

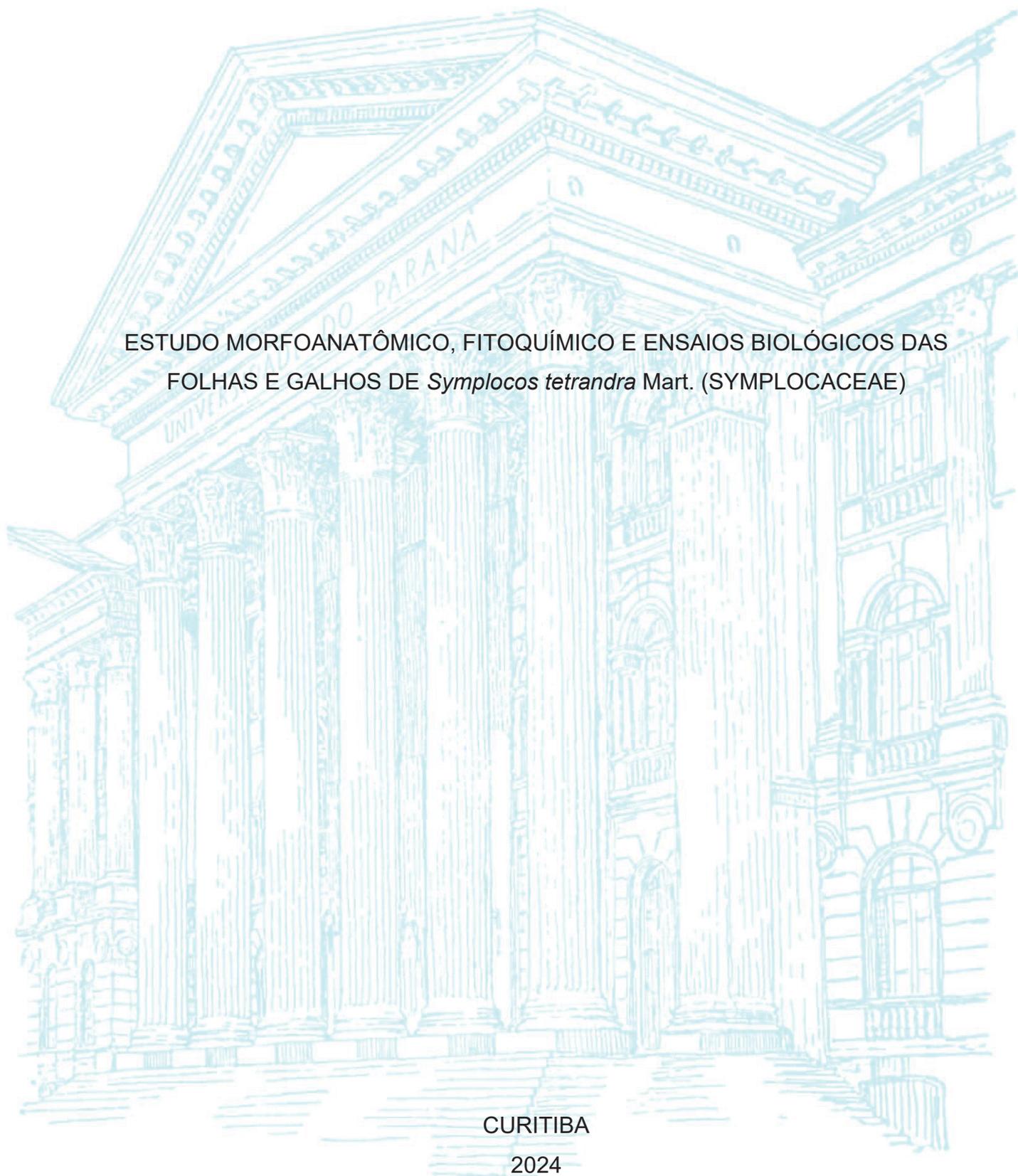
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DE FÁTIMA GARCIA

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS DAS
FOLHAS E GALHOS DE *Symplocos tetrandra* Mart. (SYMPLOCACEAE)

CURITIBA

2024



JULIANA DE FÁTIMA GARCIA

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS DAS
FOLHAS E GALHOS DE *Symplocos tetrandra* Mart. (SYMPLOCACEAE)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane De Fátima
Gaspari Dias

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Deise Prehs
Montrucchio

CURITIBA

2024

Garcia, Juliana de Fátima

Estudo morfoanatômico, fitoquímico e ensaios biológicos das folhas e galhos de *Symplocos tetrandra* Mart. (Symplocaceae) [recurso eletrônico] / Juliana de Fátima Garcia – Curitiba, 2024.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2024.

Orientador: Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Coorientador: Profa. Dra. Deise Prehs Montrucchio

1. Terpenos. 2. Antioxidantes. 3. Toxicidade. I. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. II. Montrucchio, Deise Prehs. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 547.71



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIANA DE FÁTIMA GARCIA** intitulada: **ESTUDO MORFOANATOMICO, FITOQUIMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS DAS FOLHAS E GALHOS DE *Symplocos tetrandra* Mart. (SYMPLOCACEAE)**, sob orientação da Profa. Dra. JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovada no rito de defesa. A outorga do título de mestra 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, 30 de Janeiro de 2024.

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Presidente da Banca Examinadora

LUCIANA GIBBERT
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO)

LUCIANE DALARMI

Avaliador Externo (CENTRO DE ENSINO SUPERIOR DE MARINGÁ - CURITIBA)

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmã,
orientadores, professores e amigos que
sempre me incentivaram e apoiaram nos
estudos e a todos que constantemente
buscam o conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Agradeço aos meus pais por me incentivarem e apoiarem nos estudos e minha irmã Ana Julia, por ajudar a superar os momentos difíceis.

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Josiane De Fátima Gaspari Dias por todos os ensinamentos, conselhos, ajudas, exemplo e dedicação relacionados a pesquisa e a vida.

Aos professores do laboratório, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, Prof^ª. Dr^ª. Marilis Dallarmi Miguel, Prof^ª. Dr^ª. Deise Prehs Montrucchio, Prof^ª. Dr^ª Luciane Dalarmi e Prof^ª. Dr^ª Tomoe Nakashima pelo apoio ao desenvolvimento do trabalho e aconselhamentos.

A Prof^ª. Dr^ª Lorene Armstrong por todo o ensinamento, suporte e disposição com os conhecimentos morfoanatômicos.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo suporte para realizar o estudo morfoanatômico.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar a pesquisa de mestrado.

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

Aos técnicos de laboratórios Paulo, Graça e Monica Surek pelo auxílio nas atividades desenvolvidas.

Aos amigos do mestrado que contribuíram com a pesquisa e pela troca de experiências, incentivo e parceria em todos os momentos.

Muitas vezes as coisas que me parecem verdadeiras, quando comecei a concebê-las, tornaram-se falsas, quando quis colocá-las sobre o papel.

René Descartes

RESUMO

A família Symplocaceae possui 406 espécies aceitas, distribuídas em diversos continentes e representada por gênero único, o *Symplocos* Jacq. No Brasil, o gênero está localizado na Mata Atlântica e cerrado. Estudos demonstraram potencial antimicrobiano, antitumoral e antiviral do gênero e presença de moléculas que apresentam bioatividade como flavonoides, terpenos e saponinas. O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico das folhas e galhos de *Symplocos tetrandra* Mart. Para o estudo morfoanatômico foram realizados cortes paradérmicos e transversais, observados sob microscopia de luz e eletrônica de varredura, e utilizados reagentes de identificação qualitativa de compostos. Foram constatadas estruturas como osteoesclereídes, cristais prismáticos, drusas e estômatos paracítico que reforçam a classificação taxonômica e ajudam na identificação da espécie. O estudo fitoquímico consistiu no preparo dos extratos etanólicos brutos e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente das folhas e galhos para pesquisa de metabólitos presentes na planta, para esse fim foi realizado o perfil fitoquímico e a cromatografia em camada delgada, em que se utilizou diferentes tipos de reagentes e reveladores para caracterizar compostos. Foi descoberto a presença de terpenos, flavonoides, cumarinas, saponinas e aminogrupos. Os ensaios biológicos foram divididos em pesquisa da capacidade antioxidante, toxicidade e atividade antimicrobiana. Para o antioxidante foram realizados o teor de fenólicos totais, flavonoides totais, radical DPPH e fosfomolibdênio, com as amostras dos extratos bruto e frações na concentração de 200 µg/mL em metanol. Os ensaios de fenólicos e flavonoides totais foram realizados curvas de calibração, com o ácido gálico e a quercetina, respectivamente, em que os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico e quercetina. O ensaio do radical DPPH foi realizado utilizando a curva padrão de trolox com os resultados em equivalente de trolox, e o fosfomolibdênio que utilizou o controle ácido ascórbico para os cálculos da porcentagem equivalente de ácido ascórbico. As amostras apresentaram um potencial antioxidante com destaque a fração clorofórmio dos galhos de *S. tetrandra*, por apresentar valores elevados nos ensaios conduzidos. O teste de toxicidade foi realizado seguindo o modelo com *Artemia salina* utilizando os extratos brutos e frações, os resultados foram determinados com a contagem de mortos, para o cálculo de CL₅₀ pelo programa estatístico IBM SPSS por meio do método Probitos, sendo os valores superiores a 1000 µg/mL, com as amostras classificadas como não tóxicas. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método da determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição seriada em caldo, as amostras dos extratos brutos não demonstraram inibição do crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, pela presença de turbidez no meio. A espécie *S. tetrandra* apresenta potencial para futuras pesquisas fitoquímicas, biológicas e farmacológicas, pois foram levantados dados promissores para o conhecimento científico, ajudando a elucidar uma espécie com pouco estudo.

Palavras-chave: cristais; terpenos; antioxidante; toxicidade; *Symplocos*.

ABSTRACT

The family Symplocaceae has 406 species recognized, distributed in several continents and represented by a sole genus, the *Symplocos* Jacq. In Brazil, the genus is mainly located in Mata Atlântica rain forest and Cerrado. Studies have also shown the genus to have antimicrobial, antitumor and antiviral potential, as well as the presence of molecules with biological activities such as flavonoids, terpenes and saponins. The purpose of the paper was to analyze the morphoanatomy, phytochemistry and biological tests of the leaves and twigs of *Symplocos tetrandra* Mart. For the morphoanatomical study, paradermal and transversal sections cuts were observed under a light and scanning electron microscopy and qualitative compound identification reagents were used. It was possible to verify structures such as osteosclereids, prismatic crystals, druses and paracytic stomata which reinforces the taxonomic classification and help identify the species. The phytochemical study was done by preparing the crude ethanolic extract and hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions of the leaves and twigs to research for metabolites present in the plant. To this end, the phytochemical outline and thin layer chromatography were performed, using different types of reagents and developers to characterize compounds. The presence of terpenes, steroids, flavonoids, coumarins, saponins and amino groups was discovered. The biological tests were divided into antioxidant capacity, toxicity and antimicrobial activity. For antioxidants, the content of total phenolics, total flavonoids, DPPH radical and phosphomolybdenum were measured using samples of the crude extracts and fractions at a concentration of 200 µg/mL in methanol. The total phenolic and flavonoid assays were carried out using calibration curves, employing gallic acid and quercetin, respectively, and the results were expressed as gallic acid and quercetin equivalents. For the DPPH radical the assay was carried out with the standard trolox curve with the results in trolox equivalent and percentage, and the phosphomolybdenum assay was performed using the ascorbic acid control to calculate the equivalent percentage of ascorbic acid. The samples showed antioxidant potential, especially the chloroform fraction in *S. tetrandra* twigs, which showed high values in the tests conducted. The toxicity test was carried out using the *Artemia salina* model, with crude extracts and fractions. The results were determined by counting the dead and calculating the CL₅₀ through the IBM SPSS statistical program using the Probitos method, with values above 1000 µg/mL being classified as non-toxic. Antimicrobial activity was determined using the minimum inhibitory concentration method by serial microdilution in broth. Samples of the crude extracts did not inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, due to the presence of turbidity in the broth. The *S. tetrandra* species has potential for future phytochemical, biological and pharmacological research, as promising data was collected for scientific knowledge, helping to elucidate a species with very few studies.

Key-words: crystals; terpenes; antioxidants; toxicity; *Symplocos*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA SYMPLOCACEAE	.20
FIGURA 2 -	ESTRUTURAS DOS COMPONENTES QUÍMICOS DE <i>Symplocos</i>	25
FIGURA 3 -	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA	28
FIGURA 4 -	COLETA DA ESPÉCIE <i>Symplocos tetrandra</i> Mart.	29
FIGURA 5 -	PARTES AÉREAS DE <i>S. tetrandra</i> SOLUÇÃO FAA50	30
FIGURA 6 -	TRITURAÇÃO DAS FOLHAS DE <i>Symplocos tetrandra</i> Mart.	34
FIGURA 7 -	EXTRAÇÃO POR SOXHLET DE <i>Symplocos tetrandra</i> Mart.	35
FIGURA 8 -	HIDROLATO DA HIDRODESTILAÇÃO DE <i>S. tetrandra</i>	43
FIGURA 9 -	MICROPLACAS DO PADRÃO E AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE FENÓLICOS TOTAIS	45
FIGURA 10 -	MICROPLACAS DO PADRÃO E AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE FLAVONOIDES TOTAIS	47
FIGURA 11 -	MICROPLACAS DO ENSAIO DPPH• DAS AMOSTRAS DE <i>S.</i> <i>tetrandra</i>	49
FIGURA 12 -	MICROPLACA DO ENSAIO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS DE <i>S. tetrandra</i>	51
FIGURA 13 -	<i>Artemia salina</i> Leach	52
FIGURA 14 -	MICROPLACAS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM AMOSTRAS DE <i>S. tetrandra</i> ANTES DA INCUBAÇÃO.....	55
FIGURA 15 -	MORFOLOGIA DAS FOLHAS DE <i>S. tetrandra</i>	56
FIGURA 16 -	MORFOANATOMIA DAS FOLHAS DE <i>S. tetrandra</i>	58
FIGURA 17 -	ANATOMIA DO PECÍOLO DE <i>S. tetrandra</i>	60
FIGURA 18 -	ANATOMIA DO CAULE DE <i>S. tetrandra</i>	61
FIGURA 19 -	HISTOQUÍMICA DE <i>S. tetrandra</i>	63
FIGURA 20 -	ESPECTRO DO CRISTAL PRISMÁTICO POR EDS DO PECÍOLO.....	64
FIGURA 21 -	ESPECTRO DA DRUSA POR EDS DO PECÍOLO	65
FIGURA 22 -	ESPECTRO DA DRUSA POR EDS DO CAULE	65
FIGURA 23 -	CUMARINAS COM FLUORESCÊNCIA VERDE AMARELADO ...	71

FIGURA 24 -	ESTEROIDES COM COLORAÇÃO VERDE PELA REAÇÃO DE LIEBERMANN BURCHARD	71
FIGURA 25 -	ESPUMA PERSISTENTE DO TESTE DE SAPONINAS	72
FIGURA 26 -	CCD DA FRAÇÃO HEXANO PARA TERPENOS	75
FIGURA 27 -	CCD DA FRAÇÃO REMANESCENTE PARA ALCALOIDES	76
FIGURA 28 -	CCD DA FRAÇÃO REMANESCENTE PARA AMINOGRUPO.....	77
FIGURA 29 -	CCD DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PARA FLAVONOIDES.	78
FIGURA 30 -	MICROPLACAS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM AMOSTRAS DE <i>S. tetrandra</i> APÓS A INCUBAÇÃO	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	GÊNERO <i>Symplocos</i> E COMPONENTES QUÍMICOS	24
TABELA 2 -	DILUIÇÃO PARA A CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO	45
TABELA 3 -	DILUIÇÃO PARA A CURVA PADRÃO DE QUERCETINA.....	46
TABELA 4 -	DILUIÇÕES PARA AS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE <i>A. salina</i> ..	53
TABELA 5 -	RESULTADOS DAS MEDIDAS DO LIMBO E PECÍOLO DE <i>S.</i> <i>tetrandra</i>	57
TABELA 6 -	RESULTADOS DA PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS.....	67
TABELA 7 -	RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE TEOR DE SÓLIDOS E RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS HIDROALCÓOLICOS DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>S. tetrandra</i>	68
TABELA 8 -	RESULTADOS DOS RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS	68
TABELA 9 -	PERFIL FITOQUÍMICO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>S. tetrandra</i>	70
TABELA 10 -	PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>S. tetrandra</i>	72
TABELA 11 -	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES ..	73
TABELA 12 -	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>S. tetrandra</i>	80
TABELA 13 -	TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>S. tetrandra</i>	81
TABELA 14 -	RESULTADOS DA CAPACIDADE DE CAPTURA DO RADICAL DPPH DAS AMOSTRAS DE <i>S. tetrandra</i>	82
TABELA 15 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS DE <i>S. tetrandra</i>	84
TABELA 16 -	RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE PRELIMINAR FRENTE <i>Artemia salina</i> DAS AMOSTRAS DE <i>S. tetrandra</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Carbono
°C	Graus Celsius
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIFLOMA	Ciências Florestais e da Madeira
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DPPH●	Radical DPPH
EBF	Extrato bruto folhas
EBG	Extrato bruto galhos
EDS	Espectroscopia por Dispersão de Elétrons
FAA	Formol, ácido acético glacial, e álcool etílico a 70% (v/v)
FAF	Fração acetato de etila folhas
FAG	Fração acetato de etila galhos
FCF	Fração clorofórmio folhas
FCG	Fração clorofórmio galhos
FHF	Fração hexano folhas
FHG	Fração hexano galhos
FRF	Fração remanescente folhas
FRG	Fração remanescente galhos
H	Hidrogênio
IV	Radiação infravermelha
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
m/m	Massa por massa
nm	nanômetro
O	Oxigênio
OH	Hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
R ²	Coeficiente de determinação da reta
RMN	Ressonância magnética nuclear

trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacromato-Ácido 2-carboxílico
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
W	Watt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	FAMÍLIA SYMPLOCACEAE	20
2.2	GÊNERO <i>Symplocos</i>	21
2.3	ESPÉCIE <i>Symplocos tetrandra</i> Mart.	22
2.4	PERFIL FITOQUÍMICO	23
2.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	28
3.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO	29
3.2.1	Estudo macroscópico	30
3.2.2	Processamento do material coletado	30
3.2.3	Análise microscópica	31
3.2.4	Testes histoquímicos	31
3.2.5	Microscopia eletrônica de varredura	31
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	32
3.3.1	Perda por dessecação	32
3.3.2	Teor de cinzas totais	33
3.4	PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	33
3.4.1	Teor de sólidos	36
3.4.2	Rendimento dos extratos brutos etanólicos e frações	36
3.5	ESTUDO DO PERFIL FITOQUÍMICO	37
3.5.1	Perfil fitoquímico	37
3.5.1.1	Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%	37
3.5.1.2	Pesquisa de alcaloides	38
3.5.1.3	Pesquisa de leucoantocianidinas	38
3.5.1.4	Pesquisa de heterosídeos flavônicos	39
3.5.1.5	Pesquisa de cumarinas	39

3.5.1.6	Pesquisa de substâncias iridoidais	39
3.5.1.7	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos	40
3.5.1.8	Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos	40
3.5.1.9	Preparo do extrato aquoso a 20%	41
3.5.1.10	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	41
3.5.1.11	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	41
3.5.1.12	Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos	42
3.5.1.13	Pesquisa de taninos	42
3.5.1.14	Pesquisa de aminogrupos	42
3.5.2	Extração do óleo essencial	42
3.5.3	Cromatografia em camada delgada	43
3.5.4	Fenólicos totais	44
3.5.5	Flavonoides totais	46
3.6	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	48
3.6.1	Radical DPPH	48
3.6.2	Redução do fosfomolibdênio	50
3.7	ENSAIOS BIOLÓGICOS	52
3.7.1	Teste de letalidade frente <i>Artemia salina</i> (Leach)	52
3.7.2	Atividade antimicrobiana	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1	ESTUDO MORFOANATÔMICO	56
4.1.1	Estudo macroscópico	56
4.1.2	Análise microscópica	57
4.1.3	Testes histoquímicos	62
4.1.4	Análise dos cristais por EDS e MEV	64
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	66
4.2.1	Perda por dessecação e cinzas totais	66
4.3	ESTUDO FITOQUÍMICO	67
4.3.1	Teor de sólidos e rendimento dos extratos e frações	67
4.3.2	Perfil fitoquímico	69
4.3.3	Extração do óleo essencial	73
4.3.4	Cromatografia em camada delgada	73
4.3.5	Fenólicos totais	79

4.3.6	Flavonoides totais	80
4.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	81
4.4.1	Radical DPPH	81
4.4.2	Redução do fosfomolibdênio	83
4.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS	85
4.5.1	Teste de letalidade frente <i>Artemia salina</i> (Leach)	85
4.5.2	Atividade antimicrobiana	86
5	CONCLUSÃO	89
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DO USO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO ..	99
	ANEXO 2 – FOTO EXSICATA	100

1 INTRODUÇÃO

Há vários anos, o homem tem usufruído das plantas como recurso para manutenção da vida, uma vez que estão disponíveis na natureza, podendo ser utilizadas para diversos fins como alimentação, construção, decoração e remédios. O conhecimento acumulado pelo tempo, pela busca do saber do homem em compreender o uso das plantas, principalmente para fins medicinais, tem sido foco de diversos estudos em diferentes áreas (FERREIRA et al., 2020).

Assim, as observações empíricas sobre o uso e a eficácia de plantas contribuíram de forma relevante para a exploração científica do uso tradicional, desde o manejo, preparo de remédios, dose e indicação terapêutica, favorecendo e impulsionando o estudo científico em busca de possíveis constituintes químicos nas drogas vegetais (FERREIRA et al., 2020).

O Brasil é considerado o país com a flora mais rica do mundo, com alta extensão de florestas tropicais, como a Amazônia. Fazendo parte do corpo florestal brasileiro está presente a Mata Atlântica, encontrada nas planícies e vertentes voltadas para o mar das serranias costeiras, com diversidade florística e um alto índice de endemismos de espécies. Por isso é reconhecida internacionalmente como uma das prioridades em termos de conservação de florestas tropicais (KURTZ; ARAÚJO, 2000).

Na Mata Atlântica, especialmente na região do Sul e Sudeste do Brasil, está localizada a espécie vegetal *Symplocos tetrandra* Mart. pertencente à família Symplocaceae (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023). Caracterizada por se apresentar como árvore ou arbórea com folhas simples, alternas espiraladas, tricomas simples ou ausentes, com flores actinomorfas, gamossépalas, gamopétalas, diversos estames epipétalos, anteras globosas ou elipsoides, ovário ínfero e fruto drupáceo. Popularmente é conhecida como sete-sangria, cana-preta ou pessegueiro-bravo, pelos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente (REBOUÇAS et al., 2020; ROMÃO et al., 2022).

A espécie *Symplocos tetrandra* Mart. assim como os representantes da família Symplocaceae do Brasil, ainda não foram estudadas quanto às suas possíveis propriedades farmacológicas e fitoquímicas, apenas estudos taxonômicos

referentes à família foram realizados por Miquel (1856b), Brand (1901), Bidá (1995) e Aranha Filho (2006, 2008, 2011) (REBOUÇAS et al., 2020).

Estudos conduzidos na Ásia das espécies do gênero *Symplocos* comprovaram, que algumas espécies possuem propriedades anti-HIV, antitumorais e antimicrobianas. Na medicina popular chinesa são utilizadas para tratamento de diversas doenças (ARANHA FILHO, 2011).

