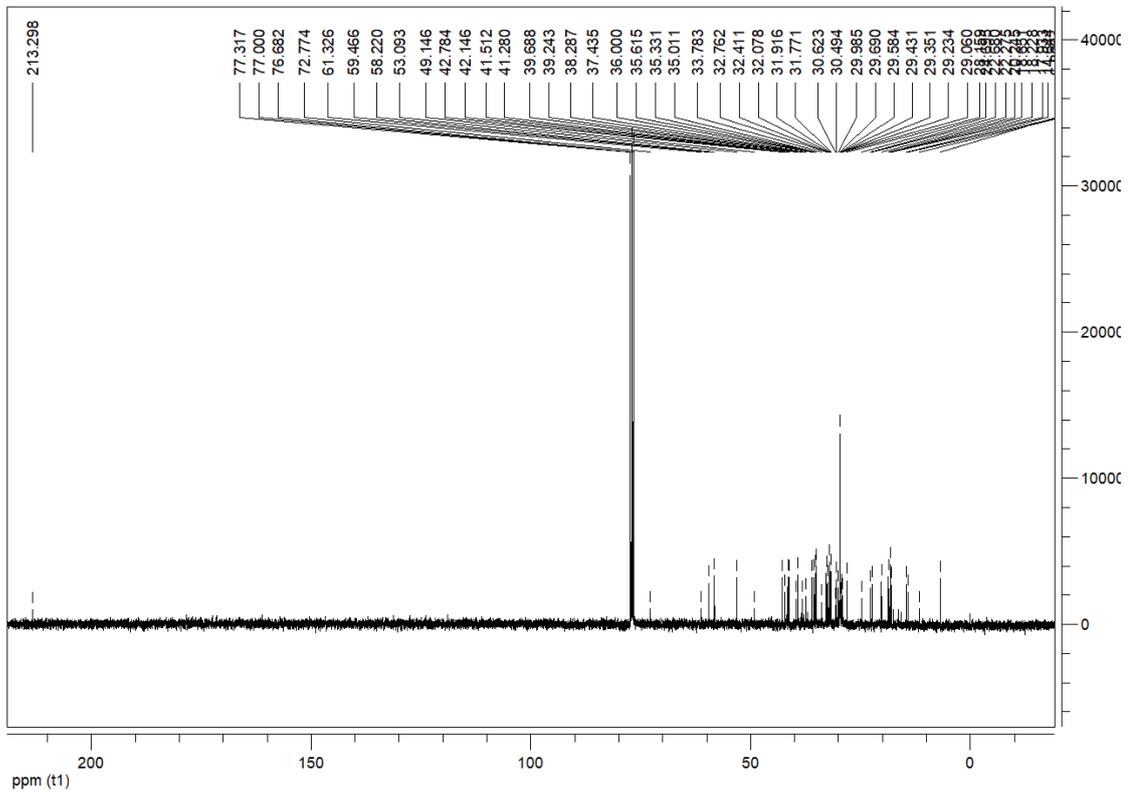
Os resultados apresentados nos espectrogramas obtidos (figura 27, 28 e 29) foram analisados e comparados com dados da literatura, a fim de caracterizar o composto isolado. A tabela 11 mostra a relação dos valores de sinais obtidos em RMN para o composto isolado com dados da literatura.

FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE ¹H DO COMPOSTO ISOLADO FHG-08

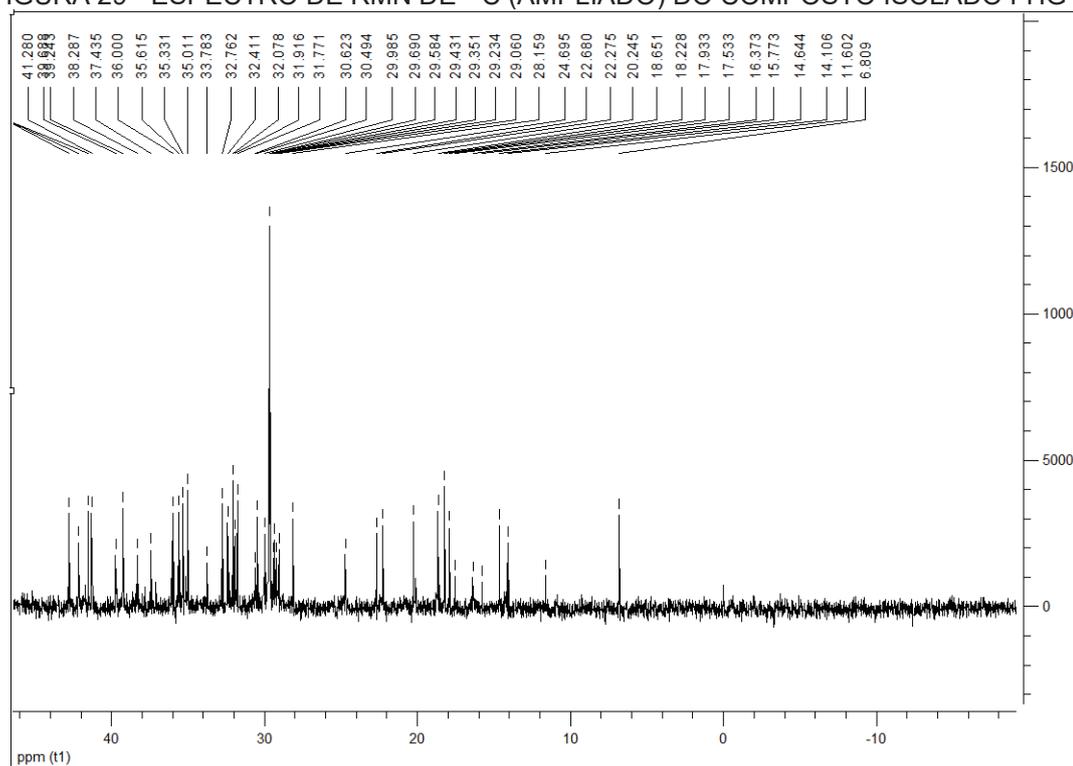


FONTE: O autor (2022).

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DO COMPOSTO ISOLADO FHG-08



FONTE: O autor (2022).

FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (AMPLIADO) DO COMPOSTO ISOLADO FHG-08

FONTE: O autor (2022).

4.4.1.1 Identificação do composto FGH-08 por ressonância magnética nuclear (RMN)

TABELA 11 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C PARA O COMPOSTO ISOLADO FHG-08 COMPARADOS A DADOS DA LITERATURA PARA FRIDELINA (CONTINUA)

^{13}C	FHG-08 (friedelina)	Referência (KROGH, 1996)	Referência (ARAGÃO <i>et al.</i> , 1990)
1 (CH ₂)	22,27	22,3	22,7
2 (CH ₂)	41,51	41,5	41,8
3 (C)	213,29	213,2	213,0
4 (CH)	58,46	58,2	58,2
5 (CH)	42,14	42,1	42,8
6 (CH ₂)	41,28	41,3	41,2
7 (CH ₂)	18,23	18,2	18,3
8 (CH)	53,10	53,1	53,2
9 (C)	37,43	37,4	37,8
10 (CH)	59,47	59,4	59,5
11 (CH ₂)	35,61	35,6	35,2
12 (CH ₂)	30,49	30,5	32,4

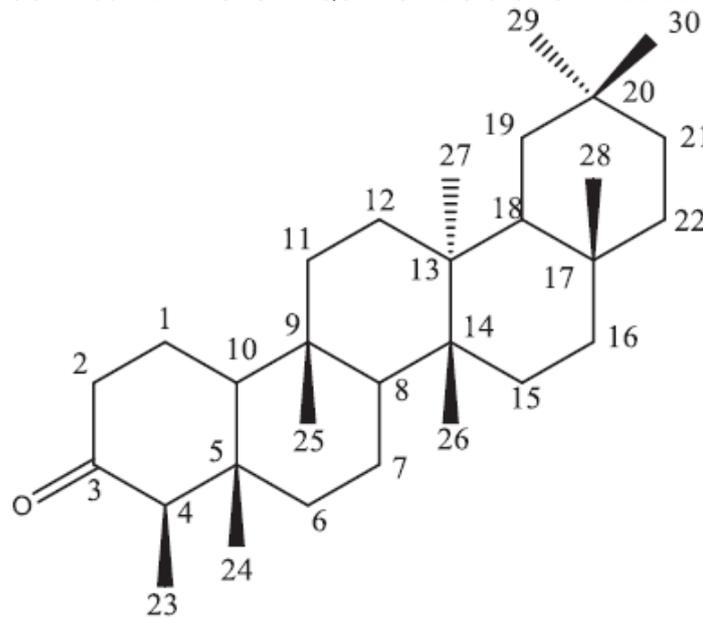
TABELA 11 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C PARA O COMPOSTO ISOLADO FHG-08 COMPARADOS A DADOS DA LITERATURA PARA FRIEDELINA (CONCLUSÃO)

13 (C)	39,68	39,7	38,2
14 (C)	38,28	38,3	39,7
15 (CH ₂)	32,41	32,4	30,6
16 (CH ₂)	36,00	36,0	36,1
17 (C)	29,98	30,0	30,0
18 (CH)	42,78	42,8	42,9
19 (CH ₂)	35,33	35,3	35,3
20 (C)	28,15	28,1	28,2
21 (CH ₂)	32,76	32,7	32,9
22 (CH ₂)	39,24	39,2	39,3
23 (CH ₃)	6,81	6,8	6,8
24 (CH ₃)	14,64	14,6	14,1
25 (CH ₃)	17,93	17,9	18,2
26 (CH ₃)	20,27	20,2	20,1
27 (CH ₃)	18,65	18,6	18,6
28 (CH ₃)	32,07	32,1	32,1
29 (CH ₃)	35,01	35,0	35,0
30 (CH ₃)	31,77	31,8	31,8

FONTE: O autor (2022).

Os espectros de RMN apresentados na tabela 11 permitiram identificar sinais que revelam a presença de carbonos quaternários (C), terciários (CH), secundários (CH₂) e primários (CH₃). A absorção na faixa de 213,0 ppm é referente ao carbono C3 da carbonila presente no composto químico e representa uma das principais características moleculares do composto isolado. A comparação dos resultados de RMN de ^{13}C com os encontrados na literatura levaram à conclusão de que a substância isolada FHG-08 se trata do triterpeno pentacíclico friedelina (figura 30) (ARAGÃO *et al.*, 1990).

FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-OXO-FRIEDELANO



FONTE: O autor (2022).

A formação do cristal de friedelina demonstrou formação em agulhas e incolor.

Pesquisa realizada por Ferro (2016) demonstrou a inibição do edema induzido por carragenina em camundongos *Swiss* machos e fêmeas em doses de friedelina de 10,0 mg/kg, com inibição da formação de edema após 2 h da administração de forma semelhante à indometacina, antiinflamatório utilizado como fármaco de referência no estudo, apresentando mesma dose e tempo de resposta. Também avaliada a ação antiinflamatória de friedelina frente a indução de edema pelos mediadores de inflamação serotonina, histamina e PGE-2 em camundongos *Swiss*, observando a redução da formação de edema 60 minutos após a administração de 10,0 mg/kg de friedelina apenas para os testes frente a histamina e PGE2, não demonstrando redução na análise induzida por serotonina.

