



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA**

**AIANE NASCIMENTO SANTANA**

***Libidibia ferrea* Mart: INFLUÊNCIA SAZONAL NO TEOR DE FENÓLICOS DO CAULE DE ESPÉCIMENS DA CAATINGA E MATA ATLÂNTICA, BIOFILMES DO FRUTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE SEUS EXTRATOS**

**SALVADOR- BAHIA**

**2020**



**AIANE NASCIMENTO SANTANA**

***Libidibia ferrea* Mart: INFLUÊNCIA SAZONAL NO TEOR DE FENÓLICOS DO CAULE DE ESPÉCIMENS DA CAATINGA E MATA ATLÂNTICA, BIOFILMES DO FRUTO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE SEUS EXTRATOS**

**Dissertação apresentada à Universidade do Estado da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**Orientadora: Lourdes Cardoso de Souza Neta**

**SALVADOR-BAHIA**

**2020**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, princípio, meio e fim de tudo, pela graça concedida para fazer e concluir o mestrado;

À minha orientadora Lourdes Cardoso de Souza Neta pela orientação, oportunidade, paciência e carinho. Por tornar esse processo leve, por transpor os muros acadêmicos e por nos ensinar tanto com sua humildade, docilidade e competência;

Aos meus pais (Zenildes e Melchiades), meus irmãos (Sheila, Lucas e Mateus), meus sobrinhos (Victor e Laura) pelo incentivo, pelo suporte, amor e força dedicados a mim, necessários durante todo o processo;

A minha família Obra Lumen;

A Paulo, por ter me acompanhado nessa jornada, por dividir as dores e alegrias desse período, me apoiando e incentivando com muito amor e carinho;

Ao meu grupo de pesquisa: Rebeca, Rodrigo, Andreza, Ana Luísa e Júlia pelo apoio, parceria, pelo auxílio nos experimentos e pelos momentos de descontração que tivemos juntos;

Aos meus amigos que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação;

Ao professor Dr Madson Pereira de Gódoi pela contribuição nos ensaios antioxidantes, na quantificação de fenólicos, flavonoides e taninos; e por fazer isto com muita solicitude e paciência.

A Universidade do Estado da Bahia pela infraestrutura para a realização do trabalho;

A Fundação de Amparo ao Pesquisador Baiano (FAPESB) pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada (PGQA) pelo suporte e apoio financeiro;

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

Aos funcionários do PGQA: Angela, Pedro e Edson pela disponibilidade e empenho ajudar;

A estudante de iniciação científica Iasmin Almeida Alvarenga, doutorando Heiter Boness, aos professores doutores Elisângela Fabiana Boffo e Paulo Roberto Ribeiro de Jesus pela realização dos experimentos e processamento dos dados de RMN feitos no Laboratório Vianco de Ressonância Magnética (LABAREM) – UFBA, necessários para a quantificação do teor de ácido elágico e análise quimiométrica dos extratos;

Ao Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, professor Dr Florisvaldo da Silva Ramos e professor Dr Ramon dos Santos El-Bachá, pelos testes citotóxicos in vitro contra células tumorais C6 de gliomas.

A mestranda Vívian Oliveira Souza e a professora Dra. Cristiane Flora Villarreal pelo ensaio antidiabético in vivo feito Laboratório de Farmocologia e Terapêutica Experimental – LAFTE da UFBA;

A mestre Sandra Aparecida Alexandre e ao professor Dr. Rodrigo Lassarote Lavall pela realização dos biofilmes à base de quitosana realizados no Laboratório 117 do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG;

**“Deus não poderia inspirar em mim desejos irrealizáveis”. (Santa Teresinha do Menino Jesus)**

## RESUMO

*Libidibia ferrea* Mart, espécie pertencente ao gênero *Caesalpinia* (subfamília: Caesalpinioideae, Fabaceae), é largamente empregada na medicina tradicional, devido às suas propriedades terapêuticas, onde é popularmente conhecida como ‘pau ferro’ ou ‘jucá’. O estudo do potencial biológico e da influência da sazonalidade em extratos do caule de *L. ferrea*, bem como a produção de biofilmes de quitosana com partes do fruto desta espécie foram distribuídos em três capítulos denominados: 1. Uma revisão de literatura sobre a fitoquímica, atividades biológicas e aplicações terapêuticas; 2. *Libidibia ferrea* Mart: estudo sazonal e das atividades biológicas de extratos alcoólicos do caule de espécimens da Caatinga e Mata Atlântica e sua análise multivariada; 3. Produção de filmes de quitosana incorporados com extrato e pó do fruto *L. ferrea* e suas propriedades antimicrobianas.

**Palavras – chaves:** Sazonalidade. Citotoxicidade. Antifúngico. Antibacteriano. *Libidibia ferrea*

## ABSTRACT

*Libidibia ferrea* Mart is a plant species of the Caesalpinia genus (subfamily: Caesalpinioideae, Fabaceae) which is popularly known as ‘pau ferro’ or ‘júcá’. This plant is common in Brazil, occurring mainly in the Cerrado, in addition to the Caatinga and Atlantic forest. *L. ferrea* is widely known for its therapeutic properties in traditional medicine. This study reports an analysis about *L. ferrea* divided into three chapters: 1. A review of the literature on phytochemistry, biological activities and therapeutic applications; 2. Effects of seasonal variation on the total content of polyphenols, total flavonoids, tannins, in vitro antioxidant activity, multivariate and cytotoxic analysis in C6 cell line of rats glioma from the ethanolic extracts of the *L. ferrea* stem collected in Caatinga and Atlantic forest during the four seasons: winter, spring, summer and autumn, as well as the in vivo antiabetic properties of the extracts; 3. Production of chitosan films incorporated with *L. ferrea* fruit extract and powder and its antimicrobial properties.

**Key-words:** Seasonality. Cytotoxicity. Antifungal. Anti-bacterial. *Libidibia ferrea*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	iv
Capítulo 1: Fitoquímica, atividades biológicas e aplicações terapêuticas de <i>Libidibia ferrea</i> Mart.....	1
1.0 Resumo.....	1
1.1 Introdução .....	1
1.2. Material e método.....	3
1.3 Estudos farmacológicos de extratos de <i>L. ferrea</i> .....	3
1.3.1 Atividade antimicrobiana .....	4
1.3.2 Atividade anticâncer.....	5
1.3.3 Atividade citotóxica e larvicida.....	6
1.3.4 Atividade anti-inflamatória e analgésica .....	7
1.3.5 Atividade curativa .....	9
1.3.6 Atividade antioxidante e quantificação de polifenóis .....	10
1.3.7 Outras atividades .....	12
1.4 Constituintes químicos de <i>L. ferrea</i> e suas atividades farmacológicas .....	13
1.4.1 Derivados flavonoides.....	13
1.4.2 Taninos.....	15
1.4.3 Outros .....	15
1.5 Considerações finais.....	17
Capítulo 2: Variações sazonais de compostos fenólicos, atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, citotóxica em células C6 de glioma de rato e antidiabética <i>in vivo</i> de <i>Libidibia ferrea</i> .....	19
2.0 Resumo.....	19
2.1 Introdução .....	20
2.2 Material e métodos.....	23
2.2.1 Reagentes .....	23
2.2.2 Coleta da planta.....	23
2.2.3 Preparação dos extratos .....	24
2.3 Determinação de fenólicos totais .....	26
2.4 Determinação do conteúdo de flavonoides .....	26
2.5 Quantificação de Taninos.....	27



2.6 Atividade antioxidante .....	27
2.6.1. Ensaio DPPH.....	27
2.6.2 Ensaio ABTS.....	28
2.7 Análise multivariada por RMN de <sup>1</sup> H.....	28
2.8 Atividades antibacteriana e antifúngica .....	29
2.8.1. Microrganismos.....	29
2.8.2 Ensaio de microdiluição em caldo.....	29
2.8.3 Determinação da concentração microbicida.....	30
2.9 Citotoxicidade em células de C6 glioma.....	30
2.10 Estudo <i>in vivo</i> do potencial antidiabético dos extratos CCV e CMV e ácido elágico.....	31
2.10.1 Animais .....	31
2.10.2 Modelo de neuropatia diabética .....	32
2.10.3 Delineamento e tratamentos .....	32
2.10.4 Avaliação comportamental – Teste de Von Frey .....	33
2.10.5 PCR em Tempo Real.....	33
2.10.6 Parâmetros bioquímicos .....	34
2.11 Análise Estatística .....	34
2.12 Resultados .....	34
2.12.1 Teor total de fenóis.....	36
2.12.2 Conteúdo total de flavonoides.....	36
2.12.3 Teor de Taninos.....	37
2.12.4 Atividade antioxidante .....	37
2.12.5 Análise multivariada .....	37
2.12.6 Atividade antimicrobiana .....	39
2.12.7. Citotoxicidade em células de C6 glioma.....	42
2.12.8 Atividade antidiabética.....	43
2.12.8.1 Efeito do tratamento com extratos etanólicos da casca do caule de <i>L. ferrea</i> e do ácido elágico na glicemia em jejum.....	43
2.12.8.2 Efeito do tratamento com o extrato etanólico CMV e do ácido elágico na massa corporal, ingestão de alimentos e água .....	44
2.12.8.3 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico .....	46
2.12.8.4 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real .....	47
2.12.8.5 Parâmetros bioquímicos .....	49
2.13 Discussão.....	50

2.14 Considerações finais.....	60
Capítulo 3: Biofilmes de quitosana com extratos do fruto de <i>Libidibia ferrea</i> e suas propriedades antimicrobianas .....	62
3.0 Resumo.....	62
3.1 Introdução .....	62
3.2 Material e métodos .....	66
3.2.1. Reagentes .....	66
3.2.2. Coleta da planta.....	66
3.2.3. Preparação dos extratos .....	66
3.3 Determinação de fenólicos totais .....	67
3.4 Determinação de flavonoides totais .....	67
3.5 Quantificação de Taninos.....	68
3.6 Atividade antioxidante .....	68
3.6.1 Ensaio DPPH.....	68
3.6.2 Ensaio ABTS.....	69
3.7 Preparo dos biofilmes quitosana-extratos.....	69
3.8 Atividade antimicrobiana dos extratos e biofilmes .....	70
3.8.1 Microrganismos.....	70
3.8.2 Ensaio de microdiluição .....	71
3.8.3 Determinação da concentração bactericida mínima .....	71
3.8.4 Ensaio por difusão em ágar .....	72
3.9 Resultados e Discussão .....	73
3.9.1 Teor de fenólicos, flavonoides e taninos totais e atividade antioxidantes dos extratos do fruto de <i>L. ferrea</i> .....	73
3.9.2 Biofilmes de quitosana com amostras do fruto de <i>L. ferrea</i> .....	75
3.9.2 Atividade antimicrobiana .....	76
3.9.2.2 Atividade antimicrobiana dos filmes à base de quitosana.....	78
3.10 Considerações finais.....	82
4.0 Referências.....	83
5.0 APÊNDICE – Tabela de compostos identificados e isolados, estruturas químicas, atividades farmacológicas e tecidos descritos em estudos fitoquímicos e farmacológicos de <i>L. ferrea</i> .....	94

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição percentual de trabalhos reportados na literatura sobre: órgãos estudados, métodos de extração e solventes empregados nos estudos fitoquímicos e farmacológicos de *L. ferrea*.....4
- Figura 2.** Gráfico de escores (PC1 × PC2) para os espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos extratos (47,5 % de variância).....38
- Figura 3.** Análise de agrupamento hierárquica dos componentes principais representando a relação de similaridade da composição dos extratos. ....39
- Figura 4.** Curva da viabilidade celular da linhagem C6 de glioma de rato após tratamento com extratos do caule de *L. ferrea* da Mata Atlântica, obtidos nas estações do inverno, CMI, (a); primavera, CMP, (b) e verão, CMV, (c).....42
- Figura 5.** Avaliação da glicemia durante o período experimental.....43
- Figura 6.** Avaliação do peso corporal durante o período experimental.....44
- Figura 7.** Consumo de água durante o período de tratamento.....45
- Figura 8.** Consumo de ração durante o período de tratamento.....46
- Figura 9.** Efeito do ácido elágico e CMV sobre o limiar nociceptivo mecânico em camundongos com neuropatia diabética.....47

<b>Figura 10.</b> Efeito do ácido elágico e EECCFMIII sobre o perfil de expressão gênica na medula espinal de camundongos com neuropatia diabética.....	48
<b>Figura 11.</b> Efeito do ácido elágico e CMV sobre o perfil de expressão gênica no nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética.....	49
<b>Figura 12.</b> Gráficos de correlações entre os teores totais de fenólicos e flavonoides (a); fenólicos e taninos (b) e fenólicos e taninos, excluindo o extrato do outono da Caatinga (c).....	53
<b>Figura 13.</b> Correlações entre atividade antioxidante (DPPH) e teores totais de fenólicos (d); atividade antioxidante (DPPH) e teor de taninos (e); atividade antioxidante (DPPH) e teores totais de fenólicos, excluindo os extratos no inverno e outono da Mata Atlântica (f) atividade antioxidante (DPPH) e teor de taninos com exclusão dos extratos no outono, da Caatinga e inverno, da Mata Atlântica (g).....	55
<b>Figura 14.</b> Correlações entre a atividade antioxidante (ABTS) e o teor de fenólico total (h), atividade antioxidante (ABTS) e teor de taninos total (i), atividade antioxidante (ABTS) e fenólico total excluindo os extratos do inverno e primavera da Mata Atlântica (j) atividade antioxidante (ABTS) e teor de taninos total excluindo os extratos do inverno e primavera da Mata Atlântica (k).....	56
<b>Figura 15.</b> Representação da quitina (a), e quitosana (b).....	64
<b>Figura 16.</b> Fotografia dos biofilmes de quitosana 100%; quitosana-pó do fruto (A), quitosana-extrato etanólico do fruto (B), e quitosana-extrato aquoso do fruto (C).....	76
<b>Figura 17.</b> Zona de inibição de crescimento bacteriano de <i>M. luteus</i> dos biofilmes a base de quitosana enriquecido com o extrato aquoso do fruto nas concentrações de 20% em massa do extrato (A) e 50% em massa do extrato (B).....	79
<b>Figura 18.</b> Atividade dos filmes de quitosana – extrato etanólico (EtFr10 – 50%), quitosana – extrato aquoso (AqFr10-50%) e quitosana – pó de fruto (PFr10 – 50%) contra <i>M. luteus</i> (A), <i>S. aureus</i> (B), <i>S. epidermidis</i> (C) e <i>B. subtilis</i> (D).....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Informações sobre as datas da coleta, massa do material seco, rendimento dos extratos da casca do caule de <i>L. ferrea</i> coletados nas quatro estações do ano nos biomas da Caatinga e Mata Atlântica e o comportamento da chuva e da temperatura nos meses de coleta.....	25
<b>Tabela 2:</b> Resultado dos teores de fenólicos, flavonoides e taninos totais e atividade antioxidante dos extratos etanólicos da casca do caule de <i>L. ferrea</i> .....	35
<b>Tabela 3:</b> Atividade antimicrobiana de extratos do caule <i>L. férrea</i> .....	41
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros bioquímicos de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.....	50
<b>Tabela 5:</b> Filmes de quitosana incorporados com amostras de fruto de <i>L. férrea</i> .....	70
<b>Tabela 6:</b> Resultado dos teores de fenólicos, flavonoides e taninos totais e atividade antioxidante do extrato etanólico e aquoso do fruto de <i>L. ferrea</i> .....	73
<b>Tabela 7:</b> Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo de extratos do fruto de <i>L. férrea</i> .....	77
<b>Tabela 8:</b> Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar de quitosana e de seus biofilmes preparados com amostras do fruto de <i>L. ferrea</i> .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CIMs** Concentrações inibitórias mínimas

**ZI** Zona de inibição

**PE** Pirogalol

**TPA** 12-O-tetradecanoilforbol acetato

**NaCl** Cloreto de sódio

**DL<sub>50</sub>** Dose Letal em 50% de uma população

**TNF- $\alpha$**  Fator de necrose tumoral

**IL-1 $\alpha$**  Interleucina 1 alfa

**PGE2** Prostaglandina E2

**NO** Óxido nítrico

**ID<sub>50</sub>** Dose infecciosa em 50% de uma população

**MDA** Malondialdeído

**TLC** Cromatografia em camada fina

**BSA** Albumina de soro bovino

**HPLC** High Performace Liquid Cromatograph (Cromatografia líquida de alta eficiência)

**DPPH** 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**IC<sub>50</sub>** Concentração Inibitória de 50% de uma população

**EAG** Equivalente de ácido gálico

**EC** Equivalente de catequina

**EC<sub>50</sub>** Concentração efetiva que induz efeito em 50% de uma população

**ORAC** Oxygen radical absorbance capacity - capacidade de absorção dos radicais oxigenados

**HDL-C** Lipoproteína de alta densidade

**RMN de <sup>1</sup>H** Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**RMN de <sup>13</sup>C** Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

**HEp-2** Anticorpo antinuclear

**MTT** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**CC<sub>50</sub>** Concentração Citotóxica em 50% de uma população

**FTIR** Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

**PAL** Fenilalanina amônia-ase

**4CL** *p*-coumaroil:CoA ligase

**CHS** Chalcona sintase

**CCI** Extrato etanólico da casca do caule da Caatinga coletado no Inverno

**CCP** Extrato etanólico da casca do caule da Caatinga coletado na Primavera

**CCV** Extrato etanólico da casca do caule da Caatinga coletado no Verão

**CCO** Extrato etanólico da casca do caule da Caatinga coletado no Outono

**CMI** Extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica coletado no Inverno

**CMP** Extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica coletado na Primavera

**CMV** Extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica coletado no Verão

**CMO** Extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica coletado no Outono

**UV/VIS** Ultravioleta visível

**MHz** Mega Hertz

**DMSO-*d*<sub>6</sub>** Dimetilsulfóxido deuterado

**TMSP-*d*<sub>4</sub>** (2,2,3,3-*d*<sub>4</sub>-3-trimetilsililpropionato de sódio)

**IL-1 $\beta$**  Interleucina 1 beta

**Nrf-2** Fator de transcrição

**RNase** Ribonuclease

**RNA** Ácido ribonucleico

**cDNA** DNA complementar

**RNA<sub>m</sub>** RNA mensageiro

**(FIA-ESI-IT-MS/MS<sup>n</sup>)** Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap – Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas acoplada a um íon-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra).

**ED<sub>50</sub>** Dose efetiva em 50% de uma população

**EAFrLF** Extrato Aquoso do Fruto de *Libidibia ferrea*

**EEFrLF** Extrato Etanólico do Fruto de *Libidibia ferrea*

## **Capítulo 1: Fitoquímica, atividades biológicas e aplicações terapêuticas de *Libidibia ferrea* Mart**

### **1.0 Resumo**

O potencial uso na medicina popular de *Libidibia ferrea* estimulou um conjunto diversificado de estudos relacionados às atividades farmacológicas de extratos e substâncias isoladas desta planta. O presente capítulo apresenta uma revisão de literatura sobre a fitoquímica, atividades biológicas e aplicações terapêuticas de *Libidibia ferrea* que foi possível através compilação de trabalhos disponíveis nos bancos de dados eletrônicos. O potencial antiinflamatório e analgésico é a atividade farmacológica mais amplamente estudada de *L. ferrea*, mas outras atividades também são atribuídas, como antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, anticâncer, curativa e antidiabética. Estudos fitoquímicos mostraram que esta espécie possui uma diversidade de compostos químicos que apresentam atividades farmacológicas relevantes. Esta revisão discute 80 compostos isolados e/ou identificados de diferentes tecidos de *L. ferrea*, que incluem flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, ácidos graxos, dentre outros. Algumas substâncias isoladas apresentaram efeito antioxidante e citotóxico, entretanto o estudo ainda é incipiente e uma investigação mais abrangente dessas substâncias se faz necessário.

### **1.1 Introdução**

O emprego de plantas, animais, microorganismos e organismos marinhos no tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade (YUAN, 2016). As substâncias naturais obtidas destas fontes desempenham papel importante no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças humanas (NEWMAN, 2003, 2007, 2012, 2016). Neste intuito, o potencial de descoberta de moléculas e/ou extratos bioativos de espécies vegetais tem sido ampliado, através de estudos fitoquímicos, com abordagem de bioprospecção, dentre outras (ELISABETSKY, 1991; ZANIN *et al.*, 2012; NEWMAN, 2003, 2007, 2012, 2016).

A bioprospecção da família Fabaceae mostrou uma diversidade estrutural de metabólitos secundários distribuídos em seus gêneros (WINK, 2013), com destaque para o *Caesalpinia*, subfamília Caesalpinioideae, o qual é composto de cerca de 150 espécies de árvores e arbustos



perenes e decíduos, distribuídos em países tropicais e subtropicais (DAS *et al.*, 2010; GAGNON *et al.*, 2013). Essas espécies são conhecidas por suas propriedades medicinais e algumas são usadas para o tratamento de disenteria, tuberculose, infecções de pele e inflamação, como *C. sappan* (HWANG, 2018) e tumores, cistos e fibrose cística, como *C. bonduc* (ARIF *et al.*, 2009).

Alguns estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Caesalpinia* foram motivados pela relevância medicinal de suas espécies e proporcionaram o isolamento de compostos com diferentes propriedades biológicas, predominantemente derivados de flavonoides, triterpenoides e diterpenos de cassano. Os derivados de diterpenos de cassano são antioxidantes e antibacterianos (DICKSON, 2007), antitumorais contra diferentes linhas celulares (DENG *et al.*, 2016) e anti-inflamatórios (YODSAOUE *et al.*, 2010). Já os flavonoides apresentam atividades anti-inflamatórias (RAO, 2005) e antimicrobianas (KASPERISKI *et al.*, 2018; SRINIVAS *et al.*, 2003).

*Libidibia ferrea* Mart (*Caesalpinia ferrea*) é uma das espécies de *Caesalpinia* que ainda possui um potencial elevado de ser explorada quanto aos perfis químico e biológico, devido ao seu emprego na medicina tradicional para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios, como hematomas, reumatismo, febre, enterocolite; feridas; contusões; diabetes e diarreia. Sua ocorrência no território brasileiro é principalmente no Cerrado, seguido da Caatinga e Mata Atlântica, das regiões Norte e Nordeste, onde é popularmente denominada de ‘pau-ferro’ ou ‘jucá’ (CARVALHO *et al.*, 1996; LOPES *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2012) (UEDA *et al.*, 2001).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos com extratos, frações e substâncias obtidos de *L. ferrea* comprovaram algumas de suas propriedades medicinais como o efeito analgésico e anti-inflamatório de seus extratos (CARVALHO *et al.*, 1996) e de frações do extrato de fruto, enriquecidas com polissacarídeos, que foram ativas em modelo de inflamação aguda (DE ARAUJO *et al.*, 2014).

Derivados da chalcona isolados do extrato em acetona do caule de *L. ferrea* apresentaram atividade inibitória no crescimento celular em células HL-60 de leucemia humana com inibição enzimática da Topoisomerase II (NOZAKI *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 2013) e outras substâncias do extrato metanólico do fruto mostram efeitos antitumorais, com testes de ativação *in vitro* do vírus Epstein-Barr (EBV-EA), que ativa a produção de células cancerígenas e subsequente ensaio de tumor de pele *in vivo* em camundongos (NAKAMURA *et al.*, 2002). Diante da relevância

biológica, bem como da fitoquímica, das espécies do gênero *Caesalpinia* e especialmente do potencial farmacológico de *L. ferrea*, neste capítulo foi feita uma revisão de literatura consistentemente sobre a aspectos fitoquímicos e farmacológicos de *Libidibia ferrea*.

## **1.2. Material e método**

A literatura usada nesta revisão foi do período de 1994 a 2020, disponível nos bancos de dados eletrônicos Scopus, Web of Science e SciFinder. Os termos usados no levantamento foram “*Libidibia ferrea* e compostos isolados”, “*Caesalpinia ferrea* e compostos isolados”. Esta pesquisa foi realizada em setembro de 2018 a junho de 2020, para registros de abril de 1994 a janeiro de 2020. Os artigos que foram selecionados para revisão reportavam sobre estudos fitoquímicos, atividades biológicas e farmacológicas. As fórmulas estruturais das substâncias foram desenhadas usando o ChemDraw Ultra 12.0.

## **1.3 Estudos farmacológicos de extratos de *L. ferrea***

A relevância biológica da leguminosa *L. ferrea* é amplamente relatada na literatura, em termos das propriedades farmacológicas das substâncias isoladas, frações e extratos de diversos órgãos desta espécie. O levantamento bibliográfico realizado para *L. ferrea* revelou que o fruto foi o mais estudado, seguido pela folha, semente e caule, com incidência em cerca de 40, 16 e 12%, respectivamente, dos manuscritos selecionados (Figura1a). Em relação aos métodos de extração para obtenção dos extratos brutos, a frio foi predominante, através da maceração (42%) e sistema soxhlet (15%) (~25-26%) (Figura1c). A avaliação biológica de amostras de extratos, frações e substâncias de *L. ferrea* foi realizada quanto as atividades antimicrobiana, anticâncer, citotóxica, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, dentre outras, como será descrito resumidamente a seguir.

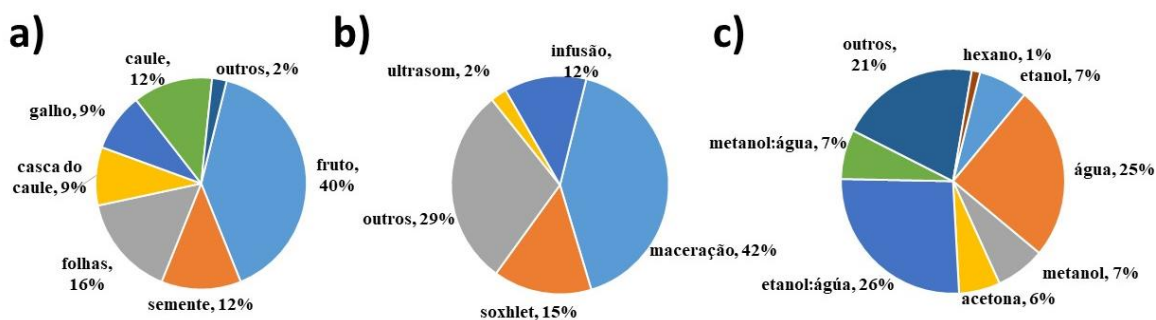


Figura 1: Distribuição percentual de trabalhos reportados na literatura sobre: órgãos estudados (a), métodos de extração (b) e solventes empregados (c) nos estudos fitoquímicos e farmacológicos de *L. ferrea*.

### 1.3.1 Atividade antimicrobiana

O extrato hidroalcoólico do fruto, 80% em metanol (Extração por maceração), inibiu o crescimento *in vitro* de patógenos orais em modelos planctônicos, com valores de concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de 25,0; 40,0; 66,0; 100,0 e 66,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei*, respectivamente. Para os quais as CIMs para clorexidina foram de 5,0, 0,4, 0,4, 1,5, 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. (Sampaio *et al.*, 2009). O extrato etanólico do fruto (Extração por maceração) também foi ativo contra *S. mutans* e *S. oralis*, com CIMs de 1,56 e 3,13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). Já os extratos foliares obtidos por maceração com ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol exibiram atividade antimicrobiana de amplo espectro contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, os mais ativos foram os em ciclohexano e clorofórmio com valores de CIMs que variaram de 0,39 a 6,25  $\text{mg mL}^{-1}$  para as cepas testadas (LUNA *et al.*, 2020).

Os extratos aquoso e em água:acetona (7:3, v v<sup>-1</sup>) da casca do caule obtidos por turbo-extração foram testados pelo métodos de microdiluição em caldo e difusão em ágar contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Methicillin-resistant S. aureus* (MRSA), *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexneri*, onde os valores de CIMs para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, MRSA, *S. enteritidis*, *S. flexneri* e *K. pneumoniae* variaram de 5000 - 625  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para o aquoso e de 150 - 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o em água - acetona, respectivamente. Já por difusão em ágar foram encontrados zonas de inibição para estas bactérias

(ZIs) na faixa de 11 a 13 mm para o extrato em aquoso e de 8,0-15,0 mm para o acetona:água. Além disto, o em acetona:água mostrou inibição contra *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, com zonas de inibição de  $7.00 \pm 0.00$  e  $10.00 \pm 0.00$  mm, respectivamente (De Araújo *et al.*, 2014). A maior atividade antimicrobiana do extrato em água-acetona foi atribuída a presença de polifenóis [6,88 µg de pirogalol (PE) por g de extrato vegetal], por espectrofotometria utilizando o reagente Folin Ciocalteau (De Araújo *et al.*, 2014).

Inibidores de tripsina contidos nas sementes de *L. ferrea* extraídos com NaCl foram testados em fungos fitopatogênicos como *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*, por controle do crescimento e esporulação micelial. Este extrato protéico foi testado nas concentrações de: 0, 10, 20, 40 and 80 µg mL<sup>-1</sup>. A inibição máxima de esporulação (91%) foi alcançada na concentração de 40 µg mL<sup>-1</sup> para o fungo *C. guaranicolla*. Já para *F. oxysporum*, o efeito no crescimento micelial do fungo, quando comparado ao controle, demonstrou que apenas a concentração de 80 µg mL<sup>-1</sup> apresentou diferença entre as concentrações testadas. Entretanto, em 80 µg mL<sup>-1</sup> o extrato protéico mostrou 73% de inibição na esporulação das colônias. O efeito para *S. rolfsii* não foi tão pronunciado (Bariani *et al.*, 2012).

Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana diversificada, inibindo o crescimento de fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dos fungos, *C. albicans*, e o gênero *Staphylococcus*, para bactérias, foram os mais suscetíveis aos extratos.

### **1.3.2 Atividade anticâncer**

A atividade antitumoral do extrato metanólico do fruto (Extração por refluxo) e de suas frações em clorofórmio, acetato de etila, n-butanol e água, obtidas por partição, foi avaliada em uma triagem primária por ensaio de ativação *in vitro* do antígeno do vírus Epstein-Barr (EBV-EA) induzido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato). A fração em acetato de etila apresentou maior atividade inibitória na ativação do vírus EBV-EA, com inibição da ativação celular a 0% na dose de 100 mg mL<sup>-1</sup> (Nakamura *et al.*, 2002). Outra fração em acetato de etila do extrato em acetona do caule obtido por maceração inibiu topoisomerase II (tipo II) e a proliferação celular em leucemia humana HL60 (Nozaki *et al.*, 2007).

Extratos brutos fruto preparados em água:etanol a 40%, 60% e 80% (v v<sup>-1</sup>), obtidos por turbo-extração com etanol, apresentaram inibição da proliferação celular da linhagem tumoral HT-

29, de câncer colorretal humano, no período de 24h de incubação. Destes, o extrato (60%), na concentração de 25,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi capaz de inibir 50% do crescimento das células viáveis, enquanto o a 80%, na concentração de 12,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foi capaz de inibir 43,7% desta linhagem (Guerra *et al.*, 2017).

A atividade citotóxica observada para o extrato etanólico (70%, v v<sup>-1</sup>) da folha obtido por refluxo contra cinco linhagens celulares de câncer humano do fígado (HepG2), mama (MCF-7), cólon (HCT-116), laringe (Hep2) e da próstata (PC3) evidencia o potencial anti-câncer de *L. ferrea* (HUSSEIN, 2016). Destas linhagens, as mais sensíveis ao extrato testado foram HepG-2, Hep2, MCF-7 e HCT-116, com valores de concentração do extrato que inibiu 50% das células (IC<sub>50</sub>), de 19,3; 20,0; 21,8 e 24,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (HUSSEIN, 2016).

### 1.3.3 Atividade citotóxica e larvicida

O extrato etanólico das folhas (Extração por maceração) apresentou toxicidade significativa, na concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para as larvas de *Artemia salina* e para as do *Aedes aegypti*, com mortalidade de 68 e 10%, respectivamente (DE S. LUNA *et al.*, 2005). O extrato aquoso de sementes (Extração com NaCl) de *L. ferrea* apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti* no terceiro estágio com 85% de mortalidade em 24 horas (CAVALHEIRO *et al.* 2009), taxa superior à taxa de 10% encontrada no extrato etanólico de folhas, que apresentou mortalidade de 10% a 500 ppm contra as larvas de *A. aegypti*, no quarto estágio (DE S. LUNA *et al.*, 2005).

A toxicidade dos polissacarídeos presentes na fração polissacarídica das sementes a 1 mg kg<sup>-1</sup> em ratos foi bem tolerado e não produziu alterações nos parâmetros de toxicidade (PEREIRA *et al.* (2012). No estudo de Guerra *et al.* (2017), os extratos brutos do fruto preparados a 40, 60 e 80% em etanol (v v<sup>-1</sup>) nas concentrações de 25,0 e 12,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não mostraram toxicidade na linhagem celular HEK-293, de células renais embrionárias humanas não tumorais, usada como controle de parâmetros de citotoxicidade.

Cavalheiro *et al.* (2009) avaliaram a toxicidade aguda em ratos do extrato bruto de sementes de *L. ferrea*, por injeção intraperitoneal na dose de 0,3 mL 10 g<sup>-1</sup> de peso corporal. Este não mostrou toxicidade aguda e também não foram observadas perda de peso, mudanças comportamentais, diarreia ou outras alterações. Adicionalmente, o aquoso do fruto obtido por maceração

administrado por gavagem não teve efeito tóxico duradouro na dose de 300 mg kg<sup>-1</sup>, por peso corporal, nos órgãos reprodutivos de ratos Wistar (LUCINDA *et al.*, 2010).

Além destes estudos, baixa toxicidade também foi obtida para o extrato aquoso do fruto (Extração com NaCl) e sua fração rica em proteínas, onde em dose única em camundongos, obtiveram uma dose letal média, DL<sub>50</sub>, de 2.500,0 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal por Freitas *et al.* (2012). Lima *et al.*, (2012) também avaliaram a toxicidade oral aguda do extrato etanólico do fruto obtido por maceração, contudo o DL<sub>50</sub> não foi calculado porque a dose de 2 mg kg<sup>-1</sup> não foi letal para os animais estudados. A citotoxicidade em células de macrófagos (J774) do extrato metanólico do fruto (Extração com ultrassom) sem semente (FrMeOH) foi avaliada por COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.* (2017) onde obtiveram baixa citotoxicidade para o extrato, com IC<sub>50</sub> acima de 500 µg mL<sup>-1</sup>.

O extrato etanólico das folhas a 70% (v v<sup>-1</sup>) obtido por refluxo apresentou atividade citotóxica contra a linhagem celular de queratinócitos HaCaT, com IC<sub>50</sub> = 114,4 ± 18,9 g ml<sup>-1</sup>, pelo ensaio vermelho neutro (NRU) (Nawwar *et al.*, 2015). O extrato hidroalcoólico da casca do caule e das sementes de *L. férrea* (Extração por maceração), nas doses de 1g kg<sup>-1</sup> por dia, não afetou a capacidade reprodutiva de ratos fêmeas. Exceto pelo peso da placenta que foi significativamente menor que o controle, o que pode ser uma indicação de toxicidade para impedir o desenvolvimento adequado do feto (PICKLER *et al.*, 2019).

### **1.3.4 Atividade anti-inflamatória e analgésica**

Bacchi (1994) investigaram a atividade preventiva anti-úlceras do extrato do caule obtido por maceração em etanol de *L. férrea*, 70% v v<sup>-1</sup>, administrado por via oral e intraperitoneal em ratos Wistar fêmeas. As lesões gástricas foram induzidas e tratadas posteriormente com a administração 400 mg kg<sup>-1</sup> por peso corporal, e os parâmetros avaliados foram secreção gástrica, efeito analgésico, tempo de sono e atividade motora espontânea. Este extrato diminuiu o volume da secreção gástrica, no entanto, no índice de úlcera, a redução por administração intraperitoneal foi maior que por via oral. Outro efeito observado foi o impedimento de lesões agudas na mucosa gástrica. Além disto, o extrato não teve efeito na analgesia, no tempo de sono e nos testes de atividade motora espontânea (Bacchi, 1994).

A atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso e em água-acetona do caule foi evidenciada pela redução significativa da migração de leucócitos, pelo modelo de peritonite por carragenina em ratos (DE ARAÚJO *et al.* (2014).