Devido a poucas pesquisas realizadas e publicadas nas áreas de morfoanatomia, fitoquímica e ensaios biológicos da espécie *Symplocos tetrandra* Mart., bem como o gênero e família dos indivíduos localizados no continente americano, o presente trabalho busca descrever as características encontradas em cada experimento e elucidar os resultados para descobrir possíveis metabólitos primários ou secundários da espécie vegetal, que possam ser de utilidade medicinal ou industrial, visando melhorar a qualidade de vida das pessoas e sociedade. Uma vez que pode se tornar uma nova opção para tratamentos dependendo das características dos componentes químicos encontrados, além de aprimorar o repertório bibliográfico dos *Symplocos* do Brasil trazendo mais conhecimento científico a população.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar o estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico das folhas e galhos da espécie *Symplocos tetrandra* Mart.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a revisão de literatura da família, gênero e espécie de *Symplocos tetrandra* Mart. (SYMPLOCACEAE);
- Coletar e identificar a espécie *S tetrandra*;
- Cadastrar a pesquisa no SisGen;
- Realizar o estudo morfoanatômico e histoquímico das folhas, pecíolo e caule;
- Proceder o estudo do perfil físico-químico das partes aéreas;

- Realizar os ensaios fitoquímicos preliminares com as folhas e galhos;
- Preparar os extratos brutos alcoólicos e frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólico das folhas e galhos da espécie;
- Realizar a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para caracterizar compostos dos extratos brutos alcoólicos e frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólico;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos e frações;
- Investigar o potencial antioxidante dos extratos brutos e frações orgânicas provenientes das folhas e galhos, a partir do ensaio radical DPPH e fosfomolibdênio;
- Realizar o teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* dos extratos e frações;
- Investigar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA SYMPLOCACEAE

A família Symplocaceae pertencente a ordem Ericales, possui gênero único denominado *Symplocos* Jacq. com aproximadamente 406 espécies (POWO, 2023; WFO PLANT LIST, 2023). A distribuição geográfica se dá nas zonas tropicais e subtropicais dos continentes das Américas, Ásia, sendo a maior parte na região sul e leste, e Oceania (FIGURA 1). Os representantes, geralmente, se localizam em altas altitudes, ambientes montanhosos e em locais com pouca alteração no ambiente, devido a ação humana (ARANHA FILHO, 2011; REBOUÇAS et al., 2020).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA SYMPLOCACEAE



FONTE: Stevens, 2001.

A família Symplocaceae está presente na América do Norte, Central e Sul, possuindo ao todo, 174 espécies descritas na família. São reconhecidas cerca de 45 espécies em solo brasileiro, onde 34 espécies são endêmicas, a maioria localizada na região do cerrado no Sudeste e na Mata Atlântica presente no Sul e Sudeste (ARANHA FILHO, 2008; ARANHA FILHO 2011; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023; REBOUÇAS et al., 2020).

Os representantes da família Symplocaceae possuem a taxonomia descrita como plantas lenhosas, sendo árvores e arbustos, normalmente glabros ou com tricomas simples. As folhas são simples, alternas, espiraladas ou dísticas, sem

estípulas, com característica cor verde-amarelado brilhante, inteiras e pecioladas. A margem geralmente é serrilhada na metade distal e a nervação é broquidódroma ou cladódroma. As inflorescências são axilares ou raramente terminais: racemo, panícula ou cimeira, raramente glomérulo ou uniflora (ARANHA FILHO, 2008; JOLY, 1993).

As flores são pequenas, com pedicelo geralmente articulado, bissexuadas ou raramente unissexuadas, pentâmeras ou trímeras, radiais e actinomorfas, o cálice gamossépalo e gamopétalas, possuindo número variável de pétalas de três a onze, sendo mais comum cinco pétalas em dois verticilos e soldadas apenas na base. Os estames são polistêmones ou isostêmones, epipétalos e costumam ser numerosos formando cinco distintos grupos com filetes soldados, de tamanhos desiguais, sendo os internos mais curtos. O ovário é ínfero com dois a cinco carpelos e outros tantos lóculos, cada um com dois a quatro óvulos pendentes. O fruto é indeiscente, em geral drupáceo, apresentando cálice e disco persistentes (ARANHA FILHO, 2008; JOLY, 1993).

2.2 GÊNERO *Symplocos* Jacq.

Os representantes do gênero *Symplocos* caracterizam-se pelas folhas simples, alternas espiraladas a dísticas e ausência de estípulas; tricomas simples ou ausentes, flores actinomorfas, gamossépalas, gamopétalas; estames epipétalos e numerosos; anteras globosas ou elipsoides, menores que os filetes; ovário ínfero ou raro semi-ínfero, bi a heptacarpelar; estilete único, simples e ereto; óvulos unitegmentados; fruto drupáceo e coroado pelo cálice persistente (REBOUÇAS et al., 2020).

As aplicações das espécies pertencentes a esse gênero variam conforme a localização geográfica. Na Ásia, o gênero é utilizado para montagem de cabanas e na medicina tradicional para tratamento de diferentes doenças, como dor de estômago, diarreia, disenteria, doenças oculares, gengivite hemorrágica e distúrbios uterinos e montagem de cabanas (ARANHA FILHO, 2011; KHAN, et al. 2001)

No Brasil, é empregada na ornamentação urbana, como visto em praças de Curitiba e Porto Alegre. Usada na adulteração da erva-mate, pois as folhas de *Symplocos* são morfológicamente semelhantes às folhas de *Ilex paraguariensis*

A.St.-Hil. Nos Estados Unidos, é utilizada como fonte de corante, devido à secagem em tons de amarelo. Com isso, existe a possibilidade das espécies sul-americanas de *Symplocos* possuírem o mesmo potencial por geralmente secarem de forma amarelada (ARANHA FILHO, 2011).

Muita atenção deve ser dada às espécies de *Symplocos* da Ásia, pois foi comprovado que algumas espécies possuem propriedades anti-HIV, antitumorais e antimicrobianas. Os avançados conhecimentos taxonômicos do gênero no continente podem ter contribuído para os estudos fitoquímicos e farmacológicos feitos com as espécies do gênero, tendo sido empregadas com sucesso na indústria farmacêutica (ARANHA FILHO, 2011; ISHIDA et al., 2001; TANG et al., 2004).

No Brasil, a falta de estudos de revisão taxonômica pode ser uma das principais razões pela ausência de trabalhos e pelo atraso do conhecimento fitoquímico e farmacológico do gênero *Symplocos* na América do Sul, quando comparado ao continente asiático (ARANHA FILHO, 2011).

2.3 ESPÉCIE *Symplocos tetrandra* Mart.

Conhecida popularmente como caúna, caúna-preta, maria-mole, pau-de-cangalha, pessegueiro-bravo, sete-sangria e yvyra-beui está localizada entre os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, não ocorrendo exclusivamente no Brasil, pois extrapola a fronteira brasileira em direção à Argentina e possivelmente ao Uruguai. Cresce em floresta ombrófila mista, mas também em transição para floresta ombrófila densa, em altitudes variadas de 10 a 1.700 m (ARANHA FILHO, 2011; ROMÃO et al., 2022).

A importante descrição taxonômica específica da *Symplocos tetrandra* Mart. foi realizada por Aranha Filho (2011), que resultou nos seguintes dados: arbusto a árvore, com tronco áspero; ramo maduro raramente lenhoso, esverdeado, amarelo-esverdeado ou marrom-esverdeado; gema glabra; primórdios foliares glabros, raramente pilosos com os tricomas semelhantes a papilas. Folhas ao longo do ramo, patentes; pecíolo abaxial arredondado, adaxial plano ou côncavo; lâmina rômbica ou elíptica. Inflorescência cimosas ou racemosas, pedúnculo visível e glabro (ARANHA FILHO, 2011; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023).

Apresenta inflorescência masculina com flores; pedúnculo, flor estaminada, filetes distintos ou conatos; ovário com septos incompletos, óvulos ausentes ou reduzidos, estigma ausente, punctiforme ou capitado, inflorescência feminina uma a treze flores, pedúnculo. Flor pistilada, anteras desenvolvidas, óvulos, estilete, estigma capitado ou trilobado. Drupa elipsoide, ovoide ou subglobosa, glabra, lobos do cálice eretos ou adpressos, possui endocarpo e semente estriada, quase circular em corte transversal (ARANHA FILHO, 2011; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023).

Os indivíduos que possuem flores são coletados entre abril e junho, mas a floração pode adiantar para fevereiro, ou ainda, entre julho e novembro, embora os espécimes desta época sejam raros. Frutifica entre outubro e dezembro, porém já foram coletados frutos entre junho e setembro, e ainda, entre janeiro e maio (ARANHA FILHO, 2011).

2.4 PERFIL FITOQUÍMICO

Investigar de forma preliminar os componentes químicos das plantas possibilita conhecer previamente os extratos e a natureza das substâncias que podem estar contidas no material vegetal. Dessa maneira, as principais classes de constituintes químicos detectadas com os testes analíticos fitoquímicos são os ácidos graxos, terpenoides, esteroides, fenóis, alcaloides, cumarinas e flavonoides. Ao término do processo é possível identificar substâncias ou classes de substâncias que possam apresentar atividade farmacológica (MACIEL et al., 2002).

O acúmulo de alumínio, presença de iridoides e ácido elágico são os principais caracteres químicos homólogos, herdados de ancestrais comuns, presentes em *Symplocos*. Ainda, há a presença de drusas e estômatos do tipo paracíticos que armazenam grande volume de água (STEVENS, 2001). Além disso, o gênero possui uma variedade de componentes químicos descritos na literatura asiática, incluindo terpenoides, flavonoides, saponinas, lignanas, fenóis, esteroides e alcaloides (BADONI et al., 2010).

Uma revisão baseada nos constituintes encontrados em espécies de *Symplocos* foi fornecida por Badoni (2010) apresentados na tabela 1.

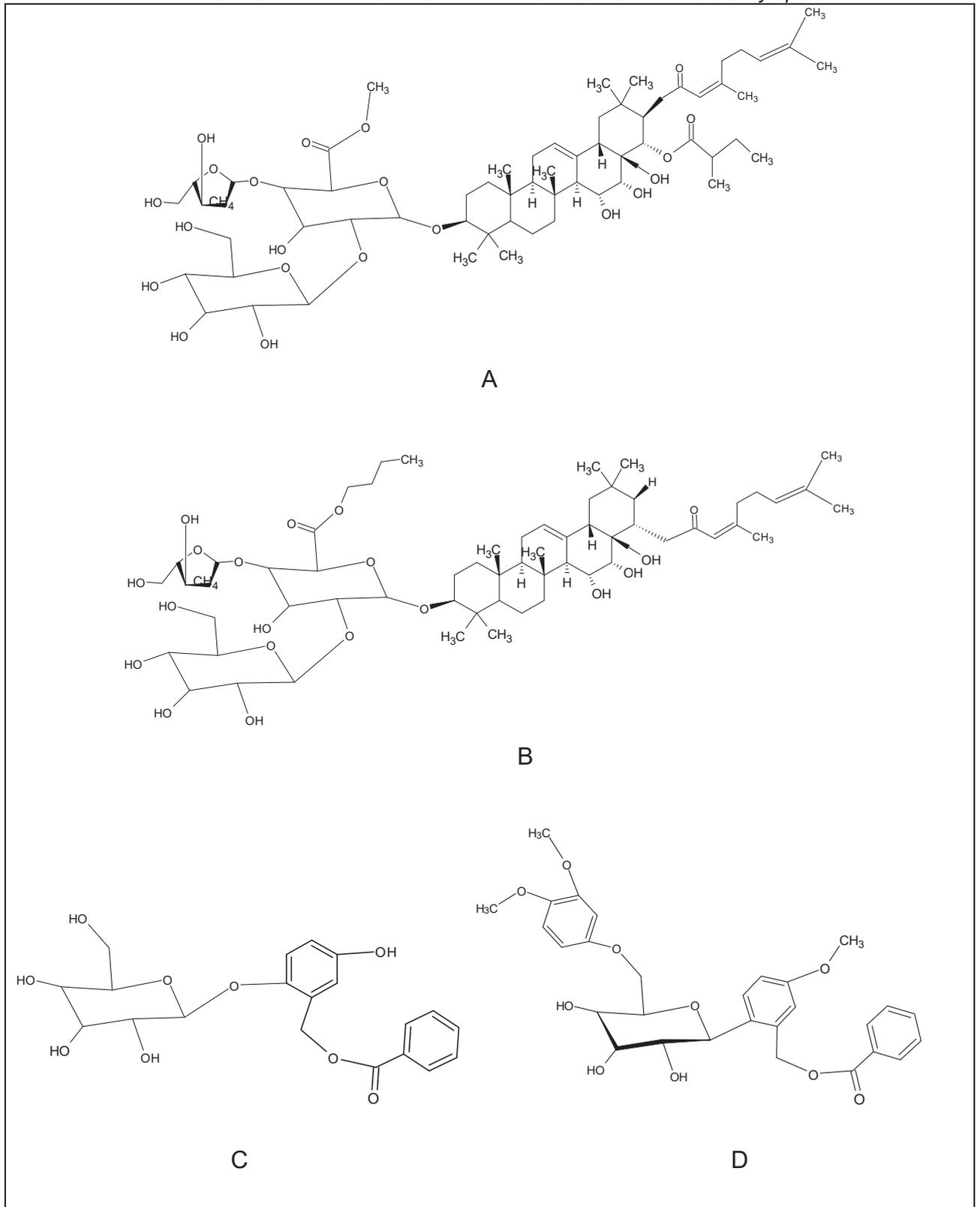
TABELA 1 – GÊNERO *Symplocos* E COMPONENTES QUÍMICOS

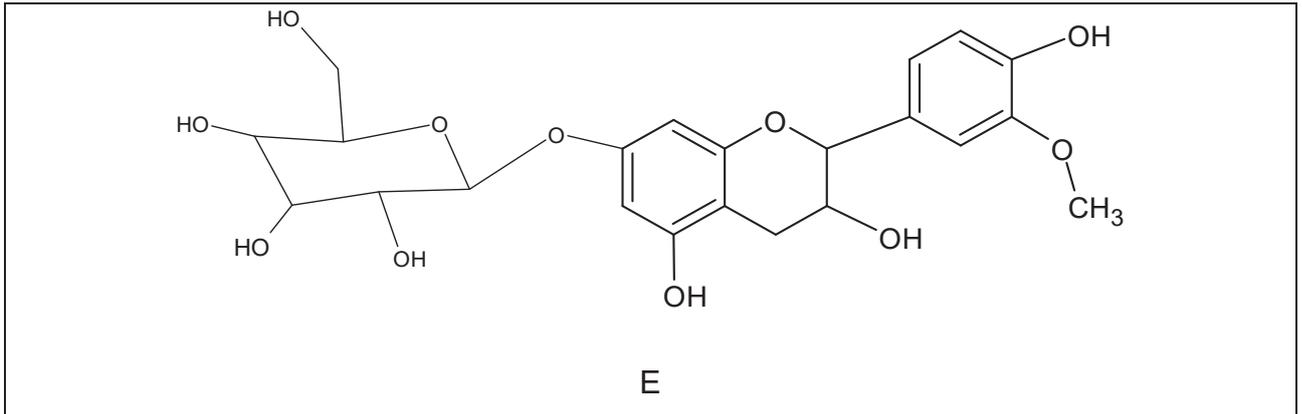
Nome da planta	Componentes
<i>Symplocos caudata</i> Wall. ex G. Don	Matairesinosídeo
<i>Symplocos celastrinea</i> Mart. ex Miq.	Isoboldin
<i>Symplocos chinensis</i> (Lour.) Druce	Saponinas triterpenicas, Simplicósídeos A – F
<i>Symplocos confusa</i> Brand	Glucosídeo Dihidrochalcona: Confusosídeo
<i>Symplocos lancifolia</i> Siebold & Zucc.	Ácido ursólico, quercitina, ácido gálico
<i>Symplocos lucida</i> Wall. ex G. Don	Simplicósigenol
<i>Symplocos racemosa</i> Roxb.	Glicosídeos fenólicos, triterpenoides, ácido elágico, ácido oleanólico, glicosídeos saponinicos, ácido simplocurônico, alcaloides.
<i>Symplocos spicata</i> Roxb.	Glicosídeo flavonol
<i>Symplocos uniflora</i> (Pohl) Benth.	Glicosídeo flavonol (Simplicósídeo): 3'-O – metil – (-) – epicatequina 7 – O – β – glucosídeo

FONTE: Adaptado de Badoni, 2010.

Na China, seis saponinas triterpenoides foram isoladas como metil ou butil ésteres, a partir do extrato de butanol das raízes da *Symplocos chinensis* (Lour.) Druce (Symplocaceae), espécie considerada tóxica, porém usada na medicina popular para tratar tumefação, enterite, nefrite e picada de cobra. Ainda, foi relatado atividade citotóxica de saponinas do extrato de butanol, contra linhagens de células tumorais (TANG et al., 2004).

Os princípios compostos químicos encontrados em estudos com espécies de *Symplocos*, foram representados na figura 2. A estrutura das moléculas das saponinas triterpenoides estabelecidas por Tang et. al (2004) foram classificadas como simplicósídeos A (FIGURA 2A), B, C, D, E e F (FIGURA 2B) por RMN extensa 1D e 2D e por espectrometria de massa de alta resolução (HR-MS).

FIGURA 2 – ESTRUTURAS DOS COMPONENTES QUÍMICOS DE *Symplocos*



FONTE: A, B – Adaptado de Badoni, 2010; Tang et al., 2004.; C, D – Adaptado de Badoni, 2010; Niyati, et al., 2016.; E – Adaptado de Badoni, 2010; Tschesche, *et al.*, 1980.

LEGENDA: A – Simplicósido A ($C_{63}H_{100}O_{23}$); B – Simplicósido F ($C_{61}H_{98}O_{21}$); C – Salireposídeo ($C_{20}H_{22}O_9$); D – Simploversídeo ($C_{29}H_{32}O_{10}$); E – Simplicósido ($C_{22}H_{26}O_{11}$).

O estudo de investigação fitoquímica da espécie *Symplocos racemosa* Roxb., mostrou a presença de flavonoides nas partes aéreas da planta, diferentes tipos de glicosídeos que foram extraídos por frações polares do caule, e outros componentes como triterpenoides, ácido elágico, ácido oleanólico e glicosídeos fenólicos como salireposídeo (FIGURA 2C), simplicósido e simploversídeo (FIGURA 2D) (NIYATI, et al. 2016).

Poucos são os estudos sobre as propriedades farmacológicas e fitoquímicas das *Symplocos* sul-americanas (ARANHA FILHO, 2011). Em 1980 foi realizado um trabalho que descreve um novo tipo de glicosídeo flavonol, Simplicósido (FIGURA 2E), para a espécie *Symplocos uniflora* (Pohl) Benth., localizada em Minas Gerais, que até então apenas saponinas, chamadas de saponinas triterpenoides com 4-5 unidades de açúcar eram conhecidas como constituintes da espécie (TSCHESCHE et al., 1980).

2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A atividade antimicrobiana foi descrita utilizando extratos metanólicos das folhas, raízes e cascas do caule de *Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S.Moore e das frações obtidas por partição em éter de petróleo, diclorometano e acetato de etila, por método de disco de difusão, sendo que todas as frações mostraram atividade positiva para bactérias e protozoário (*Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Trichomonas vaginalis*) testados, além de que o fracionamento melhorou o nível de

atividade em todos os casos. A espécie é usada na China para tratar diarreia, disenteria, doenças femininas, pele e infecções em geral (KHAN, et al. 2001).

A espécie *Symplocos racemosa* foi testada quanto a atividade antibacteriana, utilizando o extrato de éter de petróleo e etanólico em diferentes concentrações, contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*) e Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Pelo método de difusão em poço de ágar, com o padrão de ciprofloxacino, observou-se atividade bactericida do extrato etanólico das cascas de *S. racemosa*, exceto em *P. aeruginosa* e *E coli* (NIYATI, et al., 2016).

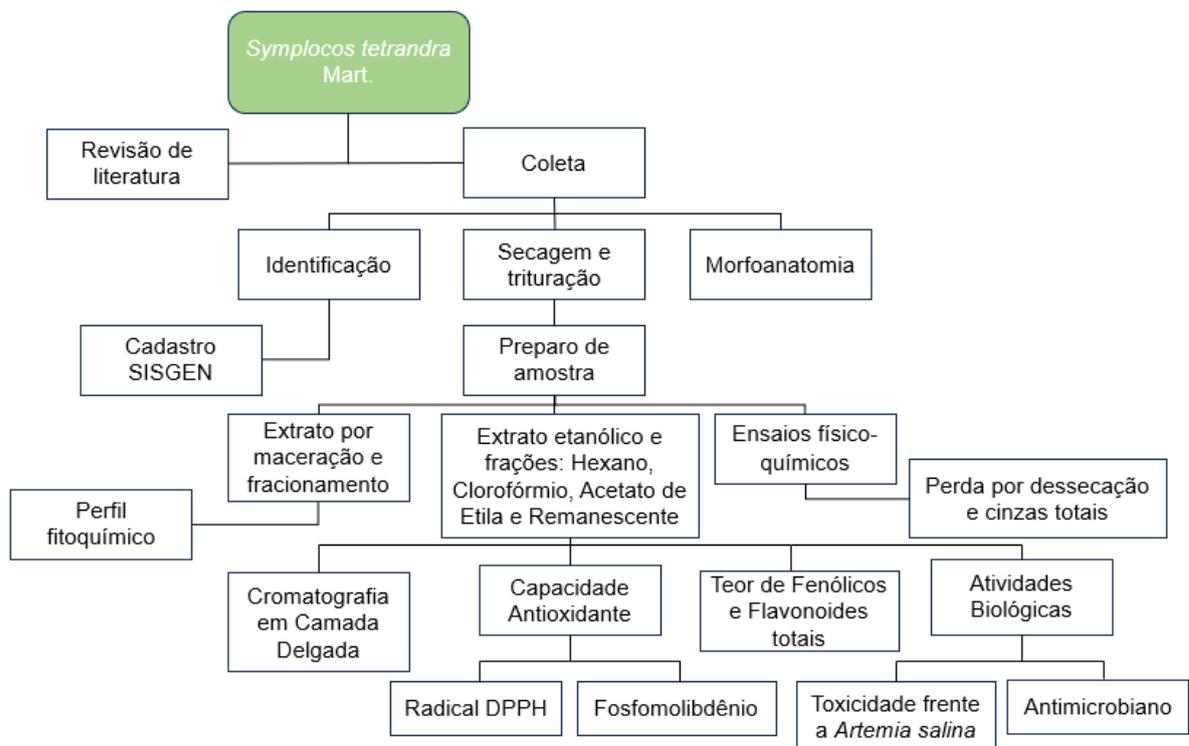
A formulação de uma combinação do óleo herbal *Jatyady taila* com o caule da *Symplocos racemosa* mostrou resultado promissor contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), responsável por infecções que envolve risco de vida. Utilizando o método por difusão em poço de ágar *in vitro* foi encontrado uma eficácia comparada a gentamicina com uma zona de inibição expressiva (NIYATI, et al., 2016).

As hastes da espécie *Symplocos setchuensis* Brand, nativa do sul da China, foram utilizadas para o preparo do extrato etanólico, fracionamento com solventes com hexano, triclorometano, acetato de etila, metanol e realizado cromatografia em colunas de sílica gel e funcionalizada com octadesilsilano (ODS ou C-18), permitindo o isolamento de componentes e posterior identificação do *matairesinol* e *harman* que mostraram significativa atividade anti-HIV pela inibição da replicação viral (ISHIDA, et al. 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida seguindo as etapas descritas no fluxograma da figura 3. Iniciou-se com a revisão de literatura da espécie, seguido da coleta, identificação e cadastro no SisGen. Parte do material coletado fresco foi separado para a pesquisa morfoanatômica e histoquímica, enquanto a outra parte foi seco, triturado, pesado e identificado para o preparo das amostras para as análises e testes físico-químicos, fitoquímicos e biológicos.

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



FONTE: A autora, 2023.

