



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



RUBENS SANTOS BARRETO

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA *in silico* E *in vitro* DE *Bredemeyera brevifolia*

Feira de Santana - BA
2023

RUBENS SANTOS BARRETO

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA *in silico* E *in vitro* DE *Bredemeyera brevifolia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves
Coorientadores: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar (UESB) e Prof. Dr. Manoelito C. dos Santos Junior

Feira de Santana - BA
2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



DANIELLE FIGUEREDO DA SILVA

Data: 15/08/2023 17:20:25-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Danielle Figuerêdo da Silva
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente



HUGO NEVES BRANDAO

Data: 16/08/2023 10:36:24-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente



JORGE MAURICIO DAVID

Data: 16/08/2023 16:19:18-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jorge Mauricio David
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente



VANDERLUCIA FONSECA DE PAULA

Data: 16/08/2023 16:33:05-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Documento assinado digitalmente



CLAYTON QUEIROZ ALVES

Data: 15/08/2023 17:03:15-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves
Universidade Estadual de Feira de Santana
Orientador e Presidente da Banca

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

B264e

Barreto, Rubens Santos

Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade biológica *in silico* e *in vitro* de *Bredemeyera brevifolia* / Rubens Santos Barreto. – 2023.

102 f.: il.

Orientador: Clayton Queiroz Alves.

Co-orientadores: Rosane Moura Aguiar, Manoelito C. dos Santos Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2023.

1. Componentes químicos dos vegetais. 2. *Bredemeyera brevifolia*.
I. Título. II. Oliveira, Alves Clayton Queiroz, orient. III. Aguiar, Rosane Moura, coorient. IV. Santos Junior, Manoelito C. dos, coorient.
III. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 581.19

À minha Mãe e meu Pai (in memoriam), por tudo que me ensinaram.

À minha esposa Andreia, pelo amor e apoio incondicional.

Às minhas filhas Alice e Rebeca, minhas maiores fontes de inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e por tudo que consegui alcançar.

A minha Mãe, meu Pai e Irmãos, sempre incentivando, torcendo e vibrando a cada conquista.

A minha Esposa, pelo permanente incentivo, por ter assumido todas as demandas que surgiram durante minha ausência, pela paciência para ouvir as minhas lamúrias sobre as coisas que insistiam em dar errado, por sofrer em cada momento de dificuldade e comemorar a cada pequena vitória, por ser a companheira de todas as horas, enfim agradeço por tudo e mais alguma coisa...esta vitória é nossa!

As minhas Filhas, que mesmo sem compreenderem completamente este processo, sempre transmitiram amor, compreensão e carinho, me fortalecendo diariamente ao longo dessa jornada.

A minha Coorientadora, Profa. Rosane Aguiar, que esteve presente em todos os momentos deste doutorado, desde o primeiro contato com o Prof. Clayton, participando das etapas de planejamento, execução e finalização dos trabalhos. Você abriu as portas burocráticas, acadêmicas e físicas necessárias para que eu conseguisse concluir meu doutorado. Ao permitir meu acesso ao LOE e ao Laboratório de Cromatografia da UESB, muitas barreiras foram derrubadas, acredito que sem sua participação, não teria conseguido concluir a tese. Sou muito grato por seu apoio, orientação e amizade.

Ao meu Orientador, Prof. Clayton Queiroz, por me receber como orientando. Pelo seu profissionalismo, por estar sempre disponível, por compreender as dificuldades normais, e sobretudo as adicionais provocadas pelo período da pandemia, por compreender que eu precisava realizar uma parte do trabalho experimental em outra instituição, em um momento em que minha presença no LABEXA se fazia necessário. Sou muito grato a ti, pela orientação, por não me deixar desanimar, pela amizade e parceria que conseguimos construir nesse período.

A um grupo seleta de amigos “A diretoria”, formado por minha companheira Andreia, Rosane, Moacyr, Darci e Dani, que desde os tempos da graduação estão ao meu lado, pela amizade verdadeira, encorajamento e apoio demonstrado ao longo desses anos. Lembrarei sempre que a ideia deste doutorado surgiu em um de nossos tantos encontros cervejeiros.