Carvalho *et al.* (1996) estudaram o potencial anti-inflamatório e analgésico *in vivo* do extrato aquoso do fruto de *L. férrea* obtido por maceração. Neste modelo experimental, carragenina e ácido acético foram utilizados para induzir inflamação e contrações musculares, respectivamente, a fim de medir a atividade analgésica. O grupo tratado com 300 mg kg<sup>-1</sup> do extrato bruto apresentou inibição da formação de edema de 36,3 e 23,0%, nas segunda e terceira horas, após a administração oral, respectivamente. O grupo animal tratado com o extrato reagiu menos vigorosamente ao teste de placa quente após 60 min, em relação ao grupo controle. Não houve diferença aparente entre as vias oral e intraperitoneal, com a administração de 100 mg kg<sup>-1</sup> de extrato. Grupos tratados, anteriormente, com 10 e 20 de extrato vegetal exibiram uma redução significativa no número de contorções de 88 e 92, respectivamente. Outro extrato aquoso do fruto e de sua fração rica em proteínas também foi avaliado quanto a atividade anti-inflamatória e analgésica em por Freitas *et al.* (2012), onde na dose testada, 100 mg kg<sup>-1</sup>, as amostras apresentaram efeito anti-inflamatório, reduzindo o número de leucócitos polimorfonucleares no exsudato inflamatório, além de serem analgésicas, protegendo os camundongos contra estímulos nocivos induzidos quimicamente pelo ácido acético.

Lima *et al.* (2011) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico a 95% do fruto, através do uso de tioglicolato para induzir peritonite e de xileno para edema no ouvido, e o seu efeito analgésico por meio do teste de permeabilidade vascular provocado pela aplicação de uma solução de ácido acético e formalina para induzir dor. O extrato foi eficaz nas doses de 25 e 50 mg kg<sup>-1</sup>, no teste de tioglicolato, com efeito mais pronunciado com inibição de 68,4 e 71,8%, respectivamente, em comparação ao controle. Além disto, este extrato na dose de 50 mg kg<sup>-1</sup> reduziu o edema da orelha em 66,6% e inibiu significativamente a permeabilidade vascular em 66,1%, em relação ao controle e no teste da formalina mostrou uma inibição significativa da nocicepção de 34,0% em relação ao controle, na segunda fase do experimento.

O extrato do fruto de *L. ferrea* obtido por fluido supercrítico apresentou capacidade anti-inflamatória, por regular negativamente a expressão de marcadores de indução de resposta inflamatória, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , além da produzir de óxido nítrico (Dias *et al.*, 2013).

A atividade anti-inflamatória *in vivo* estudada por Pereira *et al.* (2012) pelos modelos de inflamação aguda mostrou que a fração polissacarídica das sementes TPL (polissacarídeos totais) e suas subfrações (FI, FII e FIII) possuem potente atividade através da modulação de histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandina E2 (PGE2) e NO em edema induzido por carragenina, onde foi demonstrado o envolvimento de mastócitos.

O extrato aquoso das sementes (Extração por maceração) apresentou efeito antinociceptivo na dor periférica, induzida por ácido acético, com ID<sub>50</sub> médio de 5,99 mg kg<sup>-1</sup> e sua fração lipídica causou inibição da dor induzida por formalina, com ID<sub>50</sub> médio de 5,67 mg kg<sup>-1</sup> para a fase inicial e de 0,02 mg kg<sup>-1</sup> para a fase tardia (Sawada *et al.*, 2014). Já no teste de placa quente, esta fração causou um aumento no tempo de latência dos animais, indicando um efeito antinociceptivo central (Sawada *et al.*, 2014). Nos trabalhos de Carvalho *et al.* (1996) e Freitas *et al.* (2012) doses mais altas de extrato foram utilizadas e a maior eficiência do efeito analgésico obtido pode estar associada a diferenças na composição das partes das plantas.

O extrato aquoso das folhas de *L. ferrea* obtido por turbo-extração também apresentou atividade anti-inflamatória em um modelo experimental de inflamação intra-articular induzida por zimosan, quando administrados por gavagem nas doses de 100, 200 e 300 mg kg<sup>-1</sup> em ratos Wistar. Neste estudo, o extrato reduziu citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e marcadores de estresse oxidativo (MDA, glutaciona) nos tecidos articulares (FALCAO *et al.*, 2019).

### **1.3.5 Atividade curativa**

O uso tópico de uma pomada preparada com o pó da casca do caule de *L. ferrea* adicionado à vaselina estéril, na proporção de 1:2 m m<sup>-1</sup>, teve um efeito significativo na cicatrização de feridas abertas na pele de cabras, onde as feridas tratadas com o pó de casca apresentaram um processo de cicatrização mais rápido que o grupo controle (vaselina), por análise histológica. Além disso, foi observado que após a segunda semana de tratamento não houve crescimento da bactéria *S. aureus*, indicando uma possível atividade antibacteriana de *L. ferrea* (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Outras formulações de pomadas preparadas com base no pó do fruto mostraram atividade cicatrizante em feridas da pele, com lesões reduzidas, em um teste pré-clínico em ratos (CARVALHO *et al.*, 2016) e em de feridas de coelho (BATISTA *et al.*, 2017). Neste estudo, o tratamento tópico desencadeou um processo de cicatrização mais esteticamente organizado, menos hiperêmico e exsudativo,



evidenciando que houve intervenção no processo de cicatrização, minimizando os eventos da fase inflamatória.

### 1.3.6 Atividade antioxidante e quantificação de polifenóis

A concentração de polifenóis no extrato hidrometanólico bruto dos frutos (80%, v v<sup>-1</sup>) de *L. ferrea* foi estimada em 7,3%, pelo método do azul da Prússia (SAMPAIO *et al.*, 2009). A quantificação de compostos fenólicos revelou que o extrato hidroalcoólico do fruto (Extração por maceração) de *L. ferrea* apresentou um teor de 460 ± 4,16 mg g<sup>-1</sup> (EAG) e uma atividade antioxidante 38,06% (± 2,04) maior do que a do ácido ascórbico, com IC<sub>50</sub> = 182,98 ± 1, 81 µg ml<sup>-1</sup>, pelo método fosfomolibdênio (DA SILVA *et al.*, 2011). Através do método espectrofotométrico com Folin-Ciocalteu a variabilidade fenólica em extratos dos frutos de *L. ferrea* obtidos por infusão, coletados em catorze locais diferentes do Brasil, foi obtida com variação total do conteúdo fenólico de 37,85 ± 0,23 - 13,99 ± 0,32 g % para ácido gálico e 29,09 ± 0,23 - 10,75 ± 0,32 %g para o ácido elágico (FERREIRA *et al.*, 2016).

A quantificação de substâncias fenólicas como ácido elágico e ácido gálico no extrato etanólico do fruto (20, 40, 60 e 80%, v v<sup>-1</sup>, em etanol) foi realizada por HPLC por Guerra *et al.* (2017). Neste estudo, os extratos 40 e 20% (v v<sup>-1</sup>), em etanol, apresentaram os maiores teores de ácido elágico e ácido gálico, com 2,89 ± 0,551 e 4,43 ± 0,132 % g respectivamente.

O extrato hidrometanólico do caule teve um teor de compostos fenólicos de 0,151 ± 0,005 mg de GAE g<sup>-1</sup> extrato seco, pelo ensaio com o reagente Folin-Ciocalteu e inibiu 21,51% do radical DPPH (OLIVEIRA *et al.*, 2010). E a coagulação por camada fina (TLC) para identificação química dos constituintes do extrato aquosos (Extração por infusão) da casca do caule de *L. ferrea* revelou a presença de taninos condensados (catequinas) e taninos hidrolisáveis (ácidos gálico e elágico). Já o seu teor total de taninos de 266 mg g<sup>-1</sup> foi conduzido pelo método de precipitação de caseína. Além disto, este extrato apresentou ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido elágico, nas concentrações de 112,76; 17,75; 6,13 e 12,00 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente, por HPLC (VASCONCELOS *et al.*, 2011). O extrato hidrometanólico do caule (extração por maceração) de *L. ferrea* apresentou um teor de tanino de 6,24%, por difusão radial em meio sólido com albumina de soro bovino (BSA), enquanto o extrato metanólico do mesmo órgão apresentou um teor total de flavonoides de 0,49%, por espectrometria com cloreto de alumínio (Siqueira *et al.*, 2012). De

Araújo *et al.* (2014) estimaram o conteúdo polifenólico dos extratos aquoso e em acetona-água do caule de 6,41 e 6,88  $\mu\text{g g}^{-1}$  (expressos em equivalentes de pirogalol (PE) por g de extrato vegetal), na ordem, por método colorimétrico com o reagente Folin-Ciocalteu. Ainda neste extrato, o conteúdo de ácido gálico variou de 0,0010 a 0,0013  $\mu\text{g g}^{-1}$  e de catequina de e 0,027 e 0,011  $\mu\text{g g}^{-1}$ , ambos obtidos por HPLC.

Já para o extrato etanólico da casca do caule (extração por maceração) foram determinados teores de ácido gálico, ácido 3-*O*-galoyl quinico e o galato de etila de 17,68; 13,26 e 28,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, por HPLC, juntamente com os de ácido valônico dilactona, ácido elágico e ácido metilelágico-pentosídeo de 63,00; 57,64 e 4,98  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). A análise por HPLC da impressão dos extratos hidroalcoólicos da casca do caule e das sementes confirmou a presença de ácido elágico como principal composto (PICKLER *et al.*, 2019)

Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017) quantificaram o conteúdo fenólico e de flavonoide dos extratos em hexano e metanol de folhas, galhos e frutos sem sementes obtidos de *L. ferrea* por métodos espectrofotométricos com cloreto de ferro III ( $\text{FeCl}_3$ ) (padrão: pirogalol) para quantificação de fenólicos e cloreto de alumínio III ( $\text{AlCl}_3$ ) (padrão: quercetina e naringenina) para flavonóides. Dentre os órgão estudados, o extrato metanólico dos frutos sem sementes apresentou valores mais pronunciados de fenólicos totais (514,65 mg de pirogalol  $\text{g}^{-1}$  de extrato seco) e flavonóides totais (69,35 mg de quercetina  $\text{g}^{-1}$  de extrato seco e  $64,11 \pm 1,19$  mg de naringenina  $\text{g}^{-1}$  de extrato seco). Contudo, em relação a polaridade dos solventes extratores nos diferentes órgãos da planta, os extratos metanólicos foram mais enriquecidos em fenólicos e flavonoides que os em hexano (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017).

Port's (2013) quantificaram o conteúdo total de flavonoides e fenólicos do extrato aquoso das folhas (extração por infusão) de *L. ferrea*. O extrato apresentou teores totais de fenólicos de  $68,13 \pm 15,93$  mg  $\text{g}^{-1}$  EAG e de  $4,56 \pm 1,58$  mg  $\text{g}^{-1}$  de EC. As atividades antioxidantes deste extrato foram avaliadas pelo ensaio DPPH ( $\text{IC}_{50} = 46,70 \pm 4,01$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e também pelo método utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno / ácido linoléico ( $\text{IC}_{50} = 93,29 \pm 13,92$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Além disto, foram quantificados no extrato ácido gálico e quercetina, por HPLC-DAD, onde foram obtidos  $0,59 \pm 0,05$  mg  $\text{g}^{-1}$  de ácido gálico e  $0,13 \pm 0,01$  mg  $\text{g}^{-1}$  de quercetina. Já o extrato etanólico a 70% (v v<sup>-1</sup>) das folhas apresentou atividade antioxidante com  $\text{EC}_{50} = 12,5 \pm 2,9$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pelo método ORAC

(Nawwar *et al.*, 2015) e a análise por HPLC do extrato aquoso das folhas detectou concentrações de 1,56 (0,77) % m m<sup>-1</sup> para ácido elágico e 1,20 (1,38) % m m<sup>-1</sup> para ácido gálico (FALCAO *et al.*, 2019).

### 1.3.7 Outras atividades

O extrato hidroalcoólico (80%) do fruto (Extração por maceração) de *L. ferrea* e suas frações mostraram atividade inibitória da enzima aldose redutase, a qual é envolvida nas complicações do diabetes (UEDA, 2004; UEDA *et al.*, 2001). O potencial antidiabético desta espécie foi também mostrado pelas propriedades hipoglicêmicas do extrato aquoso de casca de caule em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, onde a administração oral de doses do extrato de 300 e 450 mg kg<sup>-1</sup> em ratos diabéticos mostrou reduções significativas nos níveis de glicemia de 70 e 79,5%, respectivamente, em comparação ao grupo controle com diabetes (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

A atividade clastogênica aguda *in vivo* dos extratos etanólicos (Extração por maceração) da casca do caule de *L. ferrea* em células da medula óssea foi avaliada em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), nas concentrações de 500, 1000 e 1500 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal, via administração por gavagem de dose única (0,5 mL). Contudo, o extrato não teve efeito clastogênico nas condições testadas e não induziu aumento significativo no número médio de células com micronúcleos ou aberrações cromossômicas (De Souza, 2006). O extrato etanólico da casca de *L. ferrea* não foi mutagênica nas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA97a e TA102) (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014).

Estudou-se um preparo feito com o pó do fruto de *L. ferrea* na proporção de 20% e 50% com vaselina sobre o efeito repelente contra moscas da família Calliphoridae: *Lucilia eximia*; *Chrysomya albiceps*; *Chrysomya megacephala*, *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* and *Sarconesia clorogaster*. As duas preparações mostraram efeito repelente, contudo bem maior para a preparação com a concentração de 50% do pó do fruto (FERNANDES *et al.*, 2016).

Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017) avaliaram a atividade antileishmanial de extratos em hexano e metanol de folhas, galhos e frutos sem sementes obtidos de *L. ferrea* contra as formas promastigotas e amastigotas causadoras de leishmaniose cutânea e, além disto, o efeito do tratamento tópico com hidrogéis contendo extrato ativo em hamsters experimentais infectado com

*L. (L.) amazonensis*. O extrato metanólico de frutos sem sementes (FrMeOH) foi o mais ativo contra promastigotas de *L. (L.) amazonenses*, com  $IC_{50} = 15,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e *L. (V.) guyanensis*, com  $IC_{50} = 173,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas formas amastigotas, o extrato na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (FrMeOH), *in vitro*, inibiu a sobrevivência dos amastigotes de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses* na, em 62 e 54%, respectivamente, em relação ao controle. Além disto, este extrato em preparação de formulação com hidrogel também causou a redução no volume de lesão em animais, diminuindo a inflamação na região da lesão e a carga parasitária, quando comparados ao controle não tratado ou recebendo apenas o gel sem o extrato.

Os efeitos hipolipidêmicos do extrato etanólico a 70% (v v<sup>-1</sup>) das folhas de *L. ferrea* foram avaliados por Nawwar *et al.* (2015) em ensaios *in vitro* sobre a atividade da HMG CoA redutase, a principal enzima limitante da biossíntese do colesterol e *in vivo* em ratos Wistar, os quais foram tratados oralmente com  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal de extrato vegetal. Este inibiu a atividade enzimática em cerca de 86% na concentração de  $2,27 \pm 0,14 (\mu\text{mol mg}^{-1})$  e no ensaio *in vivo*, o tratamento com extrato resultou em uma diminuição significativa no teor de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, triglicerídeos e lipídios totais (53,08%; 25,03%; 48,84% e 23,28%, respectivamente), enquanto o colesterol lipoproteína de alta densidade (HDL-C) aumentou significativamente em 158,71% em comparação ao grupo hipercolesterolêmico não tratado.

#### 1.4 Constituintes químicos de *L. ferrea* e suas atividades farmacológicas

A partir da prospecção fitoquímica de algumas espécies do gênero *Caesalpinia*, os metabólitos descritos incluem predominantemente diterpenos, triterpenos, compostos fenólicos e outros. Os diterpenóides são os constituintes predominantes no gênero *Caesalpinia* (WU *et al.*, 2011; ZANIN; DE CARVALHO *et al.*, 2012). No entanto, para *L. ferrea*, nenhum diterpeno ainda foi isolado e seu estudo fitoquímico é ainda incipiente (APÊNDICE).

##### 1.4.1 Derivados flavonoides

O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas (Extração por refluxo) de *L. ferrea* resultou no isolamento de nove flavonas glicosiladas: orientina **1**, vitexina **2**, isoorientina **3**, isovitexina **4**, isovitexina 2''- *O*- $\beta$ - [xilopiranosil-(1''''  $\rightarrow$  2''')-*O*- $\beta$ -xilopiranosil] **5**, vitexina 2''- *O*- $\beta$ -[xilopiranosil- (1''''  $\rightarrow$  2''')-*O*- $\beta$ -xilopiranosil] **6** e orientina 2''-*O*- $\beta$ -[xilopiranosil-(1''''  $\rightarrow$

2''')-O- $\beta$ -xilopiranosil **7**, 2''-O-galoilvitexina **8** e 2''-O-galoilorientina **9** (HUSSEIN, 2016; NAWWAR *et al.*, 2014, 2015). Orientina **1** e vitexina **2** exibem ligação C-glicosídica na posição 8 do anel A e diferem pelo grau de oxidação do anel B. Isoorientina **3** e isovitexina **4** têm ligação C-glicosídica na posição 6 do anel A. O 2''-O-galoilvitexina **8** difere da vitexina **2** e 2''-O-galoilorientina **9** difere da orientina **1** por esterificação na posição 2 do glicosídeo. As substâncias **1**, **3** e **7** são derivados da luteolina, enquanto que os compostos **2**, **4**, **5** e **6** são da apigenina. As substâncias **8** e **9** mostraram atividade antioxidante, pelo método ORAC, de EC<sub>50</sub> = 3,8  $\pm$  0,4 e 1,9  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Em adição, estas substâncias apresentaram atividade citotóxica em queratinócitos HaCaT, com valores de EC<sub>50</sub> de 59,7  $\pm$  3,8 e 67,9  $\pm$  5,9  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, respectivamente para **8** e **9**.

O composto 2''-O-galoilorientina **9** também mostrou efeito citotóxico em linhagens celulares de câncer do fígado (HepG2), mama (MCF-7), cólon (HCT-116), laringe (Hep-2) e próstata (PC3), com valores de IC<sub>50</sub> de 18,5; 22,6; 24,2 e 28,4  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para HepG-2, HCT-116, Hep2 e MCF-7, na ordem (HUSSEIN, 2016; NAWWAR *et al.*, 2014, 2015).

O levantamento bibliográfico indicou que dentro do gênero *Caesalpinia* foram isolados flavonoides glicosilados apenas em extratos de *L. ferrea*. Outros não glicosilados foram identificados também nesta planta, como a flavona apigenina **10**, que foi isolada do extrato hidroalcoólico do fruto e casca do caule (PEDROSA *et al.*, 2016); flavonoides do tipo flavan-3-ol, como epicatequina **11** foi identificada no extrato hidroalcoólico do fruto, hidroalcoólico, etanólico e hidroacetônico da casca do caule (PEDROSA *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2011; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). A catequina **12** foi identificada no extrato etanólico, hidroalcoólico, hidroacetônico e aquoso do caule, bem como, no extrato hidroacetônico do fruto. A flavanona taxifolina **13** e flavonóis kaempferol **14**, quercetina **15**, isorhamnetina **16**, miricetina **17** e rutina **18** foram identificados no extrato hidroalcoólico do fruto e caule desta planta (DE ARAÚJO *et al.*, 2014; PEDROSA *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2011). Um único trímero de chalcona paufferol A **19** e dois dímeros de chalconas, paufferol B **20** e paufferol C **21** foram isolados dos extratos em acetona do caule. Esses derivados exibiram atividades inibitórias contra a topoisomerase II humana com IC<sub>50</sub> de 2,1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, 15,3  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> e 14,5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, e induziu apoptose em células HL60 de leucemia humana com IC<sub>50</sub> de 5,2  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, 11,6  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> e 12,1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, respectivamente (NOZAKI *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 2013).

### 1.4.2 Taninos

Os taninos são os metabólitos majoritários do extrato aquoso dos frutos de *L. ferrea* (DE SOUZA, 2006). Esse mesmo perfil químico foi encontrado nos alcoólicos, como o etanólico da casca do caule que apresentou predominância de taninos hidrolisáveis, principalmente derivados do ácido gálico, como monogaloil glicose **22**, ácido galoil chiquímico **23**, tellimagrandin-I **24**, digaloil glicose **25**, ácido digaloilquínico **26**, galoil tanino **27**, trigaloil glicose **28**, tetragaloil glicose **29**, derivado da castalagina **30**, ácido hexa- hidroxí- difenil digaloil glicose **31**, pentagaloil glicose **32**, ácido digaloil chiquímico **33**, procianidina C2 **34** e ácido metil elágico ramnosídeo **35**. Neste mesmo extrato, dilactona do ácido valoneico **36**, ácido 3-*O*-galoil quinico **37** e ácido 3-*O*-metilelágico-4'-*O*- $\beta$ -D-arabinopiranosídeo **38** foram isolados e identificados. Essas espécies exibem um padrão de configuração, onde no esqueleto estrutural de **22-23** há uma unidade galoil ligada a uma de polioliol. Contudo, de **24-33**, a de polioliol está ligada a várias unidades de ácidos fenólicos (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). O composto **24** também foi isolado do extrato etanólico das folhas (HUSSEIN, 2016; NAWWAR *et al.*, 2014; NAWWAR *et al.*, 2015).

### 1.4.3 Outros

O ácido gálico **39** foi obtido de extratos do fruto, folhas e na casca do caule (DE ARAÚJO *et al.*, 2014; HUSSEIN, 2016; NAKAMURA *et al.*, 2002; NAWWAR *et al.*, 2014, 2015; PEDROSA *et al.*, 2016; PORT'S, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2011) e o galato de metila **40** foi isolado do fruto (NAKAMURA *et al.*, 2002a). Os compostos **39** e **40** apresentaram atividade promissora quimiopreventiva na ativação do antígeno do vírus Epstein-Barr (EBV-EA) induzido por TPA, *in vitro* (NAKAMURA *et al.*, 2002a). Estes também foram testados quanto à atividade antitumor na pele de camundongos (NAKAMURA *et al.*, 2002b), onde a carcinogênese foi induzida com TPA e o número de papilomas foi determinado uma vez por semana, durante 20 semanas com administração de doses de 85 nmol de **39** e **40**, a qual, para ambos, diminuiu a porcentagem de camundongos com papiloma (NAKAMURA *et al.*, 2002b).

O ácido elágico **41** e o ácido 2-(2,3,6-tri-hidroxi-4-carboxifenil) elágico **42**, os quais foram isolados do extrato etanólico do fruto e das folhas, mostraram inibição da atividade enzimática da aldose redutase, com IC<sub>50</sub> de 1,08 e 2,72 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Estes apresentaram também efeito inibitório sobre o acúmulo de sorbitol *in vitro* em eritrócitos isolados incubados no meio contendo glicose (UEDA, 2004; UEDA *et al.*, 2001). O ácido elágico **41** também foi obtido dos extratos hidroalcoólicos da

casca do caule e da casca da semente, extrato aquosos da casca e etanólico das folhas, sementes e caule (HUSSEIN, 2016; NAWWAR *et al.*, 2014, 2015; PICKLER *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2011; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014) e o galato de etila **43** do extrato etanólico da casca do caule (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). Nas folhas, brevifolin **44** e ácido brevifolincarboxílico **45** foram isolados do extrato etanólico. O efeito antioxidante de **45** foi avaliado pelo método ORAC, juntamente com sua citotoxicidade em queratinócitos HaCaT, pelo ensaio vermelho neutro (NRU), onde foram encontrados valores de  $EC_{50} = 5,0 \pm 1,0$  e  $124,9 \pm 22,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (NAWWAR *et al.*, 2015).

O ácido quínico **46** foi identificado por cromatografia líquida (LC-MS / MS) no extrato hidroalcoólico do caule e do fruto obtido por maceração. Contudo, neste estudo, os compostos ácido clorogênico **47**, ácido cafeico **48**, ácido 2- (2-etil-3-hidroxi-6-propionilciclohexil) acético **49** e ácido 12-oxo-fitodienoico **50** e ácido glucônico **51** estavam presentes apenas no do fruto (PEDROSA *et al.*, 2016).

Os ácidos graxos como ácido linoléico **52**, oleico **53**, alfa-linolênico linolênico **54**, palmitoleico **55**, palmítico **56**, esteárico **57** e ácido cáprico **58** foram identificados na porção lipídica das sementes por cromatografia em fase gasosa (GC), com predomínio dos ácidos linoléico, oleico e palmítico (SAWADA *et al.*, 2014).

A análise por cromatográfica gasosa do extrato do fruto com fluido supercrítico (SFE) também indicou a presença de ácido linoleico **52**, ácido palmítico **56**, ácido esteárico **57** e outros compostos como o ácido elaídico **59**, gama-sitosterol **60** e lupenona **61**. Este extrato apresentou uma composição média de 52% em ácidos graxos insaturados, 26% em ácidos graxos saturados e 13% em derivados terpenóides (DIAS *et al.*, 2013).

A fração polissacarídica da extração aquosa das sementes foi estudada por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , onde se observou que sua composição de monossacarídeos é formada por  $\alpha$ -D-galactose **62** e  $\beta$ -D-manose **63**. A fração polissacarídica foi ativa contra o vírus da Herpes simplex (HSV-1) e o poliovírus tipo 1 (PV-1), *in vitro*, apresentando valores de  $IC_{50}$  de 405 e  $1,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Esta ainda mostrou baixa citotoxicidade para células HEP-2, pelo ensaio colorimétrico brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), com  $CC_{50}$  acima de  $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Análises de FTIR dessa fração indicaram a presença da composição de açúcar de

galactomanos (64) (LOPES *et al.*, 2013), concordando assim com a análise química e físico-química dos polissacarídeos extraídos das sementes de *L. férrea*, os quais eram ricos em galactomanana (DE SOUZA, 2010). Galactomanos das sementes extraídos com NaCl foram eficazes no controle da hiperglicemia e na recuperação da sensibilidade à insulina no tecido adiposo, na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal em ratos Wistar com diabetes, a qual foi induzida por estreptozotocina (Cunha *et al.*, 2017).

Análise por GC-MS do extrato em ciclohexano da folhas e de suas frações identificou a presença de compostos octadecanal **65**, n-dodecanal **66**, octacosano **67**, docosano **68**, pentadecano **69**, heptacosano **70**, ácido pentadecanóico **71**, globulol **72**, n-decanal **73**, 14-metil-pentadecanoato **74**, ácido 1,2-benzenodicarboxílico **75**, fitol **77**, ácido hexanóico **76**, ácido benzoico **77**, pirrolidina **78**, 2,4- ácido piridinodicarboxílico **79** e heptacosano **80**, ácido linolênico e ácido palmítico (LUNA *et al.*, 2020).

### **1.5 Considerações finais**

Esta revisão apresentou 80 metabólitos secundários isolados e/ou identificados em extratos de órgãos diversos de espécimes de *L. ferrea*, como flavonoides glicosilados e agliconas, taninos, ácidos fenólicos e ácidos graxos. Contudo, os derivados de diterpenos não foram encontrados nesses estudos fitoquímicos prévios, mesmo sendo prevalente a presença destes em espécies do gênero *Caesalpinia*. Dentre os órgãos estudados, o fruto foi o mais recorrente, seguido das folhas, caule e semente e o método de extração mais empregado para obtenção dos extratos brutos destes foi a maceração, com mistura hidroalcoólica, etanol:água e água. As atividades farmacológicas mais amplamente estudadas para os extratos de *L. ferrea* foram antiinflamatória e analgésica, seguida de outras como antimicrobiana, citotóxica, antioxidante, anticâncer, curativa e anti-diabética. Estes estudos farmacológicos apresentam diversidade e revelam a importância da prospecção fitoquímica para o isolamento de substâncias responsáveis pelos efeitos biológicos dos extratos. Os efeitos de algumas substâncias isoladas foram investigados, como antioxidante e citotóxico, entretanto estes ainda são incipientes e uma investigação mais abrangente dessas substâncias se faz necessário. Assim, outros estudos farmacológicos e fitoquímicos devem ser desenvolvidos com amostras de *L. ferrea*, diante da relevância farmacológica observada para esta espécie e a fim de esclarecer mais mecanismos de ação das suas substâncias, frações e extratos ativos frente aos alvos relatados e, conseqüentemente, contribuir com a validação do seu emprego na medicina tradicional em



comunidades carentes do Nordeste brasileiro. Além disto, o status atual mostrado para *L. ferrea* pode apontar a direção para futuras pesquisas direcionadas para a comprovação de sua eficácia clínica, essencial para o desenvolvimento de novos fitoterápicos e fitofármacos, a longo prazo, a partir de amostras desta planta.

## Capítulo 2: Variações sazonais de compostos fenólicos, atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, citotóxica em células C6 de glioma de rato e antidiabética *in vivo* de *Libidibia ferrea*

### 2.0 Resumo

Este estudo relata os efeitos da variação sazonal no conteúdo total de polifenóis, flavonoides totais, taninos, na atividade antioxidante *in vitro*, análise multivariada e citotóxica em linhagem celular C6 de glioma de ratos dos extratos etanólicos do caule de *Libidibia ferrea* coletados nos biomas da Caatinga e Mata Atlântica durante as quatro estações do ano: inverno, primavera, verão e outono, bem como, as propriedades antiabéticas *in vivo* dos extratos. Os extratos foram preparados a partir da casca do caule das amostras colhidas no período de 2018 a 2019. O teor total de fenólicos e flavonóides foi determinado por métodos espectrofotométricos e o teor de taninos pelo método da difusão em ágar. A capacidade antioxidante *in vitro* foi avaliada por ensaios de eliminação dos radicais 1-1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e a análise multivariada por ressonância magnética nuclear (RMN). O efeito antibacteriano dos extratos foi determinado pelo ensaio de microdiluição e a citotoxicidade em linhagem celular C6 de glioma através do método de redução de desidrogenase usando o MTT. A atividade antidiabética foi avaliada em camundongos machos C57Bl/6 em modelo de neuropatia diabética. O conteúdo total de polifenóis e taninos variou significativamente durante o verão comparando os dois biomas. Já o conteúdo de flavonoides foi estatisticamente diferente ao longo das estações. Os testes DPPH e ABTS revelaram atividade antioxidante *in vitro* mais potente para os extratos da Caatinga, e a análise multivariada dos extratos revelou dois padrões discriminantes de agrupamento. No bioma da Mata Atlântica os extratos do inverno e primavera apresentaram os melhores efeitos antibacterianos nesse bioma. Na Caatinga, o extrato mais antibacteriano foi o do verão. Os extratos do caule da Mata Atlântica foram mais seletivos e ativos para linhagens Gram-positivas, e o extrato do inverno da Caatinga foi seletivo contra o fungo *C. albicans*. Os extratos coletados no inverno, primavera e verão no bioma da Mata Atlântica apresentaram citotoxicidade contra as células C6 de glioma com  $EC_{50}$  de que variaram de 0,13 a 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Os extratos não apresentaram efeito antidiabético, e o extrato coletado no verão da Caatinga foi tóxico para os camundongos machos. O ácido gálico, substância já isolada da planta, apresentou potencial efeito no tratamento da neuropatia diabética. O conteúdo fenólico total apresentou boa correlação com o teor de tanino. De acordo com as correlações químicas, o conteúdo fenólico parece ser responsável pelas propriedades antioxidantes. E a variação sazonal nos dois biomas parece influenciar as

atividades biológicas da espécie. O conhecimento gerado no presente trabalho contribui para entender a variabilidade da composição química e biológica de extratos de *L. ferrea* nas condições sazonais experimentadas pelo bioma da Caatinga e Mata Atlântica.

## 2.1 Introdução

*Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*, Fabaceae, comumente conhecida como pau-ferro ou jucá, é uma espécie nativa do Brasil, cujo emprego tradicional das cascas do caule, principalmente por comunidades da região Nordeste, é para o tratamento de dor, asma, tosse, gripe, inflamações (MACÊDO *et al.*, 2018), enterocolite, diarreia (BACCHI, 1994; CARVALHO *et al.*, 1996; DE ARAÚJO *et al.*, 2014; GUERRA *et al.*, 2017; SAMPAIO *et al.*, 2009) e cicatrização de feridas (PEREIRA *et al.*, 2016), dentre outros. Já suas raízes são usadas como agente antipirético e o seu fruto para o controle de diabetes (CARVALHO *et al.*, 1996; LUNA *et al.*, 2020).

Dentre as propriedades farmacológicas dos extratos de *L. ferrea* destacam-se a antimicrobiana e antifúngica da casca e do fruto (SAMPAIO;*et al.*, 2009; DE OLIVEIRA MARREIRO *et al.*, 2014;), hipoglicêmica e antidiabética das sementes, folhas e caule (CUNHA *et al.*, 2017; HASSAN *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2011; UEDA, 2004; UEDA *et al.*, 2001), anti-inflamatória, anti-úlceras e analgésico do caule e fruto (LIMA *et al.*, 2011), e, além destas, anticâncer e antioxidante (GUERRA *et al.*, 2017; NAKAMURA *et al.*, 2002a; ; NAKAMURA *et al.*, 2002b; NOZAKI *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos prévios de *L. ferrea* mostram que os derivados fenólicos são os metabólitos secundários principalmente identificados em seus extratos, como flavonoides C-glicosilados, do tipo flavonas, isolados do extrato etanólico das folhas (NAWWAR *et al.*, 2014, 2015); dímeros e trímeros de chalconas no em acetona do caule (NOZAKI *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 2013) e taninos hidrolisáveis, principalmente derivados do ácido gálico, do etanólico da casca do caule (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014).

Esses compostos fenólicos apresentam efeitos biológicos diversos, como anticâncer, anti-infeccioso, antimicrobiano e, além disto, são amplamente empregados para a prevenção de distúrbios cardiovasculares e envelhecimento (ALARCÓN FLORES, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2020; SOARES, 2002). Esses, assim como os demais metabólitos secundários, são importantes para

adaptação das espécies vegetais ao seu habitat natural e para sua defesa em situações de estresse ambiental (ABD-ELGAWAD, 2020; AKULA, 2011). Nesta situação, a biossíntese dos fenólicos é aumentada já que o metabolismo secundário pode ser influenciado por alguns fatores bióticos e abióticos, como incidência de radiação solar, disponibilidade de nutrientes no solo, suprimento de água, temperatura, umidade, herbivoria e ataques de patógenos, dentre outros (BAT *et al.*, 2018; PACIFICO *et al.*, 2015).

A via do fenilpropanóide é o ponto de partida para a biossíntese de vários metabólitos, como derivados de ligninas, flavonoides, taninos e antocianinas (IRANI, 2019; VOGT, 2010). Esta via é reconhecidamente alterada quando as espécies vegetais são submetidas a estresse abiótico ou biótico, onde vários genes são ativados ou desativados, resultando em níveis crescentes de vários metabólitos. A ativação deste metabolismo pode desempenhar um papel no desenvolvimento de barreiras protetoras nas células danificadas pelo estresse através da ativação ou desativação das enzimas limitadoras da via dos fenilpropanóides: a fenilalanina amônia-liase (PAL), *p*-coumaroil:CoA ligase (4CL) e chalcona sintase (CHS) (NAIKOO *et al.*, 2019; PIETROWSKA-BOREK, 2013; SANCHEZ-BALLESTA *et al.*, 2007).

A sazonalidade é um dos fatores que mais influencia no metabolismo secundário tanto em termos das vias metabólicas preferencialmente ativadas, bem como na quantidade produzida dos metabólitos em espécies de Fabaceae (LI *et al.*, 2020). Este efeito foi observado na alteração do conteúdo total de fenólicos de *Acacia farnesiana*, *A. tortilis* e *A. longifolia*, em condições de maior estresse oxidativo, durante períodos de excesso de energia luminosa (GABR *et al.*, 2018). Comportamento semelhante ocorreu com a variabilidade e concentração de polifenólicos nos extratos metanólicos das folhas de espécies de feno-grego (*Trigonella* spp.), em genótipos originários de habitats naturais quentes e secos (RIASAT, 2018) e também na composição de alcaloide nas sementes de *Lupinus tassilicus* (AINOUCHE, 1996). Além disto, a química de óleos essenciais do fruto de *Pterodon emarginatus* foi alterada devido a fatores sazonais (ALVES *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos que lidam com a variabilidade de metabólitos tem sido concentrados em espécies vegetais da região temperada, que são empregadas para fins comerciais. Apesar do Brasil abrigar uma ampla biodiversidade vegetal em zonas climáticas temperada, tropical e

semiárida, o estudo sobre a variação metabólica de suas espécies nativas ainda é incipiente, gerando a necessidade de pesquisas com esta abordagem (GOBBO-NETO *et al.*, 2019).