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A pesquisa com a espécie *S. tetrandra* foi cadastrada no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do patrimônio genético e conhecimento Tradicional Associado) sob o nº A0A1FD4 (ANEXO 1). Em 18 de abril de 2022 foi coletada cerca de 3000 g de material vegetal de dois indivíduos de *Symplocos tetrandra* Mart. (FIGURA 4), localizados no Capão do Cifloma, no campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, no Município de Curitiba, Paraná, com as coordenadas geográficas definidas por 25° 26' 57.813" S de latitude e 49° 14' 19.862" W de

longitude. Após a separação de folhas e galhos e secagem ao ar livre, contatou-se a quantidade de 1990,20 g de folha e 959,60 g de galhos. A exsicata está localizada no Herbário Escola de Florestas Curitiba – EFC, registrada como EFC 12751 (ANEXO 2).

FIGURA 4 – COLETA DA ESPÉCIE *Symplocos tetrandra* Mart.



FONTE: A autora, 2022.

3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Uma parte da planta *S. tetrandra* coletada foi separada para o estudo morfoanatômico antes de passar por trituração, as folhas e ramos foram separadas para realizar fixação do material, estudo macroscópico, bem como as medições, e

microscópico para preparo de lâminas realizando secções transversais das folhas, pecíolo e caule.

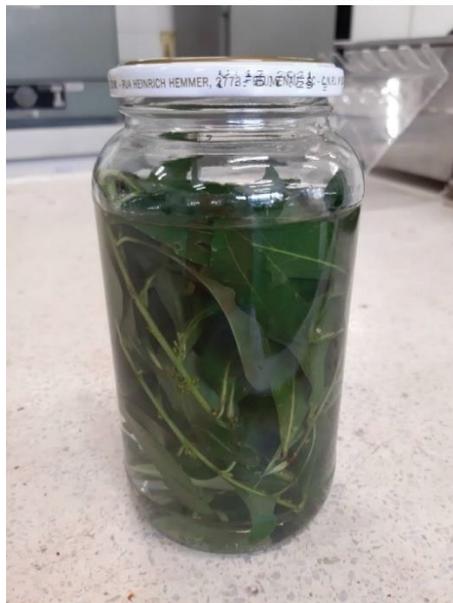
3.2.1 Estudo macroscópico

O estudo morfoanatômico foi iniciado com material fresco, recém coletado, com a análise e descrição macroscópicas. A determinação das dimensões, como comprimento e largura foram estabelecidas por média simples, com auxílio de régua e papel milimetrado.

3.2.2 Processamento do material coletado

As partes aéreas que incluem folha, pecíolo e caule foram fixados em solução FAA50 (FIGURA 5), utilizando 35 mL de formalina, 35 mL de ácido acético glacial e 630 mL de álcool etílico a 50% (proporção 5:5:90 v/v/v), para o preparo de 700 mL de solução, foi fixado por cinco dias, depois foi realizada a lavagem com água destilada seis vezes e completado com etanol 70% (v/v) o recipiente, para o fim de armazenamento. O procedimento foi realizado com o objetivo de bloquear o metabolismo celular e preservar a integridade e deixar pronto o material para a avaliação morfoanatômica microscópica e testes histoquímicos (BERLYN; MIKSCHE, 1976; JOHANSEN, 1940).

FIGURA 5 – PARTES AÉREAS DE *S. tetrandra* EM SOLUÇÃO FAA50



FONTE: A autora, 2022.

3.2.3 Análise microscópica

Para a análise de microscopia de luz foram realizados cortes paradérmicos e transversais de folhas, pecíolo e caule à mão livre com o auxílio de isopor como suporte e lâmina de barbear. Em seguida foi realizada a coloração de estruturas acidófilas com azul de astra e basófilas com fucsina básica (ROESER, 1972). Para a pesquisa dos estômatos, nas folhas, os cortes foram clarificados com solução de hipoclorito a 50% (v/v), ao se tornar translúcido foi neutralizado com ácido acético a 2% (v/v), lavado seis vezes com água destilada e corado com safranina 1% (v/v) (FUCHS, 1963). Para selar as lâminas de vidro foi utilizada a solução de glicerina 50% (v/v) sobre os cortes e aplicado esmalte incolor nas bordas da lamínula, tornando a lâmina semipermanente. Em seguida as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio Olympus CX31 acoplado a uma câmera digital Olympus C-7070.

3.2.4 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados com o material fixado em FAA e com os cortes transversais das partes estudadas, folha, pecíolo e caule, à mão livre na porção mediana do material. Os corantes e reagentes utilizados foram o ácido clorídrico a 10% (v/v) para confirmação dos cristais de oxalato de cálcio (CHAMBERLAIN, 1932), o cloreto férrico que demonstra os compostos fenólicos, o floroglucinol acidificado para lignina, o lugol que indica amido e o Sudam III, indicador de substâncias graxas, ou seja, paredes cutinizadas, suberizadas e gotículas de óleo essencial. (BERLYN & MIKSCHE, 1976; FOSTER, 1949; JOHANSEN, 1940; SASS, 1951). Amostras sem reagentes foram utilizadas como controle. O microscópio utilizado foi conforme o item 3.2.3

3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada com as folhas, o pecíolo e o caule. As amostras foram seccionadas, para a folha foi retirada da parte mediana do limbo em retângulo,

enquanto o pecíolo e caule foram seccionados transversalmente. As amostras foram colocadas em água destilada no sonicador (Digital Ultrasonic Cleaner CD-4860) por 15 minutos para evitar contaminação, em seguida passaram por desidratação crescente em álcool 80%, 90% e 100% (v/v), respectivamente, com intervalo de 15 minutos entre as soluções. As amostras secas a temperatura ambiente foram colocadas em alto vácuo e visualizadas em eletromicrografias no microscópio eletrônico de varredura (VEGA3 TESCAN) (HADDAD, 1998). Depois foram metalizadas com ouro (Balzers Sputtering SSCD 030) e analisadas com microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6360 LV). Os cristais foram analisados por EDS – Detector de espectrômetro de energia dispersiva por raio-X (Oxford Instruments, Oxford UK), anexado ao Mira 3 FESEM.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.3.1 Perda por dessecação

A perda por dessecação foi obtida pela determinação da quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada pela droga vegetal em contato com o calor em estufa, o procedimento foi realizado pelo método descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019).

Foram pesados em balança analítica 3,0 g de material vegetal seco e triturado. O material foi transferido para cadinhos previamente secos e pesados, em seguida levados à estufa a 100 °C por 24 horas. Foram retirados da estufa e colocados em um dessecador para atingir a temperatura ambiente, ao manter o peso constante, diferença de no máximo, 0,5% entre pesagens consecutivas, foi anotado os valores dos pesos das amostras. A análise foi realizada em sextuplicata com as amostras das folhas e galhos. Por último, os valores foram calculados utilizando a fórmula (1) para obter a porcentagem de perda substâncias voláteis, como água, das amostras.

$$\text{Perda por dessecação (\%)} = \frac{(P2 - P1)}{P3} \times 100$$

(1)

Legenda:

P1 = Peso do cadinho com amostra após secagem (g);

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

P3 = Peso da amostra (g)

3.3.2 Teor de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais foi realizada de acordo com o método da Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019). A técnica é empregada para determinar a quantidade de componentes inorgânicos e impurezas presentes na amostra vegetal.

Após proceder a perda por dessecação, as amostras das folhas e galhos pulverizados, depositadas nos cadinhos de porcelana, previamente preparados e pesados, foram levados a incineração em mufla por 90 minutos a 600 °C. A análise foi realizada em quintuplicata. Os valores do peso das cinzas foram anotados e utilizados no cálculo na fórmula (2) para obter o teor de cinzas totais.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{(P2 - P1)}{P3} \times 100$$

(2)

Legenda:

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

P2 = Peso do cadinho com amostra após calcinação e resfriamento (g);

P3 = Peso da amostra (g)

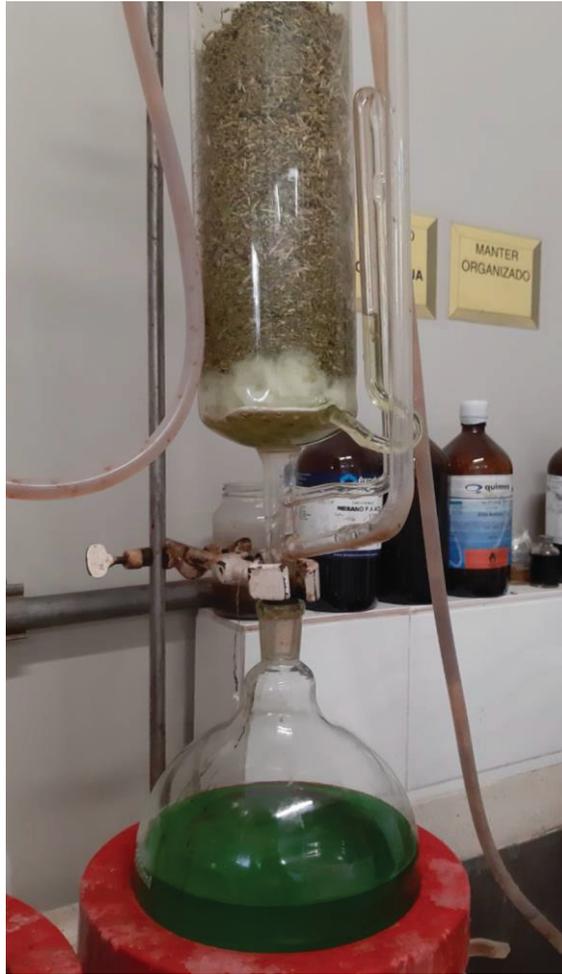
3.4 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Após a secagem, o material vegetal foi inspecionado visualmente para retirada de material orgânico estranho e partes não sadias com sinais de presença de insetos, fungos, ressecamento ou oxidação, assim iniciou-se o processo de trituração (FIGURA 6) das folhas e galhos da planta em triturador, sendo feitas separadamente e colocadas em sacos pretos para o armazenamento.

FIGURA 6 – TRITURAÇÃO DAS FOLHAS DE *Symplocos tetrandra* Mart.

FONTE: A autora, 2022.

O processo de extração foi realizado no aparelho de Soxhlet (FIGURA 7), em que 1080 g de massa vegetal das folhas secas e trituradas foram extraídas com etanol absoluto, por questão de espaço da vidraria a extração etanólica foi dividida em três partes, sendo que cada alíquota da planta foi de aproximadamente 360 g. Assim era adicionado cerca de 3,2 L de etanol no Soxhlet a cada porção extraída, totalizando um volume de 9,6 L de etanol, em relação ao tempo de extração durou cerca de 8 dias cada porção, onde era ligado por cerca de 7 horas ao dia. No término de cada extração o volume final de extrato era medido em uma proveta e recolhido em um frasco âmbar previamente limpo. Para os galhos secos foi seguido a mesma metodologia, a diferença foi que a massa vegetal diminui para duas porções de 360 g, totalizando 720 g de massa utilizada, com o volume de 6,4 L de etanol.

FIGURA 7 – EXTRAÇÃO POR SOXHLET DE *Symplocos tetrandra* Mart.

FONTE: A autora, 2022.

Antes dos extratos serem levados para evaporação de excesso de etanol, foi realizado o teor de sólidos, seguindo a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019). Em sequência, os extratos foram levados ao aparelho de rota-evaporador para remover do excesso de solvente, no caso o etanol. A evaporação foi realizada em partes, devido a capacidade do balão de 1000 mL, utilizou-se cerca de 500 mL em cada parte, o processo durou 5 dias, sendo ligado por 6 horas ao dia.

Após a obtenção dos extratos, iniciou-se o processo de fracionamento dos extratos etanólicos concentrados das folhas e galhos nos solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila. Seguindo a metodologia proposta por Carvalho et al. (2009), em um aparelho de Soxhlet, adicionou-se um cartucho de vidro com o extrato etanólico concentrado, em seguida foi adicionado aos poucos cerca de 350 mL de hexano sendo recebido em balão de fundo redondo de 500 mL, contendo

pérolas de vidro. O conjunto foi conectado ao condensador de bolas e iniciou-se o aquecimento para a extração contínua, onde ocorre a percolação do solvente, em que o solvente é condensado e elui para o extrator até refluxar.

Ao terminar a extração com o solvente hexano, o cartucho de vidro foi retirado, e a fração hexânica recolhida em um frasco de vidro âmbar previamente limpo. O processo foi repetido com os solventes clorofórmio e acetato de etila, obtendo as respectivas frações. Ao final, todos foram levados para concentração de 1/3 do volume inicial no rota-evaporador e ao final, adquirir as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e remanescente etanólica.

3.4.1 Teor de sólidos

Os cálculos de teor de sólidos presentes nos extratos brutos etanólicos das folhas e galhos foram realizados utilizando uma alíquota de 5,0 mL de extrato em placas de petri, previamente preparadas e pesadas. A análise foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019). Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram levadas à secura total em estufa a 105°C. Em seguida, foram resfriadas em dessecador, pesadas até o peso constante e os valores obtidos foram utilizados no cálculo para a determinação do teor de sólidos presentes nos extratos brutos e o cálculo do percentual do rendimento bruto.

3.4.2 Rendimento dos extratos brutos etanólicos e frações

Os valores do teor de sólidos das folhas e galhos, bem como, os volumes dos extratos obtidos ao final do processo foram utilizados para o cálculo do valor do rendimento dos extratos brutos etanólico pela fórmula (3).

$$\text{Rendimento extrato bruto (\%)} = \frac{(V. ex \times TS)}{MV} \quad (3)$$

Legenda:

V.ex = Volume de extrato bruto obtido (mL);

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

MV = Quantidade de material vegetal utilizado (g).

Para calcular o rendimento das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólica das folhas e galhos, foi considerado a massa vegetal seca inicial em grama (g) das folhas e galhos como 100% e comparado com a massa seca de cada fração obtida após o fracionamento e secagem, obtendo o resultado em porcentagem %.

3.5 ESTUDO DO PERFIL FITOQUÍMICO

3.5.1 Perfil fitoquímico

Parte da massa vegetal triturada de folhas e galhos foram separados para investigação fitoquímica, paralelamente ao processo de extração. O estudo seguiu a metodologia utilizada pela apostila de ensaio sistemático de análise em fitoquímica utilizada na graduação do curso de farmácia da UFPR, escrita por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003), onde foram preparadas pelo método de maceração em banho-maria, o extrato hidroalcoólico e aquoso a 20% do vegetal em estudo, para determinação do resíduo seco e de grupamentos químicos.

Para o extrato hidroalcoólico foram investigados heterosídeos flavônicos, alcaloides, esteroides e/ou triterpenos, amino grupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos. Para o extrato aquoso foram pesquisados os glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos, taninos (condensados e hidrolisáveis), amino grupos e flavonoides.

3.5.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

Os extratos foram preparados por maceração em banho-maria a 70°C por 60 minutos de 40 g das folhas de *Symplocos tetrandra* Mart. em 200 mL de álcool etílico a 70 %. Após esfriar, foi filtrado por papel de filtro e o volume foi completado até 200 mL, em seguida foi mantido sob refrigeração até a realização de todos os ensaios fitoquímicos. O extrato foi submetido ao fracionamento para obter as frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila. Primeiro o extrato hidroalcoólico foi concentrado até $\frac{1}{3}$ do volume, em seguida foi transferido para um funil de

separação, agitado 10 vezes com 20 mL de cada solvente e o volume foi completado até 200 mL com os respectivos solventes, obtendo as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcóolica remanescente. O procedimento foi repetido para o extrato dos galhos.

3.5.1.2 Pesquisa de alcaloides

A pesquisa de alcaloides foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcaloides (Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand). Foi evaporado à secura 50 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcóolica remanescente em banho maria a 70 °C, seguido de dissolução do resíduo em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1 %. Foi transferido para 5 tubos de ensaio, 2 mL do extrato clorídrico (em cada tubo) e efetuou-se a pesquisa de alcaloides com os reativos gerais. O aparecimento de precipitado indica reação positiva. Para confirmar a reação foram transferidos 15 mL das frações para um funil de separação e foi alcalinizado com hidróxido de amônio até pH 10. O reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio) mostra precipitado branco com turvação branca sutil; Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) um precipitado com coloração de tijolo; Bouchardat (Iodo Iodeto de potásio) o precipitado possui coloração alaranjada; e Bertrand (ácido sílico túngico), o precipitado apresenta a coloração branca ou turvação branca sutil.

3.5.1.3 Pesquisa de leucoantocianidinas

A pesquisa de leucoantocianidinas se procedeu com a adição de 10 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e remanescente em uma cápsula de porcelana para levar à secura em banho-maria a 70 °C. Em seguida foi dissolvido em 5 mL de álcool etílico, 5 gotas de HCl concentrado e aquecido à ebulição. No caso de reação positiva, é observado o efeito bato crômico com o desenvolvimento de coloração vermelha.

3.5.1.4 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

A pesquisa de heterosídeos flavônicos foi realizada pela reação de Schinoda ou reação da cianidina. Foram transferidos 20 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e remanescente em uma cápsula de porcelana para levar à secura em banho-maria a 70 °C e dissolver com 10 mL de etanol. Em tubo de ensaio foram transferidos 5 mL das frações dissolvidas, juntando com 200 mg de limalha de magnésio e lentamente adicionando 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. Caso apareça a coloração alaranjada indica a presença de flavonas, a violácea indica a presença de flavanonas e vermelha indica a presença de flavonóis. As chalconas, auronas e isoflavonas não desenvolvem coloração, porém as chalconas em meio ácido produzem flavanonas.

3.5.1.5 Pesquisa de cumarinas

Foram transferidos para uma cápsula de porcelana 30 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e concentrado até 5 mL em banho-maria a 70 °C. A fração hidroalcolica remanescente foi acidificada até pH 1 com HCL 2N, e concentrada em banho-maria até 5 mL. Após esfriar foi extraída em funil de separação com éter etílico em duas porções de 10 mL. As frações etéreas das duas extrações foram misturadas e evaporadas em banho-maria até volume de 5 mL. Foram colocados 3 mL de cada fração (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etérea) em tubos de ensaio e posteriormente, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 1N recém preparado. Os tubos foram levados para uma câmara de luz ultravioleta em 366 nm, ficando expostos em repouso por 15 minutos. Para reação positiva é observado o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

3.5.1.6 Pesquisa de substâncias iridoidais

Para a pesquisa de iridoides foram preparadas 3 reações de identificação. Na primeira foram transferidos 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente para tubos de ensaio. Para a primeira reação foram adicionadas pequena quantidade de cristais de floroglucinol e 1 mL de ácido clorídrico, o

desenvolvimento de coloração verde escura indica reação positiva. Na segunda reação, foram transferidos novamente 2 mL das frações, em seguida foram adicionadas duas gotas de ácido sulfúrico e se aparecer a coloração rosa violácea indica reação positiva. Na terceira reação, também foram transferidos 2 mL de frações para tubos de ensaio, adicionados 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina 1% e duas gotas de ácido sulfúrico, a coloração rosa cereja indica reação positiva.

3.5.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

A pesquisa de antraquinonas foi realizada pela reação de Borntraeger com NH_4OH . Utilizando um balão de fundo redondo de 100 mL foram transferidos 30 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente e adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. Em seguida foram acopladas a um condensador e levadas ao refluxo por 30 minutos. Os extratos foram filtrados a quente com papel de filtro. Ao filtrado foram adicionados 30 mL de água destilada, transferidos para um funil de separação e separado a fração orgânica das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, enquanto a fração remanescente foi extraída com éter etílico por duas vezes de 10 mL. As frações foram concentradas em banho-maria a 60 °C até 5 mL e transferidas para tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio e agitado lentamente, para evitar elevação da pressão interna. Caso desenvolva a coloração rósea-vermelha indica a presença de antraquinonas e/ou naftoquinonas.

3.5.1.8 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

Em cápsulas de porcelana foram evaporados a secura 30 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente em banho-maria a 60°C, em seguida o resíduo foi dissolvido com 5 mL de clorofórmio. Foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico para três tubos de ensaio e o volume foi completado para 2,0 mL com clorofórmio. Foi adicionado em cada tubo de ensaio, 1 mL de anidrido acético e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente para a reação de Liebermann Burchard. A formação da coloração rósea escura ou azul indica triterpenos pentacíclicos, a presença da função carbonila na

posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6, enquanto a coloração verde indica esteroides com função hidroxila na posição 3 e dupla ligação entre 5 e 6 do anel aromático, devido a formação de um derivado sulfônico de colesterialeno e a coloração amarela possivelmente indica um grupamento metila no carbono de posição 14.

3.5.1.9 Preparo do extrato aquoso a 20%

Foi realizada a extração por maceração em banho-maria a 70°C por 60 minutos de 40 g das folhas de *S. tetrandra* em 200 mL de água destilada. Em seguida foi filtrado a quente com papel de filtro em um cartucho de vidro e o volume completado até 200 mL, em seguida foi mantido sob refrigeração até a realização de todos os ensaios fitoquímicos. O procedimento foi repetido para o extrato dos galhos.

3.5.1.10 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram transferidos 10 mL do extrato aquoso para um funil de separação e extraído com álcool butílico saturado com água duas vezes com 10 mL cada. Em seguida foi reunida as frações em capsula de porcelana, concentrado até 5 mL e adicionado 5 gotas de HCl concentrado, por último levado a ebulição. Na reação positiva é observado o efeito batocrômico, pela mudança de função e desenvolve a coloração vermelha pela formação de antocianidina.

3.5.1.11 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Realizado pelo ensaio de espuma, foram transferidos 10 mL para três tubos de ensaio, agitados energicamente durante 5 minutos em movimentos vigorosos e deixado em repouso por 30 minutos. Foi medido a altura da espuma formada logo após a agitação e 30 segundos após a agitação, no tubo, se desenvolver espuma com altura maior que 1 centímetro e persistente, após o período de repouso, que não desaparece com a adição de HCl 2N, indica a presença de heterosídeos saponínicos.

3.5.1.12 Pesquisa de heterosídeos cianogénicos

Com base no método de Guignard foram transferidos 5 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, seguido da adição de 1 mL da solução aquosa de ácido sulfúrico 1N. Posteriormente, foi suspedido uma tira de papel picro sódico com uma rolha de cortiça no tubo e levado ao banho-maria a 60 °C por 30 minutos. O aparecimento de cor vermelho-castanho na tira de papel indica a presença de heterosídeos cianogénicos, pela conversão do ácido cianídrico em isopurpurato de sódio.

3.5.1.13 Pesquisa de taninos

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL de extrato aquoso, seguido de 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1% (v/v). O desenvolvimento de coloração azul é sugestivo da presença de taninos hidrolisáveis, a cor verde indica taninos condensados e flavonoides e a cor marrom a presença de polifenóis.

3.5.1.14 Pesquisa de aminogruppo

Foram concentrados 10 mL de extrato aquoso em banho maria a 60 °C em cápsula de porcelana. Posteriormente em papel filtro, em pontos previamente demarcados, foram adicionadas 5 gotas do extrato aquoso concentrado. Após a secagem do papel filtro, este foi nebulizado com solução de ninhidrina, preparada segundo Stahl (1969) e levada à estufa à temperatura de 100 °C por um período de 15 minutos. A reação é considerada positiva, caso ocorra o aparecimento de coloração azul violácea.

3.5.2 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação por arraste a vapor, em aparelho de Clevenger, utilizando cerca de 300 g de folhas de *S. tetrandra*, 300 g em 3,5 L de água destilada, durante 10 horas. Foram guardados 500 mL do extrato aquoso e recolhido o hidrolato, em frascos âmbar, resultando em

oito frascos de 50 mL (FIGURA 8). Foi também recolhido o conteúdo da lavagem com hexano. Todos os frascos foram mantidos em freezer.

FIGURA 8 – HIDROLATO DA HIDRODESTILAÇÃO DE *S. tetrandra*



FONTE: A autora, 2022.

3.5.3 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método rápido e de fácil reprodutibilidade, com a finalidade de investigar a presença de constituintes químicos, pela separação de compostos presentes em uma amostra. Possui a fase móvel, que é o solvente com polaridade específica, em que ao eluir separa os compostos sobre a fase estacionária, no caso, as placas com sílica-gel GF 254 nm. Ao final pode ser usado métodos de revelação de natureza química ou física, levando a reações de coloração e fluorescência.