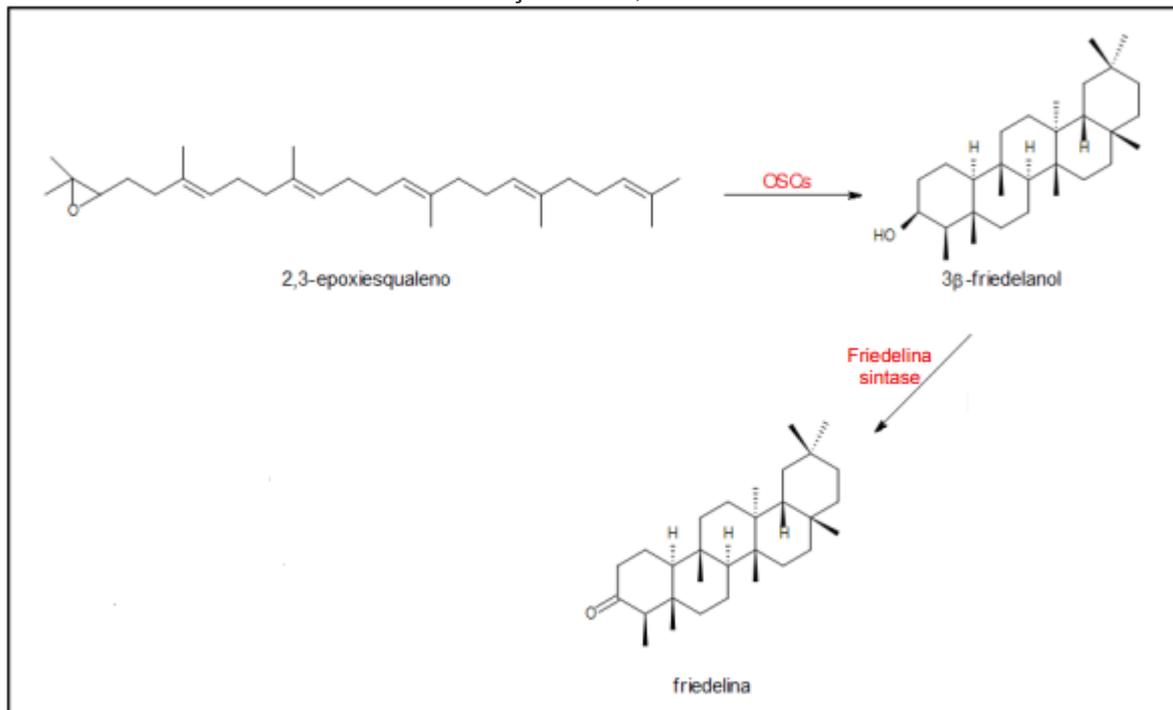
Neste mesmo estudo foi avaliada a ação da friedelina na resposta inflamatória de pleurisia induzida por LPS, sendo verificado a redução no fluxo leucócitos e neutrófilos em todas as doses testadas (1, 10 e 50 mg/kg) comparadas ao efeito antiinflamatório de dexametasona (2,5 mg/kg).

Foi observada a redução do número de neutrófilos aderidos às células endoteliais comparados ao controle utilizado (fucoidina) e a redução da quimiotaxia de neutrófilos comparados ao antiinflamatório dexametasona, a redução de quimiotaxia causada por friedelina também foi comprovada por microscopia. Na

avaliação do efeito de friedelina na quantificação de citocinas presentes no processo de pleurisia, observou-se que doses de friedelina a 50,0 mg/kg reduziu os níveis de todos os mediadores avaliados (IL-6, IL-1beta, CXCL2 e CXCL1) (FERRO, 2016).

4.4.1.2 Biossíntese dos triterpenos friedelânicos

FIGURA 31 - BIOTRANSFORMAÇÃO DE 2,3-EPOXIESQUALENO À FRIEDELINA



FONTE: Corsino *et al.* (2000).

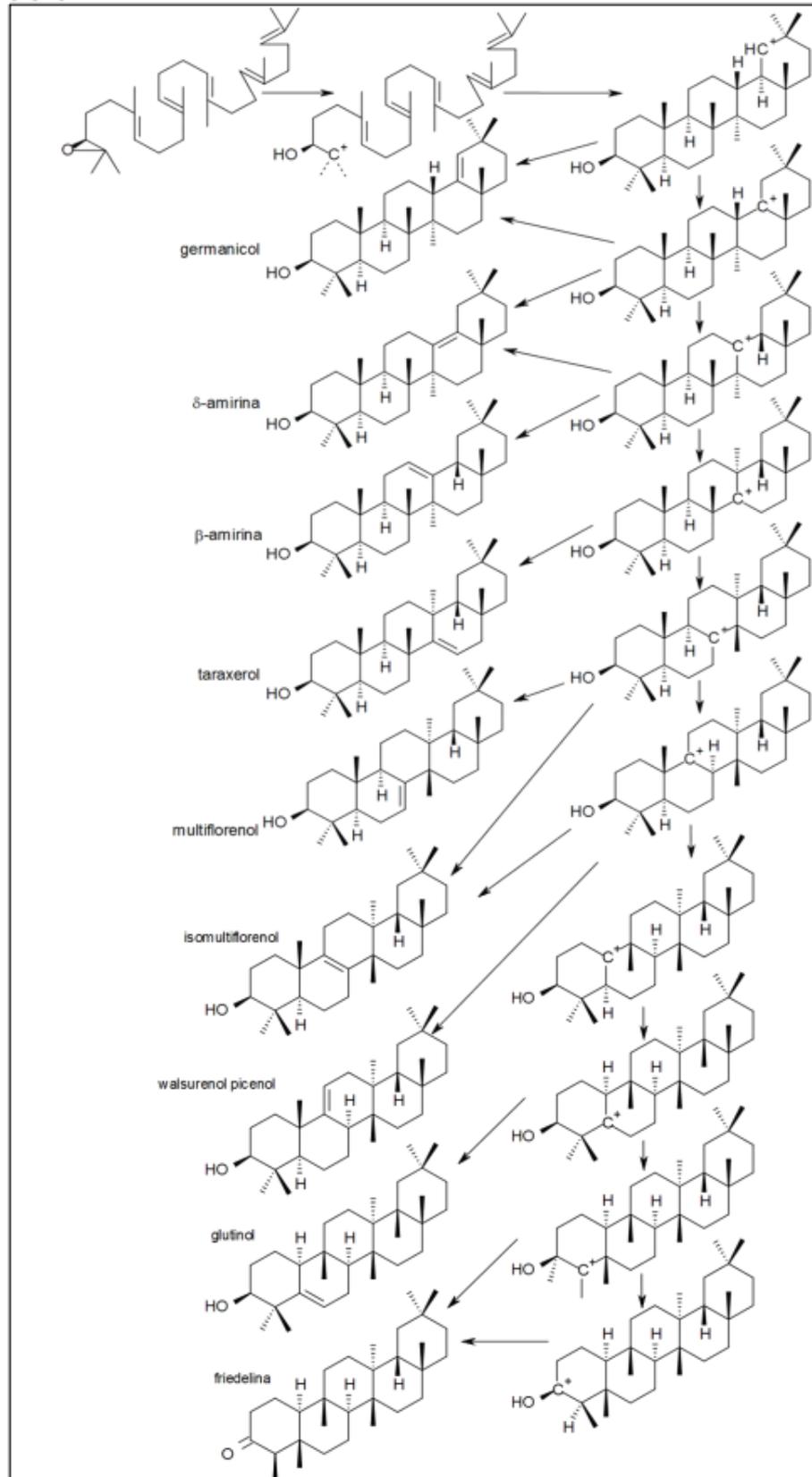
NOTA: OSCs = Oxidoesqualeno ciclase.