A Caatinga, onde predomina o clima semiárido, representa um bioma exclusivo do Brasil e ocupa uma área equivalente a 11% (844.453 km<sup>2</sup>) do território nacional (MMA – Brasil, 2011; IBGE, 2019). Suas espécies se distribuem em quase todos os estados do nordeste brasileiro, com ocorrência de endemismo, principalmente de espécies da família Fabaceae (27%) (FERNANDES, 2020). O semiárido se caracteriza por baixa umidade e irregularidade de chuvas, com longos períodos de escassez pluviométrica, que podem chegar até cerca de nove meses, influenciando diretamente na disponibilidade hídrica desta região (DA SILVA, 2019; SILVA *et al.*, 2017).

Já Mata Atlântica brasileira está submetida a climas diferentes, com regiões marcadas pelo clima subtropical úmido no Sul; outras pelo clima tropical e algumas ainda que ocorrem muito próximas à Caatinga semiárida nordestina. Esse bioma se estende no território brasileiro parcialmente desde o Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte, com prevalência no Espírito Santo e Rio de Janeiro (IBGE, 2019). Estas regiões estão submetidas a grande quantidade de chuvas, devido à proximidade do mar e dos ventos que sopram do oceano em direção ao continente.

A Caatinga e Mata Atlântica são biomas que apresentam características de clima e vegetação muito distintas, por isso, é de se esperar que uma mesma espécie vegetal coletada nas duas regiões apresente diferença na produção de seus metabólitos secundários. Assim, mediante a distribuição geográfica da planta medicinal *L. ferrea* em diversos biomas brasileiros, principalmente, Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado (LUNA *et al.*, 2020) e diante da demanda de pesquisas sobre sazonalidade e metabolismo secundário em espécies nativas do Brasil, novos trabalhos neste campo do conhecimento devem ser desenvolvidos.

Diante disto, neste capítulo foi proposto avaliar a influência das variações sazonais nos teores de fenólicos totais, taninos e conteúdo de flavonoides nos extratos etanólicos da casca do caule de espécimes de *L. ferrea*, coletadas na Caatinga e Mata Atlântica, e também comparar seus perfis metabólicos, através da análise multivariada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Adicionalmente, o efeito da sazonalidade foi avaliado nas atividades antioxidante, antibacteriano, antifúngico, citotóxico em células tumorais C6 de gliomas de ratos e antidiabética pelo ensaio *in vivo* em camundongos.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Reagentes

Quercetina ( $\geq 95\%$ ), ácido tânico, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotioazolina-6-sulfônico (ABTS), ácido (+) - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico - Trolox ( $\geq 97\%$ ), agarose - tipo I e persulfato de potássio anidro ( $K_2S_2O_8$ ), dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos na sima-aldrich (Aldrich Brasil Ltda., Brasil). Ácido L-ascórbico ( $\geq 99,0\%$ ), etanol PA, carbonato de sódio anidro  $Na_2CO_3$  ( $\geq 99,5$ ) foram obtidos da Synth (LABSYNTH Produtos para laboratórios Ltda.). Ácido gálico monohidratado puríssimo e cloreto de alumínio III da (Vetec,  $\geq 99,5\%$ ). O reagente Folin – Ciocalteu's e a albumina sérica bovina – BSA foram adquiridos da Merck. Ácido acético glacial PA e hidróxido de sódio (Dinâmica). Caldo nutriente, extrato de malte, extrato de levedura, extrato de batata e ágar foram adquiridos da Acumedia (Acumedia, EUA). DMSO- $d_6$  e TMSP- $d_4$  (2,2,3,3- $d_4$ -3-trimetilsililpropionato de sódio). Os antibióticos empregados nos testes de suscetibilidade antimicrobiana foram benzilpenicilina, gentamicina, ciclopirox olamina (LOPROX®, 10 mg  $g^{-1}$ , Sanofi-Aventis) e anfotericina B. (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) DMEM Mix F12, penicilina G, estreptomicina, glicose, L-glutamina, piruvato e sorofetal fpram fornecidos pela Gibco (Grand Island, NY).

### 2.2.2 Coleta da planta

Fragmentos da casca do caule de *L. ferrea* foram coletadas nas quatro estações do ano: inverno, primavera, verão e outono nos dois biomas: Mata Atlântica [Jussari (15° 11' 29" S e 39° 29' 43" W), nos períodos de julho e dezembro de 2018 e março e junho de 2019] e na Caatinga [região do submédio São Francisco, em Juazeiro (09° 24' 42" S e 40° 29' 55" W), em julho e novembro de 2018 e abril e junho de 2019], ambos municípios do Estado da Bahia, Brasil. As exsiccatas foram registradas no Herbário RADAMBRASIL (HBS), Jardim Botânico, Salvador-BA, com os números 61849 e 61850 para os espécimens coletados em Juazeiro e Jussari, respectivamente.

### 2.2.3 Preparação dos extratos

Quantidades de fragmentos do material vegetal, moído e seco, das cascas do caule de *L. ferrea* foram separadamente submetidos à maceração com etanol, grau PA, por um período de 72 horas, com três repetições. As soluções alcoólicas obtidas foram filtradas por gravidade e destiladas à pressão reduzida em evaporador rotativo para a obtenção dos extratos etanólicos brutos. Os quais foram codificados conforme o bioma e estação de cada coleta como extrato etanólico da casca do caule da Caatinga: Inverno (CCI); Primavera (CCP); Verão (CCV) e Outono (CCO); Já o extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica, como: Inverno (CMI); Primavera (CMP); Verão (CMV) e Outono (CMO). Os rendimentos destes extratos e os dados a respeito do comportamento da chuva e da temperatura ao longo dos meses nas cidades de Juazeiro e Jussari – BA, onde foram coletadas os dois espécimens de *L. ferrea* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Informações sobre as datas da coleta, massa do material seco, rendimento dos extratos da casca do caule de *L. ferrea* coletados nas quatro estações do ano nos biomas da Caatinga e Mata Atlântica e o comportamento da chuva e da temperatura nos meses de coleta.

<b>Biomias</b>	<b>Estação</b>	<b>Período de coleta</b>	<b>Caule pulverizado (g)</b>	<b>Extrato*; Rendimento (%)</b>	<b>T<sub>min</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>máx</sub> (°C)</b>	<b>Precipitação (mm)</b>
<b>Caatinga</b>	Inverno	06/07/2018	250,90	CCI; 18,51	20°	29°	5
	Primavera	07/11/2018	573,79	CCP; 19,88	23°	35°	41
	Verão	09/04/2019	56,90	CCV; 21,82	23°	33°	53
	Outono	11/06/2019	202,93	CCO; 14,73	20°	29°	8
<b>Mata Atlântica</b>	Inverno	06/07/2018	742,00	CMI; 11,13	17°	24°	113
	Primavera	11/12/2018	1.979,46	CMP; 16,01	20°	29°	144
	Verão	09/03/2019	425,93	CMV; 11,40	21°	29°	161
	Outono	12/06/2019	528,78	CMO; 13,13	18°	24°	114

\*Extrato etanólico da casca do caule da Caatinga: Inverno (CCI); Primavera (CCP); Verão (CCV) e Outono (CCO); Já o extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica, como: Inverno (CMI); Primavera (CMP); Verão (CMV) e Outono (CMO). T<sub>min</sub>: Temperatura mínima; T<sub>máx</sub>: Temperatura máxima.



### 2.3 Determinação de fenólicos totais

A metodologia para a dosagem de fenólicos totais (FT) foi segundo método descrito por Ma *et al.* (2020), com poucas modificações. Foram misturados, sob abrigo de luz, em uma microplaca de 96 poços 20  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica do extrato etanólico da casca do caule ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{L}$  de solução aquosa do reagente de Folin – Ciocalteu (10% v v<sup>-1</sup>) e 60  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de carbonato de sódio (7,5 %, m v<sup>-1</sup>). O volume de cada poço foi completado para 300  $\mu\text{L}$  com água destilada. Em seguida, a mistura foi incubada por 20 minutos, em temperatura ambiente, sob o abrigo da luz. A curva de calibração foi construída, semelhantemente, com ácido gálico na faixa de concentração de 1,0 - 8,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Onde para cada ponto da curva foram misturados, em uma microplaca de 96 poços, uma alíquota da solução metanólica de ácido gálico (0,2  $\text{mg mL}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin – Ciocalteu (10% v v<sup>-1</sup>) e 60  $\mu\text{L}$  de solução de carbonato de sódio (7,5 %, m v<sup>-1</sup>), com aferimento do volume para 300  $\mu\text{L}$  com água destilada. O metanol foi utilizado como branco. Incubou-se a placa de 96 poços com os padrões por 20 minutos em temperatura ambiente sob o abrigo da luz direta. Após esse período, as absorvâncias foram lidas a 760 nm, em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). O experimento foi conduzido em triplicata e o teor de fenólico total (FT) foram expressos como média [ $\mu\text{g}$  de ácido gálico equivalente (EAG) / mg de extrato seco]  $\pm$  desvio padrão (DP) das triplicatas.

### 2.4 Determinação do conteúdo de flavonoides

A metodologia para a dosagem do conteúdo de flavonoides (CF) totais foi segundo Obeng *et al.* (2020) com poucas modificações. Para poços de uma microplaca de 96 poços foram transferidos 60  $\mu\text{L}$  da solução metanólica do extrato vegetal ( $2\text{ mg mL}^{-1}$ ), 6  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  (2% m v<sup>-1</sup>), com aferição do volume para 300  $\mu\text{L}$ , com água destilada. A microplaca foi incubada por 30 minutos, sob abrigo de luz. A curva de calibração foi construída com o padrão quercetina na faixa de concentração de 1,5 - 12,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As leituras das absorvâncias (amostra, padrão e branco) foram feitas após o período de incubação de 30 minutos, a 414 nm, em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). O experimento foi conduzido em triplicata. Os resultados de conteúdo de flavonoides (CF) foram expressos como média [ $\mu\text{g}$  de quercetina equivalente (EQ) / mg de extrato seco]  $\pm$  DP das triplicatas.

## **2.5 Quantificação de Taninos**

A quantificação dos teores de taninos (TT) foi por método da difusão radial, segundo Hagerman (1987) e Maier (2017). Uma solução tampão foi preparada com ácido acético ( $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e ácido ascórbico ( $60 \mu \mu\text{mol L}^{-1}$ ), com adição de solução de NaOH ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) até  $\text{pH} = 5,0$ . O meio sólido foi preparado pela mistura de uma alíquota desta solução tampão, com Agarose - tipo I, sob aquecimento e agitação ocasional, até completa solubilização. Após resfriamento desta mistura até  $45^\circ\text{C}$  foram adicionados  $0,10\text{g}$  de albumina sérica bovina – BSA, sob agitação. Alíquotas de  $09 \text{ mL}$  deste meio foram distribuídos em placas de Petri ( $9 \text{ cm}$  de diâmetro). Estas placas foram seladas com filme de PVC e armazenadas sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ , por  $72$  horas. Após este período, em cada placa, poços de  $7 \text{ mm}$  de diâmetro foram feitos sob o meio sólido, aos quais foram adicionados  $20 \mu\text{L}$  de uma solução a  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  do extrato vegetal  $50\%$  ( $\text{v v}^{-1}$ ) em metanol. A curva de calibração foi preparada com padrão de ácido tânico. A faixa de concentração empregada de ácido gálico foi de  $2,5 - 50 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os diâmetros dos halos das amostras de extratos e padrão foram medidos após  $72$  horas de incubação, a  $30^\circ\text{C}$ . O experimento foi feito em triplicata. Metanol  $50\%$  ( $\text{v v}^{-1}$ ) foi usado como branco.

## **2.6 Atividade antioxidante**

### **2.6.1. Ensaio DPPH**

O ensaio DPPH foi realizado de acordo com o método de Mercado-Mercado (2020), com modificações. Foram adicionados a uma placa de  $96$  poços  $280 \mu\text{L}$  da solução estoque de DPPH ( $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $20 \mu\text{L}$  da solução dos extratos. Concentrações dos extratos na faixa de  $10 - 1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram usadas para traçar os valores de  $\text{IC}_{50}$ . As placas foram incubadas ao abrigo da luz durante  $30 \text{ min}$  e as absorvâncias obtidas a  $515 \text{ nm}$ . A curva de calibração foi construída adicionando o volume de  $280 \mu\text{L}$  da solução do radical DPPH ( $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e alíquotas da solução do padrão trolox ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), completando o volume de  $300 \mu\text{L}$  com metanol para a construção da curva de calibração na faixa de concentração de  $1,0 - 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Após  $30 \text{ min}$  de incubação, a absorvância a  $515 \text{ nm}$  foi medida em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Locus). O experimento foi realizado em triplicata.

## 2.6.2 Ensaio ABTS

A determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS foi conforme método de Le Grandois *et al.* (2017), com modificações. O cátion do radical ABTS ( $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ) foi formado por reação das soluções aquosas de ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com persulfato de potássio ( $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Este reagente foi armazenado sob abrigo da luz, à temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente, a solução de  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  foi diluída com metanol até atingir absorvância na faixa de 0,8 – 1, a 734 nm, em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). Foram adicionados à placa de 96 poços 280  $\mu\text{L}$  da solução estoque do radical catiônico  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  e 20  $\mu\text{L}$  da solução dos extratos. Concentrações na faixa de 10 – 1,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos extratos vegetais foram usadas para traçar os valores de  $\text{IC}_{50}$ . A curva de calibração na faixa de 1,0 – 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi construída misturando volumes de 280  $\mu\text{L}$  da solução do radical e diferentes alíquotas da solução estoque do padrão trolox ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) acrescido de metanol para completar o volume dos poços (300  $\mu\text{L}$ ). Após 20 min de incubação, a absorvância a 734 nm foi medida por um espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.7 Análise multivariada por RMN de $^1\text{H}$

Soluções das amostras dos extratos (20 mg) foram preparadas em  $\text{DMSO-}d_6$ , contendo 0,02% de TMSP-  $d_4$  (2,2,3,3-d<sub>4</sub>-3-trimetilsililpropionato de sódio, 600,0  $\mu\text{L}$ ) e, em seguida, foram transferidas para tubos de RMN (5 mm). As experiências de RMN foram realizadas em um espectrômetro Varian Inova 500 MHz de 11,7 Tesla equipado com uma detecção inversa de 5 mm com gradiente de campo no eixo z ativamente blindado. Na aquisição em triplicata dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a janela espectral (*Spectral Width* – SW) foi ajustada para o intervalo de -1 a 11 ppm, com 32768 pontos. Foram adquiridos 64 aquisições (*Number of Scans* – NS) com pulso de 7,0  $\mu\text{s}$  (P1), tempo de aquisição de 5,5 s (*Acquisition* – AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 2,0 s (D1) e fator de ganho do receptor de 34 (RG). A temperatura foi controlada para 300K e o TMSP-  $d_4$  foi utilizado como padrão interno ( $\delta$  0,0). Os espectros foram processados no *software* ACD/Labs Release versão 12.01 aplicando multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz e transformada de Fourier de 64 k pontos. A correção de fase foi realizada manualmente e a correção da linha de base foi aplicada em toda a faixa espectral.

Todos os espectros processados de RMN de  $^1\text{H}$  foram convertidos para uma matriz que foi construída com auxílio do *software Origin* versão 8.0. Os sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram alinhados com o algoritmo *icoshift* no *Software MatLab* versão *R2017a*. Para isso, foram avaliados três parâmetros de entrada, *xt* (vetor de destino), *xp* (matriz) e *inter* (modo de alinhamento). Para *xt* foi usada a média 2, definida como 3 vezes o valor da média para obter melhor alinhamento de sinais com baixa intensidade. Em *xp* foi adicionada a matriz de dados. Para *inter* foi aplicado inicialmente o modo global “*whole*”, em seguida, uma sequência de 25 intervalos cuidadosamente definidos para alcançar o melhor resultado de alinhamento. O tratamento quimiométrico foi realizado com auxílio do programa *Pirouette*® versão 4.5 (*InfoMetrix Inc., Bothell, Washington, USA*). Os parâmetros e a seleção de variáveis foram otimizados a partir das análises exploratórias de dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , a fim de obter melhores resultados da técnica de PCA. Com relação aos parâmetros, foram usadas a normalização (norma um) e o autoescalamento, sendo excluídos os ruídos espectrais e regiões de solventes como a da água residual da supressão e do TMS- $d_4$ .

## **2.8 Atividades antibacteriana e antifúngica**

### **2.8.1. Microrganismos**

As nove linhagens, adquiridas na Coleção de Culturas Tropical (CCT)/ Fundação André Tosello, empregadas nos ensaios foram: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *B. cereus* (CCT 0096), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 0090), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028) *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (CCT0728), *Fusarium oxysporum* (CCT 3243). As culturas foram mantidas em meio sólido: bactérias em ágar nutriente; leveduras em extrato de malte e *F. oxysporum* em ágar dextrose de batata. A incubação das culturas de bactérias e fungos foi no período de 24h (36 °C) e 72 h (26 °C), respectivamente.

### **2.8.2 Ensaio de microdiluição em caldo**

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo normas técnicas do CLSI (2005), com pequenas modificações (ARAÚJO *et al.*, 2017; CAIRESet *al.*, 2018). Caldo de nutriente; extrato de malte/levedura e extrato de batata foram utilizados como meio de cultura para

crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Os extratos foram dissolvidos em solução aquosa de 20% de DMSO ( $v v^{-1}$ ). Para o teste de suscetibilidade antimicrobiana adicionou-se aos poços de uma placa de Elisa de 96 poços 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo apropriado em cada poço e 100  $\mu\text{L}$  de cada solução estoque da amostra a ser testada. Foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  do controle positivo (antibiótico ou antifúngico) e 100  $\mu\text{L}$  da mistura da solução do diluente. Após a diluição em série, as concentrações celulares finais foram ajustadas, comparando a turbidez da suspensão do microrganismo em água com o padrão na escala 0,5 de McFarland ( $\sim 1-2 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  desta suspensão foi transferida para cada poço da placa de Elisa. A concentração dos extratos variou de 2000 – 15,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas a 36 ° C (24 h) e 26 ° C (72 h) para crescimento de bactérias e fungos, respectivamente. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) de cada amostra foi determinado como a menor concentração que inibiu visualmente o crescimento do microrganismo. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os extratos foram considerados ativos quando inibiram o crescimento microbiano em concentrações inferiores a maior concentração testada (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os compostos benzilpenicilina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), gentamicina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ciclopirox olamina (400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e anfotericina B (250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram utilizados como controle positivo.

### **2.8.3 Determinação da concentração microbicida**

Na placa de 96 poços, dos que apresentaram ausência de turbidez, na leitura do ensaio de microdiluição em caldo, 10  $\mu\text{L}$  foram inoculados em ágar nutriente, para bactérias, e extrato de malte, para levedura, contidos em placas de Petri. Em seguida, as placas foram incubadas em temperaturas e períodos apropriados para cada microrganismo. Após incubação, a menor concentração testada, na qual havia ausência de crescimento microbiano visível, foi determinada como senso a concentração microbicida mínima (CMM) (ARAÚJO *et al.*, 2017).

### **2.9 Citotoxicidade em células de C6 glioma**

Os extratos da Caatinga (CCI, CCP, CCV e CCO) e Mata Atlântica (CMI, CMP, CMV e CMO) foram testados quanto à atividade citotóxica contra a linhagem celular C6 de glioma de rato, em parceria com o Laboratório de Biologia Celular e Neuroquímica (LabNq), da Universidade Federal da Bahia, seguindo a metodologia utilizada por (LEMES *et al.* 2019).

Os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) a uma

concentração de 14,3 mg mL<sup>-1</sup> e filtrados sob pressão. A amostra foi dissolvida em meio de cultura DMEM (Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 100 UI mL<sup>-1</sup> de penicilina G, 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina, glicose 7,0 mM, L-glutamina 2,0 mM, 0,011 g L<sup>-1</sup> de piruvato e soro fetal de vitelo a 10% (v / v) (Gibco, Grand Island, NY). Para a viabilidade celular, as células C6 de glioma foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2,4 x 10<sup>4</sup> células cm<sup>-2</sup> e tratados com concentrações entre 0,7 e 0,004 mg mL<sup>-1</sup> de cada extrato. Células cultivadas em meio de cultura com 0,5% de DMSO (v / v) ou apenas com o meio foram utilizadas como controle. As células foram tratadas durante 48 horas numa atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após o tratamento, adicionou-se 100 µL<sup>-1</sup> de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma) a 1,0 mg mL<sup>-1</sup> a cada poço e as células foram incubadas durante 2 h a 37 °C. Em seguida, os meios foram removidos e as células foram lisadas pela adição de dodecilsulfato de sódio, 20% (p v<sup>-1</sup>), dimetilformamida 50% (v v<sup>-1</sup>). A absorvância foi medida em um leitor de placas (THERMO PLATE<sup>R</sup>) a 595 nm. A viabilidade celular foi determinada como a porcentagem em absorvância em relação aos controles não tratados. O IC<sub>50</sub> foi determinado representando graficamente a porcentagem de viabilidade celular em função do logaritmo das concentrações dos extratos testados. A equação gerada no programa GraphPad Prism foi utilizada para o cálculo do EC<sub>50</sub>.

## **2.10 Estudo *in vivo* do potencial antidiabético dos extratos CCV e CMV e ácido elágico.**

A avaliação antidiabética dos extratos do caule obtidos na estação do verão nos biomas Caatinga (CCV) e Mata Atlântica (CMV) e ácido elágico foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Universidade Federal da Bahia, em parceria com a professora Cristiane Flora Villarreal, pelos seus orientandos Vívian Oliveira Souza e Pedro Santana Sales. Os oito extratos da casca do caule passaram por uma análise preliminar por HPLC para identificação do ácido elágico, a fim de selecionar para o estudo o que apresentou o maior teor de ácido elágico, o qual foi o CCV, e o menor, CMV.

### **2.10.1 Animais**

Experimentos foram realizados em camundongos machos C57BL/6 (25–30g) obtidos nas Instalações de Animais do Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ (Brasil). Os animais foram alojados em salas com temperatura controlada (22–25°C), sob um ciclo claro-escuro de 12:12

horas, com acesso a água e comida *ad libitum*. Todos os testes comportamentais foram realizados entre as 7:00 e às 19:00. Os procedimentos de tratamento e manuseio de animais estavam em conformidade com as diretrizes do National Institutes of Health para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH, 8023) e o Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais FIOCRUZ (CPqGM 025/2011). Foram feitos todos os esforços para minimizar o número de animais utilizados e evitar qualquer desconforto desnecessário (EVANGELISTA et al, 2018). O limiar nociceptivo foi avaliado ao longo de todo o período experimental, usando filamentos de von Frey, para confirmar o desenvolvimento de neuropatia diabética (EVANGELISTA *et al*, 2018). Testes bioquímicos avaliaram os efeitos dos tratamentos sobre parâmetros de função renal e hepática.

### **2.10.2 Modelo de neuropatia diabética**

O diabetes foi induzido por injeção intraperitoneal (i.p.) de uma solução de estreptozotocina ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) em tampão de citrato (pH 4,5) por três dias consecutivos (GUIMARÃES et al, 2013). O grupo naive recebeu tampão de citrato no lugar da estreptozotocina. Os níveis de glicose no sangue foram determinados em amostras de sangue obtida pela veia da cauda, usando glicosímetro digital Accu-Check (Roche Diagnósticos, Mannheim, Alemanha). Os camundongos foram considerados diabéticos quando os valores de glicemia excederam  $300 \text{ mg dL}^{-1}$ .

### **2.10.3 Delineamento e tratamentos**

Quatro semanas após a indução do modelo de diabetes, foram iniciados os tratamentos. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais ( $n = 6 / \text{grupo}$ ). Grupo 1 (naive) animais não diabéticos; o grupo 2 (veículo diabético) consistiram em camundongos diabéticos tratados diariamente com veículo; grupo 3 (camundongos diabéticos tratados diariamente com ácido elágico a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ; diluído em solução salina, grupo 4 [camundongos diabéticos tratados diariamente com extrato etanólico da casca do caule de *L. ferrea* do verão da Mata Atlântica (CMV)] e grupo 5 [camundongos diabéticos tratados diariamente com extrato etanólico da casca do caule de *L. ferrea* do verão da Caatinga (CCV)] com administração de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  (diluído em DMSO 5% em solução salina). Os tratamentos foram realizados por via oral diariamente em uma única dose por 28 dias consecutivos. A glicemia e o peso corporal foram registrados semanalmente, enquanto a ingestão de alimentos e água foi monitorada duas vezes por semana.

#### **2.10.4 Avaliação comportamental – Teste de Von Frey**

Os parâmetros sensoriais da neuropatia diabética foram avaliados ao longo do período experimental, usando o ensaio comportamental estabelecido que avalia o limiar nociceptivo mecânico (CHAPLAN, 1994) com filamentos de von Frey (Stoelting; Chicago, IL, EUA). Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas acrílicas (12 × 10 × 17 cm) com piso de grade de arame, permitindo acesso total ao aspecto ventral das patas traseiras, 20 minutos antes do início do teste. Uma série logarítmica de nove filamentos foi aplicada à superfície plantar da pata traseira ipsilateral para determinar a rigidez limiar necessária para a retirada de 50% da pata, de acordo com o método não paramétrico de Dixon, conforme descrito por Chaplan (1994) e colaboradores. Uma resposta positiva foi caracterizada pela remoção da pata, seguida por movimentos claros de dor. O desenvolvimento da neuropatia diabética foi caracterizado por alodinia mecânica, indicada pela redução do limiar de retirada da pata (em gramas).

#### **2.10.5 PCR em Tempo Real**

A expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NOS induzida e Nrf-2 na medula espinal e nervo isquiático de camundongos dos diferentes grupos experimentais foi avaliada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR). Os camundongos foram sacrificados por overdose anestésica e o segmento L4-L5 da medula espinal ou 1 cm do nervo isquiático bilateralmente de cada animal foi coletado e acondicionado em tubos livres de RNase, sendo imediatamente armazenado em freezer -80°C. Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de reagente Trizol (Gibco - BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.), a extração do RNA total foi realizada de acordo com as orientações do fabricante e a concentração foi determinada por medição fotométrica utilizando o aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Em seguida, o RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa utilizando-se o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems). A condição de ciclagem utilizada foi: 1º ciclo (25°C – 10 minutos), 2º ciclo (37°C – 1 hora), 3º ciclo (37°C – 1 hora) e 4º ciclo (4°C -  $\infty$ ) no termociclador MasterCycle gradiente (Eppendorf, EUA). O cDNA sintetizado foi armazenado à -20°C até o momento de uso. O cDNA obtido foi usado para análise da expressão quantitativa dos genes TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NOS induzida e Nrf-2 em reações de PCR. À reação de amplificação de qRT-PCR contendo 4,5  $\mu$ L da amostra de cDNA e 5,5  $\mu$ L de MIX formado por Taqman Master Mix (Applied Biosystems), sondas Taqman (Applied Biosystems) acima indicadas e água ultrapura foram realizadas em duplicata no Sistema



de Detecção ABI Prism 7500 Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob condições do padrão de ciclagem térmica. Os valores médios de Cycle threshold (Ct) foram usados para calcular a expressão do gene estudado, com normalização ao controle interno (GAPDH - Mm 9999915\_g1) usando o método  $2^{-\Delta Ct}$ . Amostras com coeficiente de variação maior que 5% foram excluídas. Um controle sem amostra (NTC) e outro sem a enzima para transcrição reversa (No-RT) também foram incluídos.

#### **2.10.6 Parâmetros bioquímicos**

No final do tratamento, as amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas a 4000 rpm por 10 min, a uma temperatura de 4 °C para obter soro, que foi armazenado em -20 °C até momento da análise. Os seguintes parâmetros foram determinados: creatinina, nitrogênio da uréia no sangue (BUN), albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT). Dosagens foram feitas usando a automação Wiener lab®.

#### **2.11 Análise Estatística**

Todos os dados foram expressos como valores médios  $\pm$  DP, submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey (o nível de significância foi estabelecido em  $P < 0,02$ ). Correlações pareadas entre diferentes variáveis de resposta também foram conduzidas para confirmar as correlações existentes. Os da atividade antidiabética são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, ou média  $\pm$  erro padrão da média das medidas feitas em seis animais em cada grupo. Os dados foram analisados usando ANOVA 2way, seguida pelas comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .

#### **2.12 Resultados**

Os teores de fenólicos totais, flavonoides, taninos e potencial antioxidante foram determinados em todos os extratos da casca do caule de *L. ferrea* como apresentados na Tabela 02, bem como, a análise quimiométrica por RMN de  $^1H$  (Figuras 2 e 3), atividade antimicrobiana (Tabela 3), citotóxica em células tumorais C6 de glioma (Figura 4) e antidiabética (Figura 5 – 11; Tabela 4).

Tabela 2: Resultado dos teores de fenólicos, flavonoides e taninos totais e atividade antioxidante dos extratos etanólicos da casca do caule de *L. ferrea*.

Extratos*	Teores ( $\mu\text{g mg}^{-1} \pm \text{DP}$ )			Atividade antioxidante ( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DP}$ )	
	Fenólicos	Flavonoides	Taninos	DPPH	ABTS
CCI	328,82 $\pm$ 33,81 <sup>(a)</sup>	4,89 $\pm$ 0,25	308,25 $\pm$ 62,85	7,93 $\pm$ 0,10	6,72 $\pm$ 0,08
CCP	327,95 $\pm$ 10,53 <sup>(a)</sup>	5,96 $\pm$ 0,11	326,37 $\pm$ 27,23	7,60 $\pm$ 0,08	5,96 $\pm$ 0,08
CCV	336,34 $\pm$ 18,1 <sup>(b)</sup>	7,36 $\pm$ 0,19	328,38 $\pm$ 30,19	7,58 $\pm$ 0,08	4,86 $\pm$ 0,06
CCO	332,00 $\pm$ 12,8 <sup>(a)</sup>	7,75 $\pm$ 0,31	278,06 $\pm$ 17,43	7,23 $\pm$ 0,09	7,34 $\pm$ 0,07
CMI	342,71 $\pm$ 16,27 <sup>(a)</sup>	4,23 $\pm$ 0,11	328,38 $\pm$ 30,19	8,08 $\pm$ 0,09	9,53 $\pm$ 0,11
CMP	350,24 $\pm$ 20,86 <sup>(a)</sup>	3,15 $\pm$ 0,11	338,45 $\pm$ 17,43	6,82 $\pm$ 0,07	9,47 $\pm$ 0,11
CMV	271,5 $\pm$ 31,4 <sup>(b)</sup>	5,70 $\pm$ 0,38	217,67 $\pm$ 17,43	9,18 $\pm$ 0,10	12,66 $\pm$ 0,12
CMO	301,9 $\pm$ 29,18 <sup>(a)</sup>	8,75 $\pm$ 0,55	268,06 $\pm$ 30,19	7,64 $\pm$ 0,09	9,99 $\pm$ 0,11
Valor Médio	326,93 $\pm$ 21,62	5,97 $\pm$ 0,25	299,20 $\pm$ 29,11		
Trolox				4,34 $\pm$ 0,05	6,03 $\pm$ 0,06

Letras diferentes entre parênteses indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste de variância de Tukey ( $< 0,02$ ). Resultados expressos como média aritmética ( $\pm$ ), desvio padrão N=3. \*Extratos etanólicos da casca do caule dos biomas: **Caatinga**: Inverno (CCI); Primavera (CCP); Verão (CCV) e Outono (CCO) e da **Mata Atlântica**: Inverno (CMI); Primavera (CMP); Verão (CMV) e Outono (CMO).  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG: microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato seco; ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ: microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de extrato seco) e  $\mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT: microgramas equivalentes de ácido tânico por miligrama de extrato seco)

### 2.12.1 Teor total de fenóis

O conteúdo total fenóis de todos os extratos preparados de *L. ferrea* (bioma da Caatinga e Mata Atlântica), determinada pelo método de Folin-Ciocalteu, foi expresso como equivalente de ácido gálico. Os resultados experimentais indicaram grandes quantidades de fenólicos nos extratos do caule de *L. ferrea* coletados nas quatro estações do ano, com percentual médio de  $32,39 \pm 2,16$  % (massa/massa), e de  $326,93 \pm 21,62 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG. Ao comparar os valores entre os biomas, os maiores foram apresentados por CMP ( $350,24 \pm 20,86 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG) e CCV ( $336,34 \pm 18,10 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG). O conteúdo fenólico dos extratos da Caatinga, nas quatro estações, não apresentou diferença significativa. Já na Mata Atlântica o resultado na estação do verão foi significativamente diferente dos da primavera e inverno. Os teores de fenólicos totais nos dois biomas, quando a coleta foi feita na mesma estação, não apresentaram valores significativamente diferentes, exceto, para o verão, onde os teores de fenólicos foram de  $336,34 \pm 18,10$  e  $271,51 \pm 31,4 \mu\text{g mg}^{-1}$  EAG, para os extratos da Caatinga e Mata Atlântica, respectivamente.

### 2.12.2 Conteúdo total de flavonoides

O conteúdo total de flavonóides dos extratos brutos de *L. ferrea* foi expresso como equivalente de quercetina. Os extratos do caule apresentaram teor de flavonoides totais médio em torno de  $0,59 \pm 0,02$ % (massa/massa), e de  $5,97 \pm 0,25 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ, que foi menor em relação ao obtido para fenólico total de  $32,39 \pm 2,16$  % ( $326,93 \pm 21,62 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG). Os maiores teores de flavonoides foram obtidos nos extratos do outono, nos dois biomas [Caatinga: CCO ( $7,75 \pm 0,31 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ) e Mata Atlântica: CMO ( $8,75 \pm 0,55 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ)], sem diferença significativa ao nível de confiança de 98%. Todos os extratos do caule da Caatinga coletados no inverno (CCI), primavera (CCP) e verão (CCV) apresentaram maiores teores de flavonoides, com valores diferentes estatisticamente [ $4,89 \pm 0,25$ ;  $5,96 \pm 0,04$  e  $7,36 \pm 0,19 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ], respectivamente, quando comparados com os da Mata Atlântica. Na Caatinga, o teor de flavonoides do extrato do outono foi estatisticamente diferente do inverno e primavera. Entretanto, para os da Mata Atlântica as diferenças significativas nos teores foram notadas em todas as estações estudadas, onde os valores aumentaram do inverno para o outono.

### 2.12.3 Teor de Taninos

Os maiores teores de taninos nos extratos, expressos como equivalentes de ácido tânico, foram obtidos no do verão, da Caatinga (CCV:  $328,38 \pm 30,19 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT) e no da primavera, da Mata Atlântica (CMP:  $338,45 \pm 17,43 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT). Ao comparar os teores nas mesmas estações do ano, entre os dois biomas, foi verificado que estes não sofreram influência com a variação sazonal. Entretanto, exceto para o obtido no verão, onde os valores apresentaram diferenças significativas, com o extrato do caule da Caatinga (CCV) mais rico em taninos, que o da Mata Atlântica (CMV:  $217,67 \pm 17,43 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT). Os extratos, de forma geral, apresentaram altas concentrações deste metabólito, percentual médio de  $29,92 \pm 2,91\%$  (massa/massa);  $299,20 \pm 29,11 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT.