As amostras das frações orgânicas hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcolica remanescente, foram preparadas em metanol, em concentração de 20 mg/mL. As frações investigadas foram aplicadas em locais demarcados na placa, com altura de 0,5 centímetros, para melhor eluição, com o auxílio de um tubo capilar. A pesquisa das amostras foi realizada em triplicata.

As principais classes de metabólitos investigados foram: terpenos, flavonoides, taninos, alcaloides e cumarinas. Para cada grupo foi adotado uma fase móvel específica, bem como um revelador, de acordo com o quadro 1:

QUADRO 1 – ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Metabólitos	Fase móvel/ Proporção	Revelador	Metodologia
Terpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina 1%:ácido Sulfúrico (1:1)	WAGNER, 1996
Cumarinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Hidróxido de sódio 1N	MIGUEL, 2003
Flavonoides	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Reativo de NEU	WAGNER, 1996
Taninos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Cloreto férrico (1%)	WAGNER, 1996
Alcaloides	Clorofórmio: MeOH (95:5) universo amônio	Reativo de Dragendorff	VALENTE et al., 2006

FONTE: A autora, 2023.

3.5.4 Fenólicos totais

A pesquisa de fenólicos totais foi realizada segundo a metodologia de Singleton e Rossi (1965) e Surek et al. (2022) utilizando o método espectrofotométrico pela medição da absorbância das amostras após a reação com o reagente Folin-Ciocalteu. O método permite dosear os compostos fenólicos presentes na amostra para verificar uma possível capacidade antioxidante, por serem metabólitos que geralmente estão relacionados com essa atividade.

Na análise foram testadas as amostras dos extratos brutos e frações orgânicas das folhas e galhos de *S. tetrandra* totalizando dez amostras, em que foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol. A primeira parte da pesquisa, consistiu na montagem da curva padrão de ácido gálico para comparação das absorbâncias das amostras com as obtidas no padrão de ácido gálico. Foram preparadas uma sequência de diluições do ácido gálico em metanol, a partir de uma solução mãe de ácido gálico (1 mg/mL), na tabela 2.

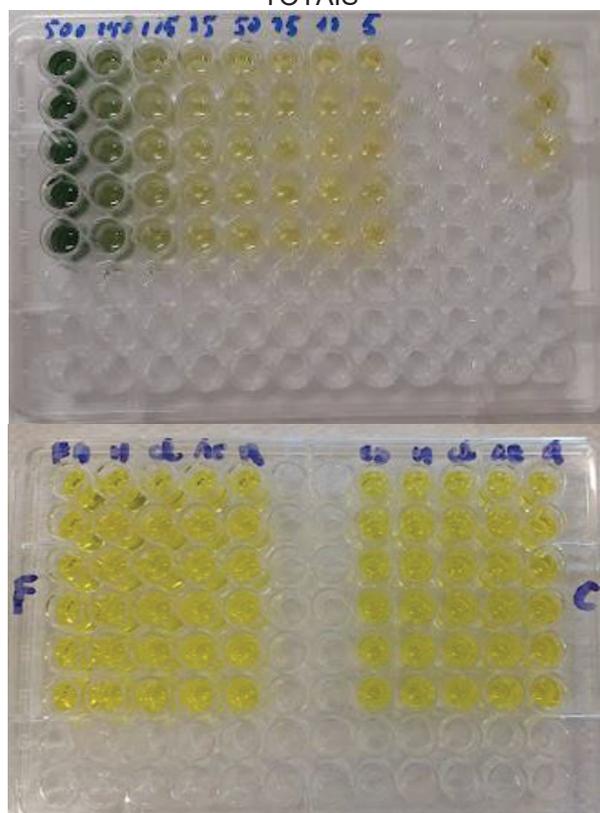
TABELA 2 – DILUIÇÃO PARA A CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$)	ÁCIDO GÁLICO (μL)	METANOL (μL)
25	250	9750
50	500	9500
75	750	9250
100	1000	9000
150	1500	8500

FONTE: A autora, 2023.

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, em quintuplicata (FIGURA 9). Para a pipetagem foram usados 20 μL de amostra, 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 80 μL da solução de carbonato de sódio (7,5 g/100 mL). Para o branco foi pipetado 180 μL de metanol e 20 μL de amostra. Em seguida, as placas foram mantidas ao abrigo da luz por uma hora e levadas para leitura em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1601 PC a 690 nm.

FIGURA 9 - MICROPLACAS DO PADRÃO E AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE FENÓLICOS TOTAIS



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Diluições do ácido gálico de 500 a 5 μL ; Amostras: F – Folhas; G – Galhos; EB – Extrato bruto; H – Hexano; Cl – Clorofórmio; AE- Acetato de etila; R – Remanescente.

A curva de calibração padrão de ácido gálico obtida apresentou a equação da reta de $y = 0,0012x + 0,0371$ e um coeficiente de determinação de $R^2=0,9982$. Os resultados obtidos, considerando a curva de calibração padrão de ácido gálico foram expressos em micrograma equivalente de ácido gálico por miligrama de amostra (μg EAG/mg).

3.5.5 Flavonoides totais

A pesquisa de flavonoides totais foi realizada pela metodologia descrita por Devequi-Nunes et al. (2018) e Surek et al. (2022) utilizando o método espectrofotométrico pela medição da absorbância das amostras após a adição do cloreto de alumínio. O método permite dosear a quantidade de flavonoides presente na amostra, similar ao ensaio de fenólicos totais, sendo de baixo custo e fácil reprodutibilidade.

Na análise foram testadas as amostras dos extratos brutos e frações orgânicas das folhas e galhos de *S. tetrandra* totalizando dez amostras, em que foram preparadas na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol. Primeiro foi construída a curva padrão de quercetina para comparação das absorbâncias das amostras, a partir de uma solução mãe de quercetina (1 mg/mL) em metanol que foi diluída, conforme a tabela 3.

TABELA 3: DILUIÇÃO PARA A CURVA PADRÃO DE QUERCETINA

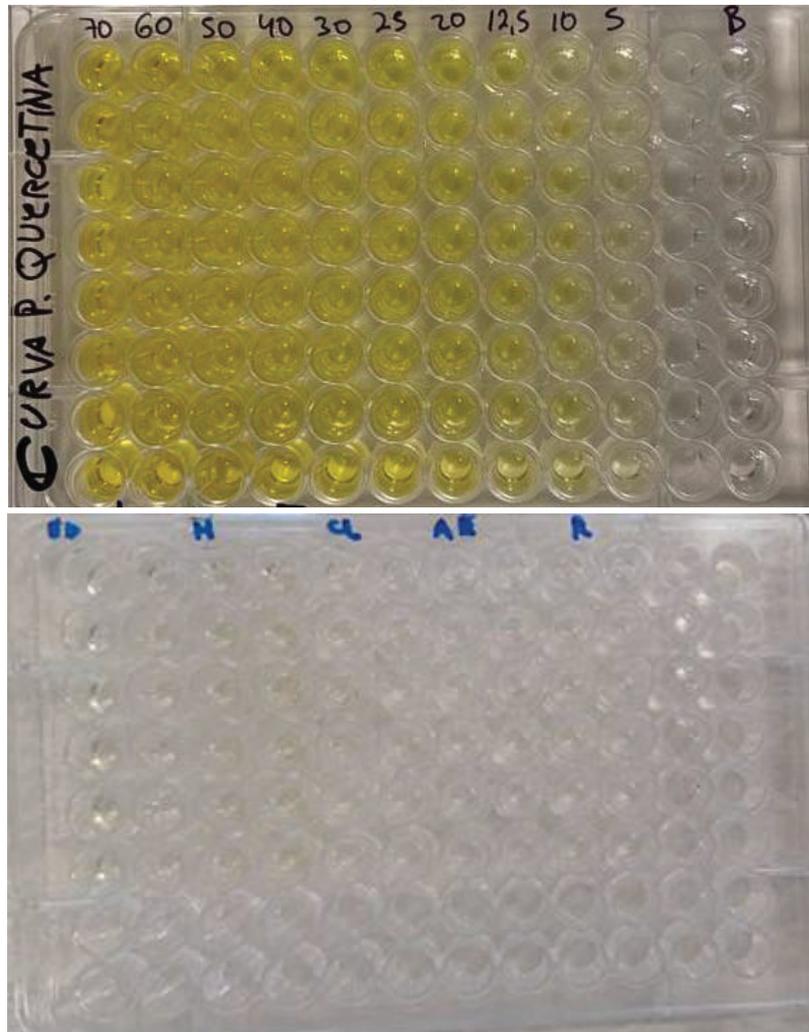
CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	QUERCETINA (μL)	METANOL (μL)
30	300	9700
25	250	9750
20	200	9800
15	150	9850
10	100	9900
5	50	9950

FONTE: A autora, 2023.

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, em sextuplicata (FIGURA 10). Foram utilizados 100 μL de amostra e 100 μL do cloreto de alumínio (2 g/100 mL) e para o branco foi pipetado 100 μL de amostra e 100 μL de metanol.

Em seguida, as placas foram mantidas ao abrigo da luz por uma hora e levadas para leitura em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1601 PC a 414 nm.

FIGURA 10 - MICROPLACAS DO PADRÃO E AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE FLAVONOIDES TOTAIS



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Diluições de quercetina de 70 a 5 µL; Amostras: EB – Extrato bruto; H – Hexano; CI – Clorofórmio; AE- Acetato de etila; R – Remanescente.

A curva de calibração padrão de quercetina obtida apresentou a equação da reta de $y = 0,0193x + 0,0435$ e um coeficiente de determinação de $R^2=0,9948$. Os resultados obtidos, considerando a curva de calibração padrão de quercetina, foram expressos em micrograma equivalente de quercetina por miligrama de amostra ($\mu\text{g EQ/mg}$).

3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os ensaios para o estudo da capacidade antioxidante das amostras em análise permitem verificar a presença de compostos que retardam a degradação oxidativa dos extratos e frações por meio de reações que levam a alteração de cor.

3.6.1 Radical DPPH

O procedimento de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) para verificação da capacidade antioxidante dos extratos e frações de *S. tetrandra* se baseou nas metodologias propostas por Salgueiro et al. (2014) e Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), em que foram testadas dez amostras, sendo os extratos bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcolico das folhas e galhos da espécie.

O ensaio se baseia em verificar se as amostras em estudo contêm substâncias capazes de fornecer um átomo de hidrogênio para sequestrar o radical DPPH, formando um composto chamado hidrazina, que resulta na mudança de coloração de violeta para amarelo pálido do meio.

Para realizar o teste do DPPH● foi preparada uma solução metanólica, pesando 3 mg de DPPH● e em seguida diluindo em 25 mL de metanol, gerando uma concentração de 0,3 mMol/L em um balão volumétrico âmbar. A primeira parte da pesquisa, consistiu na montagem da curva de calibração de trolox, nas concentrações 2, 5, 7,5, 10 e 12,5 µL/mL, para comparação das absorvâncias das amostras com as obtidas pelo padrão e para calcular a porcentagem de atividade antioxidante em relação ao trolox, segundo a fórmula (3), com auxílio do software Microsoft Excel ®:

$$(\% \text{ da atividade antioxidante}) = \frac{(AA - AB)}{AN} \times 100 \quad (3)$$

Legenda:

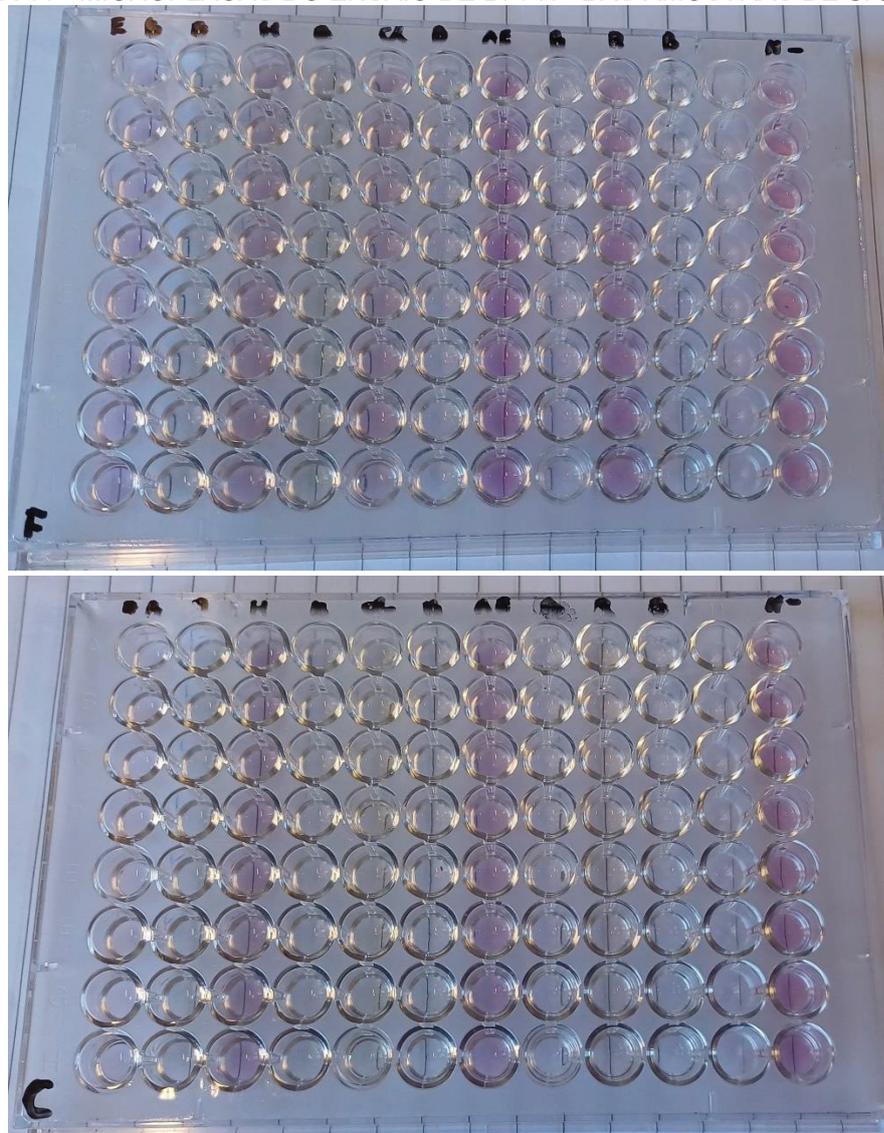
AA= Absorvância amostra ou controle positivo;

AB= Absorvância branco;

AN= Absorvância negativo

O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços (FIGURA 11), sendo adicionados com auxílio de pipetas 29 μL da solução de DPPH \bullet e 71 μL de amostra em cada poço, sendo que as amostras foram previamente preparadas na concentração 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol, assim como os controles positivos utilizados que foram o ácido ascórbico e BHT, que também foram pipetados 71 μL de cada controle e 29 μL da solução de DPPH \bullet . Para o branco foi utilizado o metanol e para o controle negativo metanol com a solução de DPPH \bullet .

FIGURA 11 - MICROPLACAS DO ENSAIO DE DPPH \bullet DAS AMOSTRAS DE *S. tetrandra*



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Amostras: F – Folhas; G – Galhos; EB – Extrato bruto; H – Hexano; Cl – Clorofórmio; AE- Acetato de etila; R – Remanescente; B – Branco; N- (controle negativo).

Após 30 minutos de reação em repouso no escuro, as absorvâncias foram medidas a 540 nm utilizando um leitor de microplacas Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA. Os ensaios foram realizados em octuplicata.

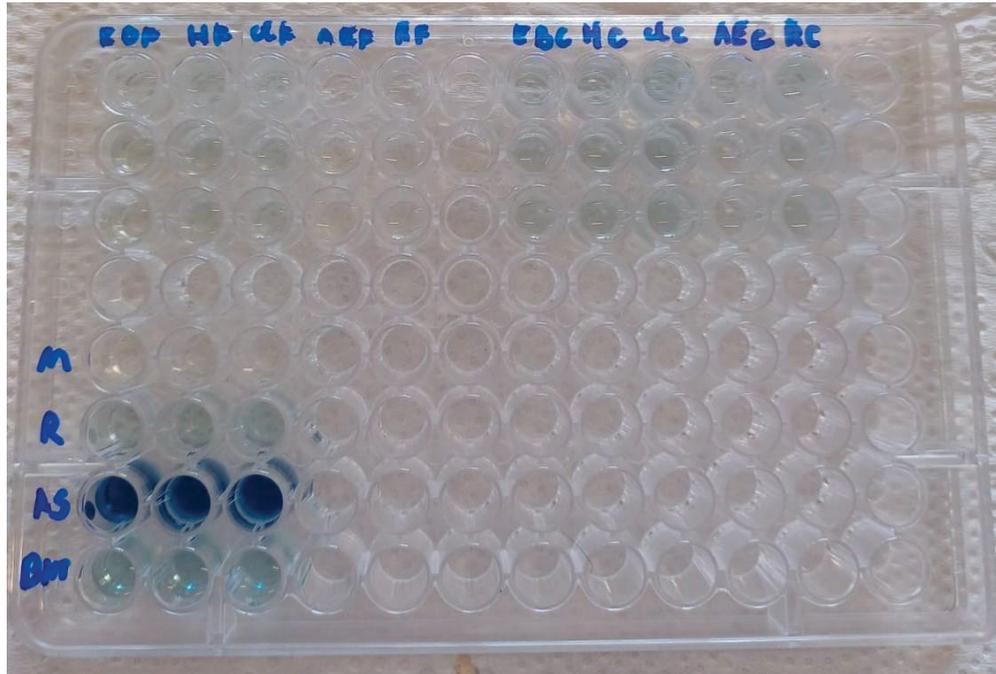
A curva de calibração padrão de trolox obtida apresentou uma equação de regressão linear $y = -0,0115x + 0,1956$ e o coeficiente de determinação $R^2=0,9893$. Os resultados foram apresentados em micrograma equivalente de trolox por miligrama de amostra (μg EQT/mg).

3.6.2 Redução do fosfomolibdênio

O procedimento de redução do reagente fosfomolibdênio foi realizado segundo a metodologia proposta por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) para verificação da capacidade antioxidante dos extratos e frações de *S. tetrandra*, em que foram testadas dez amostras, sendo os extratos bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcolólico das folhas e galhos da espécie. A pesquisa de redução do fosfomolibdênio avalia a capacidade antioxidante da amostra pela conversão do molibdênio (VI) para molibdênio (V), observando a alteração das amostras de incolor para coloração verde azulada.

Para realizar o ensaio foi preparado a solução de reagente fosfomolibdênio, composta pela mistura de ácido sulfúrico (3 mol/L), fosfato de sódio anidro (0,1 mol/L), molibdato de amônio (0,03 mol/L) e água destilada, quantidade total para o volume de 300 mL. As amostras dos extratos brutos e frações foram preparadas na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em metanol, assim como o controle positivos utilizado que foi o ácido ascórbico.

Em tubos de ensaios com tampas previamente limpos foram adicionados 1,5 mL de água destilada, 0,3 mL de amostra ou metanol como branco e 1 mL da solução reagente de fosfomolibdênio. Em seguida os tubos foram incubados em banho maria a 95 °C por 90 minutos semiabertos, após o tempo retirados para resfriar a temperatura ambiente. Por último passado 200 μL com auxílio de pipeta para a microplaca de 96 poços (FIGURA 12) e realizado a leitura no espectrofotômetro em 695 nm.

FIGURA 12 - MICROPLACA DO ENSAIO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS DE *S. tetrandra*

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Amostras: EBF – Extrato bruto folhas; HF – Hexano folhas; CIF – Clorofórmio folhas; AEF- Acetato de etila folhas; RF – Remanescente folhas; EBG – Extrato bruto galhos; HG – Hexano galhos; CIG – Clorofórmio galhos; AEG- Acetato de etila galhos; RG – Remanescente galhos; M – Metanol; R – Rutina; AS – Ácido ascórbico; BHT – Butilhidroxitolueno.

A capacidade antioxidante das amostras dos extratos bruto e frações dos galhos e folhas de *S. tetrandra* neste estudo foi calculada em relação ao ácido ascórbico, que foi considerada o controle com 100% de atividade antioxidante neste modelo. O cálculo foi realizado segundo a fórmula (4), utilizando o software Microsoft Excel ®:

$$(\% \text{ capacidade antioxidante}) = \frac{(AA - AB)}{AAC - AB} \times 100$$

(4)

Legenda:

AA= Absorbância da amostra;

AB= Absorbância do branco;

AAC= Absorbância do ácido ascórbico

As amostras e controles do ensaio do reagente de fosfomolibdênio foram realizados em triplicata e os resultados apresentados em porcentagem equivalente de ácido ascórbico (% EQAA).

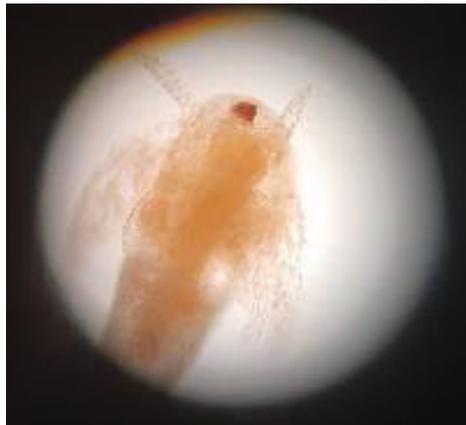
3.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados com os extratos brutos das folhas e galhos e suas respectivas frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcóolica. As amostras utilizadas em cada teste ou ensaio dependeu do que se pretendia analisar.

3.7.1 Teste de letalidade frente a *Artemia salina* Leach

Para realizar o teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach (FIGURA 13), foi utilizada a metodologia proposta por Meyer (1982), com modificações. Iniciou-se com o preparo da solução salina (água do mar artificial), diluindo 14,31 g de sal marinho (Instant Ocean Sea Salt) em 400 mL de água destilada. O pH foi ajustado e mantido entre 8,0 e 10,0 com carbonato de sódio a 10% m/v, para evitar a morte dos microcrustáceos sensíveis a variação de pH. A solução salina foi levada para aeração por 30 minutos, em seguida adicionado 200 mg de cistos de *A. salina* na solução, para a eclosão dos ovos, a agitação foi mantida por 48 horas, com iluminação (20 W) e temperatura entre 27°C e 30°C.

FIGURA 13 - *Artemia salina* Leach



FONTE: A autora, 2023.

Foram testados os extratos brutos e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente das folhas e galhos de *S. tetrandra*. As amostras e o controle positivo de sulfato de quinidina foram preparados a partir de uma solução mãe, sendo 100 mg de cada amostra/controlado positivo solubilizado em 1 mL de DMSO e

completado o volume com água salina, em um balão volumétrico de 100 mL. Para o controle negativo foi utilizada a solução de DMSO 1% em água salina. Foram preparadas diluições em seis concentrações de cada amostra em frascos de vidro de 10 mL (tabela 4).

TABELA 4 – DILUIÇÕES PARA AS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE *A. salina*

Concentração (µg/mL)	Volume SM (µL)	Volume água salina (µL)
1000	5000	-
750	3750	1250
500	2500	2500
250	1250	3750
100	500	4500
50	250	4750

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: SM – Solução mãe.

Após o preparo das amostras e controles e eclosão dos ovos, foram transferidos 10 náuplios para os frascos de vidro, organizados em quintuplicata para cada concentração e o volume final de cada frasco foi completado para 5 mL. Após 24 horas, realizou-se a contagem dos náuplios mortos e vivos das amostras e controle, os dados foram avaliados a partir da determinação da concentração letal (CL₅₀) e intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa estatístico IBM SPSS Software®, pelo método Probitos (FINNEY, 1971).

Assim é possível determinar o valor das concentrações capazes de matar 50% dos náuplios em cada amostra e de acordo com Meyer (1982), as amostras são consideradas tóxicas quando o valor de CL₅₀ for inferior a 1000 µg/mL.