Aos colegas e novos amigos do GPSB, Jéssica, Adrienne, Glauber, Daniele, Jonaldo, Verônica, Gláucia, Syntia, Henrique e Maísa, a companhia e colaboração de vocês foi fundamental para que as coisas dessem certo na UEFS. E a Diego Mota, pela ajuda no preparo de extrato vegetal.

Aos amigos da República do Feira VI, Jhonatan, Harol, Anaís, Luís e Lionel, estudantes dedicados e excelentes companhias, pessoas especiais que tive o privilégio de conhecer.

Aos colegas do programa de RGV, Áddla, Andressa, Aritana, Carla, Daniela, Gustavo, Jamile, Jossandra, Marinho, Natália, Romeu, Rosembrando, Simônica e Uaslei, pelos momentos de estudos e de resenhas (nossa válvula de escape nos momentos mais tensos).

A Fabrício, que muitas vezes abriu mão de seu tempo de descanso para fazer meu treinamento no equipamento de HPLC.

Aos colegas dos Laboratórios de Óleos Essenciais e de Cromatografia da UESB/Jequié, Vilisaimon, Mateus e Patrícia, que tanto contribuíram para este trabalho.

Ao botânico José Floriano B. Pastore, pela identificação e coleta do material vegetal.

A Maria da Luz, pelo treinamento em microscopia, por ter cedido seu tempo e laboratório particular para viabilizar as análises microscópicas.

Aos funcionários e colaboradores do Horto Florestal e do LABEXA, que sempre estiveram dispostos a colaborar de alguma forma com os trabalhos.

Ao meu amigo Walter (IFBA/Salvador), pelo incentivo de sempre, e pela análise de infravermelho.

Ao Prof. Djalma Menezes, pelo apoio e por permitir que eu utilizasse o espaço de seu laboratório de pesquisa.

Ao Laboratório de Bioinformática e Química Computacional da UESB/Jequié, na pessoa do Prof. Wagner Soares, pelo suporte na parte dos ensaios *in silico*.

Ao Grupo de Pesquisa em Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico da UFPE, na pessoa da Profa. Rejane Neves, pelos ensaios *in vitro*.

A Agnaldo (IUNIR), por sua importante contribuição nos ensaios *in vitro*.

A Naiane (UESC), pelas nossas discussões a respeito da “metodologia PRISMA”, utilizada na elaboração da revisão integrativa.

A coordenadora do Grupo de Pesquisa em Catálise e Química de Materiais (UESB/Itapetinga), Profa. Alexilda Oliveira, pela quantificação dos ácidos graxos.

Ao Prof. Marcos Bezerra do Laboratório de Química Analítica (UESB/Jequié), pelo suporte no planejamento multivariado.

Aos laboratórios LabRMN (UFG) e LABAREMN (UFBA), pelas análises de RMN.

A UESB/DCT/PGQUIM, que abriu suas portas para que eu pudesse concluir meus experimentos em um momento em que tudo estava extremamente complicado devido ao período pandêmico.

Ao IFBA por ter viabilizado meu afastamento para cursar o doutorado. Instituição que tenho muito orgulho em fazer parte do corpo docente.

A todos os colegas do IFBA/Jequié, em especial a Núbia Moura e Núbia Soares, pelo incentivo e por assumirem as demandas decorrentes do meu afastamento.

A UEFS, em especial a todos os docentes e técnicos do Colegiado do PPG-RGV, pela receptividade, profissionalismo, compartilhamento de conhecimento e suas valorosas contribuições para o sucesso deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