### 2.12.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos da casca do caule de *L. ferrea* foi expressa em concentração capaz de inibir 50% (IC<sub>50</sub>) os radicais DPPH e ABTS. Os valores de IC<sub>50</sub> dos extratos do caule para o radical DPPH variaram significativamente nos biomas estudados, ao longo de todas as estações, com exceção do inverno. Estes foram de  $7,60 \pm 0,08$ ;  $7,58 \pm 0,08$  e  $7,23 \pm 0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os da Caatinga na primavera, verão e outono, respectivamente. Enquanto de  $6,82 \pm 0,07$ ;  $9,18 \pm 0,10$  e  $7,64 \pm 0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para os da Mata Atlântica, nas mesmas estações. Os extratos com maior efeito antioxidante foram o do outono, na Caatinga e o da primavera, na Mata Atlântica, com maior atividade que a do padrão (IC<sub>50</sub> trolox<sub>DPPH</sub> =  $6,34 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Já no ensaio de eliminação de radicais livres ABTS, os valores de IC<sub>50</sub> dos extratos em todas as estações, nos biomas estudados, mostraram diferenças significativas, com a maior atividade antioxidante obtida para os da Caatinga, com faixa de valores de IC<sub>50</sub> de  $4,86$  a  $7,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em comparação com os da Mata Atlântica. Os extratos mais antioxidantes, pelo método ABTS, foram o do verão (IC<sub>50</sub> de  $4,86 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), na Caatinga e o da primavera (IC<sub>50</sub> de  $9,47 \pm 0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), na Mata Atlântica, ambos, foram mais ativos que o padrão (trolox, IC<sub>50</sub> de  $6,03 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 2.12.5 Análise multivariada

Análises de PCA (*Principal Component Analysis*) dos extratos do caule de *L. ferrea* foram realizadas excluindo o sinal residual do DMSO-*d*<sub>6</sub>, as regiões de ruídos e as regiões dos espectros

que não contribuíram para o resultado de discriminação, além disso, estas regiões de exclusão foram verificadas de forma que proporcionassem a melhor discriminação das amostras (Figura 1). Ao comparar os perfis metabólicos ou variações metabólicas nos extratos obtidos em todas as estações do ano, em cada bioma, foram observados dois padrões discriminantes principais de agrupamento com relação à procedência geográfica, onde os escores negativos são referentes aos da Caatinga e os positivos aos da Mata Atlântica. Os extratos da Caatinga apresentam diferenças na composição química quando comparados aos da Mata Atlântica, nas mesmas estações, como indicado pelas distâncias entre os pontos no gráfico de PCA (Figura 2).

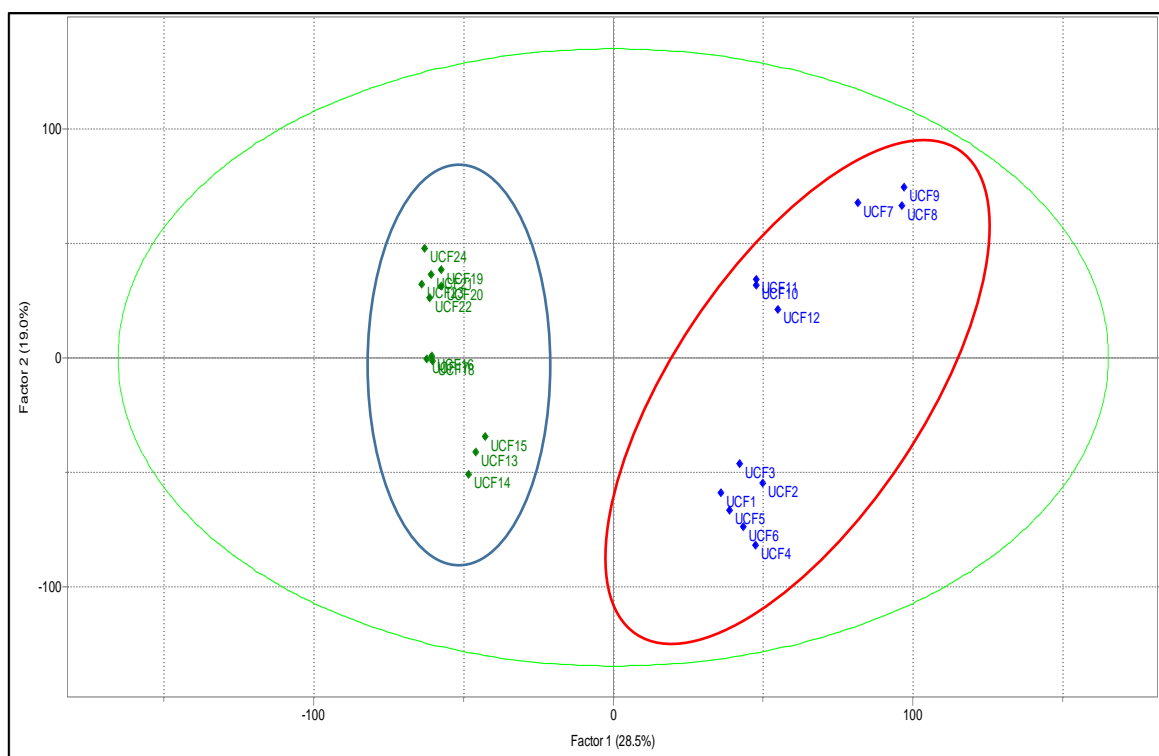


Figura 2: Gráfico de escores (PC1 × PC2) para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos (47,5 % de variância). Análise de agrupamento hierárquica dos componentes principais representando a relação de similaridade da composição dos extratos. Extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica: (UCF1, UCF2 e UCF3 = CMI); Primavera (UCF4, UCF5 e UCF6 = CMP); Verão (UCF7, UCF8 e UCF9 = CMV) e Outono (UCF10, UCF11 e UCF12 = CMO); já o extrato etanólico da casca do caule da Caatinga, como: Inverno (UCF13, UCF14 e UCF15 = CCI); Primavera (UCF16, UCF17 e UCF18 = CCP); Verão (UCF19, UCF20 e UCF21 = CCV) e Outono (UCF22, UCF23 e UCF24 = CCO).

A Figura 3 mostra o dendograma para os resultados de HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). Os resultados foram separados em dois grandes grupos, que confirmaram os obtidos na

PCA, separando as amostras da Mata Atlântica (UCF1 a UCF12) e Caatinga (UCF13 a UCF24). Uma avaliação no dendrograma mostra, no grupo das amostras da Caatinga, agrupamentos existentes entre os extratos do Outono/Verão e Primavera/Inverno. Já para as da Mata Atlântica, os agrupamentos no dendrograma mostram apenas a similaridade entre as do Inverno/Primavera.

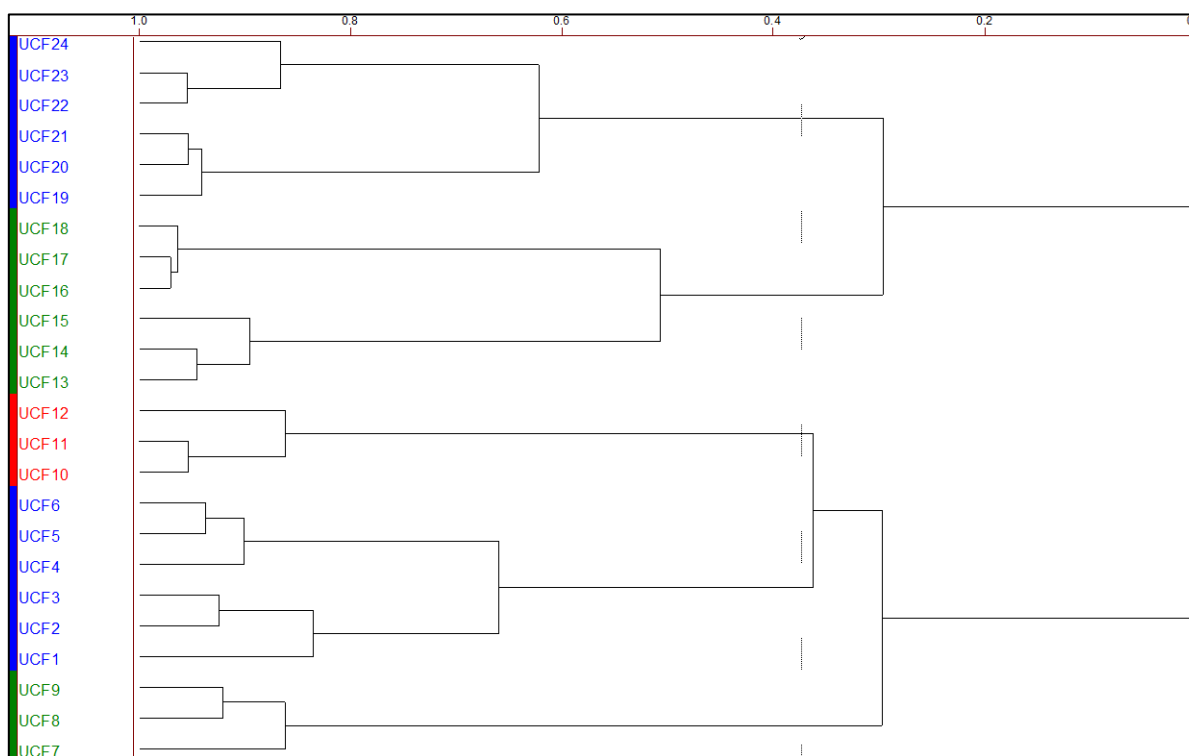


Figura 3: Análise de agrupamento hierárquica dos componentes principais representando a relação de similaridade da composição dos extratos. Extrato etanólico da casca do caule da Mata Atlântica: (UCF1, UCF2 e UCF3 = CMI); Primavera (UCF4, UCF5 e UCF6 = CMP); Verão (UCF7, UCF8 e UCF9 = CMV) e Outono (UCF10, UCF11 e UCF12 = CMO); já o extrato etanólico da casca do caule da Caatinga, como: Inverno (UCF13, UCF14 e UCF15 = CCI); Primavera (UCF16, UCF17 e UCF18 = CCP); Verão (UCF19, UCF20 e UCF21 = CCV) e Outono (UCF22, UCF23 e UCF24 = CCO).

### 2.12.6 Atividade antimicrobiana

Todos os valores de CIMs e CMMs para os microrganismos testados estão apresentados na Tabela 4. Os extratos do caule da Mata Atlântica, em todas as estações, apresentaram maior efeito para as linhagens Gram-positivas, que os da Caatinga, com destaque para os do inverno (CMI) e primavera (CMO), com valores de CIMs de 250, 125, 500 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 250, 62,5, 500 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *B. cereus*, respectivamente. O maior efeito

bactericida desses extratos foi para *B. cereus* com CMM de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os extratos etanólicos da casca do caule da Caatinga, obtidos em todas as estações do ano, apresentaram atividade bacteriostática contra Gram-negativas, todos com valores de CIMs de 1000 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente (CIM = 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Destes, o do verão na Caatinga (CCV) foi o mais ativo e o único bactericida para *P. aeruginosa*, Gram-negativa, (CMM = 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O extrato oriundo do inverno na Caatinga, dentre todos os testados, foi seletivo para *C. albicans*, mostrando efeito fungistático (CIM = 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Tabela 3: Atividade antimicrobiana de extratos do caule *L. ferrea*

*Extratos	CIM/CMM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )													
	Gram-positiva								Gram-negativa				Fungos	
	<i>Sa</i>		<i>Sep</i>		<i>Bs</i>		<i>Bc</i>		<i>Pa</i>		<i>Ec</i>		<i>Ca</i>	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
CCI	500	1000	>2000		1000	1000	500		500	>2000	1000	>2000	2000	>2000
CCP	500	1000	>2000		2000	>2000	250	>2000	500	>2000	1000	>2000	>2000	
CCV	500	1000	>2000		500	2000	250	>2000	500	2000	1000	>2000	>2000	
CCO	500	1000	>2000		1000	>2000	250	>2000	500	>2000	1000	>2000	>2000	
CMI	250	500	125	500	500	500	250	>2000	>2000		>2000		>2000	
CMP	250	500	62,5	1000	500	500	250	>2000	>2000		>2000		>2000	
CMV	250	1000	1000	2000	2000	2000	250	>2000	>2000		>2000		>2000	
CMO	500	500	1000	2000	2000	>2000	250	>2000	>2000		>2000		>2000	
benzilpenicilina	0,04	>25	2,2	>25	0,08	0,16								
gentamicina									1,25	>5	0,63	>5		
ciclopirox olamina													12,5	>25

\*Extratos etanólicos da casca do caule dos biomas: **Caatinga**: Inverno (CCI); Primavera (CCP); Verão (CCV) e Outono (CCO) e da **Mata Atlântica**: Inverno (CMI); Primavera (CMP); Verão (CMV) e Outono (CMO). *Sa*- *Staphylococcus aureus*; *Sep*- *Staphylococcus epidemirdis*; *Bs*-*Bacillus subtilis*; *Bc*- *Bacillus cereus*; *Ec*- *Escherichia coli*; *Pa*- *Pseudomonas aeruginosa*; *Ca*- *Candida albicans*. Concentração inicial: benzilpenicilina- 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; gentamicina - 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; ciclopirox olamina – 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . > Não teve efeito na maior concentração testada.



### 2.12.7. Citotoxicidade em células de C6 glioma

No ensaio de citotoxicidade, os extratos das estações do inverno (CMI), primavera (CMP) e verão (CMV), da Mata Atlântica, foram ativos contra a linhagem celular C6 de glioma de rato, com valores de  $EC_{50}$  de 0,13; 0,23 e 0,5  $mg mL^{-1}$ , respectivamente (Figura 4). Contudo, os da Caatinga, em todas as estações (CCI, CCP, CCV e CCO), bem como, o do outono da Mata Atlântica (CMO) foram inativos frente a esta linhagem. O controle positivo temozolomida teve uma  $EC_{50}$  560  $\mu mol L^{-1}$  de  $\mu M$ .

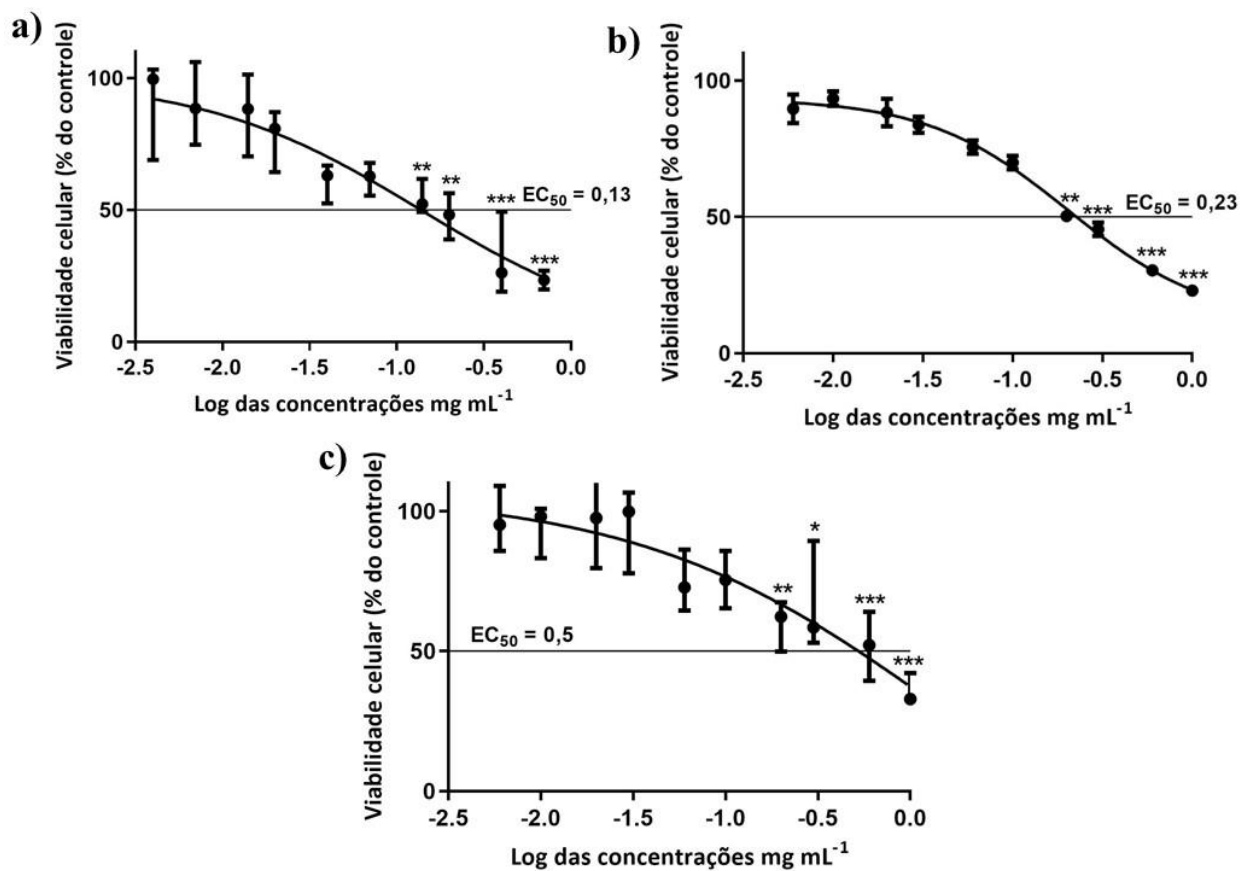


Figura 4. Curva da viabilidade celular da linhagem C6 de glioma de rato após tratamento com extratos do caule de *L. ferrea* da Mata Atlântica, obtidos nas estações do inverno, CMI, (a); primavera, CMP, (b) e verão, CMV, (c).

## 2.12.8 Atividade antidiabética

### 2.12.8.1 Efeito do tratamento com extratos etanólicos da casca do caule de *L. ferrea* e do ácido elágico na glicemia em jejum

As medidas de glicemia foram realizadas antes da indução do modelo e durante todo o período experimental, nos dias 7, 14, 21 e 28. Antes da indução ao diabetes não houve qualquer diferença entre os níveis glicêmicos dos grupos (Figura 5). Após a indução, o grupo veículo apresentou níveis glicêmicos significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive, que se mantiveram durante todo o período, demonstrando o estabelecimento do modelo de diabetes. O grupo tratado com ácido elágico apresentou diferença estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$ ), com médias de glicemia maiores, também durante todo o período experimental. O grupo tratado com o extrato (CMV) apresentou médias de glicemia significativamente diferentes em relação ao grupo naive na segunda ( $p < 0,05$ ) e quarta ( $p < 0,001$ ) semana do tratamento. Contudo, o grupo 5 foi retirado da análise dos resultados, pois a administração do extrato CCV causou a morte dos camundongos antes de finalizar o experimento.

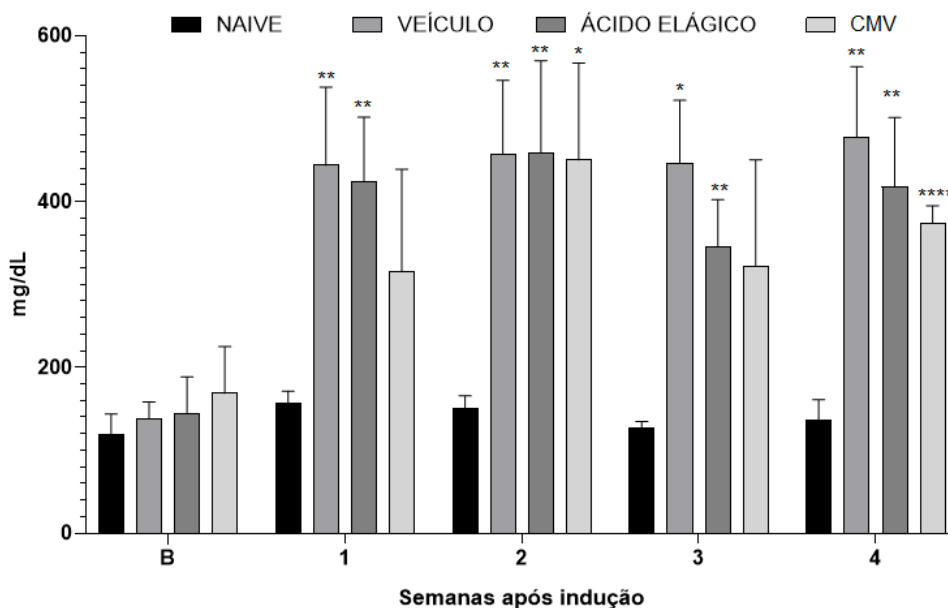


Figura 5. Avaliação da glicemia durante o período experimental. \*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,05$ ); \*\*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$ ).

### 2.12.8.2 Efeito do tratamento com o extrato etanólico CMV e do ácido elágico na massa corporal, ingestão de alimentos e água

As figuras 6, 7 e 8 mostram a evolução da massa corporal, ingestão de alimento e água nos grupos experimentais durante o tratamento de 28 dias, respectivamente. A massa dos camundongos foi monitorada ao longo do período experimental. Houve redução de massa corporal nos camundongos diabéticos no tempo de 3 semanas de tratamento ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação ao grupo naive, que não foi induzido ao diabetes. O grupo CMV não apresentou redução quando comparado ao grupo naive no fim do período experimental.

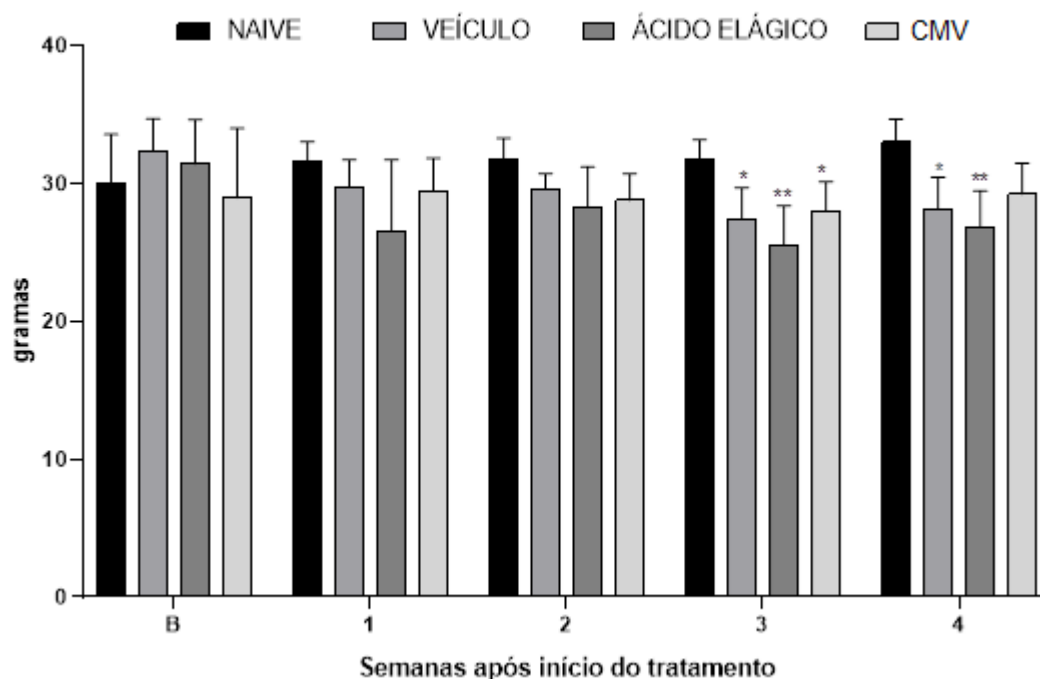


Figura 6. Avaliação do peso corporal durante o período experimental. \*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,05$ ); \*\*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$ ).

Na primeira e segunda semana de tratamento os animais diabéticos apresentaram aumento do consumo de água com relação ao grupo naive ( $p < 0,05$ ). Na terceira semana de tratamento, apenas o grupo veículo e ácido elágico diferiram em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). No período final do experimento, os grupos tratados com ácido elágico e CMV, apresentaram diferença estatística em comparação ao grupo naive ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ,

respectivamente), não reduziram a polidipsia, e o grupo tratado com ácido elágico também apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo veículo ( $<0,05$ ).

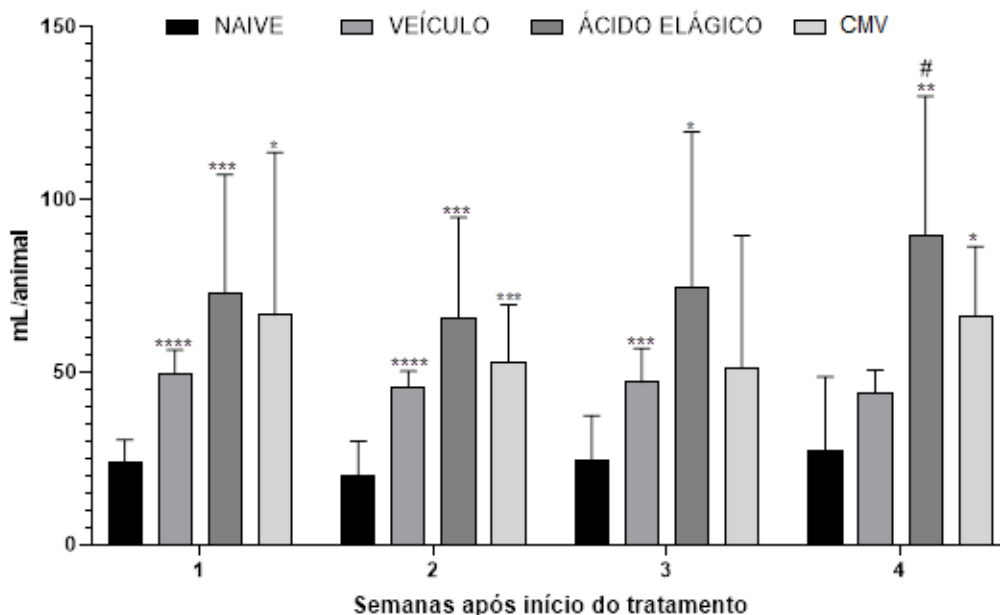


Figura 7. Consumo de água durante o período de tratamento. \*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,05$ ); \*\*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$ ); \*\*\*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,0001$ ); # Significância estatística em relação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ).

Na primeira semana de tratamento não houve diferença significativa no consumo da ração entre os grupos avaliados. A partir da segunda semana os grupos que receberam veículo e ácido elágico aumentaram o consumo em relação ao grupo naive ( $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$  na 2ª semana;  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  na 3ª semana respectivamente). Ao fim do experimento (4ª semana), todos os grupos diabéticos exibiram aumento do consumo de ração em relação ao grupo naive, não diabético. Nesse tempo, o grupo CMV apresentou redução do consumo quando comparado ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ).

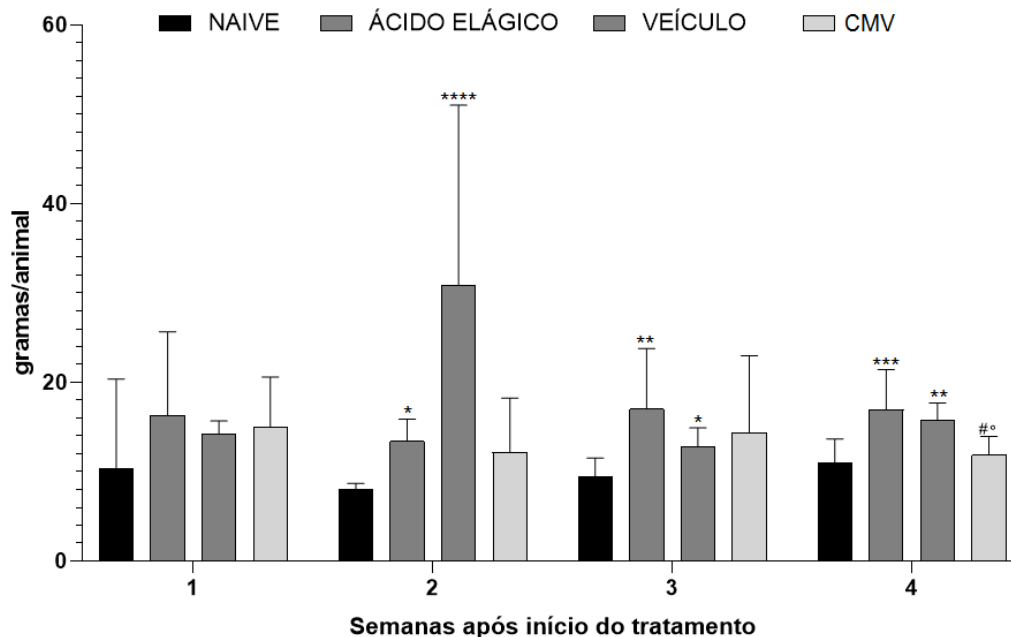


Figura 8. Consumo de ração durante o período de tratamento. \*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,05$ ); \*\*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$ ); \*\*\*Significância estatística em relação ao grupo naive ( $p < 0,0001$ ); # Significância estatística em relação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ).

### 2.12.8.3 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico

A figura 9 mostra o efeito dos tratamentos sobre a neuropatia diabética sensorial, avaliada pela mensuração do limiar nociceptivo mecânico dos camundongos. Os limiares foram medidos antes da administração solução salina, ácido elágico ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e CMV ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ), e uma hora após sua administração (1h). Os pontos B1, B2 e B3 representam as avaliações comportamentais antes da indução do diabetes. Quatro semanas após a indução do modelo de diabetes há diminuição dos limiares nociceptivos mecânicos dos animais em relação ao grupo naive, não diabético. Esse resultado, interpretado como desenvolvimento de alodinia mecânica, indica a instalação da neuropatia sensorial diabética. O tratamento com ácido elágico aumentou o limiar nociceptivo mecânico em relação ao veículo ao longo do período experimental ( $p < 0,05$ ), indicando efeito antinociceptivo na neuropatia sensorial diabética. O tratamento com CMV foi

capaz de aumentar o limiar em relação ao grupo veículo nos dias 17 e 22 de tratamento, mas esse efeito antinociceptivo não se manteve.

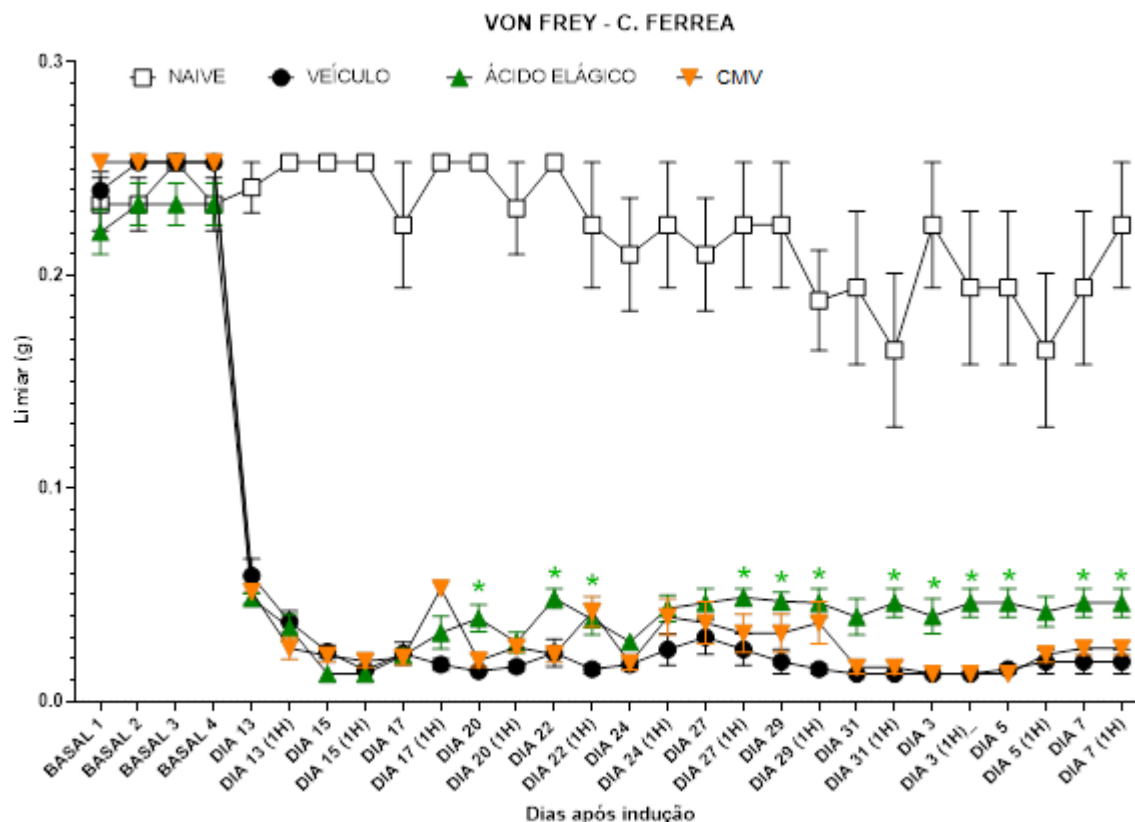


Figura 9. Efeito do ácido elágico e CMV sobre o limiar nociceptivo mecânico em camundongos com neuropatia diabética. \*Significância estatística em relação ao veículo ( $p < 0,05$ ).

#### 2.12.8.4 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real

Os níveis da expressão de RNAm de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS induzida e Nrf2 foram avaliados na medula espinal (Figura 10) e nervo isquiático (Figura 11) de camundongos dos diferentes grupos, por PCR em Tempo Real, no fim do período experimental. Os dados demonstram que os animais neuropáticos tratados com veículo apresentaram valores elevados de RNAm de IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), iNOS induzida (C) e do fator de transcrição Nrf2 (D) em relação ao grupo naivo ( $p < 0,05$ ). Em camundongos neuropáticos tratados com ácido elágico (100 mg kg<sup>-1</sup>), mas não com CMV (500 mg kg<sup>-1</sup>), os níveis de mRNA de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e iNOS induzida foram reduzidos ( $p$

<0,05), enquanto os de Nrf-2 foram aumentados ( $p < 0,05$ ). O mesmo perfil de efeito foi observado tanto na medula espinal quanto no nervo isquiático.

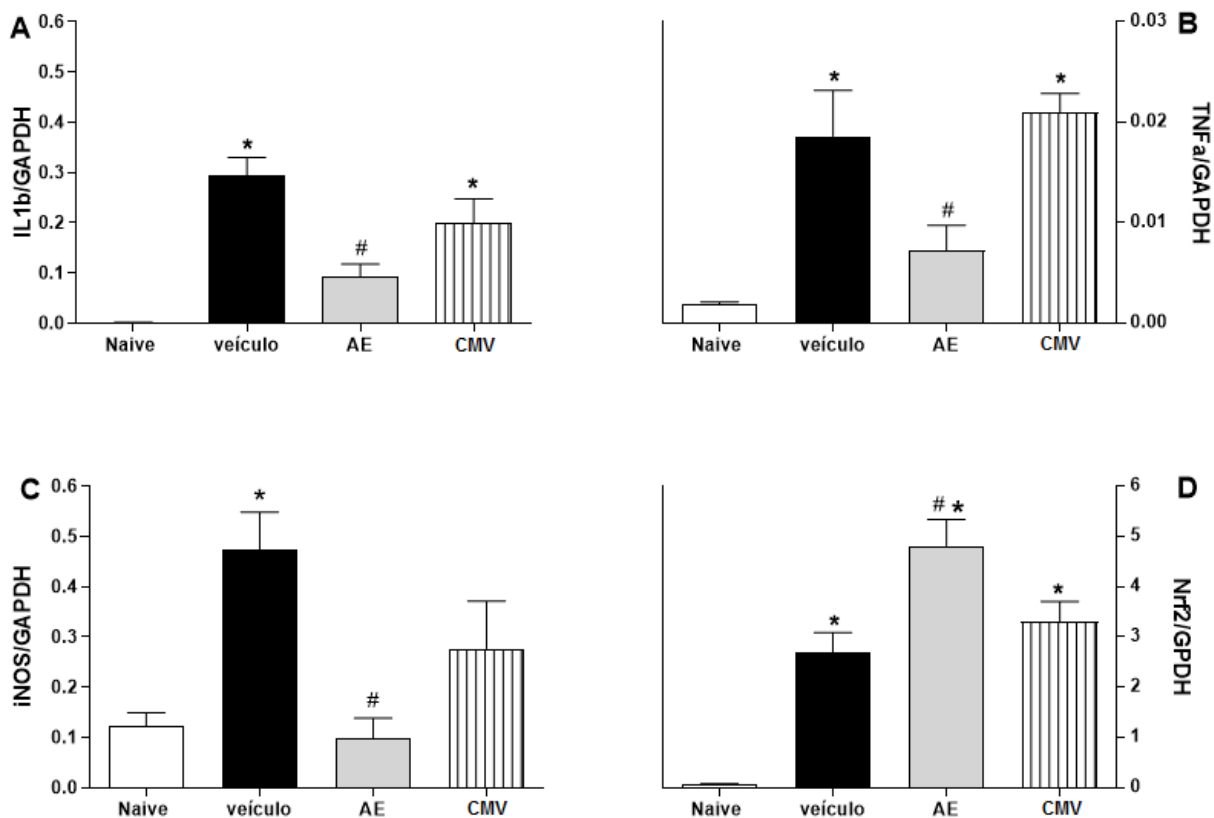


Figura 10: Efeito do ácido elágico e EECCFMIII sobre o perfil de expressão gênica na medula espinal de camundongos com neuropatia diabética. \* Significativamente diferente do grupo naive ( $p < 0,05$ ). # Significativamente diferente do grupo veículo ( $p < 0,05$ ).