Foi descrito por Corsino e colaboradores (2000) a biotransformação de triterpenos através da ciclização do 2,3-epoxiesqualeno (figura 31). Este estudo demonstrou a formação de friedelina em folhas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa).

Em 2010, Wang *et al.* realizou um estudo sobre a biossíntese de terpenos pela expressão da enzima oxidoesqualeno ciclase (OSC) de *Kalanchoe daigremontiana* em *Saccharomyces cerevisiae*, esquematizando os precursores formados nos rearranjos catalisados pelas enzimas OSCs (figura 32).

As propriedades farmacológicas já descritas para os compostos da classe friedelano incluem antihipertensivo, antinociceptivo, antiedematogênico, vasorelaxante e antimicrobianos. (JIAO *et al.*, 2007; ANTONISAMY *et al.*, 2011; SUNIL *et al.*, 2013; CHINSEMBU, 2016).

FIGURA 32 - SEQUÊNCIA DE REARRANJOS E TRITERPENOS FORMADOS NA CICLIZAÇÃO CATALISADA POR OSCs



FONTE: Wang *et al.* (2010).

4.4.2 Polifenóis totais e flavonoides totais

Compostos fenólicos são considerados os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante de drogas vegetais (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBYLIA, 2002).

O ensaio de Folin-Ciocalteu é um dos métodos mais utilizados para doseamento de fenóis totais, sendo geralmente aplicado em estudos junto com métodos baseados na transferência de eletros, mostrando uma correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante (SINGLETON *et al.* 1999).

Caracteriza-se por uma mistura de ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdídicos em meio básico (coloração amarela). Os compostos fenólicos presentes na amostra são oxidados formando O₂ que reage com os ácidos formando compostos que levam a alteração de cor. A determinação de fenóis é frequentemente apresentada em equivalente a ácido gálico (SINGLETON *et al.* 1999).

Os resultados das análises de polifenóis e flavonoides totais estão apresentados na tabela 12 e no gráfico 1. As amostras vegetais de galhos apresentaram valores superiores as amostras de folhas, com destaque para as frações acetato de etila (100,37 mgEAG/g \pm 0,90 para galhos e 69,81 mgEAG/g \pm 0,60 para folhas).

TABELA 12- TEOR DE POLIFENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS DE FOLHAS E GALHOS DE *Senegalia nitidifolia*

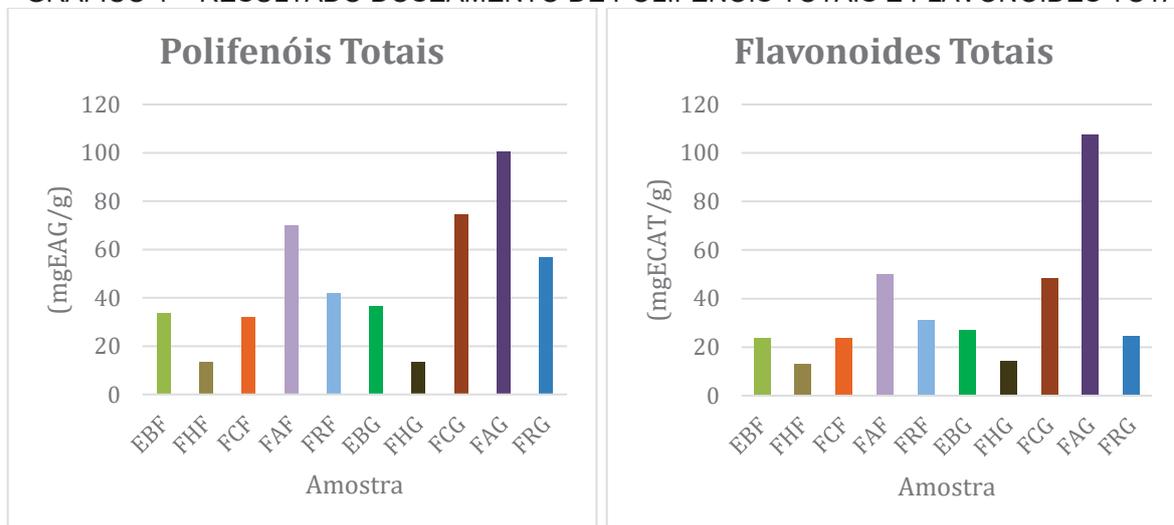
Amostra	Polifenóis totais (mg EAG/g) ± DP	Flavonoides totais (mg ECAT/g) ± DP
EBF	33,48 (± 0,77) g	23,73 (± 0,13) e
FHF	13,51 (± 0,27) i	12,88 (± 0,90) f
FCF	31,95 (± 0,07) h	23,65 (± 0,36) e
FAF	69,81 (± 0,60) c	50,00 (± 0,34) b
FRF	41,88 (± 0,49) e	31,03 (± 0,50) c
EBG	36,43 (± 0,37) f	27,01 (± 0,68) d
FHG	13,45 (± 0,46) i	14,00 (± 0,34) f
FCG	74,37 (± 0,21) b	48,40 (± 0,73) b
FAG	100,37 (± 0,90) a	107,44 (± 0,70) a
FRG	56,86 (± 0,45) d	24,40 (± 0,84) e

FONTE: O autor (2022).