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

“A persistência é o caminho do êxito”.
Charles Chaplin

RESUMO

Este trabalho relata o estudo fitoquímico do extrato hidrometanólico de *Bredemeyera brevifolia* e o potencial bioativo dos extratos. Para isso foram realizadas três abordagens distintas, que se configuram nos capítulos desta tese: 1) uma revisão integrativa sobre o gênero; 2) o estudo fitoquímico e do potencial antifúngico *in silico* e *in vitro*; e 3) um estudo da aplicação da metodologia de superfícies de respostas no fracionamento da fração hexânica por CC e CLAE-DAD, além da avaliação do potencial genotóxico do extrato hidrometanólico e fração hexânica pelo protocolo *Allium cepa*. A revisão integrativa revelou que as espécies *B. brevifolia*, *B. floribunda* e *B. laurifolia* foram estudadas do ponto de vista etnobotânico, apenas os extratos e substâncias de *B. floribunda* foram submetidas a algum ensaio biológico, enquanto que estudos fitoquímicos foram feitos com *B. brevifolia* (onde foram identificados xantonas e ácidos graxos), e *B. floribunda* (identificando xantonas, saponinas e um flavonoide). No estudo fitoquímico das frações orgânicas do extrato das folhas, a partir da fração hexânica de *B. brevifolia* foram identificados os ésteres metílicos dos ácidos graxos: ácido palmítico, margárico, linolelaídico, oleico, esteárico, dihomog- γ -linolênico e araquídico. Da fração clorofórmica foi isolada a xantona identificada como 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, até então inédita no gênero. O extrato hidrometanólico foi testado quanto ao potencial antifúngico *in vitro*, frente a cepas de fungos de amostras clínicas resistentes a azóis, apresentando-se ativo contra fungos leveduriformes, filamentosos e dermatófitos. No estudo *in silico*, a xantona e os ácidos graxos demonstraram potencial farmacocinético para o desenvolvimento de fitofármacos e análogos semissintéticos com ação antifúngica. No estudo sobre a aplicação da metodologia de superfície de respostas, como ferramenta quimiométrica, se obteve uma fase móvel otimizada para o fracionamento da fração hexânica, possibilitando sua semipurificação e posterior separação de substâncias por CLAE-DAD semipreparativa. Tal estratégia permitiu o isolamento de terpenos identificados pela primeira vez no gênero: ácidos oleanólico e ácido ursólico, além de um inédito, o ácido 3 β ,26,27-triidroxiolean-12-en-23,28-dióico. Na avaliação da genotoxicidade, não foram observadas anormalidades, indicando que pelo protocolo utilizado o extrato hidrometanólico e a fração hexânica não apresentam genotoxicidade frente a espécie *A. cepa*.

Palavras-chave: *B. brevifolia*. Xantona. Triterpeno. Ácido graxo. Atividade antifúngica. Quimiometria.

ABSTRACT

This work reports the phytochemical study of the hydromethanolic extract of *Bredemeyera brevifolia* and the bioactive potential of the extracts. For this, three different approaches were carried out, which are configured in the chapters of this thesis: 1) an integrative review on genus; 2) the phytochemical study and antifungal potential *in silico* and *in vitro*; and 3) a study of the application of the response surface methodology in the fractionation of the hexane fraction by CC and HPLC-DAD, in addition to the evaluation of the genotoxic potential of the hydromethanolic extract and hexane fraction by the *Allium cepa* protocol. The integrative review revealed that the species *B. brevifolia*, *B. floribunda* and *B. laurifolia* were studied from an ethnobotanical point of view, only the extracts and substances of *B. floribunda* were submitted to some biological assay, while phytochemical studies were carried out with *B. brevifolia* (where xanthenes and fatty acids were identified), and *B. floribunda* (where xanthenes, saponins and a flavonoid were identified). In the phytochemical study of the organic fractions of the leaf extract, from the hexane fraction of *B. brevifolia*, the methyl esters of the fatty acids were identified: palmitic, margaric, linoleic, oleic, stearic, dihomogamma-linolenic and arachidic acid. From the chloroform fraction, the xanthone identified as 1-hydroxy-3,7-dimethoxyxanthone, hitherto unpublished in the genus, was isolated. The hydromethanolic extract was tested for its *in vitro* antifungal potential against fungal strains from clinical samples resistant to azoles, and it was shown to be active against yeast, filamentous and dermatophyte fungi. In the *in silico* study, xanthone and fatty acids demonstrated pharmacokinetic potential for the development of phytopharmaceuticals and semi-synthetic analogues with antifungal action. In the study on the application of the response surface methodology, as a chemometric tool, an optimized mobile phase was obtained for the fractionation of the hexane fraction, allowing its semi-purification and subsequent separation of substances by semi-preparative HPLC-DAD. This strategy allowed the isolation of terpenes identified for the first time in the genus: oleanolic acid and ursolic acid, in addition to an unprecedented one, 3 β ,26,27-trihydroxyolean-12-en-23,28-dioic acid. In the evaluation of the genotoxicity, no abnormalities were observed, indicating that, according to the protocol used, the hydromethanolic extract and the hexane fraction do not present genotoxicity against the *A. cepa* species.