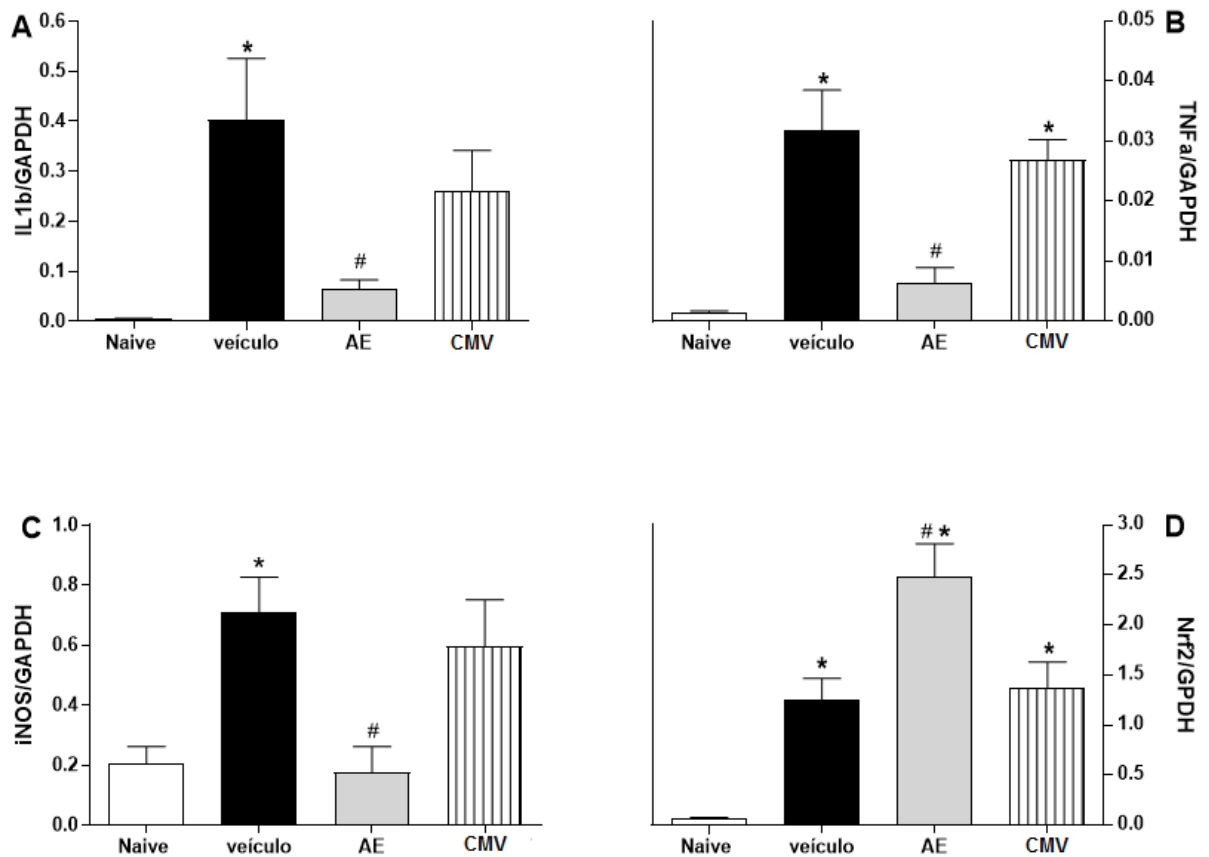


Figura 11: Efeito do ácido elágico e CMV sobre o perfil de expressão gênica no nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética. \*Significativamente diferente do grupo naive ( $p < 0,05$ ). #Significativamente diferente do grupo veículo ( $p < 0,05$ ).

### 2.12.8.5 Parâmetros bioquímicos

No fim do período experimental amostras de sangue foram coletadas para a realização das análises bioquímicas. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos com relação aos parâmetros analisados: AST (Aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), uréia, creatinina e albumina. Esses dados indicam que os tratamentos com o extrato CMV e ácido elágico não induziram toxicidade sistêmica detectável (Tabela 4).



Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Parâmetro	Naive	Veículo	Ácido Elágico	CMV
AST	122,2 ± 74,79	125,00 ± 45,69	143,67 ± 75,69	100,00 ± 23,93
ALT	85,67 ± 91,98	82,60 ± 14,12	73,00 ± 21,64	61,75 ± 13,89
URÉIA	52,50 ± 4,64	60,20 ± 13,20	60,33 ± 7,58	43,00 ± 15,30
CREATININA	0,32 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,42 ± 0,08	0,35 ± 0,06
ALBUMINA	3,22 ± 0,29	3,04 ± 0,39	3,00 ± 0,53	3,30 ± 0,42

\*Os valores são expressos como média ± S.E.M. (n = 6 / grupo). Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia, creatinina, albumina; Veículo: animais diabéticos sem tratamento; Naive: grupo não diabético; Ácido elágico (100 mg kg<sup>-1</sup>); CMV (500 mg kg<sup>-1</sup>).

### 2.13 Discussão

Os teores de fenólicos e taninos totais obtidos não apresentaram valores significativamente diferentes nas estações, ao se comparar nos dois biomas estudados. Estes resultados podem implicar que a taxa de acúmulo desses compostos estava próximo do nível de saturação em todos os casos, pois há um limite na medida em que os fitoquímicos podem se acumular em um material biológico sob condições particulares (ROUTRAY; ORSAT, 2014). Exceto no extrato do verão, onde o conteúdo total de fenólicos e taninos (Tabela2) foi significativamente maior para a Caatinga (336,34 ± 18,1 µg mg<sup>-1</sup> de EAG; 271,51 ± 31,4 µg mg<sup>-1</sup> de EAT) do que na Mata Atlântica (328,38 ± 30,19 µg mg<sup>-1</sup> de EAG; 217,67 ± 17,43 µg mg<sup>-1</sup> de EAT), respectivamente.

Os estresses abióticos no verão da Caatinga são maiores do que na Mata Atlântica, com temperaturas mais altas e menor taxa de precipitação, os quais influenciam no metabolismo da via dos fenilpropanóides, com aumento na produção de compostos fenólicos. Estas condições, no verão, da Caatinga, foram mais estressoras para espécimens de *L. ferrea*, em relação as da Mata Atlântica. Adicionalmente, quando uma espécie é submetida a estresse abiótico ou biótico vários genes são ativados ou desativados, resultando em alteração dos níveis de vários metabólitos (BEREZINA, 2017; RIBEIRO; CAMILO *et al.*, 2020).

Ao avaliar, independentemente, os biomas, pode-se inferir que na Caatinga as variações sazonais associadas às diferentes estações não mostraram diferenças estatísticas na produção de compostos fenólicos e taninos totais. Enquanto na Mata Atlântica os maiores teores destes

metabólitos foram obtidos na primavera, para fenólicos, e no inverno, para taninos. O desenvolvimento do material vegetativo se inicia na primavera e os tecidos mais novos produzem mais compostos fenólicos, especialmente taninos, em comparação com tecidos velhos e maduros. Além disto, na primavera, as temperaturas altamente flutuantes e períodos de seca podem favorecer o aumento das concentrações de fenólicos (NCUBE, 2011). Em relação ao aumento de teores de taninos no inverno, pode ser inferido pelo menor índice de precipitação e temperatura mais baixa, neste bioma. Indicando que, para uma mesma espécie, sob influência de estressores ambientais diferentes, existem diversos padrões de variações sazonais responsáveis pelas flutuações nas concentrações dos metabólitos.

As influências das variações sazonais foram mais evidentes para o conteúdo de flavonoides totais dos extratos, com diferenças significativas no inverno, primavera e verão. Nestas estações, os extratos da Caatinga apresentaram maiores teores do metabólito em relação aos da Mata Atlântica, com aumento das concentrações nos do inverno e verão. Isso confirma que os efeitos estressores que assolam a Caatinga favorecem as vias metabólicas também para a produção de flavonoides (TALHAOUI *et al.*, 2015). Estes, também podem fornecer proteção contra a radiação ultravioleta prejudicial (UV-B), por atuarem como uma barreira, devido aos seus máximos de absorção na região UV. Além disso, as temperaturas aumentaram do inverno para a primavera em Juazeiro, bioma da Caatinga, assim, colaborando com a ativação da biossíntese dos flavonoides.

Os teores de flavonoides nos extratos variaram nos dois biomas nas diferentes estações. Entretanto, para a Caatinga, a produção de flavonoides parece chegar no limite no verão e outono, onde os valores não são significativamente diferentes. Estes resultados estão em conformidade com estudos prévios que mostram a ativação na biossíntese de flavonoides, quando espécies (Famílias: Dryopteridaceae, Verbenaceae e Zosteraceae) são expostas a alta radiação UV, longos períodos de seca e baixa precipitação (ENERSTVEDT *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2015). Já nos da Mata Atlântica, o conteúdo de flavonoides não apresentou um padrão de variação, como na Caatinga, ainda assim, o maior teor foi obtido no outono.

O percentual médio de fenólicos totais ( $32,39 \pm 2,16\%$ ;  $326,93 \pm 21,62 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG) encontrado nos extratos do caule de *L. ferrea* corrobora com a literatura, uma vez que, alguns trabalhos já mostraram o potencial fenólico desta espécie, como De Araújo *et al.* (2014) que estimaram o conteúdo polifenólico dos extratos do caule (Pernambuco): aquoso, em 30,47%, e o

do hidroacetônico, em 32,50% e Comandolli-Wirepkowski *et al.* (2017) obtiveram percentuais semelhantes para os extratos metanólico (Manaus, Amazonas): das folhas, 49,42% e do caule, 32,21%.

Alguns flavonoides já foram isolados da casca do caule de *L. ferrea*, como vitexina, orientina, isorientina, isovitexina, isovitexina 2''-O-β [xilopiranosil-(1'''' → 2''')-O-β-xilopiranosil], vitexina 2''-O-β-[ xilopiranosil -(1''''→2''')-O-β- xilopiranosil, orientina 2''-O-β-[ xilopiranosil -(1''''→ 2''')-O-β- xilopiranosil, 2''-O-galoilvitexina, 2''-O-galoilorientina (NAWWAR *et al.*, 2015). Os extratos do caule apresentaram teor de flavonoides totais médio em torno de  $0,59 \pm 0,02\%$  ( $5,97 \pm 0,25 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ), que foi menor em relação ao valor de fenólico total. Entretanto, estes estão de acordo com os de Port's (2013), que obtiveram um teor de flavonoides de 0,46%, para o extrato aquoso do galho de *L. ferrea*. Já Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017) determinaram para os extratos metanólicos da folha e do caule de outro espécimen de *L. ferrea* os teores de flavonoide total de 2,21 e 3,26%, respectivamente.

O elevado percentual médio do teor de fenólico total nos extratos do caule (32,39%) pode ser justificado pela presença derivados de taninos (percentual médio de  $29,92 \pm 2,91\%$ ;  $299,20 \pm 29,11 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT), já que o obtido para o conteúdo de flavonoides para essas amostras foi baixo (0,59%). Esses resultados estão de acordo com os de Siqueira *et al.* (2012), que para o extrato metanólico do caule de *L. ferrea* (Pernambuco), empregando as mesmas metodologias do presente trabalho, determinou 6,24% e 0,49% de taninos e flavonoides, respectivamente. Outros estudos prévios indicam a prevalência na rota biossintética para a produção de taninos, em relação a de flavonoides, nesta espécie. O extrato aquoso da casca do caule de outro espécimen de *L. ferrea* (Amazonas) foi estimado em 26,6% de tanino total, pelo método de precipitação de caseína (VASCONCELOS *et al.*, 2011). Adicionalmente, a análise por injeção em fluxo (FIA-ESI-IT-MS/MS<sup>n</sup>) do extrato etanólico da casca do caule de *L. ferrea* revelou a predominância de taninos hidrolisáveis (WYREPKOWSKI *et al.*, 2014).

As correlações entre os valores de fenólicos, flavonoides e taninos totais, nos diferentes extratos, foram fornecidas pelos coeficientes de correlação de Pearson. Nessas amostras, os teores de flavonoides totais não estão correlacionados com o de fenólico ( $R^2 = 0,1434$ ) (Figura 12a), como já observado. Entretanto, houve uma maior correlação entre os conteúdos totais de fenólico e taninos ( $R^2 = 0,8617$ ) (Figura 12b). Por sua vez, uma correlação bem mais adequada entre esses

dois teores foi obtida, ao remover a amostra de extrato do outono, na Caatinga ( $R^2 = 0,967$ ) (Figura 12c).

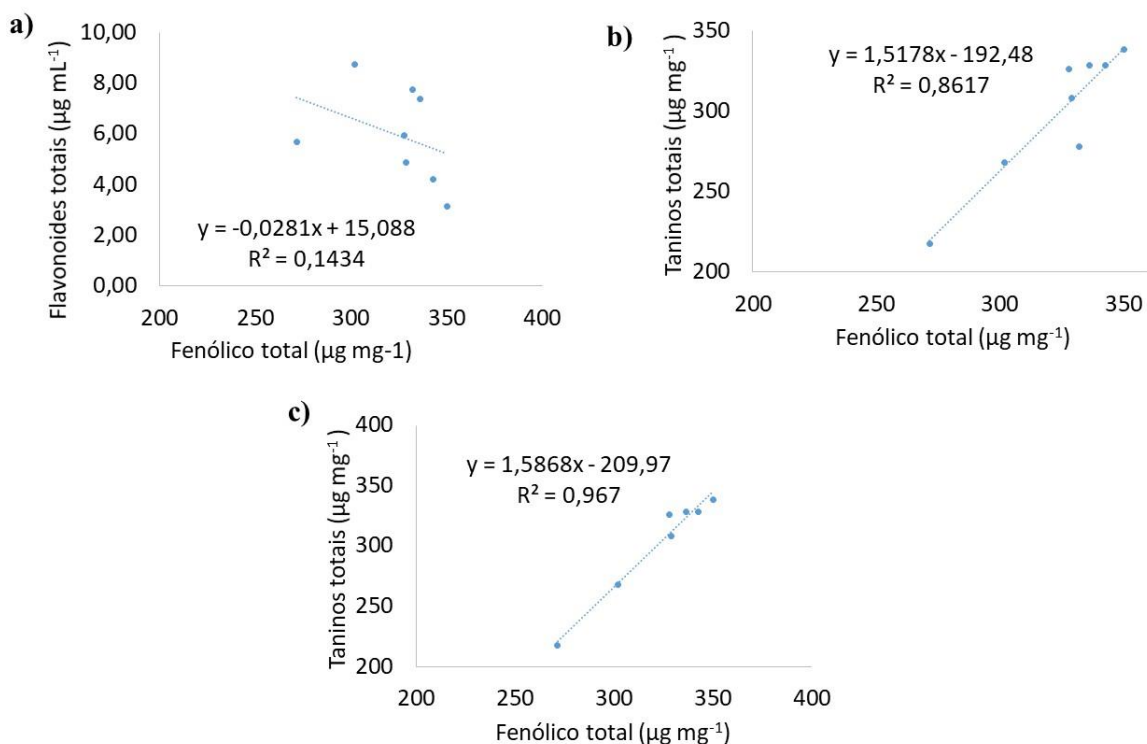


Figura 12. Gráficos de correlações entre os teores totais de fenólicos e flavonoides (a); fenólicos e taninos (b) e fenólicos e taninos, excluindo o extrato do outono da Caatinga (c).

A maior atividade antioxidante dos extratos do caule de *L. ferrea*, obtidos sazonalmente, nos dois biomas, foi mostrada pelo método do radical DPPH, com destaque para os da primavera, verão e outono. Cujos valores de  $IC_{50}$  foram significativamente diferentes, entre os dois biomas, confirmando a influência das variações sazonais nesta propriedade. Nos dois biomas, os extratos com maiores teores de fenólicos foram também os que apresentaram melhores efeitos antioxidantes, expresso pelos valores de  $IC_{50}$ , CMP ( $IC_{50} = 6,82 \pm 0,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CCV ( $IC_{50} = 7,58 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A avaliação da capacidade antioxidante em extratos alcoólicos do caule de *L. ferrea* é inédito, por esse método. Contudo, apenas do extrato aquoso do galho (Belém, Pará) já foi obtido, com  $IC_{50}$  de  $46,70 \pm 4,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  (PORT'S, 2013). A discrepância destes valores, com os encontrados neste trabalho está associada, provavelmente, a diferença do órgão da planta

estudado, além de outros fatores.

A atividade antioxidante, pelo método ABTS, de extratos de *L. ferrea* está sendo avaliado também pela primeira vez, onde foi observado que as amostras de extratos do caule de todas as estações, em ambos biomas, apresentaram diferença significativa na atividade antioxidante, com maior efeito para os da Caatinga em relação aos da Mata Atlântica. Isso indica, que o efeito da sazonalidade produz quantidades diferentes de antioxidantes específicos nos espécimens das regiões. Como no ensaio com o DPPH, os extratos com maiores teores de fenólicos, na Caatinga e Mata Atlântica, foram também os que apresentaram os maiores efeitos antioxidantes CCV ( $IC_{50} = 4,86 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CMP ( $9,47 \pm 0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Os resultados da atividade antioxidante, por DPPH, de todos os extratos da casca do caule estão correlacionados com os teores totais de fenólicos ( $R^2 = 0,6077$ ) (Figura 13d) e de taninos ( $R^2 = 0,4515$ ) (Figura 13e). Contudo, há um aumento na correlação com o teor de fenólicos ( $R^2 = 0,9202$ ) (Figura 13f), quando os extratos do inverno e outono são retirados, na Mata Atlântica. Comportamento semelhante é observado para atividade antioxidante e teor de taninos totais, quando os do outono, na Caatinga, e inverno, na Mata Atlântica, são excluídos da análise de correlação ( $R^2 = 0,7563$ ) (Figura 13g). Já o efeito antioxidante dos extratos, por ABTS, mostrou pouca correlação com os teores de fenólicos ( $R^2 = 0,3795$ ) (Figura 14h) e taninos ( $R^2 = 0,4261$ ) (Figura 14i). Entretanto, uma elevação da correlação desta atividade foi observada com os teores de fenólicos ( $R^2 = 0,933$ ) (Figura 14j) e de taninos ( $R^2 = 0,9376$ ) quando se retiram das análises, os extratos do inverno e primavera, da Mata Atlântica (Figura 14k).

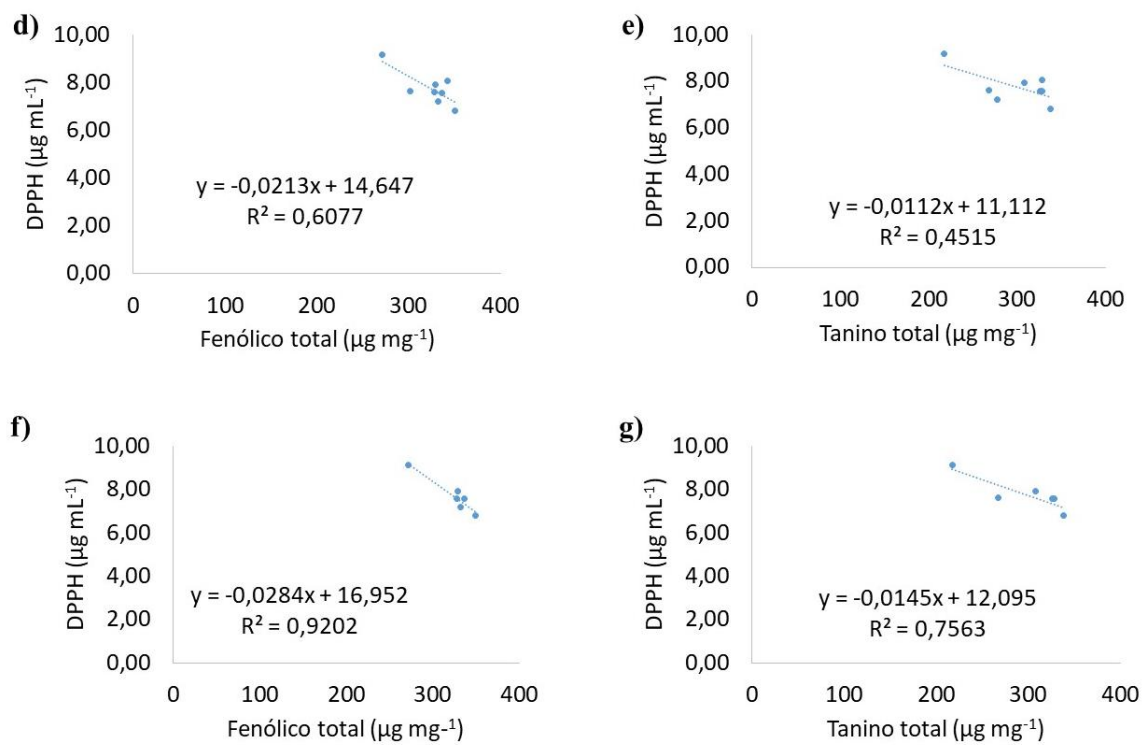


Figura 13. Correlações entre atividade antioxidante (DPPH) e teores totais de fenólicos (d); atividade antioxidante (DPPH) e teor de taninos (e); atividade antioxidante (DPPH) e teores totais de fenólicos, excluindo os extratos no inverno e outono da Mata Atlântica (f) atividade antioxidante (DPPH) e teor de taninos com exclusão dos extratos no outono, da Caatinga e inverno, da Mata Atlântica (g).

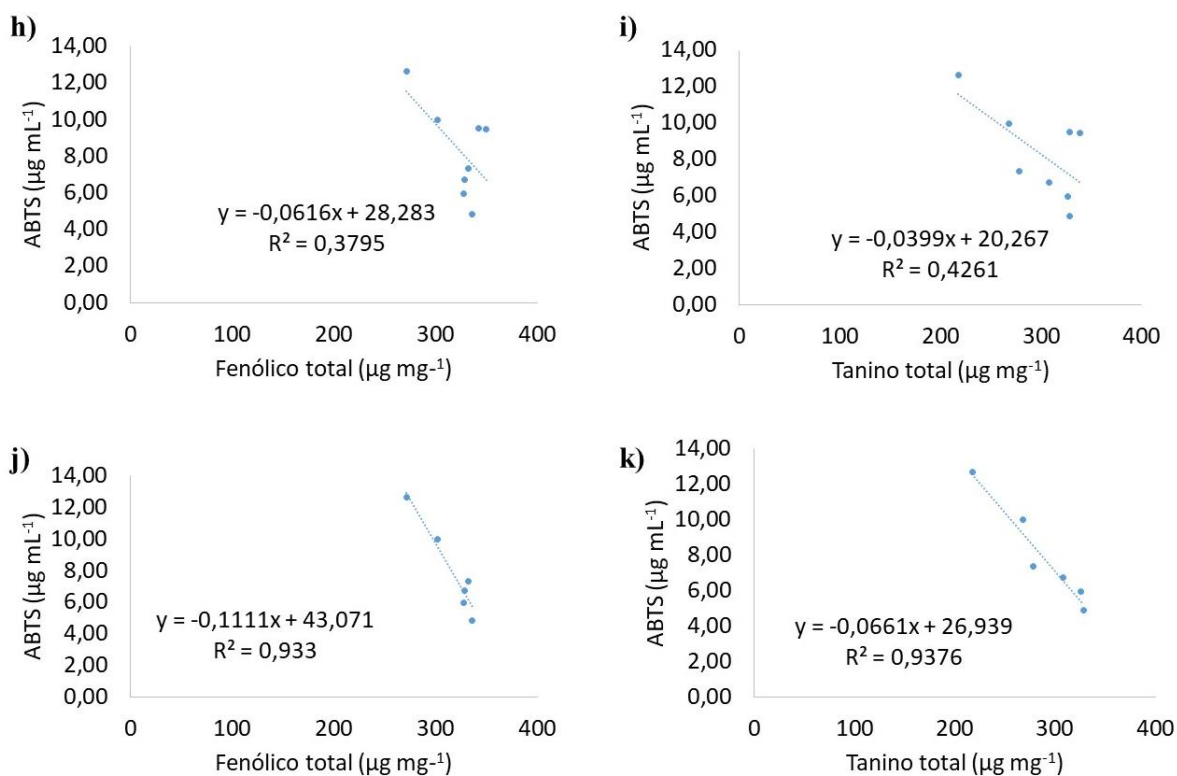


Figura 14. Correlações entre a atividade antioxidante (ABTS) e o teor de fenólico total (h), atividade antioxidante (ABTS) e teor de taninos total (i), atividade antioxidante (ABTS) e fenólico total excluindo os extratos do inverno e primavera da Mata Atlântica (j) atividade antioxidante (ABTS) e teor de taninos total excluindo os extratos do inverno e primavera da Mata Atlântica (k).

Adicionalmente, relatos da presença de fenólicos no extrato etanólico das folhas de *L. ferrea*, como 2''-*O*-galoilvitexina, 2''-*O*-galoyilorientina, e ácido brevifolincarboxílico que exibiram atividades antioxidantes no teste de sequestro do radical ORAC (capacidade de absorção dos radicais oxigenados), com  $ED_{50}$  de  $3,8 \pm 0,4$ ;  $1,9$  e  $5,0 \pm 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente ( $ED_{50} \text{Trolox} = 28,0 \pm 14,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), corroboram com a provável relação destes metabólitos, com o efeito atividade antioxidante de *L. ferrea* (HUSSEIN, 2016; NAWWAR *et al.*, 2014, 2015).

Nos dois biomas, as variâncias metabólicas entre os extratos nas quatro estações são maiores para a Mata Atlântica do que para a Caatinga, com maior dispersão das triplicatas dos extratos. As estações na Mata Atlântica são bem definidas e as variações climáticas associadas às mudanças nas estações podem justificar as dispersões das triplicatas dos extratos. Já na Caatinga,

as estações do ano não são bem definidas, com períodos chuvosos e de seca, desta forma, as pequenas variações observadas para esse bioma influenciam diretamente na menor dispersão na composição química dos extratos (Figura 2, Figura 3).

A atividade antibacteriana dos extratos do caule da Mata Atlântica, oriundos das coletas nas quatro estações: CMI, CMP, CMV e CMO, foram mais seletivos e ativos para linhagens Gram-positivas, em relação aos da Caatinga. Dentre estes, os mais bacteriostáticos foram os do inverno e primavera, onde a produção de compostos provavelmente responsáveis por este efeito foi aumentada, como indicado pela análise multivariada de todos os extratos do caule, no gráfico de PCA (Figura 2), que mostra três padrões discriminantes para as amostras da Mata Atlântica. Foi observado que as estações de inverno (UCF1-3 = CMI) e primavera (UCF4-6 = CMP) formam um grupo relativamente semelhante, bem como, a análise de agrupamento hierárquica dos componentes principais (Figura 3), que também mostra agrupamento existentes nestes extratos. Ao analisar este efeito antimicrobiano, com a quantificação dos metabólitos, os extratos mais enriquecidos em fenólicos e taninos totais também foram os mais ativos para as Gram-positiva, nos dois biomas. Assim, pode-se inferir que estes compostos estão relacionados com as atividades antibacterianas dos extratos ativos, já que estes compostos fenólicos mostram a capacidade de se ligarem à membrana das células bacterianas e, conseqüentemente, perturbarem a sua função, inibindo o crescimento celular, dentre outros modos de ação (PRGOMET *et al.*, 2019).

Na Caatinga, o extrato mais antibacteriano foi o do verão. Contudo, de maneira geral, os extratos do caule deste bioma, em todas as estações, foram mais ativos para um maior número de linhagens de bactérias, incluindo as Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*. Estes resultados sugerem uma maior produção de metabólitos responsáveis pela atividade nas quatro estações do ano, nesse bioma, em resposta a estímulos favoráveis. Entretanto, os compostos parecem ter se acumulado durante o inverno e primavera, atingido altos níveis de concentração no verão, o que justifica o maior efeito do extrato obtido da coleta no verão. Outro aspecto a ressaltar é a seletividade do extrato do caule coletado no inverno, da Caatinga (CCI), para *C. albicans*, que sugere uma maior produção de metabólitos antifúngicos, em relação às demais estações. Isso, pode ser inferido pelo fato que no inverno, a Caatinga experimentou o nível mais baixo de precipitação pluviométrica, esse fator estressor pode ter influenciado os mecanismos de defesa da planta para adaptação, levando a produção de compostos antifúngicos. Essas diferenças nas atividades



antimicrobianas, nas amostras de extratos dos dois biomas, também são evidenciadas pelos gráficos de componentes principais (Figura 2), apresentando uma separação entre as amostras da Caatinga e Mata Atlântica, assim como, a análise de agrupamento hierárquica dos componentes principais mostra distâncias euclidianas significativas entre as amostras dos dois biomas (Figura 3).

Os extratos coletados na Mata Atlântica, dentre todos os testados, mostraram seletividade na redução da proliferação de células C6 de glioma, com satisfatórios resultados para os do inverno, primavera e verão, com valores de  $EC_{50}$  de 0,13; 0,23 e 0,5  $mg mL^{-1}$ , respectivamente. A seletividade dos extratos da Mata Atlântica concorda com o estudo da variação metabólica pela análise de PCA e HCA em que as amostras da Caatinga diferenciam-se das amostras da Mata Atlântica e o efeito citotóxico está diretamente ligado à composição química dos extratos. A triagem de extratos etanólicos do caule de *L. ferrea* quanto a citotoxicidade em glioma C6 de ratos foi avaliada pela primeira vez neste trabalho. Contudo, em outras células tumorais, extratos e frações de *L. ferrea* já foram testados em outras linhagens celulares de câncer, como HL60 de leucemia humana (NOZAKI *et al.*, 2007); HepG2 do fígado; MCF-7 da mama, HCT-116 do cólon, Hep2 da laringe; PC3 de próstata (HUSSEIN, 2016) e HT-29 de colorretal humano (GUERRA *et al.*, 2017). Embora os teores de compostos fenólicos entre os extratos coletados na mesma estação nos dois biomas não apresentaram valores significativamente diferentes, pode existir uma diversificação associada às classes de substâncias fenólicas, isto explica a atividade dos extratos da Mata Atlântica. Fenólicos derivados do ácido cinâmico e flavonoides suprimiram a proliferação de células C6 de glioma de ratos (YE *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos oleuropeína e hidroxitirosol também apresentaram propriedades antitumorais *in vivo* (MARTÍNEZ-MARTOS *et al.*, 2014).

O extrato CMV não reverteu os efeitos sistêmicos do diabetes, como o controle da glicemia e os aspectos relacionados a perda de massa corporal, consumo de alimento, consumo de água e efeito antinocepcivo, também não influenciou na diminuição de citoxinas associadas aos mecanismos de neuropatia diabética. Embora não tenha apresentado atividade, este extrato não alterou os parâmetros bioquímicos, não apresentando toxicidade sistêmica para os camundongos na dose de 500  $mg kg^{-1}$ . Apesar do extrato CMV não ter apresentado atividade neste experimento, na medicina tradicional, o chá da casca do caule de *L. ferrea* tem sido utilizado por pacientes diabéticos para controlar os níveis glicêmicos (DE SOUSA ARAÚJO, 2008; TEIXEIRA, 2006) e

o extrato aquoso da casca do caule apresentou propriedades hipoglicêmicas em um modelo de diabetes induzido por STZ em camundongos tratados oralmente com  $450 \text{ mg kg}^{-1}$  ao dia, em uma dose única por 28 dias consecutivos (VASCONCELOS *et al.*, 2011). O efeito antidiabético do extrato aquoso da folha (Cairo, Egito) foi observado, quando administrado oralmente nas doses de  $250$  e  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal, com melhora efetiva da hiperglicemia, inibindo a progressão do estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por STZ (HASSAN *et al.*, 2015). As diferenças observadas para o efeito antidiabético obtido para CMV, em comparação aos relatados na literatura para outros extratos de *L. ferrea*, podem estar relacionados a aspectos como órgão da planta estudado, diferença na escolha dos solventes e métodos de extração, habitat dos espécimes, enfim fatores estressores bióticos e abióticos que geram mudanças no metabolismo secundário das plantas e alteram suas propriedades biológicas. Assim, para a confirmação e validação do efeito antidiabético relatado no uso popular de *L. ferrea*, seria necessária uma maior amostragem em termos de coleta de órgãos, em períodos e habitats diversos, através de uma abordagem etnofarmacológica.

As diferenças químicas dos extratos CMV e CCV são evidenciadas também nos resultados obtidos de teores de fenólicos, flavonoides e taninos totais, onde o extrato CCV apresentou teores significativamente maiores do que o extrato CMV, além disso, o extrato CCV inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e o extrato CMV foi citotóxico contra a linhagem celular C6 de glioma.

O extrato CCV apresentou toxicidade para os camundongos na dose de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  administrada oralmente, abaixo de doses consideradas tóxicas já relatados para extratos de *L. ferrea*, como para o extrato aquoso do fruto e sua fração rica em proteínas, ambos apresentaram  $LD_{50}$  de  $2.500 \text{ mg kg}^{-1}$  (FREITAS *et al.*, 2012). Em outro estudo, doses repetidas de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  do extrato aquoso do fruto não apresentou toxicidade em camundongos (QUEIROZ, 2001). O extrato hidroalcoólico da casca do caule nas doses de  $1 \text{ g kg}^{-1}$  por dia, não afetou a capacidade reprodutiva de ratos fêmeas (PICKLER *et al.*, 2019). Este resultado confirma a importância estudos de extratos de plantas levar em consideração as variações sazonais, visto que, uma mesma dose de extrato de uma mesma espécie, coletada em ambientes completamente diferentes, se comportam de forma também diferentes, enquanto um extrato é tóxico, o outro não apresenta toxicidade.

O tratamento com ácido elágico não alterou a glicemia e a massa corporal dos animais diabéticos mas aumentou o consumo de água na quarta semana em relação aos animais diabéticos não tratados e preveniu o pico de consumo de ração na segunda semana, embora o consumo ainda tenha sido elevado em relação ao grupo naïve. Os animais diabéticos apresentaram um aumento das citoxinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o tratamento com ácido elágico reduziu a expressão de ambas as citoxinas em ambos os tecidos avaliados, medula espinal e nervo isquiático. Os animais diabéticos apresentaram um aumento na expressão de iNOS e também de Nar2, o que pode estar relacionado ao mecanismo de manutenção da homeostase. O tratamento com ácido elágico reduziu a expressão de iNOS e aumentou a expressão de Narf2 em comparação com os animais diabéticos não tratados. O ácido elágico não reverteu os efeitos sistêmicos do diabetes, mas promoveu efeitos imunomoduladores e antioxidantes modulando mecanismos que são específicos da neuropatia diabética e, portanto, possui potencial terapêutico para o tratamento dessa condição.

#### **2.14 Considerações finais**

Os extratos do caule não apresentaram diferenças significativas nos teores de fenólicos e taninos totais nas estações ao se comparar os dois biomas estudados. Contudo, no verão, diferenças foram observadas e o conteúdo total de fenólicos e taninos foi significativamente maior para o extrato da Caatinga. Quando os biomas foram analisados de forma independentemente, as variações sazonais associadas às diferentes estações não mostraram diferenças estatísticas na produção de compostos fenólicos e taninos totais na Caatinga. Na Mata Atlântica o maior teor de fenólico foi obtido na primavera e de tanino no inverno.

A variação sazonal influenciou o conteúdo de flavonoides totais, os extratos da Caatinga apresentaram maiores teores do metabólito em relação aos da Mata Atlântica no inverno, primavera e verão. Com base na análise feita nos biomas de forma independente, para a Caatinga a produção de flavonoides foi maior no verão e outono. Na Mata Atlântica o maior teor de flavonoides foi obtido no extrato do outono. O estudo indicou uma predominância biossintética de taninos em relação a flavonoides com boa correlação entre o conteúdo fenólico total e o teor de taninos.