3.7.2 Atividade antimicrobiana

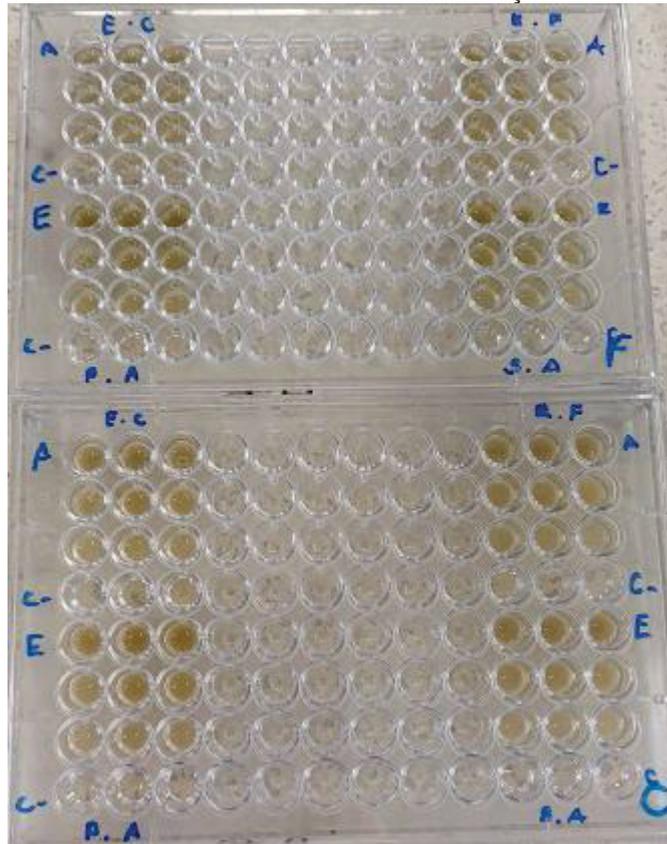
A atividade antimicrobiana de *S. tetrandra* foi avaliada pelo método da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição seriada em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (COCKERILL et al., 2012) e padronizado por Surek et al. (2021).

As amostras utilizadas foram os extratos brutos das folhas e galhos, em que foram preparadas soluções estoques em tubo tipo Eppendorf de 20.000 µg/mL diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). As cepas bacterianas testadas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Os inócuos das bactérias foram preparados em solução salina 0,85% a partir de uma cultura de placa com turbidez equivalente à escala McFarland 0,5 ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Essa suspensão foi então diluída 1:20 ($\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL).

As amostras foram diluídas em caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha). No primeiro poço foi adicionado 190,0 µL de caldo e 10,0 µL da amostra dos extratos, totalizando 200,0 µL de amostra no poço, em seguida foram realizadas as diluições seriadas, transferindo 100,0 µL do primeiro poço para o segundo poço contendo 100,0 µL de caldo, e repetido do segundo para o terceiro poço, seguido do descarte dos 100 µL finais na pipeta. O procedimento foi realizado até a obtenção das concentrações 1000 µg/mL; 500 µg/mL e 250 µg/mL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U” (FIGURA 14). A inoculação foi realizada com o acréscimo de 10 µL de suspensão bacteriana em cada poço, em fluxo laminar. O controle negativo, para confirmar a não interferência do líquido diluente nos resultados, foi realizado no quarto poço, utilizando 95 µL de caldo e 5 µL de DMSO, totalizando 100 µL. O teste foi realizado em triplicata e as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas.

FIGURA 14 – MICROPLACAS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM AMOSTRAS DE *S. tetrandra* ANTES DA INCUBAÇÃO



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Amostras: F – Folhas; G – Galhos; E.C – *E. coli*; E.F – *E. faecalis*; P.A – *P. aeruginosa*; S.A – *S. aureus*; C – Controle.

Por último, após as 18 horas, foi realizada a leitura dos resultados da inibição total do crescimento bacteriano a olho nu. A formação de turbidez nos poços foi interpretada como ausência da atividade antibacteriana, enquanto o meio límpido foi considerado como presença de atividade antibacteriana.

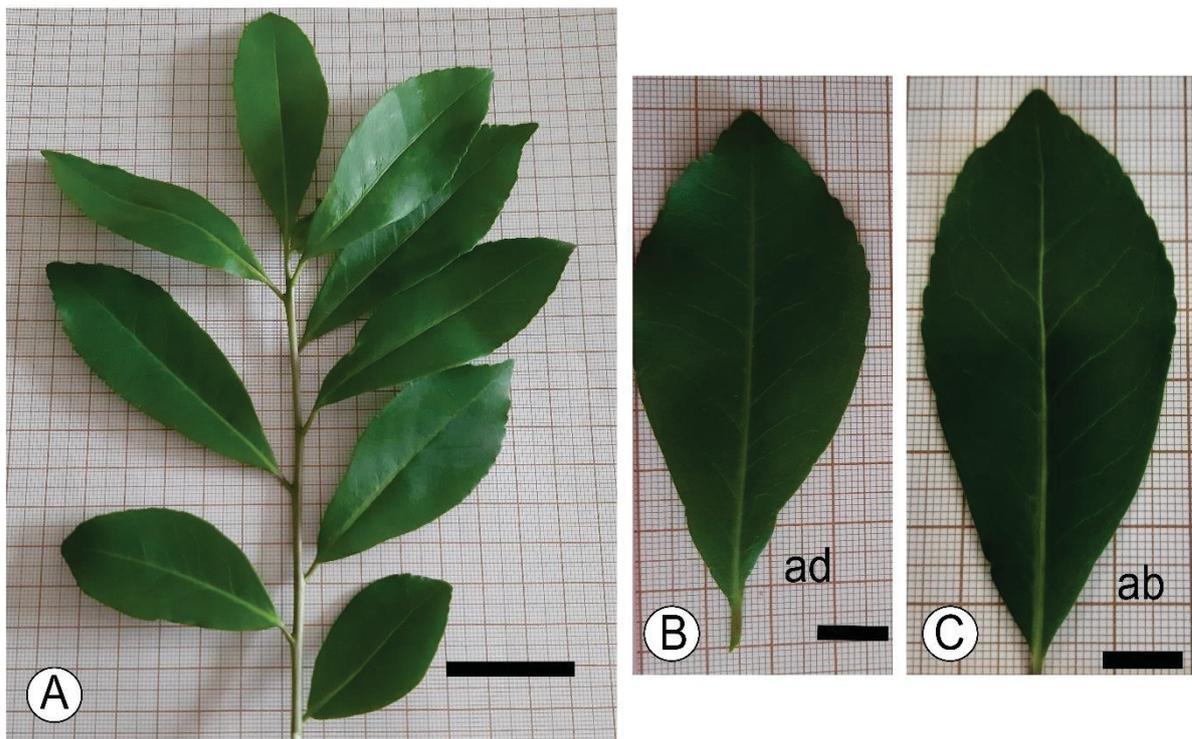
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

4.1.1 Estudo macroscópico

Os resultados macroscópicos da morfologia de *Symplocos tetrandra* Mart. mostraram folhas simples, alternas espiraladas, de consistência membranácea a cartácea e glabra (FIGURA 15). Na face adaxial, a cor varia de verde claro a escuro, brilhante, na face abaxial, verde levemente amarelado claro. As lâminas são do tipo elíptica, com margem lisa na porção inferior e serrada no terço distal superior, a descrição morfológica vai de acordo com a realizada por Aranha Filho (2011).

FIGURA 15 – MORFOLOGIA DAS FOLHAS DE *S. tetrandra*



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: A: galho de planta. B: folha face adaxial. C: folha face abaxial. Barra de escala: A = 3 cm; B, C = 1 cm.

A medição de vinte indivíduos do comprimento e largura do limbo da folha e do pecíolo em centímetros (cm) estão representados na tabela 5.

TABELA 5: RESULTADOS DAS MEDIDAS DO LIMBO E PECÍOLO DE *S. tetrandra*

	Média (cm)	± DP
Limbo comprimento	8,5	0,65
Limbo largura	3,3	0,23
Pecíolo comprimento	0,6	0,15

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: ± DP – Desvio padrão; cm (centímetros).

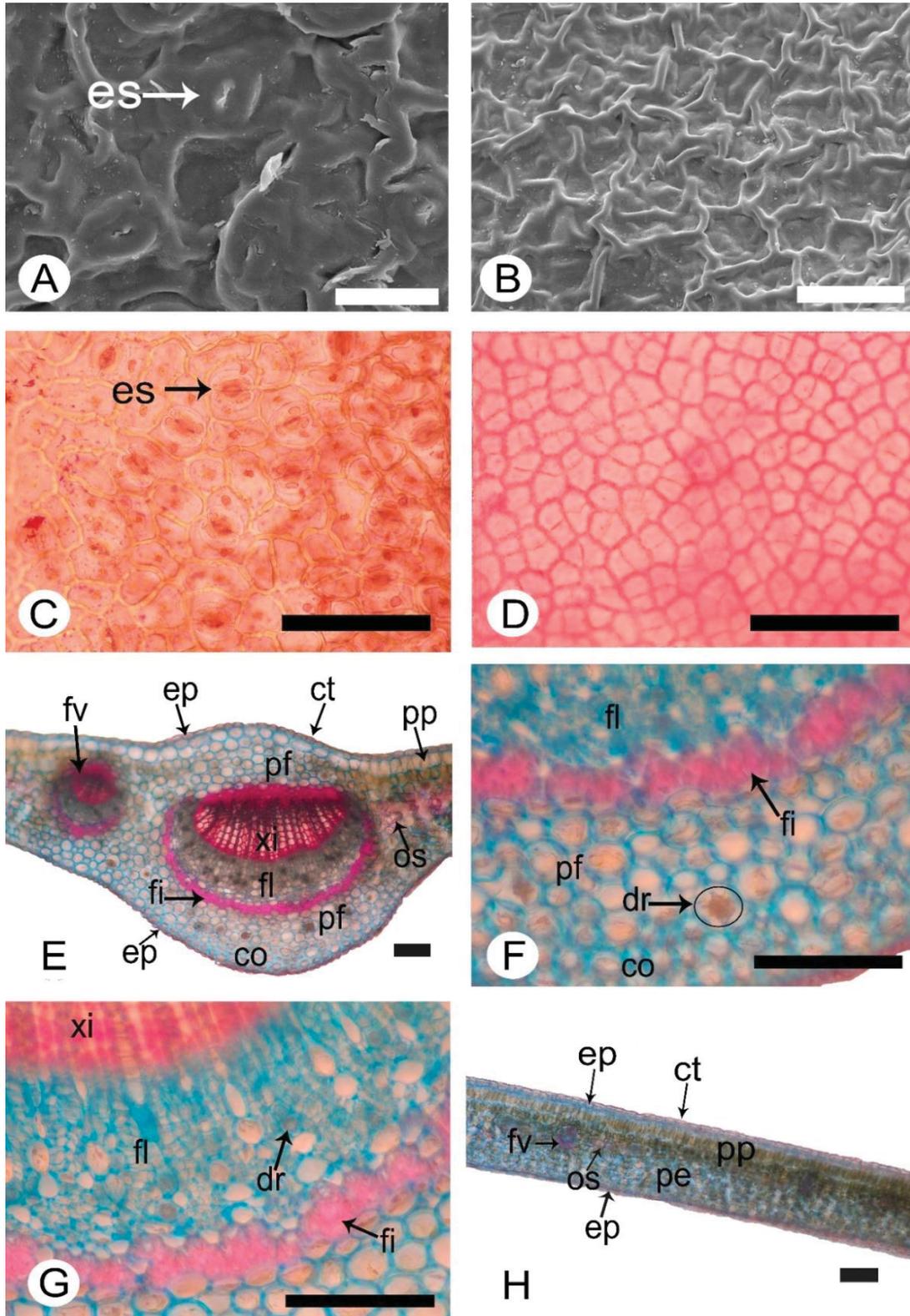
A média de tamanho encontrado em relação ao comprimento do limbo é 8,5 cm e 3,3 cm de largura (tabela 5). O ápice é obtuso a agudo, a base é aguda a obtusa, às vezes atenuada e a nervação do tipo peninérvea, broquidódroma, nervura primária plana a sutilmente impressa, nervuras secundárias discretas, nervuras terciárias escalariformes, inexpressivas, folhas persistentes a caducas, dados de acordo com a classificação de morfologia de Almeida (2018).

Observa-se a presença de pecíolo na folha, em que a média do comprimento do pecíolo foi de 0,6 cm (tabela 5), possui cor verde amarelado brilhante, plano a sutilmente canaliculado, sem indumento. O caule é circular, de cor verde amarelado brilhante, quando jovens, a marrom, quando maduros (figura 20a), conforme observado em Aranha Filho (2011).

A descrição taxonômica de *S. tetrandra* realizada por Aranha Filho (2011), mostrou ramo maduro raramente lenhoso, esverdeado, amarelo-esverdeado ou marrom-esverdeado; gema glabra; primórdios foliares glabros, raramente pilosos com os tricomas semelhantes a papilas. Folhas ao longo do ramo, patentes; pecíolo abaxial arredondado, adaxial plano ou côncavo; lâmina rômbrica ou elíptica.

4.1.2 Análise microscópica

Pela visualização frontal, ambas as faces da folha apresentam células poligonais de paredes espessas (FIGURA 16B). Na face adaxial não foi observado a presença de estômatos, porém, na face abaxial, os estômatos identificados são do tipo paracítico (FIGURA 16A,C), ou seja, possuem duas células anexas dispostas paralelamente ao maior eixo do estômato, sendo classificada como hipoestomática.

FIGURA 16 – MORFOANATOMIA DAS FOLHAS DE *S. tetrandra*

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Microscopia eletrônica de varredura. A: face abaxial; B: face adaxial; Microscopia óptica. C (face abaxial), D (face adaxial): epiderme em vista frontal (reagente: safranina); E, F, G, H: reagentes: fucsina básica e azul de astra] [co: colênquima; ct: cutícula; dr: drusa; ep: epiderme; es: estômato; fi: fibras; fl: floema; fv: feixe vascular; os: osteoesclereides; pe: parênquima esponjoso; pf: parênquima fundamental; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema]. Barra de escala: A = 20 μm; B = 50 μm; C, D, E, F, G, H = 100 μm.

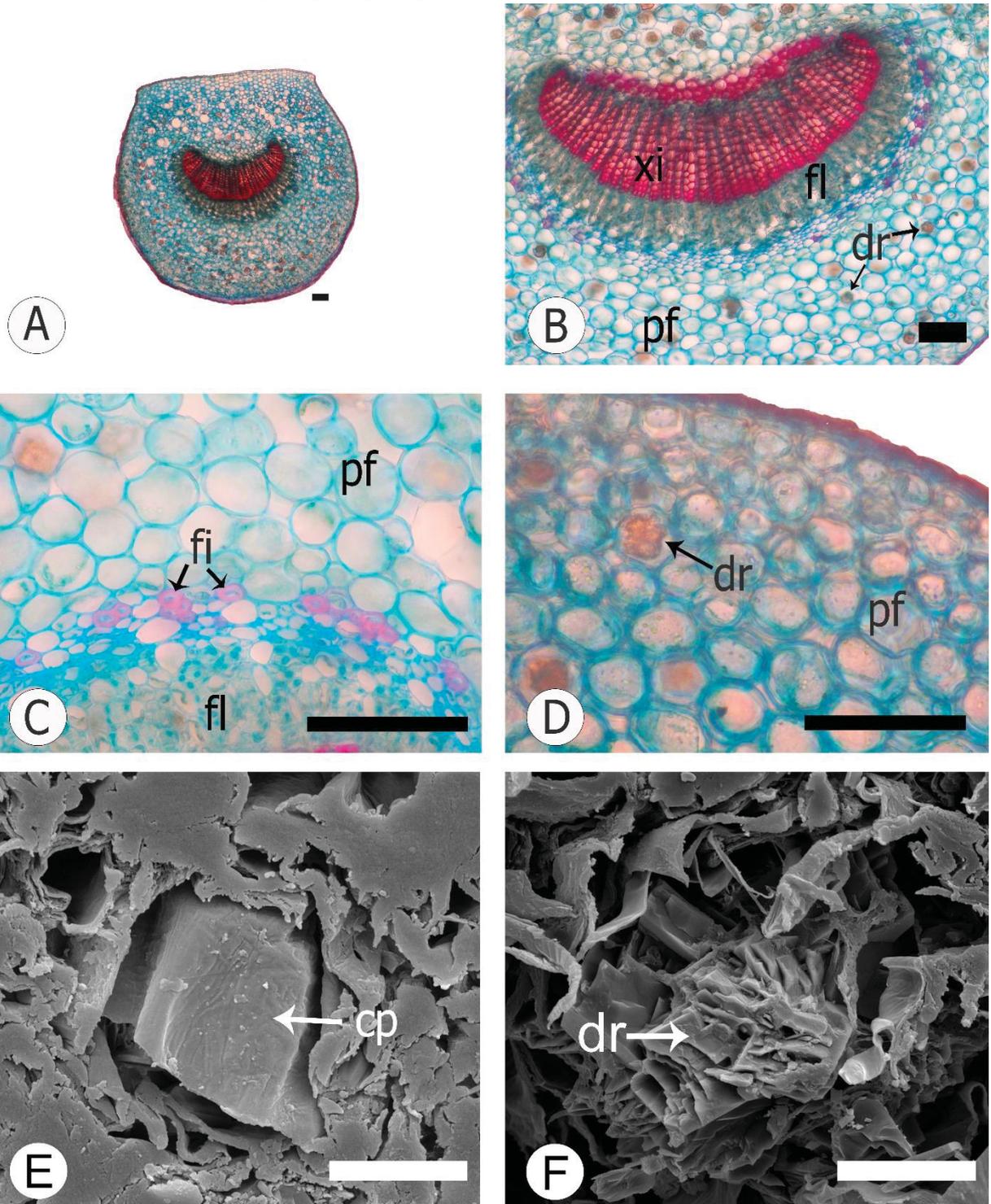
Em vista da secção transversal, a epiderme é unisseriada (FIGURA 16E,H), sendo maior na face adaxial e possui cutícula espessa em ambas as faces. O mesofilo dorsiventral apresenta duas camadas de parênquima paliçádico com células colunares e a segunda camada de células alternadas entre colunares, lobadas e esféricas (FIGURA 16H). O parênquima esponjoso apresenta cerca de sete camadas. Há presença de feixe vascular colateral de pequeno porte, circundado por bainha parenquimática alternada com fibras apostas ao floema e xilema do mesofilo (FIGURA 16E).

A nervura central apresenta um feixe colateral semicircular, com xilema voltado para a face adaxial e floema para a face abaxial. Ainda, observou-se a presença de células esclerenquimáticas (fibras) envolvendo a região do feixe vascular (FIGURA 16G) e esclereídes melhor evidenciadas nos testes histoquímicos (FIGURA 19). Foram observadas drusas e esclereídes, do tipo osteoesclereídes, no mesofilo (FIGURA 16E,F), formadas por oxalato de cálcio e carbonato de cálcio, na região da nervura central e mesofilo da folha em maior quantidade.

O pecíolo apresenta o formato plano-convexo (FIGURA 17A), a epiderme é unisseriada e apresenta cutícula delgada. O colênquima angular pode ser visualizado em três camadas, seguido de dez camadas de parênquima fundamental.

Cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas estão distribuídos por todo o pecíolo (FIGURA 17D,F), sendo observado também a presença de raros cristais prismáticos na região do parênquima fundamental (FIGURA 17E). Foi evidenciada maior quantidade de cristais no pecíolo, em relação à nervura central, mesofilo e caule. Os cristais são classificados como substâncias ergásticas, resultante do metabolismo celular, relacionados a função de defesa da planta contra predadores, sendo encontradas em células denominada idioblásticas (RODRIGUES et al., 2015).

O feixe vascular é colateral em arco aberto (FIGURA 17B), sendo o floema envolto por pequenos e alternados grupos de fibras (FIGURA 17C), as quais aparecem em maior quantidade abaixo do xilema.

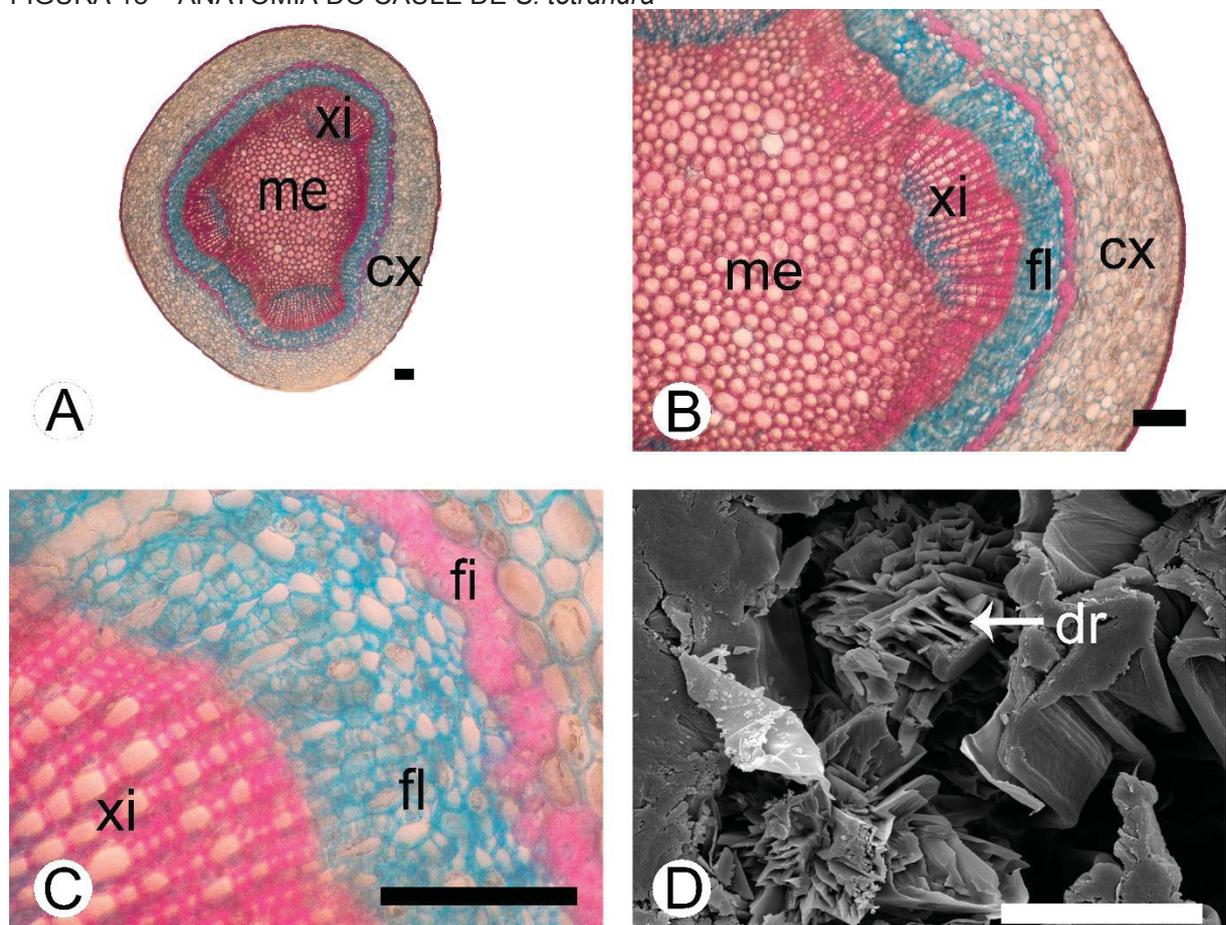
FIGURA 17 – ANATOMIA DO PECÍOLO DE *S. tetrandra*

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Corte transversal - microscopia óptica, A, B, C, D: cortes corados com fucsina básica e azul de astra. [Microscopia eletrônica de varredura. E, F] [cp: cristal prismático; dr: drusa; fi: fibras; fl: floema; pf: parênquima fundamental; xi: xilema]. Barra de escala: A, B, C, D = 100 µm; E, F = 10 µm.