NOTA: Médias seguidas das mesmas letras e números na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas; FRF) Fração remanescente de folhas; EBG) Extrato bruto de galhos; FHG) Fração hexano de galhos; FCG) Fração clorofórmio de galhos; FAG) Fração acetato de etila de galhos; FRG) Fração remanescente de galhos

GRÁFICO 1 – RESULTADO DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS



FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas; FRF) Fração remanescente de folhas; EBG) Extrato bruto de galhos; FHG) Fração hexano de galhos; FCG) Fração clorofórmio de galhos; FAG) Fração acetato de etila de galhos; FRG) Fração remanescente de galhos.

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.5.1 Propriedades antioxidantes

Os valores obtidos nos ensaios para avaliação das propriedades antioxidantes estão descritos na tabela 13 e gráfico 2, apresentados como mg equivalente ao Trolox por grama de extrato (mgTEAC/g).

As frações acetato de etila demonstraram maior presença de compostos polifenólicos e flavonoides. As frações hexano não demonstraram ação antioxidante significativa, provavelmente pela baixa concentração destes compostos.

4.5.1.1 Captura do radical DPPH

A maior inibição de radical DPPH foi apresentada pela fração acetato de etila dos galhos (595,00 mMolTEAC/g \pm 3,00), seguindo da fração acetato de etila das folhas (399,65 mMolTEAC/g \pm 3,68).

4.5.1.2 Captura do radical ABTS

Os maiores resultados apresentados para inibição de radicais ABTS foram demonstrados pela fração acetato de etila dos galhos (284,95 mMolTEAC/g \pm 2,68) seguido da fração acetato de etila de folhas (190,76 mMolTEAC/g \pm 0,93).

4.5.1.3 Capacidade de redução de ferro (FRAP)

Os resultados para as análises de capacidade de redução de ferro tiveram como destaque a fração acetato de etila de galhos (1107,02 mMolTEAC/g \pm 11,62) e a fração clorofórmio de galhos (712,78 mMolTEAC/g \pm 10,91).

TABELA 13 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE CAPTURA DOS RADICAIS DPPH E ABTS E PODER DE REDUÇÃO DE FERRO (FRAP)

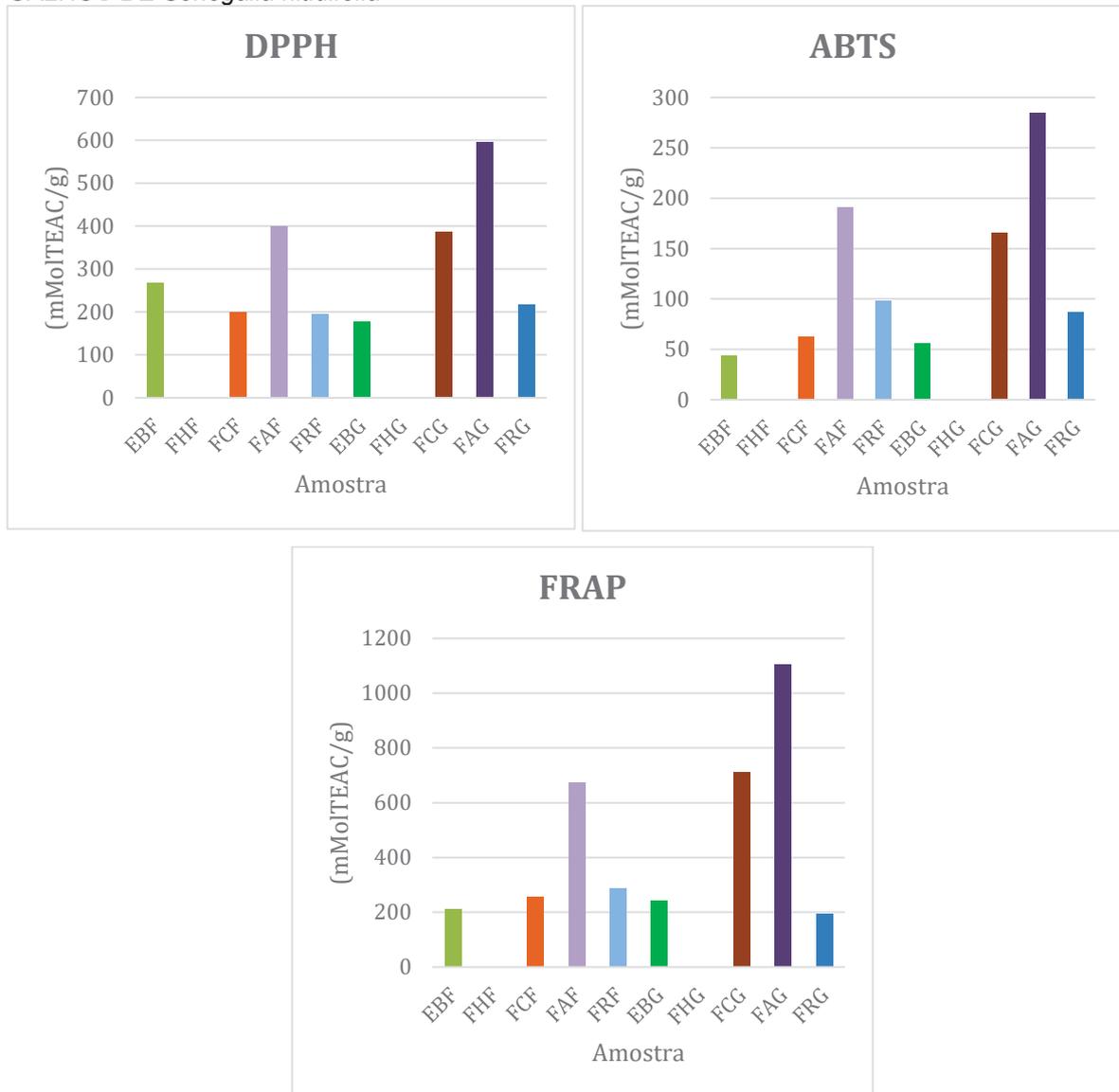
Amostra	DPPH (mMol TEAC/g) \pm DP	ABTS (mMol TEAC/g) \pm DP	FRAP (mMol TEAC/g) \pm DP
EBF	268,25 (\pm 5,32) d	43,31 (\pm 1,21) h	213,57 (\pm 3,4) g
FHF	-	-	-
FCF	198,42 (\pm 2,10) f	62,70 (\pm 1,06) f	256,34 (\pm 2,08) e
FAF	399,65 (\pm 3,68) b	190,76 (\pm 0,93) b	675,27 (\pm 2,30) c
FRF	195,21 (\pm 2,08) g	97,98 (\pm 1,28) d	286,55 (\pm 3,15) d
EBG	176,51 (\pm 1,24) h	56,21 (\pm 1,68) g	242,88 (\pm 3,61) f
FHG	-	-	-
FCG	387,03 (\pm 3,54) c	165,54 (\pm 2,07) c	712,78 (\pm 10,91) b
FAG	595,00 (\pm 3,00) a	284,95 (\pm 2,68) a	1107,02 (\pm 11,62) a
FRG	216,13 (\pm 3,90) e	86,97 (\pm 2,95) e	193,92 (\pm 2,79) h