As atividades antioxidantes dos extratos de *L. ferrea* confirmada pelos ensaios de DPPH e ABTS e ambas foram influenciadas pela sazonalidade. Houve correlação entre atividade

antioxidante in vitro e o conteúdo fenólico e de tanino total. No entanto, a confirmação desses resultados precisa ser feita através de estudos adicionais in vitro e in vivo.

Os extratos apresentaram atividade antibacteriana significativa, com seletividade e maior atividade dos extratos da Mata Atlântica para linhagens Gram-positivas, destes, os do inverno e primavera apresentaram os menores valores de MIC e MBC. No bioma da Caatinga, o extrato mais antibacteriano foi o do verão. Os extratos da Caatinga foram mais ativos para um maior número de linhagens de bactérias, incluindo as Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*. As atividades antimicrobianas dos extratos podem ser associadas ao enriquecimento de compostos fenólicos e taninos, ainda assim, se faz necessário mais estudos para estabelecer com certeza a relação. Os extratos da Mata Atlântica apresentaram efeito citotóxico significativo para a linhagem celular C6 de glioma com menor valor de IC<sub>50</sub> para o extrato do inverno. Os diferentes efeitos das atividades biológicas estudadas demonstram as diferenças químicas associadas aos espécimens coletados nos dois biomas e estações diferentes. Essas diferenças também foram evidenciadas pelo estudo de componentes principais e a análise de agrupamento hierárquica. Os extratos não apresentaram efeito antidiabético, como relatado pela medicina tradicional, entretanto, o ácido elágico, que já foi isolado da planta apresentou potencial uso clínico para o tratamento dessa doença.

Finalmente, este estudo forneceu a primeira base para a compreensão das variações sazonais no conteúdo de polifenóis, atividade antioxidante, antimicrobianas e citotóxicas em células C6 de glioma dos extratos do caule de *L. ferrea*. Os resultados apresentados podem ser úteis, uma vez que o período e o bioma de coleta podem permitir um aprimoramento significativo do perfil químico e bioativo desejado.

## **Capítulo 3: Biofilmes de quitosana com extratos do fruto de *Libidibia ferrea* e suas propriedades antimicrobianas**

### **3.0 Resumo**

Este capítulo apresenta a variação do conteúdo fenólico, de flavonoides, taninos totais, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos etanólico e aquoso do fruto e a produção de filmes à base de quitosana incorporados com amostras do fruto de *L. ferrea* e suas propriedades antimicrobianas. Os extratos foram preparados a partir do fruto coletado em julho de 2018 no bioma da Caatinga. O teor total de fenólicos e flavonóides foi determinado por métodos espectrofotométricos e o teor de taninos pelo método da difusão em ágar. A capacidade antioxidante *in vitro* foi avaliada por ensaios de eliminação dos radicais 1-1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e a atividade antibacteriana dos extratos foi determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo. Os filmes foram preparados com diferentes proporções em massa de quitosana e amostras do fruto. As atividades antimicrobianas dos filmes foram avaliadas pelo método da difusão em ágar. Os extratos do fruto não apresentaram diferenças significativas nos teores de fenólicos, flavonoides, taninos e na atividade antioxidante contra o ABTS. Os efeitos antibacterianos dos extratos do fruto foram comparáveis e o gênero *Staphylococcus* mostrou-se mais suscetível. Os filmes de quitosana incorporados com amostras do fruto potencializaram as atividades antimicrobianas dos filmes de quitosana, e o gênero *M. luteus* foi o mais suscetível. Este estudo apresentou a primeira base para a compreensão das variações do conteúdo fenólico de extratos etanólicos e aquoso do fruto e suas atividades antioxidantes e antimicrobianas, bem como, forneceu uma referência para a preparação de filmes ativos à base de quitosana e amostras de *L.ferrea* com potencial atividade antimicrobiana e uso terapêutico para o tratamento de feridas.

### **3.1 Introdução**

A pele compreende em média 15% do peso corporal total do indivíduo adulto e é formada por derme, epiderme e hipoderme (ANJUM, 2016). Um dos principais problemas que acomete este órgão são as feridas, que são definidas como uma perturbação da estrutura anatômica e de suas funções normais, podendo ser classificadas em agudas ou crônicas (OKUR *et al.*, 2020). As agudas exibem sinais bem definidos de cicatrização dentro de um tempo previsível. Enquanto as crônicas não mostram progresso normal nos estágios de cicatrização, apresentando no estado inflamatório com uma elevada quantidade de enzimas citotóxicas, radicais livres de oxigênio, mediadores

inflamatórios e metaloproteases da matriz liberadas por leucócitos polimorfonucleares (NASERI-NOSAR, 2018). Estas lesões podem ter várias causas, como distúrbios genéticos, diabetes, úlceras por pressão (venosas e arteriais da perna), intervenções cirúrgicas e trauma agudo, o qual pode ser causado por calor, congelamento, eletricidade, produtos químicos, radiação ou fricção (GIRARD *et al.*, 2016). As úlceras crônicas por pressão, venosas e provocadas por diabetes afetam uma fração substancial da população mundial, tornando-se um grande fardo global, a exemplo dos Estados Unidos, onde 6,5 milhões de pessoas sofrem de feridas crônicas e não cicatrizantes, demandando um custo para o tratamento anual de mais de US \$ 25 bilhões de dólares. Já no Brasil não existem estudos epidemiológicos que nos permitam estabelecer com precisão estes dados, porém, há estimativas que cerca de 570 mil brasileiros venham a apresentar novas feridas crônicas, a cada ano (BAGHER *et al.*, 2020; TEIRLINCK *et al.*, 2019; WU, 2019)

O emprego de um curativo sobre a ferida não apenas a protege contra infecções, mas também ajuda a manter um ambiente úmido que promove uma reepitelização mais rápida. Embora os curativos passivos tradicionais, como gaze e tule, ofereçam cobertura, podem se aderir ao leito da ferida e causarem perturbações e dores durante e após o processo de remoção (TALIKOWSKA, 2019). Assim, as características funcionais esperadas para um curativo ideal para feridas é que este seja antimicrobiano, biocompatível, absorvente de umidade e exsudato e facilmente removível sem traumatismo para ferida (ANJUM, 2016; CARLETTI, 2011; NASERI-NOSAR, 2018; TALIKOWSKA, 2019).

Os polímeros naturais apresentam uma oportunidade potencial para a produção de curativos com melhores propriedades cicatrizantes, como os biomateriais, produzidos em formulações variadas à base de quitosana (AUGUSTINE *et al.*, 2020; MOEINI *et al.*, 2020). Este polissacarídeo possui propriedades que contribuem para seu uso em aplicações biomédicas, especialmente como curativo para feridas, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, hemostática e analgésica, além de excelente capacidade de formação de filme (AHMED, 2016; SHAHZADI *et al.*, 2020). A quitosana também apresenta propriedades antimicrobiana contra diversos microorganismos, como bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *S. mitior* e *S. salivarius*. Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *S. enterica sp*,

*S. typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*. Fungos: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Fusarium sp.* (AMATO *et al.*, 2018; KURITA, 1998; NEJI *et al.*, 2020; YOUNES *et al.*, 2014; YOUNES *et al.*, 2014). A fonte de quitosana é um polímero de ocorrência natural, a quitina (Figura 15a), que é o principal componente do exoesqueleto dos crustáceos, como os camarões e caranguejos. Quando a quitina é submetida a hidrólise básica ela sofre reação de desacetilação em suas cadeias poliméricas, com a liberação do grupo acetila na forma de ácido acético e o resultado é um amino polissacarídeo com carga positiva (AHMED, 2016). A maioria das propriedades da quitosana está relacionada ao comportamento catiônico e tamanho da cadeia copolímerica (BEKTAS *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020), a qual é constituída principalmente por *N*-acetil-*D*-glicosamina (2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopirranose) e *D*-glicosamina (2-amino-2-desoxi-*D*-glicopirranose) (Figura 15b), com esta última, em maior proporção (JAWORSKA, 2020).

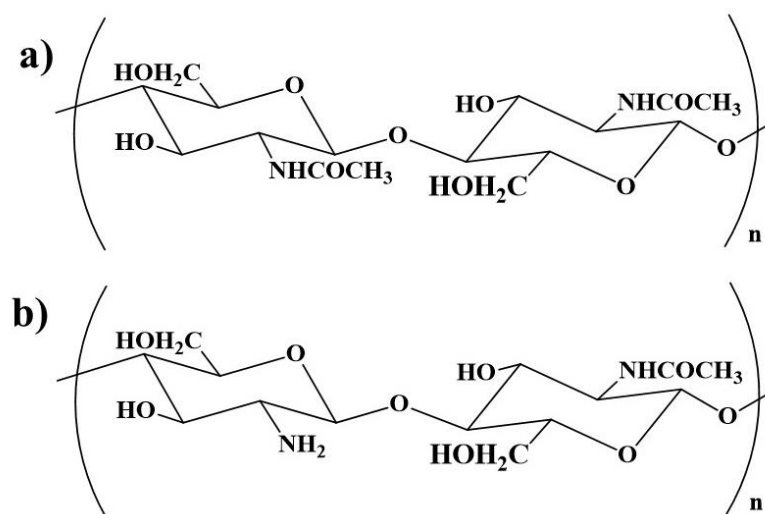


Figura 15: Representação da quitina (a), e quitosana (b)

Uma estratégia, extensivamente estudada, para potencializar as atividades biológicas da quitosana é a adição de extratos vegetais em sua matriz, com consequente melhora de algumas de suas propriedades físicas, devido às interações entre a cadeia estrutural da quitosana e os compostos bioativos presentes nestes extratos (HU, 2016; NGUYEN *et al.*, 2020). Neste contexto, o uso do extrato vegetal de *Libidibia ferrea* (Leguminosea) como antimicrobiano em biofilmes de quitosana pode satisfazer a crescente demanda de biomateriais curativos eficazes e seguros, já que a infusão do fruto de *L. ferrea* é amplamente utilizado como antimicrobiana e curativa na região amazônica

brasileira (SAMPAIO *et al.*, 2009).

*L. ferrea* é uma espécie nativa do Brasil, distribuída principalmente no Norte e Nordeste do país, cujos extratos aquosos e etanólicos do fruto são relatados como analgésicas, anti-inflamatórios (CARVALHO *et al.*, 1996; FREITAS *et al.*, 2012) e quimiopreventivos ao câncer (GUERRA *et al.*, 2017; NAKAMURA *et al.*, 2002). Extratos etanólicos e metanólicos do fruto também apresentam atividades antimicrobianas significativas contra as bactérias *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei* e antifúngica contra *Candida albicans* (DE OLIVEIRA MARREIRO *et al.*, 2014; SAMPAIO *et al.*, 2009).

Estudos prévios mostram que os extratos etanólicos do fruto de *L. ferrea* são fontes de compostos fenólicos (DA SILVA *et al.*, 2011; SAMPAIO; PEREIRA *et al.*, 2009), como o ácido elágico e o seu derivado ácido 2- (2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) elágico já foram isolados do extrato do fruto (UEDA *et al.*, 2001), bem como o ácido gálico e galato de metila que além de terem sido isolados, foram testados quanto ao efeito antitumoral em processos carcinogênicos de pele, apresentando efeito quimiopreventivo (NAKAMURA *et al.*, 2002a; NAKAMURA *et al.*, 2002b). Os fenólicos: Ácido quínico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido elágico e ácido clorogênico já foram identificados no extrato etanólico do fruto. Também deste extrato foram identificados por LC-MS/MS flavonoides do tipo Catequina: Catequina, Epicatequina e Taxifolina. O flavonoide glicosilado: Rutina. Flavonoide do tipo flavonol: Miriocetina, Quercetina, Kaempferol e Isohamnetina. E o flavonoide do tipo flavanona: Apigenina (PEDROSA *et al.*, 2016). Dessa forma, este capítulo apresenta o preparo de um biofilme de quitosana com extratos aquosos e etanólicos do fruto de um espécimen de *L. ferrea* e suas propriedades antibacteriana e antifúngica, juntamente com a determinação, nestes extratos, do teor de fenólico, flavonoides e taninos, bem como a avaliação de suas propriedades antimicrobiana e antioxidante.



## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1. Reagentes**

Quercetina ( $\geq 95\%$ ), ácido tânico, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotioazolina-6-sulfônico (ABTS), ácido (+) - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico - Trolox ( $\geq 97\%$ ), agarose - tipo I e persulfato de potássio anidro ( $K_2S_2O_8$ ), foram adquiridos na sima-aldrich (Aldrich Brasil Ltda., Brasil). Ácido L-ascórbico ( $\geq 99,0\%$ ), etanol PA, carbonato de sódio anidro  $Na_2CO_3$  ( $\geq 99,5$ ) foram obtidos da Synth (LABSYNTH Produtos para laboratórios Ltda.). Ácido gálico monohidratado puríssimo e cloreto de alumínio III da (Vetec,  $\geq 99,5\%$ ). O reagente Folin – Ciocalteu's e a albumina sérica bovina – BSA foram adquiridos da Merck. Ácido acético glacial PA e hidróxido de sódio (Dinâmica). Caldo nutriente, extrato de malte, extrato de levedura, extrato de batata e ágar foram adquiridos da Acumedia (Acumedia, EUA). TMSP-d4 (2,2,3,3-d4-3-trimetilsililpropionato de sódio). A quitosana (Polymar®,) utilizada foi adquirida da empresa Polymar (Messejana, Fortaleza, Brasil) sem purificação prévia, com um grau de desacetilação de 81% (massa molar de cerca de  $1,47 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ ). Os antibióticos empregados nos testes de suscetibilidade antimicrobiana foram benzilpenicilina, gentamicina, ciclopirox olamina (LOPROX®,  $10 \text{ mg g}^{-1}$ , Sanofi-Aventis) e anfotericina B.

### **3.2.2. Coleta da planta**

O fruto foi coletado na região do submédio São Francisco, em Juazeiro ( $09^\circ 24' 42'' \text{ S}$  e  $40^\circ 29' 55'' \text{ W}$ ), em julho de 2018. A exsicata da espécie foi registrada no Herbário RADAMBRASIL (HBS), Jardim Botânico, Salvador-BA, com o número 61849.

### **3.2.3. Preparação dos extratos**

Os frutos secos e moídos (2029,56 g) foram submetidos à maceração com etanol grau PA por um período de 72 horas, com três repetições. As soluções alcoólicas obtidas foram filtradas por gravidade e destiladas à pressão reduzida, em evaporador rotativo (803 – Fisatom), para a obtenção dos extratos etanólicos. O extrato aquoso foi preparado pelo aquecimento dos frutos secos e moídos (297,31 g), com água destilada (2 L) por duas horas, a  $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ , em placa de aquecimento (Modelo RHB1 – Merse). Em seguida, a solução foi filtrada por gravidade e liofilizada (Lyophilizer K202, Liotop) à temperatura entre  $50 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$ , pressão  $200 \text{ } \mu\text{m Hg}$ , por quatro dias. O rendimento

obtido para os extratos brutos foi de 29,33% (595,29 g) para o etanólico e 5,83% (17,33 g) para o aquoso.

### 3.3 Determinação de fenólicos totais

A metodologia para a dosagem de fenólicos totais (FT) foi segundo método descrito por Ma *et al.* (2020), com poucas modificações. Foram misturados, sob abrigo de luz, em uma microplaca de 96 poços 20  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica dos extratos do fruto ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{L}$  de solução aquosa do reagente de Folin – Ciocalteu ( $10\% \text{ v v}^{-1}$ ) e 60  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de carbonato de sódio ( $7,5\% \text{ m v}^{-1}$ ). O volume de cada poço foi completado para 300  $\mu\text{L}$  com água destilada. Em seguida, a mistura foi incubada por 20 minutos, em temperatura ambiente, sob o abrigo da luz. A curva de calibração foi construída, semelhantemente, com ácido gálico na faixa de concentração de 1,0 - 8,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Onde para cada ponto da curva foram misturados, em uma microplaca de 96 poços, uma alíquota da solução metanólica de ácido gálico ( $0,2\text{ mg mL}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin – Ciocalteu ( $10\% \text{ v v}^{-1}$ ) e 60  $\mu\text{L}$  de solução de carbonato de sódio ( $7,5\% \text{ m v}^{-1}$ ), com aferimento do volume para 300  $\mu\text{L}$  com água destilada. O metanol foi utilizado como branco. Incubou-se a placa de 96 poços com os padrões por 20 minutos em temperatura ambiente sob o abrigo da luz direta. Após esse período, as absorvâncias foram lidas a 760 nm, em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). O experimento foi conduzido em triplicata e o teor de fenólico total (FT) foram expressos como média [ $\mu\text{g}$  de ácido gálico equivalente (EAG) / mg de extrato seco]  $\pm$  desvio padrão (DP) das triplicatas.

### 3.4 Determinação de flavonoides totais

A metodologia para a dosagem do conteúdo de flavonoides (CF) totais foi segundo Obeng *et al.* (2020) com poucas modificações. Para poços de uma microplaca de 96 poços foram transferidos 60  $\mu\text{L}$  da solução metanólica dos extratos vegetais ( $2\text{ mg mL}^{-1}$ ), 6  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  ( $2\% \text{ m v}^{-1}$ ), com aferição do volume para 300  $\mu\text{L}$ , com água destilada. A microplaca foi incubada por 30 minutos, sob abrigo de luz. A curva de calibração foi construída com o padrão quercetina na faixa de concentração de 1,5 - 12,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As leituras das absorvâncias (amostra, padrão e branco) foram feitas após o período de incubação de 30 minutos, a 414 nm, em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). O experimento foi

conduzido em triplicata. Os resultados de conteúdo de flavonoides (CF) foram expressos como média [ $\mu\text{g}$  de quercetina equivalente (EQ) / mg de extrato seco]  $\pm$  DP das triplicatas.

### **3.5 Quantificação de Taninos**

A quantificação dos teores de taninos (TT) foi por método da difusão radial, segundo Hagerman (1987) e Maier (2017). Uma solução tampão foi preparada com ácido acético ( $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e ácido ascórbico ( $60 \mu \mu\text{mol L}^{-1}$ ), com adição de solução de NaOH ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) até  $\text{pH} = 5,0$ . O meio sólido foi preparado pela mistura de uma alíquota desta solução tampão, com Agarose - tipo I, sob aquecimento e agitação ocasional, até completa solubilização. Após resfriamento desta mistura até  $45^\circ\text{C}$  foram adicionados  $0,10\text{g}$  de albumina sérica bovina – BSA, sob agitação. Alíquotas de  $09 \text{ mL}$  deste meio foram distribuídos em placas de Petri ( $9 \text{ cm}$  de diâmetro). Estas placas foram seladas com filme de PVC e armazenadas sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ , por  $72$  horas. Após este período, em cada placa, poços de  $7 \text{ mm}$  de diâmetro foram feitos sob o meio sólido, aos quais foram adicionados  $20 \mu\text{L}$  de uma solução a  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  do extrato vegetal  $50\%$  ( $\text{v v}^{-1}$ ) em metanol. A curva de calibração foi preparada com padrão de ácido tânico. A faixa de concentração empregada de ácido gálico foi de  $2,5 - 50 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os diâmetros dos halos das amostras de extratos e padrão foram medidos após  $72$  horas de incubação, a  $30^\circ\text{C}$ . O experimento foi feito em triplicata. Metanol  $50\%$  ( $\text{v v}^{-1}$ ) foi usado como branco.

### **3.6 Atividade antioxidante**

#### **3.6.1 Ensaio DPPH**

O ensaio DPPH foi realizado de acordo com o método de Mercado-Mercado (2020), com modificações. Foram adicionados a uma placa de  $96$  poços  $280 \mu\text{L}$  da solução estoque de DPPH ( $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $20 \mu\text{L}$  da solução dos extratos. Concentrações dos extratos na faixa de  $10 - 1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram usadas para traçar os valores de  $\text{IC}_{50}$ . As placas foram incubadas ao abrigo da luz durante  $30 \text{ min}$  e as absorvâncias obtidas a  $515 \text{ nm}$ . A curva de calibração foi construída adicionando o volume de  $280 \mu\text{L}$  da solução do radical DPPH ( $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e alíquotas da solução do padrão trolox ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), completando o volume de  $300 \mu\text{L}$  com metanol para a construção da curva de calibração na faixa de concentração de  $1,0 - 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Após  $30 \text{ min}$  de incubação, a absorvância a  $515 \text{ nm}$  foi medida em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Locus). O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.6.2 Ensaio ABTS

A determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS foi realizada conforme método de Le Grandois *et al.* (2017), com modificações. O cátion do radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) foi formado por reação das soluções aquosas de ABTS (7 mmol L<sup>-1</sup>) com persulfato de potássio (2,45 mmol L<sup>-1</sup>). Este reagente foi armazenado sob abrigo da luz, à temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente, a solução de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída com metanol até atingir absorvância na faixa de 0,8 – 1, a 734 nm, em espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). Foram adicionados à placa de 96 poços 280 µL da solução estoque do radical catiônico ABTS<sup>•+</sup> e 20 µL da solução dos extratos. Concentrações na faixa de 10<sup>-1</sup> - 1,67 µg mL<sup>-1</sup> dos extratos vegetais foram usadas para traçar os valores de IC<sub>50</sub>. A curva de calibração na faixa de 1,0 – 10 µg mL<sup>-1</sup> foi construída misturando volumes de 280 µL da solução do radical e diferentes alíquotas da solução estoque do padrão trolox (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) acrescido de metanol para completar o volume dos poços (300 µL). Após 20 min de incubação, a absorvância a 734 nm foi medida por um espectrofotômetro de microplacas UV/VIS (LMR-96-8, Loccus). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.7 Preparo dos biofilmes quitosana-extratos

Uma porção de quitosana (10,0 g) foi solubilizada em solução de ácido acético a 2% v v<sup>-1</sup> (3 L), sob agitação, por 24h. A solução resultante foi filtrada a vácuo através de filtros de filtração rápida, média e lenta, respectivamente. Em seguida, a solução foi ajustada com solução de NH<sub>4</sub>OH até o pH próximo de 8 para precipitação de quitosana. A separação do sobrenadante foi realizada por filtração a vácuo e a quitosana foi lavada com água destilada até o pH próximo de 6,8, submetida a secagem em estufa, a 40 – 60 °C, durante 24 h e, posteriormente, moagem com auxílio de almofariz e pistilo. Após a purificação, obteve-se 7,6 g de quitosana, rendimento de 76 %. Desta quitosana foram preparados os filmes.

Os filmes a base de quitosana foram preparados segundo Koc *et al.* (2020), com modificações. Para o preparo da solução formadora de filme de quitosana pura, 0,75 g de quitosana foi dissolvida em 35 mL de solução de ácido acético a 2% (v v<sup>-1</sup>), seguida da adição do plastificante glicerol na concentração de 10% (m m<sup>-1</sup>). A mistura foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 24 h. Após este período, a mistura foi submetida a filtração por gravidade, o filtrado foi degaseificado em sonificador ultrassônico e transferido para placa de Petri

(10cm de diâmetro) de poliuretano e mantidas em estufa a 40 – 50 °C durante 48 h. Depois de formados, os filmes foram colocados por 2 h em estufa à vácuo a 50 °C para remoção de solvente residual.

Similarmente foi feito para a obtenção dos filmes de quitosana incorporados com as amostras do fruto de *L. férrea*, onde diferentes concentrações de quitosana / extrato aquoso, quitosana / extrato etanólico e quitosana / pó do fruto foram utilizadas para preparar os filmes de *L. ferrea*: 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30, 50/50 (m m<sup>-1</sup>) (Tabela 5).

Tabela 5: Filmes de quitosana incorporados com amostras de fruto de *L. ferrea*

Filmes de Quitosana	Amostras preparadas com a matriz de quitosana
Sem adição de extrato ou pó do fruto	<b>Quitosana 100%</b> = 0,75g de quitosana
Com adição do extrato etanólico do fruto (EtFr)	<b>EtFr10%</b> = 0,0075 g de extrato + 0,675 g de quitosana <b>EtFr20%</b> = 0,15 g de extrato + 0,6 g de quitosana <b>EtFr30%</b> = 0,225 g de extrato + 0,525 g de quitosana <b>EtFr50%</b> = 0,375 g de extrato + 0,375 g de quitosana
Com adição do extrato aquoso do fruto (AqFr)	<b>AFr10%</b> = 0,0075 g de extrato + 0,675 g de quitosana <b>AFr20%</b> = 0,15 g de extrato + 0,6 g de quitosana <b>AFr30%</b> = 0,225 g de extrato + 0,525 g de quitosana <b>AFr50%</b> = 0,375 g de extrato + 0,375 g de quitosana
Com adição do pó do fruto (PFr)	<b>PFr10%</b> = 0,0075 g de pó do fruto + 0,675 g de quitosana <b>PFr20%</b> = 0,15 g de pó do fruto + 0,6 g de quitosana <b>PFr30%</b> = 0,225 g de pó do fruto + 0,525 g de quitosana <b>PFr50%</b> = 0,375 g de pó do fruto + 0,375 g de quitosana

### 3.8 Atividade antimicrobiana dos extratos e biofilmes

#### 3.8.1 Microrganismos

As nove linhagens, adquiridas na Coleção de Culturas Tropical (CCT)/ Fundação André Tosello, empregadas nos ensaios de microdiluição em caldo dos extratos aquoso e etanólico do fruto foram: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *B. cereus* (CCT 0096), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (CCT 1488; ATCC 12228), *Micrococcus luteus* (ATCC = 10240), *Escherichia coli* (ATCC 94863), *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 0090; ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (CCT 0728), *Fusarium oxysporum* (CCT 3243). Contudo,

para o ensaio em difusão em ágar foram usados apenas os microrganismos: *C. albicans*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*. Todas as culturas foram mantidas em meio sólido, ágar nutriente para as bactérias e em ágar malte para os fungos, com incubação por 24h (36 °C) e 72h (26 °C), respectivamente, para bactérias e fungos.

### 3.8.2 Ensaio de microdiluição

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo normas técnicas do CLSI (2005), com pequenas modificações conforme Araújo *et al.* (2017) e Caires *et al.* (2018). Caldo nutriente e extrato de malte e levedura foram utilizados como meio de cultura para crescimento de bactérias e leveduras, respectivamente. Para o teste de suscetibilidade antimicrobiana foram adicionados aos poços, de uma placa de poliestireno de 96 poços, 100 µL de meio de cultivo apropriado. Para primeira fileira da placa foram transferidos 100 µL de cada solução estoque, preparada em DMSO 20% (v v<sup>-1</sup>), dos extratos aquoso e etanólico do fruto (4000 µg mL<sup>-1</sup>), em triplicata. Ainda nesta fileira foram adicionados 100 µL das soluções do diluente e 100 µL da solução dos antibióticos [para bactérias: benzilpenicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>) e gentamicina (100 µg mL<sup>-1</sup>) e para fungos: ciclopirox olamina (400 µg mL<sup>-1</sup>) e anfotericina B (250 µg mL<sup>-1</sup>)], em triplicata. Em seguida, foi feita a diluição seriada, com fator de diluição de dois, e foram acrescentados 100 µL do inóculo do microrganismo (escala 0,5 de McFarland, ~ 1-2 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), em todos os poços. Finalmente, a faixa de concentração testada dos extratos variou de 2000 – 15,63 µg mL<sup>-1</sup>. O período de incubação das placas foi de 36 ° C (24 h) e 26 ° C (72 h) para bactérias e fungos, respectivamente. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) de cada amostra foi determinado como a menor concentração que inibiu visualmente o crescimento do microrganismo. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os extratos foram considerados ativos quando inibiram o crescimento microbiano em concentrações inferiores a maior concentração testada (2000 µg mL<sup>-1</sup>).

### 3.8.3 Determinação da concentração bactericida mínima

Na placa de 96 poços, após a leitura dos valores de CIMs, 10 µL foram removidos e inoculados em meios sólido, onde continham ágar nutriente, para bactérias, e extrato de malte, para fungos. Em seguida, as placas foram incubadas em temperaturas e períodos apropriados para cada

microrganismo. Após este período, a menor concentração testada, na qual havia ausência de crescimento microbiano visível, foi determinada como sendo a concentração microbicida mínima (CMM) (ARAÚJO et al., 2017).

#### **3.8.4 Ensaio por difusão em ágar**

As atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos do fruto também foram avaliadas pelo método de difusão em ágar, juntamente com quitosana, biofilmes preparados de quitosana-extratos do fruto: etanólico (EtFr10%, 20%, 30% e 50%) e aquoso do fruto (AFr10%, 20%, 30% e 50%), bem como biofilmes de quitosana-fruto moído (PFr10%, 20%, 30% e 50%) (LI; YI; YU; WANG *et al.*, 2020). O inóculo de cada microrganismo foi preparado na escala de turbidez 0,5 McFarland. Desta suspensão, 200  $\mu\text{L}$  foram aliqüotados e vertidos sobre 20 mL de meio de cultivo sólido apropriado para cada microrganismo, similar ao ensaio de microdiluição, e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski. Apenas para *B. subtilis* e *S. epidermidis* foram pipetados 300  $\mu\text{L}$  da suspensão do inóculo. Após a inoculação, perfurações foram feitas no meio sólido, com tubo de vidro cilíndrico de 6 mm de diâmetro. Nestes poços foram adicionados 20 mL de soluções dos extratos do fruto ( $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 15  $\mu\text{L}$  do antibiótico, para as bactérias *B. cereus* e *B. subtilis* foram usados 20  $\mu\text{L}$  do antibiótico [gentamicina, para bactérias Gram-negativas ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), benzilpenicilina, para as Gram-positivas ( $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e anfotericina B para fungos ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ )]. Já os biofilmes preparados foram cortados em círculos de 6 mm e colocados sobre o meio de cultivo sólido recentemente inoculado. As placas foram vedadas e incubadas por 24 horas ( $37^\circ\text{C}$ ), em ensaios com bactérias e por 72 h ( $26^\circ\text{C}$ ), nos com fungos. Após esse período, os halos de inibição do crescimento foram medidos com régua milimétrica. Todo o experimento foi conduzido em triplicata.

### 3.9 Resultados e Discussão

#### 3.9.1 Teor de fenólicos, flavonoides e taninos totais e atividade antioxidantes dos extratos do fruto de *L. ferrea*

Os teores de fenólicos totais, flavonoides, taninos e potencial antioxidante foram determinados no extrato etanólico e aquoso do fruto de *L. ferrea* como apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultado dos teores de fenólicos, flavonoides e taninos totais e atividade antioxidante do extrato etanólico e aquoso do fruto de *L. ferrea*.

Extratos*	Teores			Atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> , µg mL <sup>-1</sup> ± DP)	
	Fenólicos (µg mg <sup>-1</sup> ± DP de EAG)	Flavonoides (µg mg <sup>-1</sup> ± DP de EQ)	Taninos (µg mg <sup>-1</sup> ± DP de EAT)	DPPH	ABTS
EAFrLF	327,95 ± 14,61	5,38 ± 0,22	227,74 ± 17,43	13,57 ± 0,05	3,76 ± 0,74
EEtFrLF	292,06 ± 24,35	6,24 ± 0,40	189,49 ± 20,92	6,89 ± 0,03	4,12 ± 0,21
Valor Médio	310,01 ± 19,48	5,81 ± 0,31	208,62 ± 19,17		
Trolox				4,34 ± 0,05	6,03 ± 0,06

\* Extratos: aquoso do fruto de *L. ferrea* (EAFrLF) e etanólico do fruto de *L. ferrea* (EEtFrLF); µg mg<sup>-1</sup> de EAG: microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato seco; µg mg<sup>-1</sup> de EQ: microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de extrato seco) e µg mg<sup>-1</sup> de EAT: microgramas equivalentes de ácido tânico por miligrama de extrato seco)



O conteúdo total de fenóis de todos os extratos preparados de *L. ferrea* foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso como equivalente de ácido gálico. O extrato aquoso do fruto mostrou teor de fenólico de  $327,95 \pm 14,61 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG, o qual foi maior que o encontrado no extrato etanólico de  $292,06 \pm 24,35 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG. Já para o teor de flavonoides dos extratos brutos, que foi expresso como equivalente de quercetina, um comportamento inverso foi obtido, com o maior teor para o extrato etanólico do fruto (EEtFrLF) ( $6,24 \pm 0,40 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ), em relação ao aquoso (EAFrLF) ( $5,38 \pm 0,22 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ). Na determinação de taninos por difusão radial, o extrato aquoso foi o mais enriquecido nesta classe de metabólitos, com  $227,74 \pm 17,43 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT, enquanto o etanólico apresentou  $189,49 \pm 20,92 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT. Apesar destas diferenças observadas entre os extratos, após análise estatística, não houve diferença significativa entre os teores determinados para fenólicos, flavonoides e taninos totais, indicando assim, que o uso de dois solventes não afetou a extração desses compostos no fruto.

As concentrações elevadas de fenólicos totais ( $310,01 \pm 19,48 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG) obtidas nos extratos do fruto de *L. ferrea*, com percentuais médios de  $31,00 \pm 1,95 \%$ , corroboram com os encontrados previamente para este mesmo órgão em outros espécimens de *L. ferrea*. Nestes estudos foram encontrados percentuais de fenólicos totais em extratos do fruto:  $46,0 \pm 0,42\%$ , no etanólico (80%, v v<sup>-1</sup>) de um espécimen do PARNA do Catimbau, Pernambuco (DA SILVA *et al.*, 2011); uma faixa de  $37,85 \pm 0,23$  a  $13,99 \pm 0,32\%$  em extratos metanólicos do frutos de *L. ferrea* de catorze regiões diferentes do Brasil (FERREIRA *et al.*, 2016) e  $7,3\%$  no metanólico (80%, v / v) de um espécimen da Floresta Amazônica, pelo método do azul da Prússia. As diferenças observadas nestes valores indicam variações no metabolismo secundário que são advindas de efeitos sazonais e, além disto, os métodos de extração e determinação dos fenólicos podem influenciar nos teores destes compostos.

O teor médio de flavonoides totais presente nos extratos do fruto foi de  $0,58 \pm 0,031 \%$  ( $5,81 \pm 0,31 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EQ), um valor inferior ao de fenólicos totais [ $31,00 \pm 1,95 \%$  ( $310,01 \pm 19,48 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAG)]. Esta discrepância está em conformidade com os encontrados por Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017) no extrato em metanol do fruto de *L. ferrea*, no qual determinou  $51,46 \pm 2,33 \%$  de fenólicos e  $6,94 \pm 0,39 \%$  de flavonoides totais. Adicionalmente, a quantificação de taninos em extratos do fruto de *L. ferrea* foi relatada pela primeira vez nesse trabalho, onde ao se observar o elevado teor de taninos, com percentual médio de  $20,86 \pm 1,92\%$

( $208,62 \pm 19,17 \mu\text{g mg}^{-1}$  de EAT), em relação ao de flavonoides, foi possível inferir uma prevalência biossintética para a produção de taninos no fruto, assim como observado para a casca do caule, no **Capítulo 2**.

A atividade antioxidante dos extratos do fruto de *L. ferrea* foi expressa em concentração capaz de inibir 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) os radicais DPPH e ABTS. O extrato etanólico (EEtFrLF) mostrou melhor atividade antioxidante, pelo método utilizando o radical DPPH, com de  $\text{IC}_{50} = 6,89 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  em comparação ao aquoso (EAFrLF) com  $\text{IC}_{50} = 13,57 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esses resultados foram significativamente diferentes e indicaram que a extração com etanol foi mais eficiente em concentrar substâncias com capacidade de inibir o radical DPPH. Já pelo ensaio com o radical ABTS, o EAFrLF apresentou maior efeito antioxidante ( $\text{IC}_{50} = 3,76 \pm 0,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que o EEtFrLF ( $\text{IC}_{50} = 4,12 \pm 0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), contudo estes resultados não são estatisticamente diferentes. Os extratos testados mostraram potencialmente maior ação antioxidante frente ao radical ABTS que o DPPH. Os diferentes resultados obtidos para a atividade antioxidante por DPPH e ABTS é devido aos mecanismos distintos empregados nestes métodos. Enquanto o radical DPPH reage com polifenóis (catequinas, proantocianidinas), mas não com os ácidos fenólicos e açúcares, o radical ABTS tem alta reatividade e, portanto, possui capacidade de reagir com uma ampla gama de antioxidantes (MAREČEK *et al.*, 2017). Os estudos sobre o efeito antioxidante dos frutos de *L. ferrea* ainda são incipientes e não existem relatos na literatura sobre o emprego dos métodos DPPH e ABTS para comparação. Entretanto, Da Silva *et al.* (2011) mostrou a atividade antioxidante do extrato etanólico (80%, v v<sup>-1</sup>) do fruto, pelo método fosfomolibdênio, onde obteve  $\text{IC}_{50} = 182,98 \pm 1,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### **3.9.2 Biofilmes de quitosana com amostras do fruto de *L. ferrea***

As fotografias digitais dos biofilmes preparados à base de quitosana com proporções diferentes de amostras dos extratos etanólico e aquoso do fruto e com o fruto pulverizado de *L. ferrea*, bem como, o filme controle de quitosana, são mostrados na Figura 16. O filme de quitosana pura apresentou uma superfície clara, lisa e sem bolhas. Ao aumentar a quantidade das amostras na solução polimérica de 10 para 50%, foi observado que todos os biofilmes gradativamente adquiriram coloração castanha. As superfícies dos filmes foram, em geral, lisas, com exceção dos de quitosana-fruto pulverizado (PFr), as quais se mostraram ásperas e menos compactas. Já os

enriquecidos com o extrato aquoso e etanólico apresentaram maior homogeneidade, indicando boa compatibilidade entre a matriz polimérica e os compostos ativos presentes nos extratos.