O caule é formado por epiderme uniestratificada e unisseriada, formada por uma cutícula delgada. Apresenta parênquima cortical, seguido do feixe vascular em formato circular, em que o floema contorna o xilema que se alterna em regiões mais largas e mais finas, formando três projeções mais evidentes e levemente equidistantes, possuindo medula na região central (FIGURA 18A). O feixe vascular é contornado por uma bainha esclerenquimática de fibras (FIGURA 18B,C). Cristais do tipo drusa (FIGURA 18D) foram observados no caule em menor quantidade que nas demais regiões descritas.

FIGURA 18 – ANATOMIA DO CAULE DE *S. tetrandra*



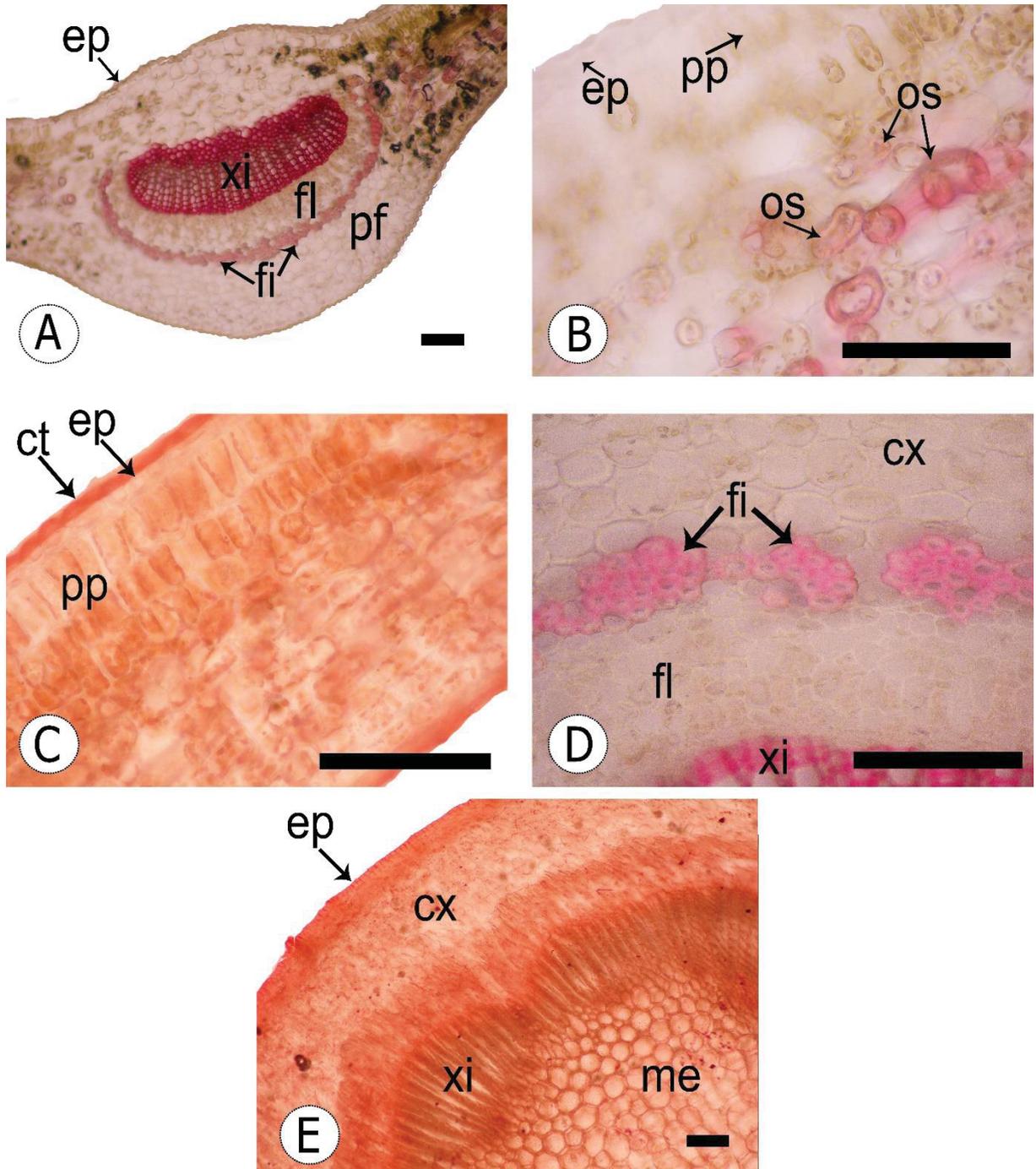
FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Corte transversal - microscopia óptica, A, B, C: cortes corados com fucsina básica e azul de astra. [Microscopia eletrônica de varredura. D] [cx: córtex; dr: drusa; fi: fibras; fl: floema; me: medula; xi: xilema]. Barra de escala: A, B, C = 100 μ m; D = 20 μ m.

4.1.3 Testes histoquímicos

Os resultados com os reagentes utilizados para os testes histoquímicos, apresentaram coloração com o floroglucinol acidificado na estrutura da folha que evidenciou a presença de fibras e esclereídes (FIGURA 19A), devido a composição de lignina. As esclereídes, quando presentes em muitas células, conferem rigidez, resistência e possuem a parede secundária bem espessada, com pontuações simples, formando longos canais (RODRIGUES et al., 2015). Foi observada a presença de osteoesclereídes (FIGURA 19B) células curtas, cujo lúmen tem forma de osso.

A reação alaranjada observada na face adaxial da folha (FIGURA 19C) e na superfície do córtex do caule (FIGURA 19E) indica a presença de substâncias lipídicas na cutícula, que reagem positivamente com o Sudan III.

FIGURA 19 – HISTOQUÍMICA DE *S. tetrandra*

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: [A, B, D: floroglucina/HCl; C, E = Sudan III. Corte transversal (A: nervura central; B, C: lâmina foliar; D, E: caule) - microscopia óptica. [ct: cutícula; cx: córtex; dr: drusa; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; me: medula; os: osteosclereídes; pf: parênquima fundamental; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema]. Barra de escala: A, B, C, D, E = 100 μ m.

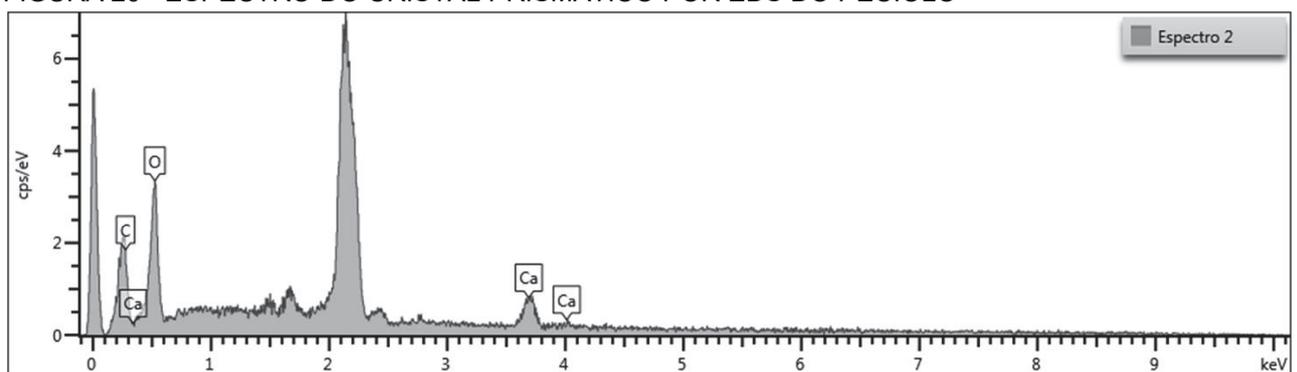
4.1.4 Análise dos cristais por EDS e MEV

Os cristais de natureza inorgânica, apresentaram composição química de oxalato de cálcio, carbonato de cálcio ou sílica. As formas variam de drusas, com diversas faces e pontiagudas; ráfides, alongados, com forma de agulhas finas; estilóides, longos, estreitos e pontiagudos e cistólitos, em forma de bolsa. Presentes nas células cristalíferas das plantas (RODRIGUES et al., 2015).

Os cristais prismáticos de oxalato de cálcio (FIGURA 17E) estão presentes no pecíolo e são compostos por 60,5% de oxigênio (O), 17,5% de cálcio (Ca) e 22% de carbono (C), sugerindo a possível estrutura molecular de CaC_2O_4 (FIGURA 20).

As drusas de oxalato de cálcio foram identificadas no pecíolo e caule, respectivamente (FIGURA 17F; 18D). Nesse caso, foram obtidos dois espectros o da figura 21 que mostra 57% de oxigênio (O), 31,40% de cálcio (Ca) e 11,60% de carbono (C), enquanto o da figura 22 mostra 59,65% de oxigênio (O) e 40,35%. Ainda, o pico de carbono da figura 22 é pouco evidenciado em relação ao da figura 21. O teste realizado com o reagente HCl 10% (v/v) não apresentou efervescência, sendo positivo para cristais de oxalato de cálcio. Por fim, os picos sem identificação no espectro EDS, correspondem ao elemento ouro, devido ao processo de metalização da amostra.

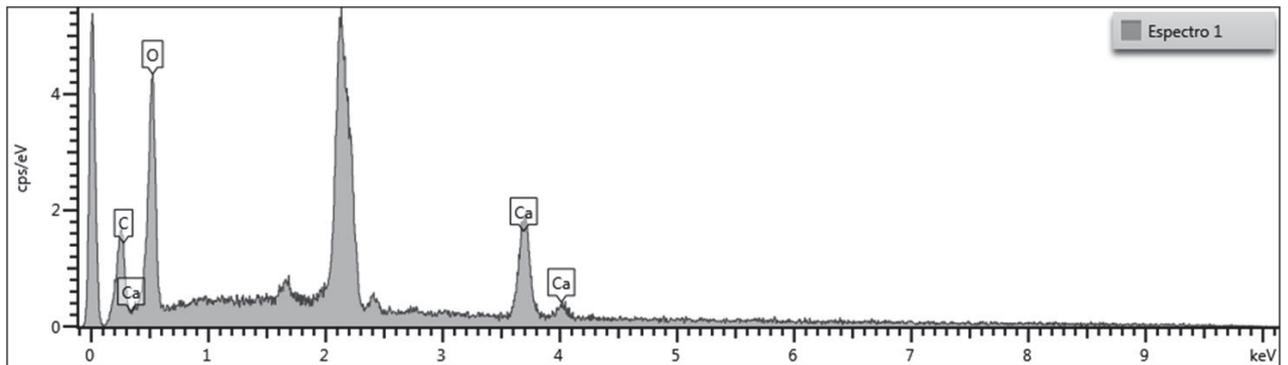
FIGURA 20 - ESPECTRO DO CRISTAL PRISMÁTICO POR EDS DO PECÍOLO



FONTE: A autora, 2023.

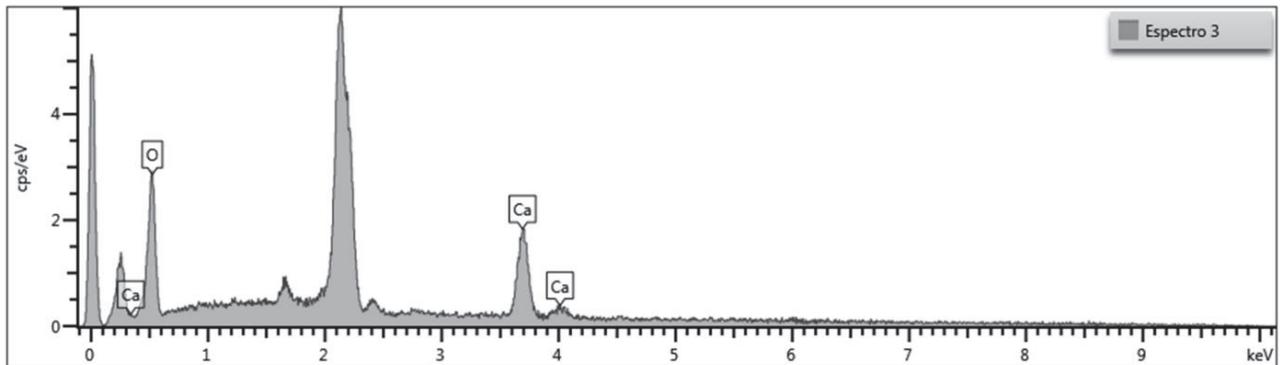
LEGENDA: Composição de oxalato de cálcio CaC_2O_4 ou carbonato de cálcio, CaCO_3 (60,5% oxigênio, 17,5% cálcio, 22% carbono).

FIGURA 21 - ESPECTRO DA DRUSA POR EDS DO PECÍOLO



FONTE: A autora, 2023.

FIGURA 22 - ESPECTRO DA DRUSA POR EDS DO CAULE



FONTE: A autora, 2023.

A pesquisa morfoanatômica de *Symplocos nitens* (Pohl) Benth. por Silva (2019) mostrou que as folhas são dorsiventrais, hipoestomáticas com idioblastos contendo drusas. Apresentam feixe colateral semicircular na região mediana da folha, faixa cambial, fibras envolvendo o feixe e colênquima angular (SILVA, 2019). Essas características anatômicas também foram observadas na espécie *S. tetrandra*, colaborando com a caracterização do gênero *Symplocos*.

A pesquisa morfoanatômica de *S. tetrandra* mostrou que as folhas são dorsiventrais, hipoestomáticas com idioblastos contendo drusas. Apresentam feixe colateral semicircular na região mediana da folha, faixa cambial, fibras envolvendo o feixe e colênquima angular. Essas características anatômicas também foram observadas nas folhas da espécie *S. nitens*, por Silva (2019).

Outro ponto verificado é a possibilidade de distinguir o parênquima paliçádico e o esponjoso de *S. tetrandra*, enquanto em *S. nitens* (SILVA, 2019) as células dos parênquimas não são diferenciáveis. No entanto, marcadores anatômicos como a presença de tricomas tectores, na região da nervura mediana de *S. nitens* (SILVA,

2019), não foram observadas em *S. tetrandra*. Tais particularidades tornam cada espécie única, permitindo identificá-las com mais facilidade.

Segundo Silva (2019), a *S. nitens* é considerada uma espécie acumuladora de alumínio (Al) devido a presença do metal em diferentes tecidos, principalmente na parede das células epidérmicas. Por ser uma característica notada no gênero, há a possibilidade de também estar presente na espécie *S. tetrandra*.

De acordo com Banerji (1974), o pecíolo de *Symplocos caudata* Wall. ex G.Don possui feixe vascular no formato em V, a extremidade distal forma um arco e a bainha é de feixe fibrosa. Já a *Symplocos crataegoides* Buch.-Ham. ex D.Don possui o feixe vascular em forma de meia-lua e a bainha do feixe parenquimatosa com as células em formato regular. Por fim, a *Symplocos racemosa* Roxb. possui o feixe vascular em forma de arco achatado e a bainha do feixe semelhante ao de *S. crataegoides*. Nenhuma das espécies supracitadas possui esclerênquima na região cortical.

O pecíolo de *S. tetrandra* não possui esclerênquima na região cortical, assim como as espécies descritas anteriormente, além disso, apresenta grupos de fibras próximo ao floema, assim como *S. caudata*. No entanto, *S. tetrandra* possui o feixe vascular em forma de arco aberto, diferentemente de *S. caudata*, *S. crataegoides*, *S. racemosa*, sendo essa uma característica única de cada espécie.

Com base nos dados levantados no estudo, é possível identificar caracteres morfoanatômicos que confirmam a classificação taxonômica e permitem a distinção de *S. tetrandra*, das demais espécies que compõem o gênero *Symplocos*. Além disso, o conhecimento das estruturas morfológicas e anatômicas pode contribuir para futuros estudos fitoquímicos, biológicos e farmacológicos relacionados à espécie.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1 Perda por dessecação e cinzas totais

Os resultados para a perda por dessecação e cinzas totais das amostras de folhas e galhos de *S. tetrandra*, segundo o cálculo em porcentagem da Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019), estão demonstrados na tabela 6.

TABELA 6 – RESULTADOS DA PERDA POR DESSECAÇÃO E CINZAS TOTAIS

Amostras	Dessecação (%) ± DP	Cinzas (%) ± DP
Folhas	4,70 ± 0,08	3,58 ± 0,01
Galhos	2,89 ± 0,06	2,42 ± 0,05

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: ± DP – Desvio padrão.

As amostras vegetais secas e trituradas das folhas de *S. tetrandra* apresentaram uma perda por dessecação de 4,70% e teor de cinzas totais igual a 3,58%, enquanto os galhos secos e triturados apresentaram perda por dessecação de 2,89% e cinzas totais de 2,42%.

De acordo com Araújo et al. (2006) os teores de umidade para as amostras vegetais devem apresentar resultado no limite máximo de 14%, pois o excesso de umidade pode facilitar o desenvolvimento de microrganismos e a ação de enzimas que degradam constituintes químicos.

Os resultados de perda por dessecação e teor de cinzas podem servir de parâmetro relevante no processamento industrial das amostras, ajudando no controle biológico para armazenamento. Ainda, o teor de cinzas serve como indicador de quantidade de sais minerais e de possível adulteração do material que contenha compostos inorgânicos (ARAÚJO et al., 2006).

4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.3.1 Teor de sólidos e rendimento dos extratos e frações

O volume resultante de extrato bruto do processo de extração hidroalcóolico das folhas de *S. tetrandra* foi 7440,0 mL, enquanto das amostras dos galhos foi 4760,0 mL de extrato bruto. Após homogeneizar as amostras e retirar a alíquota de 5,0 mL, foram determinados os valores de teor de sólidos e rendimento dos extratos das amostras iniciais das folhas e galhos representados na tabela 7.

TABELA 7 – RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE TEOR DE SÓLIDOS E RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS HIDROALCÓOLICOS DAS FOLHAS E GALHOS DE *S. tetrandra*

Amostras	Massa vegetal (g)	Volume extrato bruto (mL)	Teor de sólidos (% m/v)	Rendimento (% m/m)
Folhas	1084,13	7440,0	1,620	11,12
Galhos	760,00	4760,0	0,475	2,97

FONTE: A autora, 2023.

O teor de sólidos apresentou resultado de 1,62% para o extrato das folhas e de 0,475% para o extrato de galhos. Partindo dos valores de massa vegetal em grama, volume de extrato bruto em mililitro e do teor de sólidos foi possível calcular o rendimento do processo de extração hidroalcóolico, sendo 11,12% para o extrato das folhas e 2,97% para o extrato dos galhos. Em seguida as amostras dos extratos brutos foram concentradas em 1/3 do volume inicial.

Após separar 3,0 g de cada extrato para as análises biológicas posteriores, os extratos brutos foram submetidos ao processo de fracionamento por partição líquido-líquido em solventes de polaridade crescente, sendo eles hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se assim as frações orgânicas, chamadas de fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcóolico. Após a secura, com a massa resultante de extrato seco de cada uma, foi possível calcular o rendimento de cada fração orgânica, em relação a quantidade de material vegetal inicial das folhas e galhos. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

TABELA 8 – RESULTADOS DOS RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS

FOLHAS		
Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	41,9027	3,86
Clorofórmio	2,0806	0,19
Acetato de etila	4,3759	0,40
Remanescente	0,2854	0,03
GALHOS		
Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,5269	0,07
Clorofórmio	3,8613	0,51
Acetato de etila	0,6174	0,08
Remanescente	1,7750	0,23

FONTE: A autora, 2023.

As frações orgânicas tiveram um baixo rendimento em relação a massa vegetal inicial, com exceção da fração hexano das folhas, podendo sugerir que os compostos químicos ou metabólitos presentes na espécie *S. tetrandra* possuem características menos polares, podendo apresentar cadeias carbônicas mais longas e baixa solubilidade em água.

4.3.2 Perfil fitoquímico

O ensaio sistemático fitoquímico permite avaliar de forma qualitativa a presença dos principais grupos químicos nas drogas vegetais, por meio de reações de coloração e precipitação dos constituintes pesquisados (MIGUEL, 2003).

As análises organolépticas que avalia as características percebidas pelos sentidos humanos, como cor, odor, pH e sabor dos extratos alcoólicos e aquosos de *S. tetrandra*, realizadas de acordo com Miguel (2003), apresentaram os seguintes resultados para o extrato alcoólico das folhas: cor verde esmeralda, sabor amargo, odor mato-grama adocicado e pH igual a 5. O extrato alcoólico dos galhos manteve as características com exceção da cor, sendo um tom verde claro.

O extrato aquoso das folhas apresentou a cor castanho, sabor amargo, odor de chá amargo e pH igual a 6. As características organolépticas se mantiveram para o extrato aquoso dos galhos.

Os resultados obtidos nas análises preliminares para caracterização dos compostos fitoquímicos, das frações orgânicas do extrato hidroalcoólico e do extrato aquoso das folhas e galhos presentes na espécie *S. tetrandra* estão apresentados nas tabelas 9 e 10.

TABELA 9 – PERFIL FITOQUÍMICO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS DE *S.tetrandra*

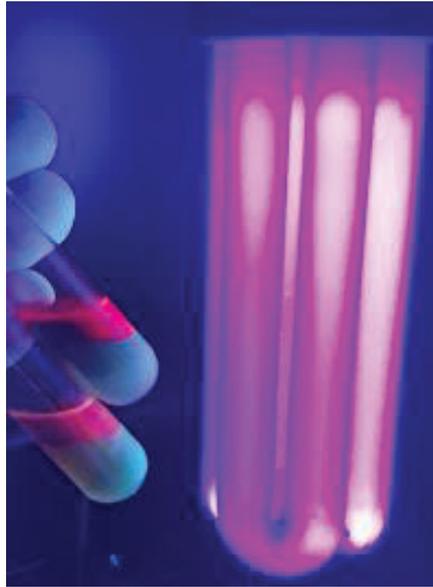
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	ANÁLISES	AMOSTRAS							
		Folhas				Galhos			
		FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR
Alcaloides	R. Bertrand	-	-	-	-	-	-	-	-
	R. Bouchardat	-	-	-	-	-	-	-	-
	R. Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-
	R. Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	R. Borntrager	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	N.A	-	+	+	-	-	+	+	-
Esteroides / Triterpenos	Liebermann Burchard	+	+	+	-	+	+	+	-
	Flavonoides	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	Oxálico bórico	-	-	-	-	-	-	-	-
	Zinco em HCl	-	-	-	-	-	-	-	-
Iridoides	N.A	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	N.A	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDAS: R. (reagente); N.A – Não aplicável; FH - Fração hexano; FC - Fração clorofórmio; FAE - Fração acetato de etila; FR - Fração remanescente. – (negativo); + (positivo).

Os resultados das frações orgânicas do extrato hidroalcolólico das folhas e galhos, mostraram a presença de cumarinas, devido a fluorescência verde amarelado leve (FIGURA 23), emitida sob a luz ultravioleta UV, nas frações clorofórmio e acetato de etila. Também foi identificado a presença de esteroides, devido a reação com coloração verde (FIGURA 24), identificando a presença de função hidroxila (OH) na molécula esteroidal. Ainda, o não desenvolvimento de coloração nas reações de pesquisa de flavonoides, sugere a possível presença de compostos como flavonas, isoflavonas e flavononas, de acordo com Miguel (2003).

FIGURA 23 - CUMARINAS COM FLUORESCÊNCIA VERDE AMARELADO



FONTE: A autora, 2022.

FIGURA 24 - ESTEROIDES COM COLORAÇÃO VERDE PELA REAÇÃO DE LIEBERMANN BURCHARD



FONTE: A autora, 2022.

TABELA 10 – PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DE *S. tetrandra*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	ANÁLISES	AMOSTRAS	
		Folhas	Galhos
Antocianinas	N.A	-	-
Cianogênicos	M. Guignard	-	-
Aminogruppo	Ninhidrina	+	+
Saponinas	Espuma	+	+
	Cianeto de potássio	-	-
Taninos	Cloreto férrico	+	+
	Dicromato de potássio	-	-
	Gelatina	-	-
	Emetina	-	-

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: N.A – Não aplicável; – (negativo); + (positivo).