FONTE: O autor (2022).

NOTA: Médias seguidas das mesmas letras e números na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas; FRF) Fração remanescente de folhas; EBG) Extrato bruto de galhos; FHG) Fração hexano de galhos; FCG) Fração clorofórmio de galhos; FAG) Fração acetato de etila de galhos; FRG) Fração remanescente de galhos.

GRÁFICO 2 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DPPH, ABTS E FRAP DE EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS DE *Senegalia nitidifolia*



FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas; FRF) Fração remanescente de folhas; EBG) Extrato bruto de galhos; FHG) Fração hexano de galhos; FCG) Fração clorofórmio de galhos; FAG) Fração acetato de etila de galhos; FRG) Fração remanescente de galhos.

4.5.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos na avaliação das atividades antimicrobianas pelo método de Concentração inibitória mínima são representados em $\mu\text{g/mL}$ e estão descritos a seguir.

O extrato bruto e frações do extrato de galhos não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana contra os microrganismos testados.

4.5.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

TABELA 14 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *S. nitidifolia* FRENTE ÀS CEPAS BACTERIANAS TESTADAS

Amostras	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EBF	125	1000	-	-
FHF	-	-	-	-
FCF	125	500	1000	500
FAF	62,5	500	1000	1000
FRF	125	500	1000	-

FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas e FRF) Fração remanescente de folhas.

O extrato bruto de folhas apresentou atividade apenas contra *S. aureus* e *E. faecalis*, com 125,0 µg/mL para inibição de *S. aureus* e 1000 µg/mL para *E. faecalis*. A fração de clorofórmio do extrato de folhas apresentou ação contra *S. aureus* (125,0 µg/mL), *E. faecalis* (500 µg/mL), *E. coli* (1000 µg/mL) e *P. aeruginosa* (500 µg/mL). Já a fração acetato de etila demonstrou atividade inibitória no crescimento de *S. aureus* (62,5 µg/mL), *E. faecalis* (500,0 µg/mL), *E. coli* (1000,0 µg/mL) e *P. aeruginosa* (1000,0 µg/mL). A fração remanescente demonstrou ação contra *S. aureus* (125,0 µg/mL), *E. faecalis* (500,0 µg/mL) e *E. coli* (1000,0 µg/mL). A fração hexano das folhas não apresentou atividade frente a nenhum dos microrganismos testados (tabela 14 e 15).

De acordo com a classificação de Pessini *et al.* (2003) a fração acetato de etila das folhas apresentaram resultado considerado *S. aureus* FCF como bom e moderado para EBF, FCF e FRF. Contra *E. faecalis* a atividade de FCF, FAF e FRF foi considerada fraca e inativa para EBF.

TABELA 15 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *S. nitidifolia* FRENTE ÀS CEPAS BACTERIANAS TESTADAS

Amostras	Concentração bactericida mínima (µg/mL)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EBF	250	-	-	-
FHF	-	-	-	-
FCF	250	500	1000	500
FAF	250	1000	1000	-
FRF	250	-	-	-

FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas e FRF) Fração remanescente de folhas.

Para um ensaio geral de atividade antimicrobiana é importante que os tipos de bactérias testadas sejam variados em sua natureza morfológica e bioquímica, a fim de verificar os grupos que podem ser sensíveis ou não ao agente antimicrobiano e propor um possível mecanismo de ação.

O conjunto de microrganismos utilizados deve conter bactérias de diferentes classificações como gram positivas e gram negativas, cocos, bacilos, aeróbicos e anaeróbicos, assim como fungos leveduriformes e filamentosos.

4.5.3 Toxicidade frente *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade preliminar utilizando microcrustáceos *Artemia salina* é um bioensaio desenvolvido para avaliar a concentração letal (CL₅₀) em pesquisas com produtos naturais em µg/mL. Esse método é aplicado em análises de resíduos de pesticidas, micotoxinas, níveis de poluição e componentes que comprometem o ambiente marinho (MEYER *et al.*, 1982).

Os resultados obtidos no bioensaio de toxicidade por *A. salina* estão apresentados na tabela 16.

TABELA 16 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE TOXICIDADE PRELIMINAR PELO MÉTODO UTILIZANDO *Artemia salina* COM AS FRAÇÕES DOS EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS E SUAS DILUIÇÕES

Amostra	Mortalidade/Concentração							Intervalo de	
	10 ($\mu\text{g/mL}$)	50 ($\mu\text{g/mL}$)	100 ($\mu\text{g/mL}$)	250 ($\mu\text{g/mL}$)	500 ($\mu\text{g/mL}$)	750 ($\mu\text{g/mL}$)	1000 ($\mu\text{g/mL}$)	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Confiança 95% ($\mu\text{g/mL}$)
EBF	0	1	0	2	0	3	2	>1000	-
FHF	0	1	0	0	0	0	0	>1000	-
FCF	0	0	0	0	0	0	3	>1000	-
FAF	1	0	1	2	0	2	1	>1000	-
FRF	0	1	0	0	2	1	4	>1000	-
EBG	0	0	2	5	7	11	14	>1000	-
FHG	0	1	2	2	3	5	14	>1000	-
FCG	0	3	1	4	2	2	1	>1000	-
FAG	1	1	0	0	1	3	23	>1000	-
FRG	1	1	1	0	0	0	1	>1000	-
Branco	0	0	0	0	0	0	0	>1000	-
Quinidina	2	8	8	15	26	27	35	510,36	374,55 - 751,96

FONTE: O autor (2022).