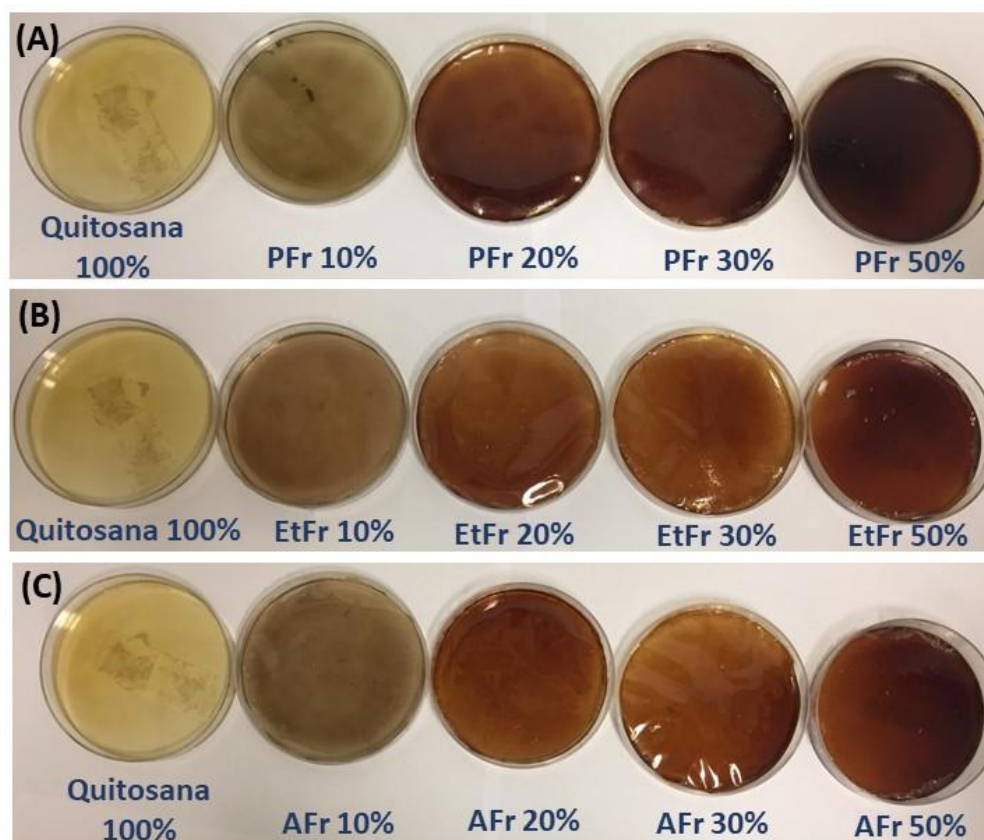


Figura 16: Fotografia dos biofilmes de quitosana 100%; quitosana-pó do fruto (A), quitosana-extrato etanólico do fruto (B), e quitosana-extrato aquoso do fruto (C).

### 3.9.2 Atividade antimicrobiana

#### 3.9.2.1 Atividades antimicrobiana dos extratos do fruto

Os extratos etanólico e aquoso do fruto apresentaram atividade bacteriostática frente as cepas Gram-positivas testadas, sendo o gênero *Staphylococcus* o mais suscetível (Tabela 7). Ambos foram ativos para *S. aureus*, contudo apenas o aquoso foi bactericida com CMM de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e também o mais ativo para *S. epidermidis*, com valores de CIM e CMM de  $15,625$  e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Já para *B. subtilis* e *B. cereus* todos foram bacteriostáticos com CIMs de  $500$  e CMMs de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. O efeito em bactérias Gram-negativas foi menos

pronunciado, com apenas o extrato aquoso bacteriostático frente a *P. aeruginosa* com CIM = 2000 µg mL<sup>-1</sup>.

Tabela 7: Atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo de extratos do fruto de *L. ferrea*

Extratos	CIM/CMM (µg mL <sup>-1</sup> )													
	Gram-positiva								Gram-negativa		Fungos			
	<i>Sa</i>		<i>Sep</i>		<i>Bs</i>		<i>Bc</i>		<i>Pa</i>		<i>Ca</i>		<i>Cg</i>	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
EAFrLF	500	2000	15,63	500	500	>2000	1000	>2000	2000	>2000	>2000		2000	>2000
EEtFrLF	1000	>2000	15,63	1000	500	>2000	1000	>2000	>2000		15,63	31,25	>2000	
benzilpenicilina	0,04	>25	2,2	>25	0,08	0,16								
gentamicina									1,25	>5				
ciclopirox olamina											12,5	>25	12,5	>25

*Sa*: *S. aureus*; *Sep*: *S. epidermidis*; *Bs*: *B. subtilis*; *Bc*: *B. cereus*; *Pa*: *P. aeruginosa*; *Ca*: *C. albicans*; *Cg*: *C. glabrata*. Concentração inicial dos controles: benzilpenicilina: 25 µg mL<sup>-1</sup>; geramicina: 5 µg mL<sup>-1</sup> e ciclopirox olamina: 25 µg mL<sup>-1</sup>. Concentração inicial dos extratos: 2000µg mL<sup>-1</sup>.

Os dois extratos mostraram similaridade no efeito antibacteriano, indicando que os diferentes métodos de extração não alteraram as composições químicas dos compostos bioativos frente as Gram-positivas. Contudo, em relação ao efeito em leveduras, a extração a frio resultou em uma maior concentração de compostos antifúngicos no extrato etanólico, o qual mostrou elevado efeito fungicida e fungicida para *C. albicans* [CIM = 15,6 e CMM = 31,25 µg mL<sup>-1</sup>]. A água permitiu extrair e/ou acumular substâncias com atividade contra *P. aeruginosa* e *C. glabrata*, já o etanol foi eficiente para extrair e/ou acumular substâncias com atividade contra *C. albicans*.

O efeito antimicrobiano de extratos alcoólicos e aquoso do fruto de *L. ferrea* ainda não havia sido avaliado para a maioria das cepas descritas acima. Contudo, Sampaio *et al.* (2009) mostrou a atividade do extrato metanólico (80% v / v) do fruto de um espécimen coletado no bioma da Amazônia para *C. albicans* (CIM = 25,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Lactobacillus casei* (CIM = 66,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Streptococcus mutans*, *S. salivarius* e *S. oralis* com CIMs de 40, 66 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente e De Oliveira Marreiro *et al.*, (2014) testou o extrato etanólico contra *S. mutans* e *S. oralis*, com valores de CIMs de 1,56 e 3,13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados obtidos, juntamente com estes relatos, apresentam o elevado potencial antibacteriano e antifúngico do fruto de *L. ferrea*. Os extratos não apresentaram efeito nas concentrações testadas para os microorganismos *E. coli* e *F. oxysporum*.

A presença de substâncias fenólicas, principalmente taninos, foi determinada nos extratos aquoso e etanólico dos frutos, contudo em estudos prévios de extratos do fruto, os teores de fenólicos e flavonoides totais foram descritos, sem detecção dos de taninos totais (BOUARAB-CHIBANE *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2019). Assim, mediante este perfil químico observado para os extratos do fruto, pode-se inferir que as propriedades antimicrobianas obtidas podem ser devido a mistura destes compostos. Esta proposição pode ser fundamentada pelas reconhecidas atividades de componentes fenólicos contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* (DEY *et al.*, 2020), *S. epidermidis* (ALBANO *et al.*, 2019; WAN, 2012), *B. cereus* (CETIN-KARACA, 2018; LEMOS *et al.*, 2014), *B. subtilis* (CHEN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2020), *E. coli* (LI *et al.*, 2020), *C. albicans* e *C. glabrata* (CANTURK, 2018; MARTINS *et al.*, 2015).

### **3.9.2.2 Atividade antimicrobiana dos filmes à base de quitosana**

As propriedades antibacterianas dos diferentes filmes de quitosana foram avaliadas *in vitro* por meio de um método de difusão em ágar-poço e disco, onde a inibição do crescimento microbiano é demonstrada pelo aparecimento de uma zona de inibição de crescimento, após o período de incubação apropriado para cada microrganismo testado (Figura 17 e Tabela 8). A atividade antimicrobiana de filmes à base de quitosana foi investigada contra: *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*.

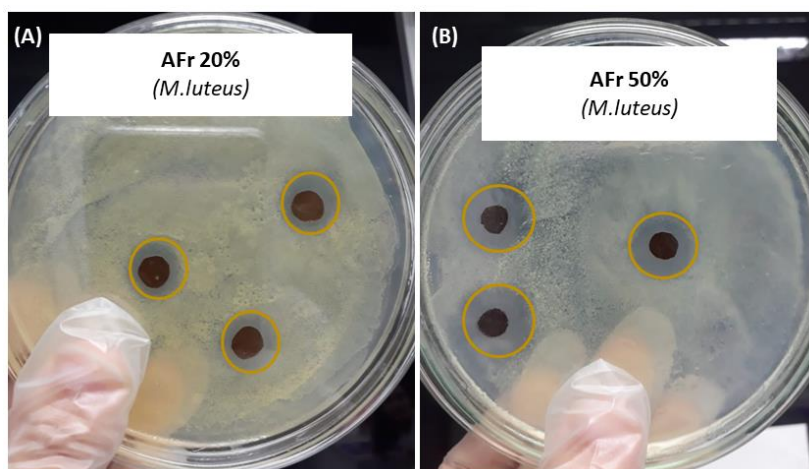


Figura 17: Zona de inibição de crescimento bacteriano de *M. luteus* dos biofilmes a base de quitosana enriquecido com o extrato aquoso do fruto, AFr20% (A) e AFr50% (B)

A atividade antibacteriana dos biofilmes contra bactérias Gram-positivas, como esperado, foi potencializada pela adição dos extratos aquosos e etanólico, assim como fruto pulverizado. Dentre todos os microrganismos testados, o mais suscetível aos biofilmes foi *M. luteus*, onde todos biofilmes foram ativos nas concentrações de 20, 30 e 50%, seguido por *S. epidermidis*, onde os biofilmes de quitosana – extrato aquoso inibiram o crescimento bacteriano nas concentrações de 20%, 30% e 50%, além disso, os filmes de quitosana - extrato etanólico e quitosana - pó do fruto nas concentrações de 30 e 50% também foram ativos. Os maiores valores de zona de inibição (ZI) para *M. luteus* foram apresentados pelos biofilmes de quitosana-extrato etanólico, com valores de ZI de 1,76; 2,05 e 1,60 mm para as respectivas concentrações de 20%, 30% e 50% (EtFr20 – 50%) e para os filmes de quitosana-pó do fruto, nas mesmas concentrações (PFr20-50%), com halos de inibição na faixa de 1,43; 1,73 e 1,85 mm. Os maiores valores de zona de inibição (ZI) para a bactéria *S. epidermidis*, foram apresentados pelos filmes de quitosana – extratos etanólico de 30 e 50%, com valores de ZI de 1,10 e 1,16 mm, respectivamente. Seguido do filme de quitosana – pó do fruto de 20 e 50%, com ZI de 1,37 e 1,44 mm, respectivamente. Dos efeitos para *S. aureus* e *B. subtilis*, destaca-se o filme de quitosana – extrato aquoso, que foi ativo nas concentrações de 30 e 50 % para *S. aureus* e nas concentrações de 20, 30 e 50 % para *B. subtilis*. Nenhum dos filmes foi ativo para a bactéria *B. cereus* e, para bactéria Gram-negativa, *P. aeruginosa*, o único filme com zona de inibição significativa foi o enriquecido com 50% do extrato etanólico (EtFr50%).

Tabela 8 – Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar de quitosana e de seus biofilmes preparados com amostras do fruto de *L. ferrea*.

Biofilme		Diâmetro da zona de inibição (mm)				
		<i>Ml</i>	<i>Sa</i>	<i>Sep</i>	<i>Bs</i>	<i>Pa</i>
<b>EtFr</b>	10%	-	-	-	-	-
	20%	1,76	-	-	-	-
	30%	2,05	-	1,10	-	-
	50%	1,60	1,0	1,16	1,00	0,97
<b>AFr</b>	10%	-	-	-	-	-
	20%	1,27	-	0,97	0,95	-
	30%	1,15	0,95	1,12	0,87	-
	50%	1,60	0,98	1,06	0,97	-
<b>PFr</b>	10%	-	-	-	-	-
	20%	1,43	-	-	-	-
	30%	1,73	-	1,37	-	-
	50%	1,85	-	1,44	-	-
Quitosana	100%	-	-	-	-	-
EEtFrLF		2,56	1,89	1,86	-	-
EAFrLF		2,41	1,86	2,02	-	-
Controle			4,10	2,13	3,05	2,40

–: sem presença de zona de inibição de crescimento. *Ml*: *M. luteus*; *Sa*: *S. aureus*; *Sep*: *S. epidermidis*; *Bs*: *B. subtilis*; *Pa*: *P. aeruginosa*. Concentração dos extratos: 8000 µg mL<sup>-1</sup>.

Para as bactérias *M. luteus*, *S. aureus* e *S. epidermidis* a atividade dos extratos foi significativamente maior do que os filmes dos respectivos extratos incorporados à quitosana. A melhor atividade dos extratos pode estar relacionada a maior disponibilidade e difusão das substâncias bioativas quando estas se encontram em solução. Por outro lado, os extratos não apresentaram atividade contra *B. subtilis* e *P. aeruginosa* pelo método da difusão em poço, mas mostraram-se ativos no ensaio da microdiluição em caldo.

O filme de quitosana 100% não mostrou atividade antibacteriana significativa, embora as soluções de quitosana têm fortes atividades antibacterianas e antifúngicas pelos métodos da difusão em poço/disco e pelo método da microdiluição em caldo (AMATO *et al.*, 2018; NEJI *et al.*, 2020; SAYARI *et al.*, 2016; YOUNES *et al.*, 2014), os filmes de quitosana não inibiram o crescimento bacteriano nos testes de difusão em ágar, provavelmente porque a quitosana em forma de filme é incapaz de se difundir através do meio de ágar circundante (DI FILIPPO *et al.*, 2020).

Como consequência, as zonas de inibição observadas para os biofilmes contendo amostras de *L. ferrea* podem ser definitivamente atribuídas à adição dos extratos e pó do fruto. A figura 18 apresenta o comportamento dos filmes para cada microrganismo suscetível. O efeito

antimicrobiano dos biofilmes mostrou ser dependente das concentrações dos extratos e pó do fruto, pois, de maneira geral, as zonas de inibição de crescimento microbiano aumentaram proporcionalmente com as quantidades adicionadas dos extratos e pó do fruto na solução formadora de filme de quitosana.

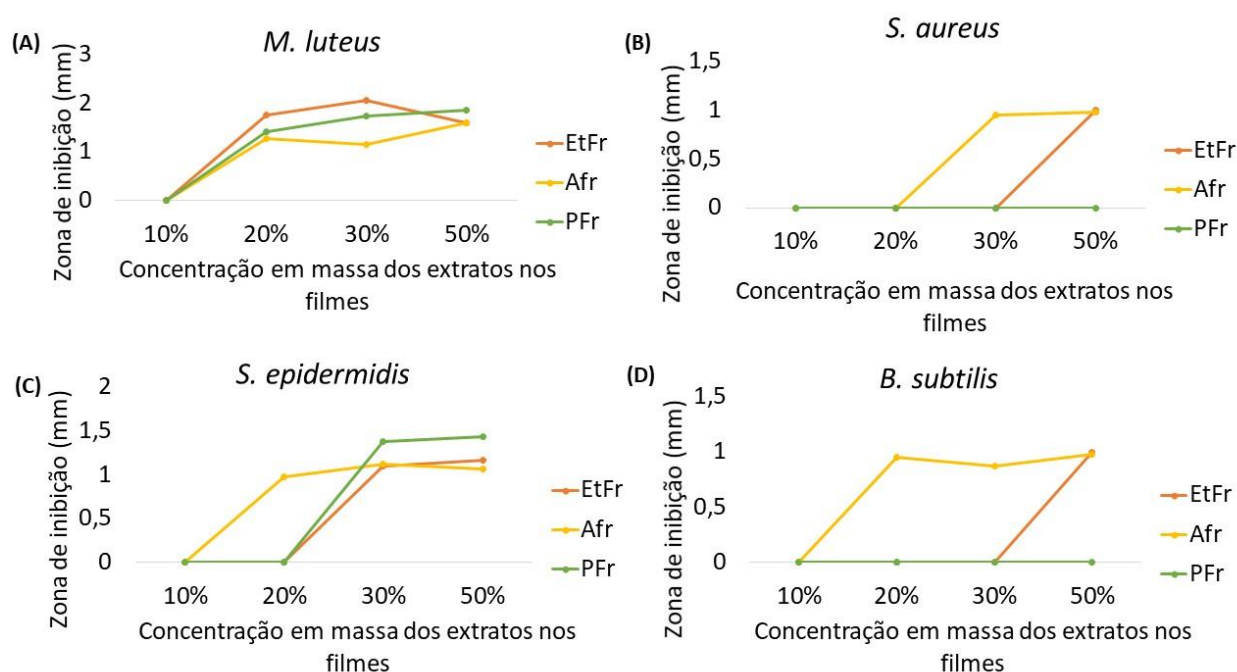


Figura 18: Atividade dos filmes de quitosana – extrato etanólico (EtFr10 – 50%), quitosana – extrato aquoso (AqFr10-50%) e quitosana – pó de fruto (PFr10 – 50%) contra *M. luteus* (A), *S. aureus* (B), *S. epidermidis* (C) e *B. subtilis* (D).

As propriedades antibacterianas dos filmes de quitosana incorporados com os extratos e pó do fruto podem estar relacionadas à presença de principalmente compostos fenólicos, uma vez que, os extratos aquosos e etanólicos do fruto de *L. ferrea* apresentaram altos teores de compostos fenólicos, bem como de taninos totais. A inclusão de compostos fenólicos em filmes a base de quitosana aumentou significativamente a atividade antimicrobiana dos filmes, conforme indicado pelos resultados já encontrados na literatura (BI *et al.*, 2019; CHENG, 2015).

As atividades antibacterianas dos filmes a base de quitosana com o pó e/ou extrato do fruto, juntamente com o reconhecido efeito cicatrizante de extratos do fruto em feridas (BATISTA *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2016), evidenciam o potencial uso destes como curativos, pois as infecções bacterianas podem atrasar significativamente a cicatrização de feridas (TEIRLINCK *et*



*al.*, 2019), as bactérias gram-positivas como *S. aureus* desempenham o papel principal no primeiro estágio da infecção e gram-negativas como *P. aeruginosa* podem ser encontradas quando a ferida já está desenvolvida (CARDONA, 2015; MOEINI *et al.*, 2020). A bactéria *M. luteus* também é comumente considerada um contaminante da pele e das mucosas, embora de baixa virulência, causa infecções graves em populações imunocomprometidas (IANNIELLO *et al.*, 2019; RODRIGUEZ-NAVA, 2020). Já a *S. epidermidis* é um patógeno oportunista envolvido em inúmeras infecções hospitalares, incluindo aquelas relacionadas a feridas na pele e dispositivos médicos implantados (AMATO *et al.*, 2018).

### **3.10 Considerações finais**

Os extratos do fruto não apresentaram diferenças significativas nos teores de fenólicos, flavonoides e taninos totais. O estudo indicou uma predominância biossintética de taninos em relação a flavonoides como observado também para os extratos da casca do caule no capítulo anterior. As atividades antioxidantes dos extratos do fruto de *L. ferrea* foram confirmadas pelos ensaios com os radicais DPPH e a extração com etanol foi mais eficiente em concentrar substâncias com capacidade de inibir o radical DPPH. No ensaio com o ABTS, as atividades não foram significativamente diferentes. Os dois extratos mostraram similaridade no efeito antibacteriano, indicando que os diferentes métodos de extração não alteraram as composições químicas dos compostos bioativos frente as Gram-positivas, sendo o gênero *Staphylococcus* o mais suscetível. O extrato etanólico foi seletivo para *C. albicans*, enquanto o aquoso para *P. aeruginosa* e *C. glabrata*. As atividades antimicrobianas dos biofilmes a base de quitosana incorporados com extratos e fruto pulverizado foram potencializadas, especialmente os filmes obtidos a partir do extrato aquoso do fruto. Dentre as bactérias, a mais suscetível foi *M. luteus*. Este estudo forneceu a primeira base para a compreensão das variações do conteúdo fenólico de extratos etanólicos do fruto e suas atividades antimicrobianas, bem como, a produção de biofilme a base de quitosana incorporado com estes extratos apresentando potencial uso terapêutico para o tratamento de feridas.

## 4.0 Referências

- ABD-ELGAWAD, A. M.; EL-AMIER, Y. A.; ASSAEED, A. M.; AL-ROWAILY, S. L. Interspecific variations in the habitats of *Reichardia tingitana* (L.) Roth leading to changes in its bioactive constituents and allelopathic activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 27, n. 1, p. 489-499, 2020/01/01/ 2020.
- AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. **Achievements in the Life Sciences**, 10, n. 1, p. 27-37, 2016/06/01/ 2016.
- AINOUCHE, A.; GREINWALD, R.; WITTE, L.; HUON, A. Seed alkaloid composition of *Lupinus tassinicus* maire (Fabaceae: Genisteeae) and comparison with its related rough seeded lupin species. **Biochemical Systematics and Ecology**, 24, n. 5, p. 405-414, 1996/07/01/ 1996.
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011/11/01 2011.
- ALARCÓN FLORES, M. I.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO FRENICH, A.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 134, n. 4, p. 2465-2472, 2012/10/15/ 2012.
- ALBANO, M.; CRULHAS, B. P.; ALVES, F. C. B.; PEREIRA, A. F. M. *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. **Microbial Pathogenesis**, 126, p. 231-238, 2019/01/01/ 2019.
- ALVES, S. F.; LUIZ BORGES, L.; DE PAULA, J. A. M.; VIEIRA, R. F. *et al.* Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 23, n. 2, p. 224-229, 2013/03/01/ 2013.
- AMATO, A.; MIGNECO, L. M.; MARTINELLI, A.; PIETRELLI, L. *et al.* Antimicrobial activity of catechol functionalized-chitosan versus *Staphylococcus epidermidis*. **Carbohydrate Polymers**, 179, p. 273-281, 2018/01/01/ 2018.
- ANJUM, S.; ARORA, A.; ALAM, M. S.; GUPTA, B. Development of antimicrobial and scar preventive chitosan hydrogel wound dressings. **International Journal of Pharmaceutics**, 508, n. 1, p. 92-101, 2016/07/11/ 2016.
- ARAÚJO, F. M.; DANTAS, M. C. S. M.; E SILVA, L. S.; AONA, L. Y. S. *et al.* Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**, 105, p. 203-206, 2017/10/15/ 2017.
- ARIF, T.; MANDAL, T. K.; KUMAR, N.; BHOSALE, J. D. *et al.* In vitro and in vivo antimicrobial activities of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Lin.) Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**, 123, n. 1, p. 177-180, May 2009.
- AUGUSTINE, R.; REHMAN, S. R. U.; AHMED, R.; ZAHID, A. A. *et al.* Electrospun chitosan membranes containing bioactive and therapeutic agents for enhanced wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, 156, p. 153-170, 2020/08/01/ 2020.
- BACCHI, E. M.; ABOIN SERTIE, J. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, 60, n. 2, p. 118-120, 1994. Article.
- BAGHER, Z.; EHTERAMI, A.; SAFDEL, M. H.; KHASTAR, H. *et al.* Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 55, p. 101379, 2020/02/01/ 2020.
- BARIANI, A.; GONÇALVES, J. F. C.; CHEVREUIL, L. R.; CAVALLAZZI, J. R. P. *et al.* Partial purification of trypsin inhibitors from *Caesalpinia ferrea* and *Swartzia polyphylla* seeds and effect of protein extracts on pathogenic fungi. **Summa Phytopathologica**, 38, n. 2, p. 131-138, 2012. Article.

- BAT, K. B.; VODOPIVEC, B. M.; ELER, K.; OGRINC, N. *et al.* Primary and secondary metabolites as a tool for differentiation of apple juice according to cultivar and geographical origin. **LWT**, 90, p. 238-245, 2018/04/01/ 2018.
- BATISTA, E. K. F.; DA TRINDADE, H. I.; FARIAS, I. S.; MARTINS, F. M. M. *et al.* Evaluation n of healing activity preparation with basis of jucá (*Cesalpinia ferrea* mart.). **Archives of Veterinary Science**, 22, n. 3, p. 30-39, 2017. Article.
- BEKTAS, N.; ŞENEL, B.; YENILMEZ, E.; ÖZATIK, O. *et al.* Evaluation of wound healing effect of chitosan-based gel formulation containing vitexin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 28, n. 1, p. 87-94, 2020/01/01/ 2020.
- BEREZINA, E. V.; BRILKINA, A. A.; VESELOV, A. P. Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia). **Scientia Horticulturae**, 218, p. 139-146, 2017/04/14/ 2017.
- BI, F.; ZHANG, X.; BAI, R.; LIU, Y. *et al.* Preparation and characterization of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan and proanthocyanidins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 134, p. 11-19, 2019/08/01/ 2019.
- BOUARAB-CHIBANE, L.; FORQUET, V.; CLEMENT, Y.; LANTERI, P. *et al.* Effect of interactions of plant phenolics with bovine meat proteins on their antibacterial activity. **Food Control**, 90, p. 189-198, 2018/08/01/ 2018.
- CAIRES, T. A.; DA SILVA, A. M. S.; VASCONCELOS, V. M.; AFFE, H. M. J. *et al.* Biotechnological potential of *Neolyngbya* (*Cyanobacteria*), a new marine benthic filamentous genus from Brazil. **Algal Research**, 36, p. 1-9, 2018/12/01/ 2018.
- CANTURK, Z. Evaluation of synergistic anticandidal and apoptotic effects of ferulic acid and caspofungin against *Candida albicans*. **Journal of Food and Drug Analysis**, 26, n. 1, p. 439-443, 2018/01/01/ 2018.
- CARDONA, A.; WILSON, S. Skin and Soft-Tissue Infections: A Critical Review and the Role of Telavancin in Their Treatment. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 61, p. S69-S78, 09/15 2015.
- CARLETTI, E.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C. Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 695, p. 17-39, 01/01 2011.
- CARVALHO, F. G.; DA SILVA SAMPAIO, J. P.; DOS SANTOS ARAÚJO, M. M.; PINTO, L. S. S. *et al.* Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. **Acta Scientiarum - Technology**, 38, n. 2, p. 137-143, 2016. Article.
- CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K. *et al.* Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 53, n. 3, p. 175-178, 1996.
- CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P. *et al.* "Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae.". **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19, n. 2B, p. 586-591, Apr-Jun 2009.
- CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of phytochemicals against *Bacillus cereus* in reconstituted infant rice cereal. **Food Microbiology**, 69, p. 189-195, 2018/02/01/ 2018.
- CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**. 1994; 53:55-63.

- CHEN, H.; YAO, J.; WANG, F.; ZHOU, Y. *et al.* Toxicity of three phenolic compounds and their mixtures on the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, 408, n. 5, p. 1043-1049, 2010/02/01/ 2010.
- CHENG, S.-Y.; WANG, B.-J.; WENG, Y.-M. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. **LWT - Food Science and Technology**, 63, n. 1, p. 115-121, 2015/09/01/ 2015.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance **Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Pennsylvania, 2005. Fifteenth Informational Supplement.
- COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; JENSEN, B. B.; GRAFOVA, I.; DOS SANTOS, P. A. *et al.* Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. **Acta Amazonica**, 47, n. 4, p. 331-340, Oct-Dec 2017.
- CUI, S.; MA, X.; WANG, X.; ZHANG, T.-A. *et al.* Phenolic acids derived from rice straw generate peroxides which reduce the viability of *Staphylococcus aureus* cells in biofilm. **Industrial Crops and Products**, 140, p. 111561, 2019/11/15/ 2019.
- CUNHA, A. P.; RIBEIRO, A. C. B.; RICARDO, N. M. P. S.; OLIVEIRA, A. C. *et al.* Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds – Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids**, 65, p. 68-76, 2017. Article.
- DA SILVA, J. V. C. d. L.; HIRSCHFELD, M. N. C.; CARES, J. E.; ESTEVES, A. M. Land use, soil properties and climate variables influence the nematode communities in the Caatinga dry forest. **Applied Soil Ecology**, p. 103474, 2019/12/19/ 2019.
- DA SILVA, L. C. N.; DA SILVA, C. A.; DE SOUZA, R. M.; JOSÉ MACEDO, A. *et al.* Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, 49, n. 9, p. 2222-2228, 2011. Article.
- DAS, B.; SRINIVAS, Y.; SUDHAKAR, C.; MAHENDER, I. *et al.* New diterpenoids from *Caesalpinia* species and their cytotoxic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 20, n. 9, p. 2847-2850, 2010. Article.
- DE ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; ASSUNÇÃO FERREIRA, M. R.; DE SOUZA NETO, M. A. *et al.* Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, 156, p. 88-96, 2014. Article.
- DE OLIVEIRA MARREIRO, R.; BANDEIRA, M. F. C. L.; DE SOUZA, T. P.; DE ALMEIDA, M. C. *et al.* Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, 6, p. 9-13, 2014. Article.
- DE S. LUNA, J.; DOS SANTOS, A. F.; DE LIMA, M. R. F.; DE OMENA, M. C. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 97, n. 2, p. 199-206, 2005. Article.
- DE SOUSA ARAÚJO, T. A.; ALENCAR, N. L.; DE AMORIM, E. L. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, 120, n. 1, p. 72-80, 2008/10/30/ 2008.
- DE SOUZA, A. B.; SOUZA, L. M. S.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, 29, n. 2, p. 380-383, 2006.
- DE SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERAKOWSKI, M. R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, 82, n. 3, p. 641-647, Oct 2010.

- DENG, Z. T.; SU, J.; DING, L. F.; TU, W. C. *et al.* Six new cassane diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan*. **Phytochemistry Letters**, 16, p. 207-212, Jun 2016.
- DEY, P.; PARAI, D.; BANERJEE, M.; HOSSAIN, S. T. *et al.* Naringin sensitizes the antibiofilm effect of ciprofloxacin and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **International Journal of Medical Microbiology**, 310, n. 3, p. 151410, 2020/04/01/ 2020.
- DI FILIPPO, M. F.; PANZAVOLTA, S.; ALBERTINI, B.; BONVICINI, F. *et al.* Functional properties of chitosan films modified by snail mucus extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, 143, p. 126-135, 2020/01/15/ 2020.
- DIAS, A. M. A.; REY-RICO, A.; OLIVEIRA, R. A.; MARCENEIRO, S. *et al.* Wound dressings loaded with an anti-inflammatory juca (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **Journal of Supercritical Fluids**, 74, p. 34-45, Feb 2013.
- DICKSON, R. A.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*. **Phytochemistry**, 68, n. 10, p. 1436-1441, May 2007.
- ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, 32, n. 1-3, p. 235-239, 1991. Article.
- ENERSTVEDT, K. H.; LUNDBERG, A.; SJØTUN, I. K.; FADNES, P. *et al.* Characterization and seasonal variation of individual flavonoids in *Zostera marina* and *Zostera noltii* from Norwegian coastal waters. **Biochemical Systematics and Ecology**, 74, p. 42-50, 2017/10/01/ 2017.
- EVANGELISTA, F.A.; VANNIER-SANTOS, A. M.; SILVA, A. S. G.; SILVA, N. D. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. **Journal of Neuroinflammation**. 2018.
- FALCAO, T. R.; RODRIGUES, C. A. O.; DE ARAUJO, A. A.; DE MEDEIROS, C. *et al.* Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) LP Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, 19, Feb 2019.
- FERNANDES, C. P. M.; MACHADO, C.; LOPES, T. V.; CUNHA, N. *et al.* Repellent Action of *Carapa guianensis* and *Caesalpinia ferrea* for flies species of Calliphoridae family. **Ciencia Rural**, 46, n. 5, p. 867-870, May 2016.
- FERNANDES, M. F.; CARDOSO, D.; DE QUEIROZ, L. P. An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high species richness and endemism. **Journal of Arid Environments**, 174, p. 104079, 2020/03/01/ 2020.
- FERREIRA, M. R. A.; FERNANDES, M. T. M.; DA SILVA, W. A. V.; BEZERRA, I. C. F. *et al.* Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius. **Pharmacognosy Magazine**, 12, n. 46, p. S285-S291, May 2016.
- FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C. *et al.* Biological Activities of *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- GABR, S.; NIKLES, S.; PFERSCHY WENZIG, E. M.; ARDJOMAND-WOELKART, K. *et al.* Characterization and optimization of phenolics extracts from *Acacia* species in relevance to their anti-inflammatory activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, 78, p. 21-30, 2018/06/01/ 2018.
- GAGNON, E.; LEWIS, G. P.; SOLANGE SOTUYO, J.; HUGHES, C. E. *et al.* A molecular phylogeny of *Caesalpinia* sensu lato: Increased sampling reveals new insights and more genera than expected. **South African Journal of Botany**, 89, p. 111-127, 2013. Article.

GIRARD, D.; LAVERDET, B.; BUHÉ, V.; TROUILLAS, M. *et al.* Biotechnological Management of Skin Burn Injuries: Challenges and Perspectives in Wound Healing and Sensory Recovery. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 23, n. 1, p. 59-82, 2017/02/01 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários %J Química Nova. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, A. F.; ALMEIDA, M. P.; LEITE, M. F.; SCHWAIGER, S. *et al.* Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food Chemistry**, 273, p. 186-193, 2019/02/01/ 2019.

GUERRA, A. C. V. D. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJO, A. A. D. *et al.* *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 92, p. 696-706, 2017.

GUIMARÃES, E.T.; CRUZ, G.S.; ALMEIDA, T.F.; SOUZA, B.S. *et al.* Transplantation of stem cells obtained from murine dental pulp improves pancreatic damage, renal function and painful diabetic neuropathy in diabetic type 1 mouse model. **Cell Transplant**. 2013; 22:2345–54.

HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, 13, n. 3, p. 437-449, 1987. Article.

HASSAN, S. K.; EL-SAMMAD, N. M.; MOUSA, A. M.; MOHAMMED, M. H. *et al.* Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 5, n. 6, p. 462-471, 2015. Article.

HU, D.; WANG, H.; WANG, L. Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. **LWT - Food Science and Technology**, 65, p. 398-405, 2016/01/01/ 2016.

HUSSEIN, S. A. M.; EL-MESALLAMY, A. M. D.; SOULEMAN, A. M. A.; MOUSA, M. A. Cytotoxic activity of bioactive compound from *Caesalpinia ferrea* Martius, Fabaceae. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, 8, n. 12, p. 2080-2084, 2016. Article.

HWANG, H. S.; SHIM, J. H. Brazilin and *Caesalpinia sappan* L. extract protect epidermal keratinocytes from oxidative stress by inducing the expression of GPX7. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 16, n. 3, p. 203-209, Mar 2018.

IANNIELLO, N. M.; ANDRADE, D. C.; IVANCIC, S.; ECKARDT, P. A. *et al.* Native valve infective endocarditis due to *Micrococcus luteus* in a non-Hodgkin's lymphoma patient. **IDCases**, 18, p. e00657, 2019/01/01/ 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Bioma e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250 000. Rio de Janeiro, 2019 – (Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, v.45, p. 125-138.