Os resultados do extrato aquoso das folhas e galhos, mostraram a presença de taninos devido a reação de precipitação com o cloreto férrico, formando um precipitado de tom marrom esverdeado, indicando a presença de taninos condensados nas amostras. Foi identificado a presença de saponinas pela análise de espuma, devido a formação de espuma persistente (FIGURA 25) durante trinta minutos, a partir da vigorosa agitação e a presença de aminogruppo por apresentar a coloração rosácea ao nebulizar o papel filtro com ninhidrina.

FIGURA 25 - ESPUMA PERSISTENTE DO TESTE DE SAPONINAS



FONTE: A autora, 2023.

4.3.3 Extração do óleo essencial

Não foi obtido óleo essencial de *S. tetrandra* durante o processo de hidrodestilação por arraste a vapor.

4.3.4 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é usada para avaliar as características qualitativas dos principais grupos químicos que constituem os princípios ativos das drogas vegetais, como os metabólitos presentes nos extratos e frações orgânicas, utilizando reveladores que provocam reações de coloração e fluorescência (MIGUEL, 2003). Pela análise por CCD foram encontrados os resultados descritos na tabela 11.

TABELA 11 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	AMOSTRAS							
	Folha				Galho			
	FH	FC	FAE	FR	FH	FC	FAE	FR
Alcaloides	-	-	-	+	-	-	-	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpenos	+	-	-	-	+	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	-	-	-	+	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: A autora, 2023.

LEGENDAS: FH - Fração hexano; FC - Fração clorofórmio; FAE - Fração acetato de etila; FR - Fração remanescente; - (negativo); + (positivo).

Foram utilizados padrões para comparação com as amostras, como o lupeol, marcador para a pesquisa de triterpenos, o estigmasterol que é usado para pesquisa de substâncias esteroidais, a quercetina para verificar a presença de flavonoides e a papaverina para pesquisa de alcaloides.

O lupeol é um triterpeno, do tipo triterpenoide pentacíclico com a função álcool secundária, é encontrado em frutas e vegetais, como nas cascas das

sementes de tremoço, seringueiras, casulos de *Bombyx mori*, látex de abetos e espécies como *Ficus auriculata* e *Ficus septica*. É descrito possuir atividade de indução de morte celular de carcinoma espinocelular na região da cabeça e pescoço (LEE et al., 2007; PUBCHEM, 2023).

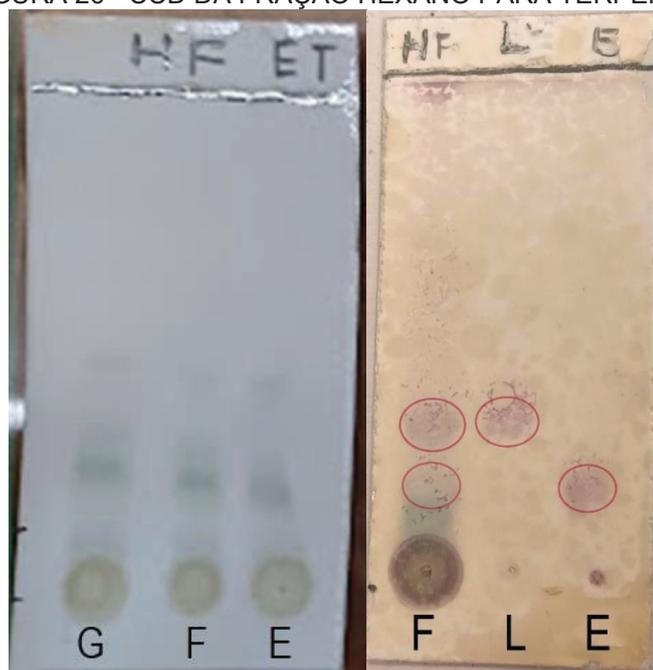
O estigmasterol, assim como o campesterol e sitosterol são fitosteróis ou esteróis vegetais, em que a função e estrutura nas plantas é similar ao colesterol humano (MARANGONI; POLI, 2010), exerce o papel de manutenção das estruturas e funcionalidades nas células vegetais, como a bicamada lipídica (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008).

A quercetina é um flavonoide, pentahidroxi-flavona, com cinco grupos hidroxilas, é encontrada em altas concentrações em maçãs, frutas vermelhas, tomate, cebola e vinho tinto. Possui ação antibacteriana e antioxidante, sendo que no organismo humano, melhora a função metabólica, modulando a inflamação e diminuindo o colesterol sérico, estando disponível como suplemento nutricional comercialmente (ANDRES et al., 2018; PUBCHEM, 2023; SHOSKES et al., 2005).

O padrão utilizado para alcaloides, denominado papaverina, é um alcaloide benzilisoquinolina, que provém da molécula isoquinolina substituída por dois grupos metoxi e um grupo dimetoxibenzil. É encontrada na espécie *Papaver somniferum*, conhecida popularmente como ópio, tem ação vasodilatadora, antiespasmódica e usada para tratamento da disfunção erétil (KIM; EL-RASHIDY; MCVARY, 1995; PUBCHEM, 2023).

O resultado para terpenos foi positivo, na fração hexano (FIGURA 26) das folhas e galhos de *S. tetrandra*, utilizando a comparação com o estigmasterol, pois os esteroides são triterpenos modificados (MIGUEL, 2003) que estão inclusos dentro dessa classe de constituinte químico. Reforçando o resultado positivo, obtido no perfil fitoquímico para esteroides.

FIGURA 26 - CCD DA FRAÇÃO HEXANO PARA TERPENOS



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDAS: HF - Fração hexano; ET; E – Estigmasterol; G – Galho; F – Folha; L - Lupeol.

É possível observar a formação das bandas nas amostras das folhas e galhos e comparar com a do estigmasterol, pois possuem os Rfs parecidos (FIGURA 26), demonstrando que é possível o composto estar presente nas amostras utilizadas ou um esteroide de composição química parecida. A revelação fica mais nítida com a utilização da vanilina sulfúrica 1% que mostrou as bandas na coloração violácea-avermelhada. Ainda foi possível observar que o lupeol, um triterpeno, ao ser revelado, demonstrou Rf equivalente ao das amostras das folhas e galhos, indicando a possibilidade da presença de triterpenos nas amostras. Mostrando que a espécie *S tetrandra* pode ser rica nos compostos terpênicos.

Os resultados corroboram com o levantamento realizado por Badoni (2010) que descreve a presença de α -spinasterol, um esteroide, isolado da casca do caule de *S. spicata* que mostrou potente atividade anti-inflamatória de edema induzidos em ratos, além de triterpenos encontrados a partir de extrato metanólico de *Symplocos paniculata* Miq., entre eles o ácido ursólico e ácido corosólico.

As bandas que ficaram retidas no ponto de aplicação e coraram com o revelador, não sofreram deslocamento com a fase móvel utilizada, pois podem estar relacionadas com compostos saponínicos, que também reagem com a vanilina sulfúrica 1%, porém possuem alta polaridade, não sendo compatível com a fase

móvel utilizada que carrega compostos de baixa polaridade, como os esteroides e triterpenos.

Foi notado a possível presença de alcaloides na fração hidroalcolica remanescente, ao revelar com o reagente de Dragendorff, notou-se a mancha vermelha nas amostras dos galhos e folhas, porém não houve deslocamento das bandas e as placas ficaram manchadas (FIGURA 27). Então, optou-se por uma adaptação da fase móvel de metanol, clorofórmio e amônia (8:2:1) e testado mais um revelador a Ninhindrina.

FIGURA 27 - CCD DA FRAÇÃO REMANESCENTE PARA ALCALOIDES

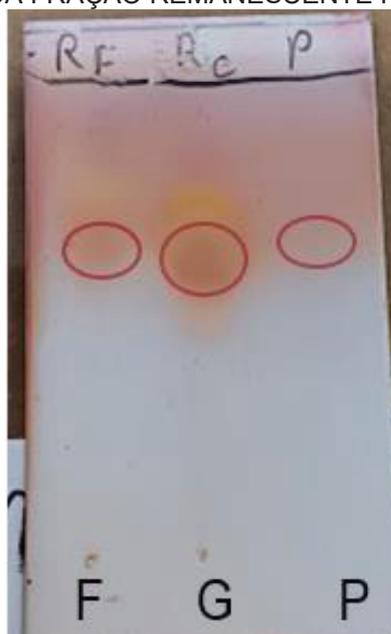


FONTE: A autora, 2023.

LEGENDAS: R - Fração remanescente; F – Folha; G – Galho.

É possível notar que a fase móvel e o revelador adotados foram mais favoráveis para a separação das bandas das amostras (FIGURA 28). Nesse caso, é possível afirmar que há a presença de compostos nitrogenados, não necessariamente um alcaloide, pois tanto no perfil fitoquímico, como nas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, não foi identificada positividade para as pesquisas de alcaloides. Na placa cromatográfica, podem ser visualizadas as bandas rosáceas (FIGURA 28), mais em destaque na fração remanescente dos galhos, o padrão utilizado para alcaloides, a papaverina, mostrou uma coloração rosa bem suave nessa pesquisa.

FIGURA 28 - CCD DA FRAÇÃO REMANESCENTE PARA AMINOGRUPO



FONTE: A autora, 2023.

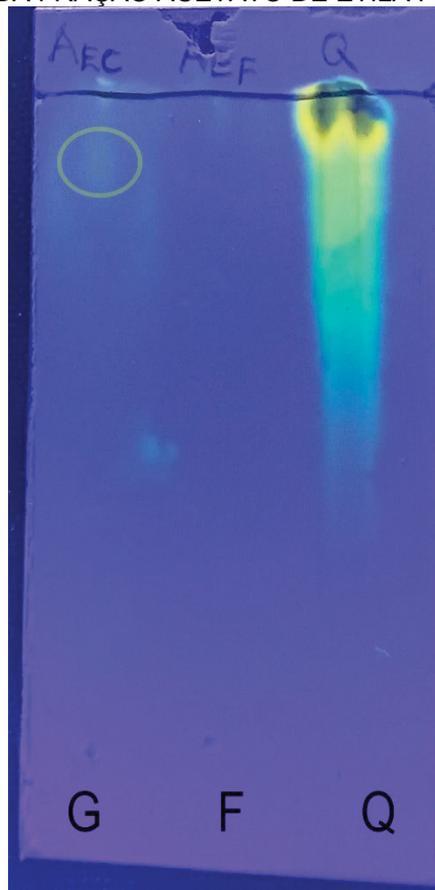
LEGENDAS: R - Fração remanescente; F – Folha; G/C – Galho/Caule; P – Papaverina.

Os alcaloides são compostos orgânicos de caráter básico com nitrogênio ligado ao anel heterocíclico (MIGUEL, 2003), porém nem todo composto nitrogenado presente nas plantas são alcaloides, assim é possível que a CCD com Ninhydrina, revelador específico para aminogrupos, possa ter identificado algum tipo de aminoácido presente na fração remanescente.

No estudo fitoquímico realizado por Devmurari (2010), mostrou a presença de alcaloides no extrato etanólico 95% (v/v) do pó da casca de *S. racemosa*, além de carboidratos, glicosídeos, saponinas e terpenoides. Esse extrato etanólico ao ser testado em diferentes tipos de bactérias, mostrou uma boa atividade antibacteriana, com exceção das bactérias gram negativas que não houve inibição de crescimento.

Na pesquisa por possíveis metabólitos presentes em *S. tetrandra* foi identificado a presença de flavonoides na fração acetato de etila dos galhos, uma banda bem suave em tom amarelado, correspondeu ao padrão da quercetina utilizado como padrão para identificação de flavonoides e a revelação realizada com reagente de NEU em radiação ultravioleta (UV) (FIGURA 29).

FIGURA 29 - CCD DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PARA FLAVONOIDES



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDAS: AE - Fração acetato de etila; F – Folha; G/C – Galho/Caule; Q – Quercetina.

No perfil fitoquímico não foi identificado a presença de flavonoides nas reações de coloração realizadas, apenas na CCD foi possível identificar, assim essas variações nas pesquisas podem estar relacionadas as metodologias empregadas e o método de extração realizado, assim é importante empregar métodos diferentes nas pesquisas de compostos metabólicos, com o intuito de complementar os resultados obtidos.

Foram encontrados estudos com alguns flavonoides no gênero *Symplocos* como o glicosídeo flavonol, denominado Simplicósídeo (figura 7) na espécie *S. uniflora* (TSCHESCHE et al., 1980) e na espécie *S. paniculata* que mostrou quantidade relevante na pesquisa de fenólicos totais nas frações aquosa e oleosa da fruta da espécie e boa capacidade antioxidante na fração metanólica (KUSUMA; KUMAR; CHITRA, 2018).

O estudo cromatográfico em camada delgada juntamente com o perfil fitoquímico permitem direcionar a pesquisa de metabólitos encontrados nas plantas, a fim de caracterizar e isolar um possível composto químico de interesse biológico

ou farmacológico que possa estar presente em *S. tetrandra*. É possível realizar a coluna cromatográfica dos extratos e frações orgânicas obtidos para separar os compostos de uma forma mais pura e seguido da identificação da estrutura química das moléculas por técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN) e radiação infravermelha (IV).

4.3.5 Fenólicos totais

Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares, sendo chamados de glicosídeos fenólicos, e proteínas, alguns exemplos incluem flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas e derivados, largamente distribuídos no reino vegetal (CROFT, 1998; RIBÉREAU-GAVON, 1968). São os principais compostos relacionados a capacidade antioxidante das drogas vegetais, a atividade dos antioxidantes fenólicos se baseia em sequestrar radicais livres e funcionam como quelantes de metais (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBYLIA, 2002; SHAHIDI et al., 1992).

O método de Folin-Ciocalteu se baseia na mistura de ácidos fosfotungstíco e fosfomolibídicos em meio básico, responsável pela coloração amarelada, assim quando presentes, os compostos fenólicos sofrem oxidação, formando oxigênio O₂ que reage com os ácidos no meio, levando a alteração de cor. É utilizado para doseamento de fenóis totais e ajuda a correlacionar os resultados com métodos de verificação da capacidade antioxidante, devido a transferências de elétrons que ocorre durante as reações analisadas desses métodos (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Os resultados do ensaio de fenólicos totais estão representados na tabela 12, expressos em micrograma equivalente de ácido gálico por miligrama de amostra (μg EAG/mg). As amostras provenientes dos galhos de *S. tetrandra*, apresentaram valores superiores as amostras das folhas, com exceção da fração remanescente. O maior valor do teor de fenólicos totais foi observado no extrato bruto dos galhos (1445,83 μg EAG/mg), seguida das frações hexano e clorofórmio dos galhos e fração clorofórmio das folhas.

TABELA 12 – TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS DE *S. tetrandra*

AMOSTRAS	FENÓLICOS TOTAIS (μg EAG/mg)	\pm DESVIO PADRÃO
EBF	836,11	\pm 17,25
FHF	1077,77	\pm 60,57
FCF	1144,44	\pm 54,54
FAF	284,72	\pm 54,88
FRF	498,61	\pm 31,68
EBG	1445,83	\pm 6,36
FHG	1194,44	\pm 36,80
FCG	1172,22	\pm 34,28
FAG	644,44	\pm 42,04
FRG	408,33	\pm 21,65

FONTE: A autora, 2023.

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; μg EAG/mg – micrograma equivalente de ácido gálico por miligrama.

O estudo com a espécie *Symplocos paniculata* mostrou conteúdo relevante de fenólicos totais no fruto da espécie, sugerindo que a fruta tem potencial de recursos naturais antioxidantes e que poderia ser utilizada em alimentos funcionais ou medicamentos para a prevenção e tratamento de doenças causadas por estresse oxidativo (FU, et al., 2010). Assim pode ser sugerido a coleta do fruto para futuras análises e pesquisas dos compostos fenólicos na espécie *S. tetrandra*.

4.3.6 Flavonoides totais

Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por C₆-C₃-C₆, são derivados da benzo- γ -pirona constituída por anéis fenólicos e piranos. O grupo é constituído pelas antocianidinas, flavonas, flavonóis, auronas, isoflavonas, a diferença entre os compostos está no número de substituições e grupamentos químicos ligados a molécula, como hidroxilas, metilas, sulfas e glicosídeos, apresentam grande variedade estrutural e geralmente estão relacionados a atividade antioxidante e antimicrobiana (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBYLIA, 2002; SHAHIDI et al., 1992; SOARES, 2002)

Os resultados do ensaio de flavonoides totais estão representados na tabela 13, expressos em micrograma equivalente de quercetina por miligrama de amostra ($\mu\text{g EQ/mg}$). As amostras provenientes dos galhos e folhas de *S. tetrandra*, apresentaram valores parecidos, sendo que o maior valor do teor de flavonoides totais foi observado na fração remanescente dos galhos (72,58 $\mu\text{g EQ/mg}$).

TABELA 13 – TEOR DE FLAVONOIDEOS TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS E GALHOS DE *S. tetrandra*

AMOSTRAS	FLAVONOIDEOS TOTAIS ($\mu\text{g EQ/mg}$)	
		\pm DESVIO PADRÃO
EBF	61,06	$\pm 0,19$
FHF	60,37	$\pm 0,06$
FCF	71,58	$\pm 0,06$
FAF	71,53	$\pm 0,06$
FRF	71,55	$\pm 0,03$
EBG	67,67	$\pm 0,13$
FHG	68,96	$\pm 0,37$
FCG	71,90	$\pm 0,09$
FAG	67,41	$\pm 0,12$
FRG	72,58	$\pm 0,01$

FONTE: O autor, 2023.

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; $\mu\text{g EQ/mg}$ – micrograma equivalente de quercetina por miligrama.

Os resultados encontrados para flavonoides totais em *S. tetrandra* das folhas e galhos são os primeiros descritos da espécie, incluindo o gênero e família, pois não foi encontrado estudos de investigação do teor de flavonoides totais, até o momento, para comparação.

4.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Radical DPPH

O método de análise indireto utilizando o radical DPPH, se baseia na capacidade antioxidante da amostra de sequestrar o DPPH \bullet do meio, ou seja, de fornecer um átomo de hidrogênio, como doador de prótons, reduzindo o radical

DPPH para hidrazina, composto de cor amarelo pálido. A avaliação é feita por espectroscopia, que ao capturar o DPPH● evitando a oxidação, mede a diminuição da absorbância pela redução de DPPH● restante no sistema, sendo proporcional a capacidade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SANCHEZ-MORENO, 2002).

O ensaio do radical DPPH é de fácil reprodutibilidade, preciso e os resultados podem ser comparados a outros métodos de capturas de radicas livres. Já foi aplicado em estudos para avaliar a capacidade antioxidante de taninos hidrolisados, compostos fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, hidroxí-flavonas, catequinas, resveratrol e polissacarídeos (SANCHEZ-MORENO, 2002).

Os resultados do ensaio da capacidade antioxidante do radical DPPH estão representados na tabela 14, expressos em micrograma equivalente de trolox por miligrama de amostra (μg EQT/mg). As amostras provenientes dos galhos e folhas de *S. tetrandra*, apresentaram valores semelhantes entre os extratos bruto e as frações, com destaque a amostra da fração clorofórmio dos galhos (7720,227 μg EQT/mg), que demonstrou visualmente a mudança de coloração para amarelo pálido na placa (FIGURA 11), seguida da fração clorofórmio das folhas (7373,900 μg EQT/mg).

TABELA 14 – RESULTADOS DA CAPACIDADE DE CAPTURA DO RADICAL DPPH DAS AMOSTRAS DE *S. tetrandra*

AMOSTRAS	RADICAL DPPH (μg EQT/mg)
EBF	5144,304
FHF	4339,297
FCF	7373,900
FAF	4391,306
FRF	6722,659
EBG	5697,406
FHG	4458,230
FCG	7720,227
FAG	4203,404
FRG	7076,397

FONTE: A autora, 2023.

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; μg EQT/mg – micrograma equivalente de trolox por miligrama de amostra.

Na pesquisa realizada por Sunil et al. (2012) com o extrato metanólico das cascas de *S. cochinchinensis* foi demonstrado a capacidade redutora com o aumento da quantidade de amostra inserida no meio do radical DPPH. No ensaio, para verificar o potencial antioxidante do extrato, foi percebido significativa atividade dose-dependente, com inibição de 50% (IC₅₀) na concentração de 820,34 µg/mg.

O extrato metanólico da espécie *S. paniculata* foi avaliado primariamente quanto ao potencial de sequestro de radicais livres estáveis pelo radical DPPH, como resultado, o extrato exibiu a atividade sequestradora do DPPH• nos critérios de inibição IC₅₀ de 23,0 mg/g (BADONI et al., 2010).

A espécie *S. tetrandra* ainda não possui estudos quanto as propriedades antioxidantes de captura do radical DPPH, sendo o primeiro estudo realizado para investigação das amostras de folhas e galhos da espécie, levando em conta a equivalência de trolox e porcentagem, ainda é possível verificar o potencial antioxidante do fruto e flores, além de empregar outros métodos de capacidade redutora de radicais como ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e FRAP (poder antioxidante de redução de íons ferro III para II).

4.4.2 Redução do fosfomolibdênio

O ensaio de redução do fosfomolibdênio se baseia na conversão por um agente redutor do molibdênio (VI) para molibdênio (V), na presença de compostos antioxidantes presentes na amostra, que leva a formação de um complexo de fosfato molibdênio (V) de cor verde. Esse complexo é avaliado por espectrofotometria no pico ótimo de 695nm em um ambiente com pH ácido. É um método de boa reprodutibilidade, aplicado para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais e vitamina E em grãos e sementes (PRIETO et al., 1999).

A atividade antioxidante das amostras dos extratos bruto e frações orgânicas das folhas e galhos de *S. tetrandra*, foram calculadas em relação ao controle ácido ascórbico, que foi considerado pelos cálculos, como 100% de atividade antioxidante seguindo o modelo fosfato molibdênio.

O ácido ascórbico, utilizado como padrão, também conhecido como vitamina C, é um antioxidante de alto potencial, pois impede a perda de elétrons das amostras, devido a fácil oxidação, por apresentar hidroxilas ligadas a dupla ligação carbono-

carbono (C=C) e um grupo redutor na sua estrutura, a redutona, do grupo químico das cetonas (BOBBIO; BOBBIO, 1995). É usado como ingrediente e aditivo na indústria alimentícia devido a suas propriedades antioxidante e redutora (FENNEMA et al., 2010).

Os resultados estão apresentados na tabela 15 em porcentagem de equivalente de ácido ascórbico (% EQAA):

TABELA 15 – RESULTADOS DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS DE *S. tetrandra*

AMOSTRAS	%EQAA	± DP
EBF	7,22	0,33
FHF	9,17	1,56
FCF	8,10	6,48
FAF	3,82	5,78
FRF	9,35	1,81
EBG	8,23	0,58
FHG	8,56	2,07
FCG	14,95	1,01
FAG	5,89	7,32
FRG	12,20	0,35

FONTE: A autora, 2023.

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; %EQAA – porcentagem equivalente de ácido ascórbico; DP – Desvio padrão.

As amostras provenientes dos galhos e folhas de *S. tetrandra*, apresentaram valores semelhantes entre os extratos bruto e as frações, com destaque a amostra da fração clorofórmio dos galhos (14,95 %EQAA), que demonstrou visualmente a coloração verde azulada mais acentuada na microplaca (FIGURA 12), seguida da fração remanescente dos galhos (12,20 %EQAA).

Não foram encontrados estudos de investigação do potencial antioxidante utilizando o método de redução fosfomolibdênio para comparação, até o momento, assim os resultados encontrados para as folhas e galhos de *S. tetrandra* são os

primeiros descritos da espécie, incluindo o gênero e família, sendo um resultado inédito, assim como o teor de flavonoides.