LEGENDA: EBF) Extrato bruto de folhas; FHF) Fração hexano de folhas; FCF) Fração clorofórmio de folhas; FAF) Fração acetato de etila de folhas; FRF) Fração remanescente de folhas; EBG) Extrato bruto de galhos; FHG) Fração hexano de galhos; FCG) Fração clorofórmio de galhos; FAG) Fração acetato de etila de galhos; FRG) Fração remanescente de galhos.

De acordo com Meyer *et al.* (1982), apenas amostras com o resultado inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ para CL₅₀ frente a *A. salina* podem representar uma atividade tóxica.

Nenhuma amostra apresentou CL₅₀ inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo assim, a espécie *Senegalia nitidifolia* não possui uma atividade tóxica considerando este método.

A ausência de atividade tóxica na espécie demonstrada neste ensaio supõe que o uso desta planta por seres humanos pode não representar riscos à saúde, sendo necessário mais estudos para confirmar essa hipótese.

5 CONCLUSÃO

As amostras vegetais de folhas e galhos da espécie *Senegalia nitidifolia* coletadas no Capão do CIFLOMA, no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná passaram por processo de estabilização, extração, particionamento e submetidas a análises que resultaram em dados que contribuem com o desenvolvimento científico, possibilitando conhecer melhor o perfil fitoquímico e as atividades biológicas da espécie estudada.

Foi possível identificar a substância friedelina, composto inédito em estudos das espécies do gênero. Suas atividades biológicas demonstraram bom desempenho como antioxidante e antimicrobiano. A análise de toxicidade preliminar por *A. salina* indica um grau de segurança no uso desta planta.

Os resultados do screening fitoquímico revelou compostos secundários de interesse que direcionam estudos futuros com o intuito de melhor descrever a composição química presente pela espécie *Senegalia nitidifolia*.

REFERÊNCIAS

AHMAD, F.; ANWAR, F.; HIRA, S. Review on medicinal importance of fabaceae family. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 151–156, 2016.

Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317833349_Review_on_medicinal_importance_of_fabaceae_family>. Acesso em: 20 ago. 2020.

ANDRADE, C. A. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n. 15, p.13-15, jan-mar. 2005.

Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2005000100004&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 20 ago. 2020.

_____. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n. 17, p. 231-235, abr-jun. 2007.

Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2007000200017&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 22 ago. 2020.

ARAGÃO, P. C. A. *et al.* Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Birsonima variabilis*. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 254-259, 1990.

BARROS, M. J. F.; MORIM, M. P., *Senegalia* (Leguminosae, Mimosoideae) from the Atlantic Domain, Brazil. **The American Society of Plant Taxonomists**. V. 39 p. 452-477. Abr. 2014.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Food Sci. Technol.-Leb**. V.30, p.609-615, 1997.

CORDELL, G. A. Phytochemistry and traditional medicine - The revolution continues. **Phytochemistry Letters**, Elsevier: Phytochemical Society of Europe. 2014.

Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/264085354_Phytochemistry_and_traditional_medicine-The_revolution_continues>. Acesso em: 20 ago. 2020.

CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F.; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinomethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**. v. 55, n. 7, p. 741-748, 2000.

DAOUB, R. M. A. et al. Characterization and functional properties of some natural *Acacia* gums. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. n. 17, p. 241-249, 2016.

Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658077X16300029>>. Acesso em: 22 ago. 2020.

DOUGHARI, J. H. Phytochemical constituents of some selected medicinal plants. **Phytochemicals: A global perspective of their role in nutrition and health**. v. 10, p. 15020-15024, out. 2012.

Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/279760234_Phytochemical_constituents_of_some_selected_medicinal_plants>. Acesso em: 01 set. 2020.

DU BOCAGE, A. L. et al. Palinotaxonomia de espécies de *Acacia* (Leguminosae-Mimosoideae) no semi-árido brasileiro. **Rodriguésia**. n. 59, p. 587-596, dez. 2007.

Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602008000300587>. Acesso em: 01 set. 2020.

CARVALHO, J. L. C. Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae. Curitiba, 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná.

Disponível em:

<<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/8280>>. Acesso em: 23 jul. 2021

CIALDELLA, A. M. El género acácia (leguminosae) en la argentina. Instituto de Botánica Darwinion. V. 25. P. 59-111. Ago. 2018.

FINNEY, D. J.: Probit analysis. 3. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge 1971. XV, 333 S., 41 Rechenbeispiele, 20 Diagr., 8 Tab., 231 Lit., L 5.80

FORZZA, R. C. *et al.* **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**, Jardim botânico do Rio de Janeiro. Vol 2. ago. 2010.

GRANT, S.; NIEZGODA, C. Field Museum of Natural History (Botany) Seed Plant Collection. Version 11.12. Field Museum. Occurrence dataset. 2020. <https://doi.org/10.15468/nxnqzf> accessed via GBIF.org on 2020-11-18. <https://www.gbif.org/occurrence/1228154858>

KUMAR, R. *et al.* Polyphenols from cutch tree (*Acacia catechu* Willd.): Normalize in vitro oxidative stress and exerts antiproliferative activity. **brazilian archives of biology and technology**. v. 60, jan-dez. 2017.

Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132017000100316>. Acesso em: 28 ago. 2020.

LEAL, L.S .S. *et al.* The anti-inflammatory and antinociceptive effects of proteins extracted from *Acacia farnesiana* seeds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, v.18, n.1, p.38-47, 2016.

Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722016000100038&script=sci_arttext>. Acesso em: 30 ago. 2020.

LEE, T.; CHOU, C. Flavonoid aglycones and indole alkaloids from the roots of *Acacia confusa*. **Journal of The Chinese Chemical Society**. v. 47, p. 1287-1290, 2000.

Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/263222865_Flavonoid_Aglycones_and_Indole_Alkaloids_from_the_Roots_of_Acacia_Confusa>. Acesso em: 20 ago. 2020.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, B. *Legumes of the World* Kew Publishing; 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2009

MARCHIORI, J. N. C.; Anatomia da madeira de *Acacia nitidifolia* Speg. (leguminosae mimonoideae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v 1, p 46-63, 1991.

MASLIN, B. R.; MILLER, J. T.; SEIGLER, D. S. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). **Australian Systematic Botany**. v. 16, p. 1-18, mar. 2003.

Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/248900706_Overview_of_the_generic_status_of_Acacia_Leguminosae_Mimosoideae>. Acesso em: 30 ago. 2020.

MASLIN, B. R.; MILLER, J. T.; SEIGLER, D. S. **DISTRIBUIÇÃO COSMOPOLITA DO GÊNERO *Acacia***. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany*. mar. 2003.

MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45 (5), 31–34.

MILLER, D. Z.; **Caracterização dendrológica da família Fabaceae em um remanescente de floresta ombrófila mista, Curitiba, PR**. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Trabalho de conclusão de curso. Curitiba, Paraná, 2015.

MOHIELDIN, E. A. M. et al. Anti-caries activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Terminalia laxiflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 27, p. 611-618, 2017.

Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2017000500611>. Acesso em: 28 ago. 2020.

MORIM, M. P.; BARROS, M. J. F. *Senegalia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB101011>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

MURPHY, D. J. et al. Molecular phylogeny of *Acacia* subgenus *Phyllodineae* (Mimosoideae: Leguminosae) based on DNA sequences of the internal transcribed spacer region. **Australian Systematic Botany**, v. 16, n. 1, p. 19-26, 2003.

Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/240509775_Molecular_phylogeny_of_Acacia_subgenus_Phyllodineae_Mimosoideae_Leguminosae_based_on_DNA_sequences_of_the_internal_transcribed_spacer_region>. Acesso em: 20 ago. 2020.

NAKAMURA, A. T.; ZAGOTTA-VITAL, F. A.; TERRA, V. Aspectos morfoanatômicos de *Senegalia angico* (Mart.) Seigler & Ebinger. (Leguminosae): uma abordagem taxonômica. **Acta Biológica Catarinense**. n. 6, p. 73-82, out-dez. 2019.

Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/338760973_Aspectos_morfoanatomicos_de_Senegalia_angico_Mart_Seigler_Ebinger_Leguminosae_uma_abordagem_taxonomica>. Acesso em: 01 set. 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>>. Acesso em: 30 ago. 2020.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais no nordeste do rio grande do sul, **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, n. 1, p. 17-22, jan-jun. 2003.

Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2003000100002>. Acesso em: 28 ago. 2020.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. Química Orgânica Experimental, Técnicas em escala pequena. Bookman, Segunda Edição, Porto Alegre-RS, 2009.

PEITZ, C.; KEBER, V. A. **Estudo fitoquímico, alelopático e antimicrobiano de *Acacia longifolia* Andr. (Willd.)**. 66 f. Monografia (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287431448_ESTUDO_FITOQUIMICO_AL_ELOPATICO_E_ANTIMICROBIANO_DE_Acacia_longifolia_Andr_Willd. Acesso em: 22 ago. 2020.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. Química Orgânica Experimental, Técnicas em escala pequena. Bookman, Segunda Edição, Porto Alegre-RS, 2009.

PICCINELLI, A.L.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (burrito), a folk Paraguayan tea. **J. Agric. Food Chem.** V.52, p.5863-5868, 2004.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H., Advances in legume systematics. **Royal Botanic Gardens, Kew**. University of Chicago. Chicago. 1981.

TAMASHIRO, J. Y.; ESCOBAR, N. A. G., Subfamília Mimosoideae, Instituto de Botânica. São Paulo, vol. 8 p 84-166. 2016.

TERRA, V.; MORIM, M.P. *Senegalia* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB101011>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

RE, R. et al. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, no 9–10, p. 1231–1237, 1999. ISBN: 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking), ISSN: 08915849, DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

RIBEIRO, R. D.; DE LIMA, H. C., Riqueza e distribuição geográfica de espécies arbóreas da família Leguminosae e implicações para conservação no Centro de Diversidade Vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil, Rodriguésia, fev. 2009.

RIBEIRO, P. G.; QUEIROZ, L. P. de.; MORIM, M. P. Flora da Bahia: Leguminosae – Parapiptadenia (Mimosoideae: Mimoseae). **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 16, p. 1–13, 2016.

Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/309623871_Flora_da_Bahia_Leguminosa_e_-_Parapiptadenia_Mimosoideae_Mimoseae>. Acesso em: 24 ago. 2020.

SANCHEZ, C. *et al.* Acacia gum: History of the future. **Food Hydrocolloids**, abr. 2017.

Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/316496177_Acacia_gum_History_of_the_future>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci. Technol. Int.** V.8 p.121-137, 2002.

SELIM, S. *et al.* Larvicidal activities of some bark and wood extracts against wood-damaging insects. **Maderas. Ciencia y tecnologia**. v. 19, p. 273-284, 2017.

Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/317273984_Larvicidal_activities_of_some_bark_and_wood_extract_acts_against_wood-damaging_insects>. Acesso em: 24 ago. 2020.

STRATIL, P., KLEJDUS, B., KUBAN, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. **J. Agric. Food Chem.**, V.54, p.607-616, 2006.

SURVESWARAN, S., CAI, Y.Z., CORKE, H., SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry** V.102, p.938–953, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Manual de normatização de documentos científicos**: de acordo com as normas da ABNT. Curitiba: Editora UFPR, 2022.

VITAL, F. O “complexo polyphylla” em *Senegalia* Raf. (LEGUMINOSAE Juss.: “CLADO MIMOSOIDEAE”): **Abordagens Morfoanatômica e Taxonômica**. Universidade Federal de Lavras. MG. 2018.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814698001022> >.

WANG, Z.; YEATS, T.; HAN, H.; JETTER, R. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 39, p. 29703-29712, 2010.

YAHARA, T. *et al.*, Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies. *Taxon*. abr. 2013.