IRANI, S.; TODD, C. D.; WEI, Y.; BONHAM-SMITH, P. C. Changes in phenylpropanoid pathway gene expression in roots and leaves of susceptible and resistant *Brassica napus* lines in response to *Plasmodiophora brassicae* inoculation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 106, p. 196-203, 2019/04/01/ 2019.

JAWORSKA, M. M.; ANTOS, D.; GÓRAK, A. Review on the application of chitin and chitosan in chromatography. **Reactive and Functional Polymers**, 152, p. 104606, 2020/07/01/ 2020.

KASPERISKI, F. M.; LIMA, E. C.; UMPIERRES, C. S.; DOS REIS, G. S. *et al.* Production of porous activated carbons from *Caesalpinia ferrea* seed pod wastes: Highly efficient removal of captopril from aqueous solutions. **Journal of Cleaner Production**, 197, p. 919-929, 2018. Article.

KOC, B.; AKYUZ, L.; CAKMAK, Y. S.; SARGIN, I. *et al.* Production and characterization of chitosan-fungal extract films. **Food Bioscience**, 35, p. 100545, 2020/06/01/ 2020.

- KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, 59, n. 1, p. 117-120, 1998/01/03/ 1998.
- LEMES, B.B., DA SILVA MIGUÊZ, L., SANTOS, R.L., DA ROCHA BASTOS SERAFIM, J.C. *et al*, 2019. Two new prenylated isoflavones from *Deguelia costata*. **Phytochemistry Letters**, 30, 181-185.
- LE GRANDOIS, J.; GUFFOND, D.; HAMON, E.; MARCHIONI, E. *et al*. Combined microplate-ABTS and HPLC-ABTS analysis of tomato and pepper extracts reveals synergetic and antagonist effects of their lipophilic antioxidative components. **Food Chemistry**, 223, p. 62-71, 2017/05/15/ 2017.
- LEMONS, M.; BORGES, A.; TEODÓSIO, J.; ARAÚJO, P. *et al*. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 86, p. 42-51, 2014/01/01/ 2014.
- LI, J.; HUANG, S.-Y.; DENG, Q.; LI, G. *et al*. Extraction and characterization of phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial activities from pickled radish. **Food and Chemical Toxicology**, 136, p. 111050, 2020/02/01/ 2020.
- LI, S.; YI, J.; YU, X.; WANG, Z. *et al*. Preparation and characterization of pullulan derivative/chitosan composite film for potential antimicrobial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 148, p. 258-264, 2020/04/01/ 2020.
- LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R. *et al*. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 148, p. 80-89, 2020/03/01/ 2020.
- LIMA, S. M. A.; ARAUJO, L. C. C.; SITONIO, M. M.; FREITAS, A. C. C. *et al*. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22, n. 1, p. 169-175, Jan-Feb 2012.
- LIMA, S. M. A.; ARAÚJO, L. C. C.; SITÔNIO, M. M.; FREITAS, A. C. C. *et al*. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22, n. 1, p. 169-175, 2011. Article.
- LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ESPADA, S. F.; PACHECO, A. C. *et al*. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, 60, p. 93-99, Sep 2013.
- LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. B.; REBOREDO, M. M.; FARIA, V. C. *et al*. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 82, n. 4, p. 907-914, 2010. Article.
- LUNA, M. S. M.; DE PAULA, R. A.; BRANDÃO COSTA, R. M. P.; DOS ANJOS, J. V. *et al*. Bioprospection of *Libidibia ferrea* var. *ferrea*: Phytochemical properties and antibacterial activity. **South African Journal of Botany**, 130, p. 103-108, 2020/05/01/ 2020.
- MA, Y.; YANG, Y.; GAO, J.; FENG, J. *et al*. Phenolics and antioxidant activity of bamboo leaves soup as affected by in vitro digestion. **Food and Chemical Toxicology**, 135, p. 110941, 2020/01/01/ 2020.
- MAIER, M.; OELBERMANN, A.-L.; RENNER, M.; WEIDNER, E. Screening of European medicinal herbs on their tannin content—New potential tanning agents for the leather industry. **Industrial Crops and Products**, 99, p. 19-26, 2017/05/01/ 2017.
- MAREČEK, V.; MIKYŠKA, A.; HAMPEL, D.; ČEJKA, P. *et al*. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **Journal of Cereal Science**, 73, p. 40-45, 2017/01/01/ 2017.

MARTÍNEZ-MARTOS, J. M.; MAYAS, M. D.; CARRERA, P.; ARIAS DE SAAVEDRA, J. M. *et al.* Phenolic compounds oleuropein and hydroxytyrosol exert differential effects on glioma development via antioxidant defense systems. **Journal of Functional Foods**, 11, p. 221-234, 2014/11/01/ 2014.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. *et al.* Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, 74, p. 648-670, 2015/11/15/ 2015.

MERCADO-MERCADO, G.; DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E. Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. **Journal of Molecular Structure**, 1199, p. 126967, 2020/01/05/ 2020.

MOEINI, A.; PEDRAM, P.; MAKVANDI, P.; MALINCONICO, M. *et al.* Wound healing and Antimicrobial effect of active Secondary Metabolites in Chitosan-based Wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, p. 115839, 2020/01/13/ 2020.

NAIKOO, M. I.; DAR, M. I.; RAGHIB, F.; JALEEL, H. *et al.* Chapter 9 - Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance: An Overview. *In: KHAN, M. I. R.; REDDY, P. S., et al (Ed.). Plant Signaling Molecules: Woodhead Publishing, 2019. p. 157-168.*

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T. *et al.* Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, 177, n. 2, p. 119-124, 2002. Article.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T. *et al.* Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, 81, n. 1, p. 135-137, 2002. Article.

NASERI-NOSAR, M.; ZIORA, Z. M. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. **Carbohydrate Polymers**, 189, p. 379-398, 2018/06/01/ 2018.

NAWWAR, M.; EL-MOUSALLAMI, A.; HUSSEIN, S.; HASHEM, A. *et al.* Three New Di-O-glycosyl-C-glucosyl Flavones from the Leaves of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences**, 69, n. 9-10, p. 357-362, Sep-Oct 2014.

NAWWAR, M. A.; HUSSEIN, S. A.; EL-MOUSALLAMI, A. M.; HASHIM, A. N. *et al.* Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Pharmazie**, 70, n. 8, p. 553-558, Aug 2015.

NCUBE, B., FINNIE, J.F., VAN STADEN, J., 2011. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. **South African Journal of Botany**, 77(2), 387-396.

NEJI, A. B.; JRIDI, M.; KCHAOU, H.; NASRI, M. *et al.* Preparation, characterization, mechanical and barrier properties investigation of chitosan-kaolinite nanocomposite. **Polymer Testing**, 84, p. 106380, 2020/04/01/ 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79, n. 3, p. 629-661, 2016. Review.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NGUYEN, T. T.; THI DAO, U. T.; THI BUI, Q. P.; BACH, G. L. *et al.* Enhanced antimicrobial activities and physiochemical properties of edible film based on chitosan incorporated with *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. leaf extract. **Progress in Organic Coatings**, 140, p. 105487, 2020/03/01/ 2020.



- NOZAKI, H.; HAYASHI, K. i.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K. *et al.* Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, 48, n. 47, p. 8290-8292, 2007. Article.
- OBENG, E.; KPODO, F. M.; TETTEY, C. O.; ESSUMAN, E. K. *et al.* Antioxidant, total phenols and proximate constituents of four tropical leafy vegetables. **Scientific African**, 7, p. e00227, 2020/03/01/ 2020.
- OHIRA, S.; TAKAYA, K.; MITSUI, T.; KIDO, M. *et al.* New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, 54, n. 37, p. 5052-5055, 2013. Article.
- OKUR, M. E.; KARANTAS, I. D.; ŞENYİĞİT, Z.; OKUR, N. Ü. *et al.* Recent trends on wound management; new therapeutic choices based on polymeric carriers. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2020/01/23/ 2020.
- OLIVEIRA, A. F.; BATISTA, J. S.; PAIVA, E. S.; SILVA, A. E. *et al.* Evaluation of the Brazilian ironwood (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) healing activity on cutaneous lesions of goats. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12, n. 3, p. 302-310, 2010. Article.
- PACIFICO, S.; GALASSO, S.; PICCOLELLA, S.; KRETSCHMER, N. *et al.* Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. **Food Research International**, 69, p. 121-132, 2015/03/01/ 2015.
- PEDROSA, T. D.; BARROS, A. O.; NOGUEIRA, J. R.; FRUET, A. C. *et al.* Anti-wrinkle and anti-whitening effects of juca (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of Dermatological Research**, 308, n. 9, p. 643-654, Nov 2016.
- PEREIRA, L. D.; MOTA, M. R. L.; BRIZENO, L. A. C.; NOGUEIRA, F. C. *et al.* Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF-alpha, IL-1 beta, NO, TGF-beta. **Journal of Ethnopharmacology**, 187, p. 213-223, Jul 2016.
- PEREIRA, L. D. P.; SILVA, R. O. D.; BRINGEL, P. H. D. S. F.; SILVA, K. E. S. D. *et al.* Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, 139, n. 2, p. 642-648, 2012. Article.
- PICKLER, T. B.; LOPES, K. P.; MAGALHAES, S. A.; KRUEGER, C. M. A. *et al.* Effect of *Libidibia ferrea* bark and seed in maternal reproductive and biochemical outcomes and fetal anomaly in rats. **Birth Defects Research**, 111, n. 13, p. 863-871, Aug 2019.
- PIETROWSKA-BOREK, M.; NUC, K. Both cyclic-AMP and cyclic-GMP can act as regulators of the phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, 70, p. 142-149, 2013/09/01/ 2013.
- PORT'S, P. D.; CHISTE, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, 53, n. 2, p. 875-881, Oct 2013.
- PRGOMET, I.; GONÇALVES, B.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; SANTOS, R. *et al.* Irrigation deficit turns almond by-products into a valuable source of antimicrobial (poly)phenols. **Industrial Crops and Products**, 132, p. 186-196, 2019/06/01/ 2019.
- QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 23, n. 3, p. 367-382, 2001.
- RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, n. 3, p. 249-253, Sep 2005.

- RIASAT, M.; HEIDARI, B.; PAKNIYAT, H.; JAFARI, A. A. Assessment of variability in secondary metabolites and expected response to genotype selection in fenugreek (*Trigonella* spp.). **Industrial Crops and Products**, 123, p. 221-231, 2018/11/01/ 2018.
- RIBEIRO, D. A.; CAMILO, C. J.; DE FÁTIMA ALVES NONATO, C.; RODRIGUES, F. F. G. *et al.* Influence of seasonal variation on phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae). **Food Chemistry**, 315, p. 126277, 2020/06/15/ 2020.
- RODRIGUEZ-NAVA, G.; MOHAMED, A.; YANEZ-BELLO, M. A.; TRELLES-GARCIA, D. P. Advances in medicine and positive natural selection: Prosthetic valve endocarditis due to biofilm producer *Micrococcus luteus*. **IDCases**, 20, p. e00743, 2020/01/01/ 2020.
- ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Variation of phenolic profile and antioxidant activity of North American highbush blueberry leaves with variation of time of harvest and cultivar. **Industrial Crops and Products**, 62, p. 147-155, 2014/12/01/ 2014.
- SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. d. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O. *et al.* In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, n. 2, p. 289-294, 2009. Article.
- SANCHEZ-BALLESTA, M. T.; ROMERO, I.; JIMÉNEZ, J. B.; OREA, J. M. *et al.* Involvement of the phenylpropanoid pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO<sub>2</sub> levels. **Postharvest Biology and Technology**, 46, n. 1, p. 29-35, 2007/10/01/ 2007.
- SAWADA, L. A.; MONTEIRO, V. S. D.; RABELO, G. R.; DIAS, G. B. *et al.* *Libidibia ferrea* Mature Seeds Promote Antinociceptive Effect by Peripheral and Central Pathway: Possible Involvement of Opioid and Cholinergic Receptors. **Biomed Research International**, 2014.
- SAWADA, L. A.; MONTEIRO, V. S. D. C.; RABELO, G. R.; DIAS, G. B. *et al.* *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: Possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed Research International**, 2014, 2014. Article.
- SAYARI, N.; SILA, A.; ABDELMALEK, B. E.; ABDALLAH, R. B. *et al.* Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 87, p. 163-171, 2016/06/01/ 2016.
- SHAHZADI, L.; BASHIR, M.; TEHSEEN, S.; ZEHRA, M. *et al.* Thyroxine impregnated chitosan-based dressings stimulate angiogenesis and support fast wounds healing in rats: Potential clinical candidates. **International Journal of Biological Macromolecules**, 160, p. 296-306, 2020/10/01/ 2020.
- SILVA, P. F. d.; LIMA, J. R. d. S.; ANTONINO, A. C. D.; SOUZA, R. *et al.* Seasonal patterns of carbon dioxide, water and energy fluxes over the Caatinga and grassland in the semi-arid region of Brazil. **Journal of Arid Environments**, 147, p. 71-82, 2017/12/01/ 2017.
- SIQUEIRA, C. F. D. Q.; CABRAL, D. L. V.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. D. S.; DE AMORIM, E. L. C. *et al.* Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: Evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2012, 2012. Article.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutricao**, 15, n. 1, p. 71-81, 2002. Review.
- SRINIVAS, K. V. N. S.; KOTESWARA RAO, Y.; MAHENDER, I.; DAS, B. *et al.* Flavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, 63, n. 7, p. 789-793, 2003/08/01/ 2003.
- TALHAOUI, N.; TAAMALLI, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. *et al.* Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. **Food Research International**, 77, p. 92-108, 2015/11/01/ 2015.

- TALIKOWSKA, M.; FU, X.; LISAK, G. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, 135, p. 50-63, 2019/06/15/ 2019.
- TEIRLINCK, E.; FRAIRE, J. C.; VAN ACKER, H.; WILLE, J. *et al.* Laser-induced vapor nanobubbles improve diffusion in biofilms of antimicrobial agents for wound care. **Biofilm**, 1, p. 100004, 2019/12/01/ 2019.
- TEIXEIRA, S. A.; DE MELO, J. I. M. Medicinal plants used in the Municipality of Jupi, Pernambuco State, Brazil. **Iheringia - Serie Botanica**, 61, n. 1-2, p. 5-11, 2006. Article.
- UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of ellagic acid and 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl)ellagic acid on sorbitol accumulation in vitro and in vivo. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 27, n. 10, p. 1584-1587, Oct 2004.
- UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K. *et al.* Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, 8, n. 5, p. 377-381, Sep 2001.
- VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; BATISTA, T. M.; CARNEIRO, E. M. *et al.* Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, n. 3, p. 1533-1541, 2011. Article.
- VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, 3, n. 1, p. 2-20, 2010. Review.
- WAN, J. F.; YUAN, J. Q.; MEI, Z. N.; YANG, X. Z. Phenolic glycosides from *Boschniakia himalaica*. **Chinese Chemical Letters**, 23, n. 5, p. 579-582, 2012/05/01/ 2012.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, 89, p. 164-175, Nov 2013.
- WONG, S. Y.; MANIKAM, R.; MUNIANDY, S. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. **Journal of Infection in Developing Countries**, 9, n. 9, p. 936-944, 2015. Article.
- WU, M.; WANG, Y. F.; ZHANG, M. L.; HUO, C. H. *et al.* Chemical Constituents of Plants from the Genus *Caesalpinia*. **Chemistry & Biodiversity**, 8, n. 8, p. 1370-1399, Aug 2011.
- WU, Y.-K.; CHENG, N.-C.; CHENG, C.-M. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. **Trends in Biotechnology**, 37, n. 5, p. 505-517, 2019/05/01/ 2019.
- WYREPKOWSKI, C. C.; DA COSTA, D.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W. *et al.* Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**, 19, n. 10, p. 16039-16057, Oct 2014.
- XIE, Y.; ZHENG, Y.; DAI, X.; WANG, Q. *et al.* Seasonal dynamics of total flavonoid contents and antioxidant activity of *Dryopteris erythrosora*. **Food Chemistry**, 186, p. 113-118, 2015/11/01/ 2015.
- YE, X.; YU, S.; LIANG, Y.; HUANG, H. *et al.* Bioactive triterpenoid saponins and phenolic compounds against glioma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 24, n. 22, p. 5157-5163, 2014/11/15/ 2014.
- YODSAOUE, O.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; TEWTRAKUL, S. *et al.* Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Phytochemistry**, 71, n. 14-15, p. 1756-1764, Oct 2010.
- YOUNES, I.; HAJJI, S.; FRACHET, V.; RINAUDO, M. *et al.* Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, 69, p. 489-498, 2014/08/01/ 2014.

YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K. *et al.* Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, 185, p. 57-63, 2014/08/18/ 2014.

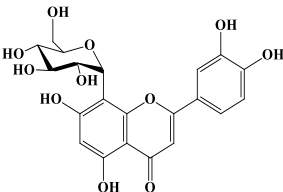
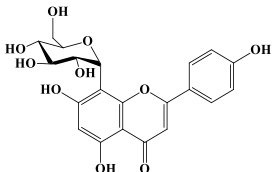
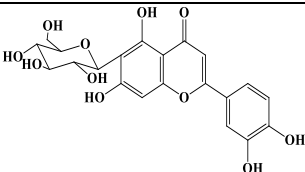
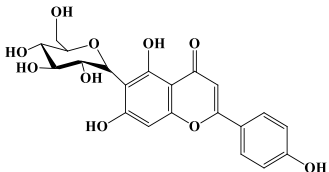
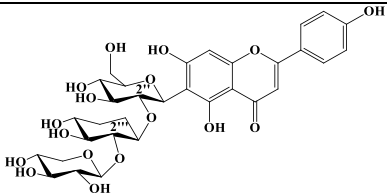
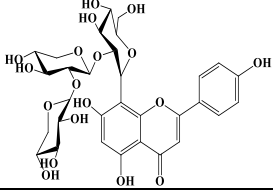
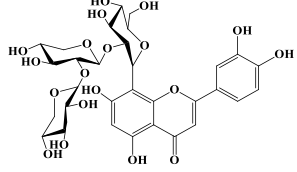
YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, 21, n. 5, 2016. Article.

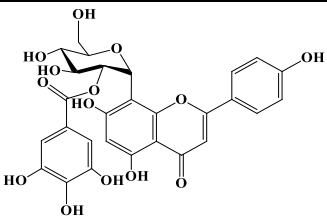
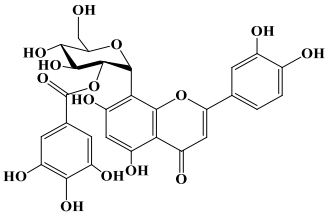
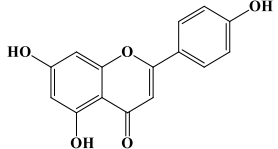
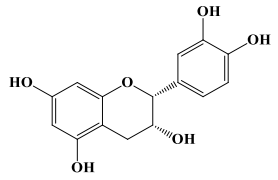
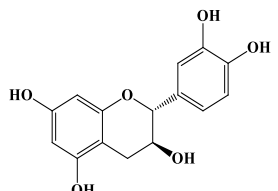
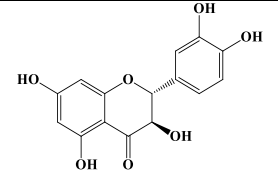
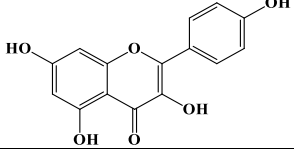
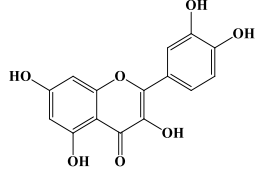
ZANIN, J. L. B.; DE CARVALHO, B. A.; MARTINELLI, P. S.; DOS SANTOS, M. H. *et al.* The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, 17, n. 7, p. 7887-7902, Jul 2012.

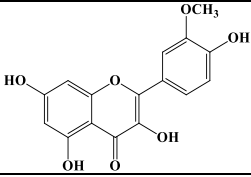
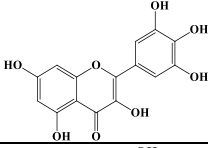
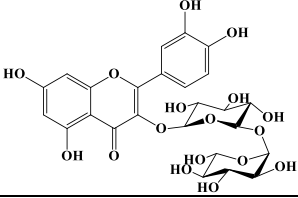
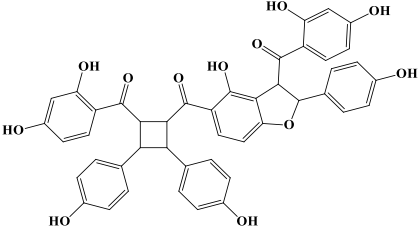
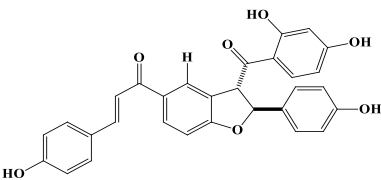
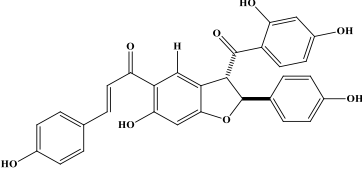
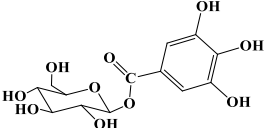
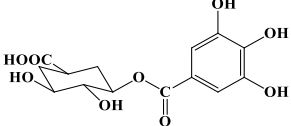
ZHANG, N.; GAO, T.; WANG, Y.; LIU, J. *et al.* Modulating cationicity of chitosan hydrogel to prevent hypertrophic scar formation during wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, 154, p. 835-843, 2020/07/01/ 2020.

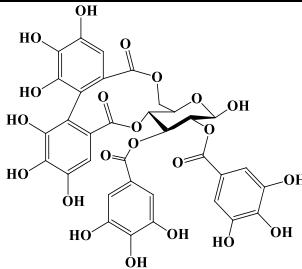
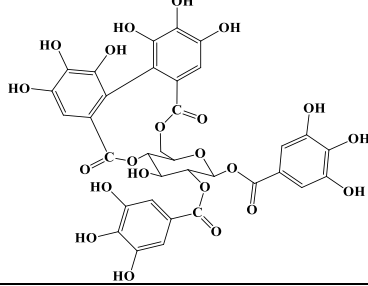
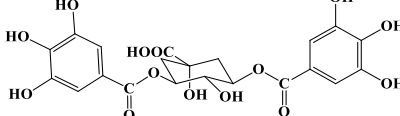
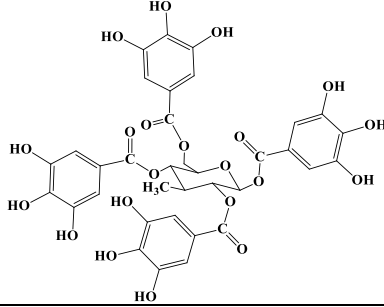
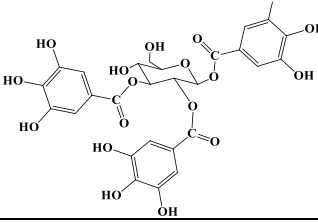
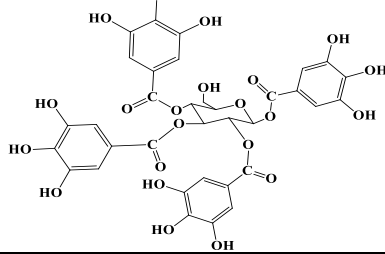
ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. **Environmental and Experimental Botany**, 59, n. 2, p. 109-116, 2007. Article.

**5.0 APÊNDICE – Tabela de compostos identificados e isolados, estruturas químicas, atividades farmacológicas e tecidos descritos em estudos fitoquímicos e farmacológicos de *L. ferrea*.**

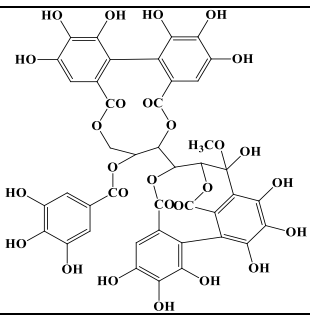
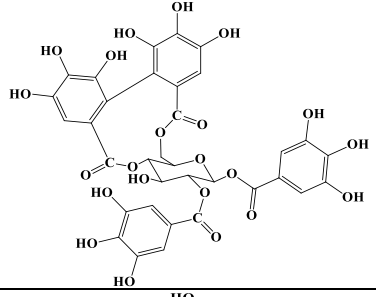
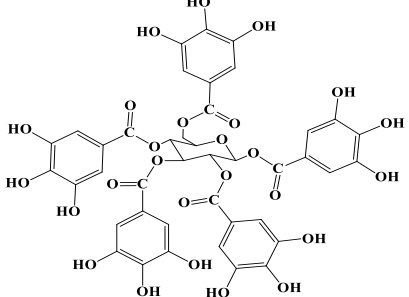
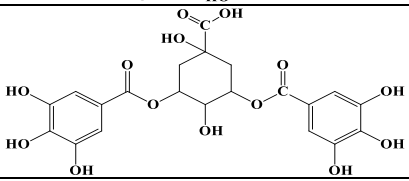
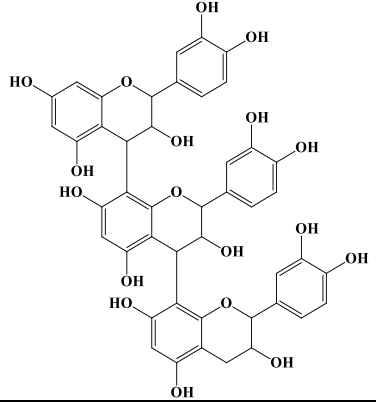
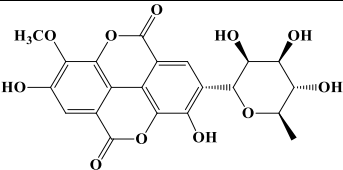
Substância	Método de extração e/ou identificação	Atividade biológica	Órgão/local de coleta da planta	Referência
orientina (1)		-	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
vitexina (2)		-	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
isorientina (3)		-	Folhas/Egito	NAWWAR <i>et al.</i> , 2014
isovitexina (4)		-	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
isovitexina 2''-O-β-[xilopiranosil-(1'''' → 2''')]-O-β-xilopiranosil] (5)		-	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
vitexina 2''-O-β-[xilopiranosil-(1'''' → 2''')]-O-β-xilopiranosil] (6)		-	Folhas/Egito	NAWWAR <i>et al.</i> , 2014
orientina 2''-O-β-[xilopiranosil-(1'''' → 2''')]-O-β-xilopiranosil] (7)		-	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015

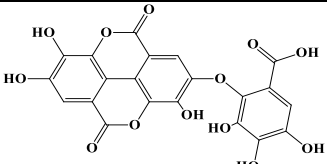
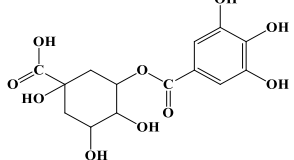
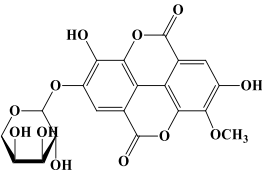
2''-O-galoilvitexina (8)		Antioxidante e citotóxico para queratinócitos. Anticâncer	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
2''-O-galoilorientina (9)		Antioxidante e citotóxico para queratinócitos	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
apigenina (10)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
epicatequina (11)		-	Casca do caule; Fruto/Manaus; Mato Grosso	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016; VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2011; WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
catequina (12)		-	Casca do caule; Fruto/Pernambuco; Manaus	DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2014; PEDROSA <i>et al.</i> , 2016; VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2011
taxifolina (13)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
kaempferol (14)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
quercetina (15)		-	Caule; Fruto/Manaus; Belém	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016; PORT'S, 2013

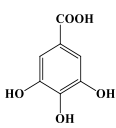
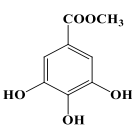
isorhamnetina (16)		-	Caule; Fruto/ Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
miricetina (17)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
rutina (18)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
paufferol A (19)		Inibição da topoisomeras e II e anticâncer	Galho/Amazona s	OHIRA <i>et al.</i> , 2013
paufferol B (20)		Inibição da topoisomeras e II e anticâncer	Galho/Amazona s	OHIRA <i>et al.</i> , 2013
paufferol C (21)		Inibição da topoisomeras e II e anticâncer	Galho/Amazona s	NOZAKI <i>et al.</i> , 2007
monogaloilglicose (22)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
ácido galoilchiquímico (23)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014

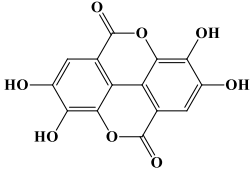
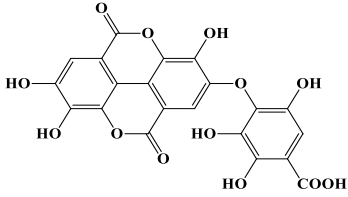
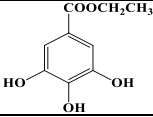
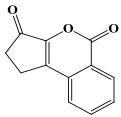
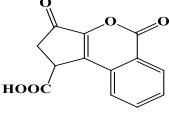
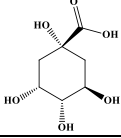
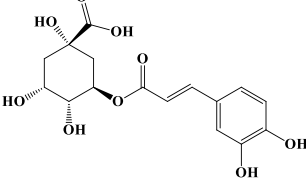
tellimagrandin-I (24)		-	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR, <i>et al.</i> , 2014, 2015
digaloil glicose (25)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
ácido digaloil quínico (26)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
galoil tanino (27)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
trigaloil glicose (28)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
tetragaloil glicose (29)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014

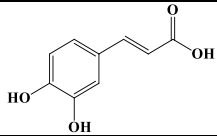
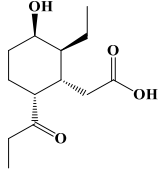
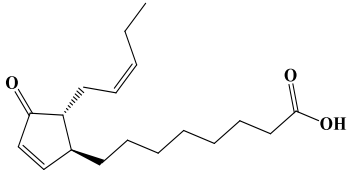
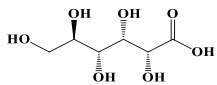
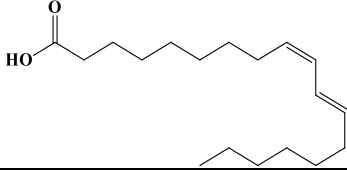
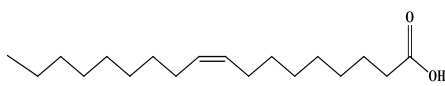
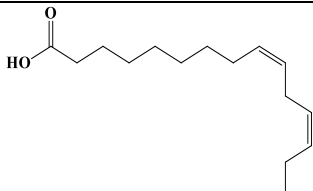
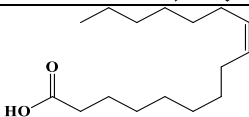
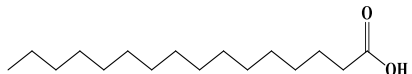
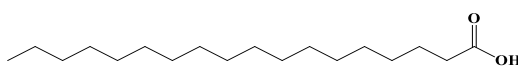


derivado da castalagina (30)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
ácido hexa-hidroxi- difênil digaloil glicose (31)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
pentagaloiil glicose (32)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
ácido digaloil chiquímico (33)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
procianidina C2 (34)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
ácido metil elágico ramnosídeo (35)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014

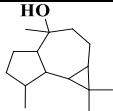
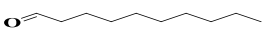
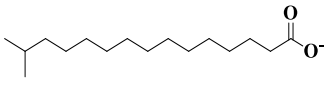
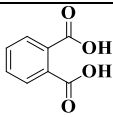
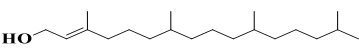
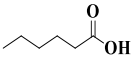
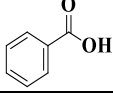

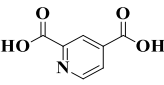
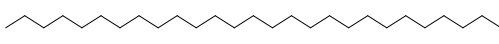
dilactona do ácido valoneico (36)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
Ácido 3- <i>O</i> -galoil quínico (37)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
ácido 3- <i>O</i> - metilelálgico-4'- <i>O</i> - $\beta$ -D- arabinopiranosídeo (38)		-	Casca do Caule/ Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014

		Inibição da aldose redutase		DE ARAÚJO <i>et al.</i> , 2014; HUSSEIN 2016; NAKAMUR <i>A et al.</i> , 2002; NAKAMUR <i>A et al.</i> , 2002; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015; PEDROSA <i>et al.</i> , 2016; PORT'S, 2013; VASCONCE LOS <i>et al.</i> , 2011; WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
ácido gálico (39)			Caule; Casca do Caule; Fruto; Folhas/ Amazonas e Pernambuco; Mato Grosso; Manaus; Pará e Egito	
galato de metila (40)		Inibição da aldose redutase	Fruto/Belém	NAKAMUR <i>A et al.</i> , 2002; NAKAMUR <i>A et al.</i> , 2002

ácido elágico (41)		Inibição da aldose redutase e do acúmulo de sorbitol (diabetes)	Caule; Casca do Caule; Folhas; Fruto; Semente/Rio Grande do Norte; Amazonas e Mato Grosso; Egito; Belém; Rio Grande do Norte	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015; PICKLER <i>et al.</i> , 2019; UEDA, 2004; UEDA <i>et al.</i> , 2001; VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2011; WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014)
ácido 2- (2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) elágico (42)		Inibição da aldose redutase e do acúmulo de sorbitol (diabetes)	Fruto/Belém	UEDA <i>et al.</i> , 2001; UEDA, 2004;
galato de etila (43)		-	Casca do Caule/Mato Grosso	WYREPKO WSKI <i>et al.</i> , 2014
brevifolin (44)		-	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
ácido brevifolincarboxílico (45)		Antioxidante e citotóxico para queratinócitos	Folhas/Egito	HUSSEIN, 2016; NAWWAR <i>et al.</i> , 2014, 2015
ácido quínico (46)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016 (
ácido clorogênico (47)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016

ácido cafeíco (48)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
ácido 2- (2-etil-3-hidroxi-6-propionilciclohexil) acético (49)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
ácido 12-oxofitodienóico (50)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
ácido glucônico (51)		-	Caule; Fruto/Manaus	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
ácido linoleico (52)		-	Fruto; Semente/Pará	DIAS <i>et al.</i> , 2013; SAWADA <i>et al.</i> , 2014
ácido oleico (53)		-	Semente/Pará	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
ácido linolênico (54)		-	Folhas; Semente/Pernambuco; Pará	LUNA <i>et al.</i> , 2020; SAWADA <i>et al.</i> , 2014
ácido palmitoleico (55)		-	Semente/Pará	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
ácido palmítico (56)		-	Semente; Fruto; Folhas/Pará; Pernambuco	DIAS <i>et al.</i> , 2013; LUNA <i>et al.</i> , 2020; SAWADA <i>et al.</i> , 2014
ácido esteárico (57)		-	Semente; Fruto/Pará	DIAS <i>et al.</i> , 2013; SAWADA <i>et al.</i> , 2014

ácido cáprico (58)		-	Semente/Pará	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
ácido eláidico (59)		-	Fruto/Pará	DIAS <i>et al.</i> , 2013
gama-sitosterol (60)		-	Fruto; Folhas/Pará; Pernambuco	DIAS <i>et al.</i> , 2013; LUNA <i>et al.</i> , 2020
lupenona (61)		-	Fruto/Pará	DIAS <i>et al.</i> , 2013
$\alpha$ -D-galactose (62)		-	Semente	LOPES <i>et al.</i> , 2013
$\beta$ -D-manose (63)		-	Semente	LOPES <i>et al.</i> , 2013
galactomananas (64)		Controla a hiperglicemia	Semente	DE SOUZA, 2010; LOPES <i>et al.</i> , 2013
octadecanal (65)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
n-dodecanal (66)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
octacosano (67)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
docosano (68)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
pentadecano (69)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
heptacosano (70)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
ácido penta decanóico (71)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020

globulol (72)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
n-decanal (73)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
14-metil-pentadecanoato (74)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
ácido 1,2-benzenodicarboxílico (75)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
fitol (76)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
ácido hexanóico (76)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
ácido benzoico (77)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
pirrolidina (78)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
ácido-2,4-piridinodicarboxílico (79)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020
heptacosano (80)		-	Folhas/Pernambuco	LUNA <i>et al.</i> , 2020