Com os resultados das investigações de capacidade antioxidante foi possível notar que a amostra proveniente da fração clorofórmio dos galhos de *S. tetrandra* é a mais promissora quanto ao potencial antioxidante, por apresentar valores elevados nos ensaios de fosfomolibdênio, radical DPPH, fenólicos e flavonoides totais, quando comparado as outras amostras. Ainda é possível realizar outros métodos de investigação antioxidante, realizar coluna cromatográfica na tentativa de isolar e identificar o possível composto responsável pela atividade, assim como pesquisar outras partes da planta como o fruto e flores.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1 Teste de letalidade frente *Artemia salina* Leach

O ensaio frente aos microcrustáceos, denominados *Artemia salina* Leach, permite avaliar de forma preliminar a toxicidade de extratos vegetais e compostos bioativos, pela concentração letal (CL₅₀) em µg/mL nas pesquisas com produtos naturais (MEYER et al., 1982).

O bioensaio é aplicado na detecção da toxicidade de compostos bioativos, análise de resíduos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, níveis de poluentes e toxinas presentes no ambiente marinho. Além disso, é um método de fácil execução, rápido e de baixo custo (MEYER et al., 1982).

Os resultados do bioensaio de toxicidade frente *A. salina* estão demonstrados na tabela 16.

TABELA 16 – RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE PRELIMINAR FRENTE *Artemia salina* DAS AMOSTRAS DE *S. tetrandra*

Amostra	Mortalidade / Concentração (µg/mL)							
	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	750 µg/mL	1000 µg/mL	CL ₅₀ µg/mL	IC 95% µg/mL
EBF	0	1	0	1	7	17	>1000	-
FHF	0	0	0	0	1	2	>1000	-
FCF	0	0	0	1	3	3	>1000	-
FAF	0	0	1	1	3	6	>1000	-
FRF	0	0	1	3	4	5	>1000	-
EBG	1	2	2	3	12	13	>1000	-
FHG	1	5	5	7	10	13	>1000	-
FCG	1	5	5	6	11	14	>1000	-
FAG	0	0	1	1	2	2	>1000	-
FRG	0	0	0	2	2	3	>1000	-
Branco	0	0	0	0	0	0	>1000	-
SQ	5	7	19	28	30	34	451,168	351,043 – 603,206

FONTE: A autora, 2023.

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; SQ – Sulfato de quinidina; CL₅₀ – Concentração letal em 50; IC – Intervalo de confiança.

Segundo Meyer et al. (1982), o resultado da concentração letal (CL₅₀) com valor menor que 1000 µg/mL frente *A. salina* representa toxicidade da amostra analisada. Na pesquisa dos extratos e frações de *S. tetrandra*, os resultados foram superiores a 1000 µg/mL, assim de acordo com o método não são consideradas tóxicas.

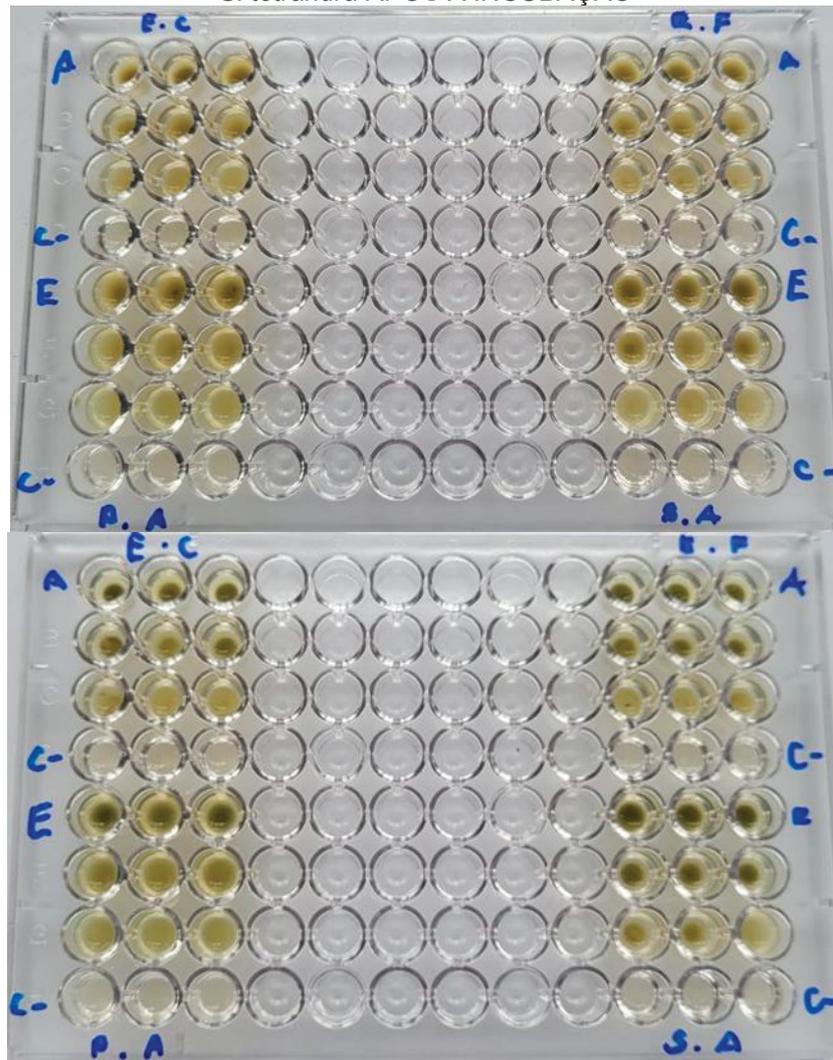
A baixa toxicidade da espécie, indicada no teste preliminar, mostra indícios que o uso da planta não oferece perigo ao meio ambiente, podendo ser empregada para pesquisas na área de agricultura e biotecnologia, sendo indicado realizar mais estudos de toxicidade da espécie.

4.5.2 Atividade antimicrobiana

Após o período de incubação das placas foram observadas a olho nu, foi notado a presença de turbidez (FIGURA 30) nos poços das placas, indicando que

houve o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*, assim a análise da atividade antimicrobiana preliminar dos extratos brutos de folhas e galhos de *S. tetrandra*, não demonstraram uma atividade de inibição do crescimento microbiano.

FIGURA 30 - MICROPLACAS DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM AMOSTRAS DE *S. tetrandra* APÓS A INCUBAÇÃO



FONTE: A autora, 2023.

LEGENDA: Presença de turbidez nos poços das amostras. Amostras: F – Folhas; G – Galhos; E.C – *E. coli*; E.F – *E. faecalis*; P.A – *P. aeruginosa*; S.A – *S. aureus*; C – Controle.

O ensaio preliminar da atividade antimicrobiana deve ser realizado com diferentes tipos de bactérias, com o intuito que sejam testadas pelas suas diferentes naturezas morfológicas e bioquímicas, para verificar os grupos que podem ser sensíveis ou não a um agente antimicrobiano e propor um possível mecanismo de ação. É importante que os microrganismos testados possuam bactérias de diferentes classificações como gram positivas e gram negativas, aeróbicos e

anaeróbicos, além de diferentes morfologias como cocos e bacilos, e fungos leveduriformes e filamentosos (SUREK, 2021).

Apesar do resultado negativo para *S. tetrandra* no ensaio da atividade antimicrobiana, vale ressaltar que outras espécies apresentaram a atividade, como a *S. cochinchinensis* descrita por Khan et al. (2001) mostrou que as frações metanólica das folhas, raízes e galhos apresentaram atividade de inibição para uma série de microrganismos testados como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, pelo método disco difusão, em que verificou-se a zona de inibição em milímetros.

Ainda é relatado atividade antibacteriana da espécie *S. racemosa* das amostras do extrato de éter de petróleo e etanólica contra bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e gram negativas como a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, utilizando o método de difusão em poço de ágar, com o padrão ciprofloxacino (NIYATI, et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

As folhas e galhos da espécie *Symplocos tetrandra* Mart. coletadas no Capão do CIFLOMA, no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná passaram por processo de secagem, estabilização, moagem, extração e particionamento, fornecendo assim amostras para o desenvolvimento da pesquisa fitoquímica e das atividades microbiológicas, toxicidade e antioxidante da espécie. Além da planta fresca, separada e usada no estudo morfoanatômico e análises físico-químicas. Desse modo, a pesquisa resultou em dados que contribuem para o conhecimento e desenvolvimento científico, ajudando a caracterizar a espécie contida na biodiversidade brasileira e incentivar futuras pesquisas na área.

Os resultados do estudo da morfoanatomia e histoquímica trouxeram novidades ao identificar caracteres morfoanatômicos como estômatos paracítico, osteoesclereídes, drusas e cristais prismáticos, que confirmam a classificação taxonômica e permitem diferenciar *S. tetrandra*, das demais espécies que compõem o gênero *Symplocos*. Além disso, o conhecimento das estruturas morfológicas e anatômicas fornecem base para futuros estudos fitoquímicos, biológicos e farmacológicos relacionados à espécie, que quando comparada a outras famílias e gêneros, possui poucos estudos.

O estudo fitoquímico levando em consideração o perfil fitoquímico e a cromatografia em camada delgada, forneceram dados de presença de metabólitos como terpenos, esteroides, triterpenos, flavonoides, saponinas e aminogrupos, sendo um dos primeiros estudos realizado no gênero de uma espécie de *Symplocos* em território brasileiro, para comparação foram encontrados um estudo antigo brasileiro e a maior parte de estudos do gênero no continente asiático.

Em relação aos estudos da capacidade antioxidante da espécie, mostrou que existe um potencial antioxidante na espécie, com destaque da fração clorofórmio dos galhos de *S. tetrandra* que apresentou valores mais expressivos na maior parte dos testes realizados, podendo ser investigado de forma mais criteriosa essa amostra.

Sobre os ensaios biológicos, em relação a toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* os valores baixos mostram indícios que o uso da planta não oferece perigo ao meio ambiente, sendo indicada para pesquisas na agricultura e

biotecnologia. Com relação a atividade antimicrobiana as amostras avaliadas de *S. tetrandra*, não demonstraram uma atividade de inibição do crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, devido a observação da presença de turbidez no meio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Symplocos tetrandra* Mart. apresenta potencial para futuras pesquisas tanto das partes estudadas folhas e galhos, quanto de outras partes, como o fruto, flores e raízes, ainda é possível realizar outros métodos de investigação de ensaios antioxidantes, biológicos e realizar o isolamento e identificação de compostos químicos da planta que possam apresentar atividades biológicas ou farmacológicas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V. de. **Morfologia da Folha de plantas com sementes**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2018. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/biblioteca/pdf/morfologia_folha.pdf>.
- ANDRES, S.; PEVNY, S.; ZIEGENHAGEN, R.; BAKHIYA, N.; SCHÄFER, B.; HIRSCH-ERNST, K. I.; LAMPEN, A. Aspectos de segurança do uso de quercetina como suplemento dietético. **Nutrição Molecular & Pesquisa Alimentar**. Vol. 62 (1), 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201700447>>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- ARANHA FILHO, J. L. M. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Symplocaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, 26(1): p. 69-77. 2008. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bolbot/article/view/11762/13538>>. Acesso em: 07 set. 2022.
- ARANHA FILHO, J. L. M. **Revisão Taxonômica das espécies sul-americanas de Symplocos Jacq. seção Hopea (L.) A. DC. (Symplocaceae)**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas, SP. 2011. Disponível em: <http://arquivos.proderj.rj.gov.br/inea_imagens/downloads/pesquisas/PE_Tres_Picos/Aranhafilho_2011.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2022.
- ARAÚJO, A. A. de S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S; MATOS, J. do R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, Vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.
- BADONI, R.; SEMWAL, D. K.; KOTHIYAL, S. K.; RAWAT, U. Chemical constituents and biological applications of the genus Symplocos. **Journal of Asian Natural Products Research**. Vol. 12, ed. 12, pg: 1069 - 1080. Dec. 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10286020.2010.532789?scroll=top&nedAccess=true>>. Acesso em: 25 out. 2022.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K.; Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis** v. 6 p. 71–79, 2016.
- BANERJEE, A; KUNWAR, A.; MISCHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172 n. 2, p. 134-139, 2008.
- BANERJI, M. L. Petiole Anatomy and Minor Veins as Aids for the Identification of *Symplocos* of Nepal. **Nelumbo**, v. 16, n. 1-4, p. 89-100, 1974. Disponível em: <<https://nelumbo-bsi.org/index.php/nlumbo/article/view/75032>>. Acesso em: 13 ago. 2023.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State University: Ames, 1976.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução a química de alimentos**, 2.ed. São Paulo: Varela, 223 p., 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. v. 28, n. 1, p. 25 - 30, 1995.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz. 6. ed., v. 1. Brasília: Anvisa, 2019.

BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, p. 217-225, 2008.

CARVALHO, J. L. de S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. de F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae para sistema modificado por Soxhlet. **Química Nova**, v. 32, p. 1031-1035, 2009.

CHAMBERLAIN, C. J. **Methods in plant histology**. 5ª ed. Chicago, The University of Chicago Press, 416 p. 1932.

COCKERILL, F. R.; WIKLER, M. A.; ALDER, J.; DUDLEY, G. M.; ELIOPOULOS, G. M.; FERRARO, M. J.; HARDY, D. J.; HECHT, D. W.; HINDLER, J. A.; PATEL, J. B.; POWELL, M.; SWENSON, J. M.; THOMSON, R. B.; TRACZEWSKI, M. M.; TURNIDGE, J. D.; WEINSTEIN, M. P.; ZIMMER, B. L. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. 9. ed, vol. 32, 2012. Disponível em: <<https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282272661315584>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**. New York, v.854, p.435-442, 1998.

DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. A.; REBOUÇAS SILVA, J.; da Silva, D. F.; da Rocha, J. L. C.; Brandão, H. N.; Borges, V. M.; Umsza-Guez, M. A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLOS ONE**, v.13, n.12, 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0207676>>. Acesso em: 24 nov. 2023.

DEVMURARI, V.P. Avaliação Antibacteriana e Screening Fitoquímico de *Symplocos racemosa* Roxb. **Jornal Internacional de Pesquisa PharmTech**. Índia, Vol. 2, n. 2, pg: 1359-1363, abr/jun. 2010. Disponível: <[https://sphinxesai.com/s_v2_n2/PT_V.2No.2/phamtech_vol2no.2_pdf/PT=59%20\(1359-1363\).pdf](https://sphinxesai.com/s_v2_n2/PT_V.2No.2/phamtech_vol2no.2_pdf/PT=59%20(1359-1363).pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2023.

FENNEMA, O. R.; DEMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fennema. Editora Artmed, ed. 4, 2010.

FERREIRA, A. L de S.; PASA, M. C.; NUNEZ, C. V. A etnobotânica e o uso de plantas medicinais na Comunidade Barreirinho, Santo Antônio de Leverger, Mato Grosso, Brasil. **INTERAÇÕES**, Campo Grande, MS, v. 21, n. 4, p. 817-830, out./dez. 2020. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/inter/a/V9CqScBCstfmGdNTZczSLWq/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 24 ago. 2022.

FINNEY, D. J. **A statistical treatment of the sigmoid response curve**. Probit analysis. Cambridge University Press, London, v. 633, 1971.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Symplocos>>. Acesso em: 09 jul. 2023.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.

Fu, L.; Xu, B. T.; Xu, X. R.; Qin, X. S.; Gan, R. Y.; Li, H. B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. **Molecules**. Basel, Switzerland. v.15, n.12, p. 8602-8617, 2010. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/15/12/8602>>. Acesso em: 25 nov. 2023.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286302002085?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 nov. 2023.

ISHIDA, J.; WANG, H. K.; OYAMA, M.; COSENTINO, M. L.; HU, C. Q.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents 46. Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. **Journal of Natural Products**. Vol. 64, ed. 7, pg: 958 - 960. Jul. 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np0101189>>. Acesso em: 27 out. 2022.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **BOTÂNICA: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo - SP, Companhia editora nacional, 11ª ed., p. 249-250, 1993.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchensis*. **Fitoterapia**. Vol. 72, ed. 7, pg: 825 - 828. Nov, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X01003148?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 out. 2022.

KIM, E.D.; EL-RASHIDY, R.; MCVARY, K.T. Gel tópico de papaverina para tratamento da disfunção erétil. **O Jornal de Urologia**. Vol. 153, pg: 361-365, 1995. Disponível em: <<https://www.auajournals.org/doi/10.1097/00005392-199502000-00019>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

KUSUMA, G.; KUMAR, B. V.; CHITRA, S. *Symplocos paniculata* Miq. – Uma revisão. **Revista Internacional de pesquisas atuais em biociência e biologia vegetal**. Vol. 5. n. 3 pg: 7-20, 2018. Disponível em: <<http://ijcrbp.com/5-3-2018/G.%20Kusuma,%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2023.

KURTZ, B. C.; ARAÚJO, D. S. D. de. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de um trecho de Mata Atlântica na Estação Ecológica Estadual do Paraíso, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 51(78/115): 69-112. 2000. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rod/a/HZMzfc5WFt7VjSW9tQq5Qf/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 23 set. 2022.

LEE, T. K.; POON, R. T.; WO, J. Y.; MA, S.; GUAN, X. Y.; MYERS, J. N.; ALTEVOGT, P.; YUEN A. P. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. **Cancer Research**, Vol. 67(18), pg: 8800-8809, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17875721/>>. Acesso em: 14 nov. 2023.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALEZ-GOMES, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternative of Laboratory Animals**. v. 20, p. 297-301, 1992.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, Vol. 25, Nº 3, pg: 429 - 438, 2002. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/tgsYhzfzBs3pDLQ5MtTnw9c/>>. Acesso em: 21 out. 2022.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 193-196, 2010.

MENSOR Et Alii. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytother. Res.** 15, 127–130 (2001).

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica**. Curso de farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity**. Songklanakarin J. Sci. Technol. Vol. 26, nº 2, Mar-Apr. 2004.

NIYATI, A.; SANJEEV, A.; UNNATI, S.; RIPAL, S.; LAL, H. A comprehensive analysis on *Symplocos racemosa* Roxb.: Traditional uses, botany, phytochemistry and pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 181, pg: 236 -

251. Apr. 2016. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874116300423>>.
Acesso em: 27 out. 2022.

Plants of the World Online - POWO. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <<http://www.plantsoftheworldonline.org/>>. Acesso em: 22 jul. 2023.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PUBCHEM. Lupeol. Biblioteca Nacional de Medicina (EUA), Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, 2004. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lupeol>>. Acesso em: 14 nov. 2023.

PUBCHEM. Papaverina. Biblioteca Nacional de Medicina (EUA), Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, 2004. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4680>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

PUBCHEM. Quercetina. Biblioteca Nacional de Medicina (EUA), Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, 2004. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>>. Acesso em: 14 nov. 2023.

REBOUÇAS, N. C.; LIMA, I. G.; CORDEIRO, L. S. **Flora do Ceará, Brasil: Symplocaceae**. Rodriguésia 71: e00522018, 2020. Disponível em:
<<https://www.scielo.br/j/rod/a/Zh3zzXDnfnChdnhw7GTyd8x/?format=pdf&lang=pt>>.
Acesso em: 27 ago. 2022.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les Composés Phénoliques des Végétaux**. Paris: Dunod, v.1, p. 254, 1968.

RODRIGUES, A. C.; AMANO, E.; ALMEIDA, S. L. de. **Anatomia Vegetal**. Florianópolis: Biologia/EaD/UFSC, 2015. 152 p. Disponível em:
<<https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Anatomia-Vegetal.pdf>>.

ROESER, K. R. **Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur**. Mikrokosmos. v. 61, p. 33-36, 1972.

ROMÃO, G. O.; CABRAL, A.; ARANHA FILHO, J. L. M.; SANTOS, F. B. D. **Symplocaceae em Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14919>>. Acesso em: 24 set. 2022.

SALGUEIRO, F. B.; LIRA, A. F.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of brazilian honeys. **Química Nova**, v. XY, n.00 p. 1-6, 2014.

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

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2^a ed. Iowa: State College Press, 1951.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/P-Wanasundara-2/publication/21864290_Phenolic_Antioxidants/links/54e624a70cf2bff5a4f3897c/Phenolic-Antioxidants.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2023.

SHOSKES, D.; LAPIERRE, C.; CRUZ-CORREA, M.; MURUVE, N.; ROSARIO, R.; FROMKIN, B.; BRAUN, M.; COPLEY, J. Efeitos benéficos dos bioflavonóides curcumina e quercetina na função precoce do transplante renal cadavérico: um ensaio randomizado controlado por placebo. **Transplantação**. Vol. 80, pg: 1556-1559, 2005. Disponível em: <https://journals.lww.com/transplantjournal/fulltext/2005/12150/beneficial_effects_of_the_bioflavonoids_curcumin.8.aspx>. Acesso em: 14 nov. 2023.

SILVA, I. L da. **Contribuição das características estruturais e bioquímicas na resistência ao alumínio, em duas espécies do cerrado**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2019. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/29469/1/texto%20completo.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2023.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965. Disponível em: <<https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>>. Acesso em: 21 nov. 2023.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 15, n.1, p. 71–81, 2002. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rn/a/mZxTyVMspZY9WJgC7SSFnbh/?lang=pt>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

STAHL, E. **Apparatus and general techniques**. In: Stahl, E., Ed., TLC in thin layer chromatography: A Laboratory Handbook, 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1969.

STEVENS, P. F. 2001 onwards. Angiosperm phylogeny website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 26 out. 2022.

SUNIL, C.; AGASTIAN, P.; KUMARAPPAN, C. IGNACIMUTHU, S. In vitro antioxidant, antidiabetic and antilipidemic activities of *Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore bark. **Food and Chemical Toxicology**. V.50, n.5, p. 0–1553, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691512000567?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 dez. 2023

SUREK, M.; FACHI, M. M.; COBRE, A. de F.; de Oliveira, F. F.; PONTAROLO, R.; CRISMA, A. R.; de SOUZA, W. M.; FELIPE, K. B. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113662, 2021.

Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874120335509>>. Acesso em: 12 set. 2023.

SUREK, M.; COBRE, A. de F.; FACHI, M. M.; SANTOS, T. G.; PONTAROLO, R.; CRISMA, A. R.; FELIPE, K. B.; SOUZA, W. M. Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis. **LWT**, v.161, p. 113370, 2022. Disponível em:

113370, 2022. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382200305X?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 nov. 2023.

TANG, M.; SHEN, D.; HU, Y.; GAO, S. & YU, S. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Symplocos chinensis*. **Journal of Natural Products**. Vol. 67, № 12: pg 1969 - 1974. Dez. 2004. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np040013g>>. Acesso em: 20 out. 2022.

TSCHESCHE, R.; BRAUN, T. M. & SASSEN, W. Symplocoside, a flavanol glycoside from *Symplocos uniflora*. **Phytochemistry**. Vol. 19, ed. 8, pg: 1825 - 1829. 1980.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200838212?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 out. 2022.

WFO PLANT LIST. Symplocaceae. Junho, 2023. Publicado na Internet. Disponível em: <<https://wfoplantlist.org/plant-list/taxon/wfo-7000000593-2022-12>>. Acesso em: 20 set. 2023.

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE USO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A0A1FD4

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A0A1FD4**
 Usuário: **Universidade Federal do Paraná**
 CPF/CNPJ: **75.095.679/0001-49**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Zanthoxylum kleinii
Cupania vernalis
Symplocos tetrandra

Título da Atividade: **Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico de espécies vegetais**

Equipe

Josiane de Fatima Gaspari Dias	Universidade Federal do Paraná
Karine Amorim Fladzinski	UFPR
KALIANE ASSUNÇÃO FARIA DA SILVA	UFPR
JULIANA DE FÁTIMA GARCIA	UFPR
Obdulio Gomes Miguel	UFPR
Marilis Dallarmi Miguel	UFPR
Deise Prehs Montrucchio	UFPR

Data do Cadastro: **05/09/2022 12:18:11**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12:18 de 05/09/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - SISGEN

ANEXO 2 – FOTO EXSICATA - REGISTRO EFC 12751

Symplocos Tetrandra Mart.