Keywords: *B. brevifolia*. Xanthone. Triterpene. Fatty acid. antifungal activity. Chemometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Fig. 1 Fluxograma da seleção de artigos para a revisão integrativa.....	24
Fig. 2 Distribuição temporal dos anos referentes às publicações incluídas	25
Fig. 3 Nuvem de palavras com os 100 termos mais citados nos títulos dos estudos	25
Fig. 4 Distribuição dos estudos por estado brasileiro.....	26
Fig. 5 Representação simplificada de etapas da biossíntese de xantonas em plantas superiores	32
Fig. 6 Triterpeno e saponinas isoladas de <i>Bredemeyera floribunda</i>	34
Fig. 7 Representação simplificada da biossíntese de saponinas triterpênicas.....	35
Fig. 8 Estrutura química do flavonoide rutina, isolado de <i>B. floribunda</i>	36
Fig. 9 Representação simplificada da biossíntese da rutina	37

CAPÍTULO 2

Fig. 1 Correlações observadas no espectro HMBC da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona	53
Fig. S1 Cromatograma de íons totais dos ésteres metílicos de ácidos graxos de HBB-C.....	65
Fig. S2 Espectro IVTF (KBr) da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona.....	66
Fig. S3 Espectro RMN ¹ H da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, (CD ₃) ₂ CO, a 500 MHz, δ (ppm)	67
Fig. S4 Espectro RMN HMQC da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, (CD ₃) ₂ CO, a 500/125 MHz, δ (ppm).....	68
Fig. S5 Espectro RMN HMBC da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, (CD ₃) ₂ CO, a 500/125 MHz, δ (ppm).....	69
Fig. S6 Mapas de interações 2D entre aminoácidos no sítio ativo da esterol-14-α-desmetilase com padrões e constituintes isolados de <i>Bredemeyera brevifolia</i>	70

CAPÍTULO 3

Fig. 1 Programa de gradiente do solvente B	77
Fig. 2 (a) modelo linear, gráficos preditos versus observados e de resíduos, (b) modelo quadrático, gráficos preditos versus observados e de resíduos. Para obter as superfícies, a proporção de metanol foi fixada em 5%.....	80
Fig. 3 Cromatogramas de HBB em λ = 240nm.....	81

Fig. 4 Correlações observadas no espectro HMBC para o triterpeno 3 β ,26,27-triidroxiolean-12-en-23,28-dióico.....	83
Fig. 5 Correlações observadas no espectro HMBC para os ácidos oleanólico e ursólico.....	87
Fig. 6 Fotografia microscópica de fragmentos de meristemas de <i>A. cepa</i>	87
Fig. 7 Fotografia microscópica de fragmentos de meristemas de <i>A. cepa</i>	88
Fig. S1 Espectro RMN ¹ H de FP2	91
Fig. S2 Espectro HMQC de FP2	92
Fig. S3 Espectro RMN ¹³ C de FP2	93
Fig. S4 Espectro DEPT 135 de FP2	94
Fig. S5 Espectro HMBC de FP2	95
Fig. S6 Espectros de EM-ESI em modo negativo, obtidos para a FP2	96
Fig. S7 Padrão de fragmentação proposto para o 3 β ,26,27-triidroxiolean-12-en-23,28-dióico, a partir dos dados de EM-ESI em modo negativo.....	97
Fig. S8 Espectro RMN ¹ H de FP3	98
Fig. S9 Espectro RMN ¹³ C de FP3	99
Fig. S10 Espectro RMN DEPT 135 de FP3	100
Fig. S11 Espectro RMN HMQC de FP3	101
Fig. S12 Espectro RMN HMBC de FP3	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tab. 1 Bredemeyera Willd. registros de ocorrência	26
Tab. 2 Xantonas isoladas do espécies de Bredemeyera Willd.....	31

CAPÍTULO 2

Tab. 1 Identificação e quantificação dos AG presentes em B. brevifolia por CG-EM e CG-DIC.	52
Tab. 2 Resultados do ensaio CIM, realizado com o extrato hidrometanólico das folhas de Bredemeyera brevifolia	54
Tab. 3 Interações intermoleculares da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, e do Ácido dihomog- linolênico no sítio da esterol-14- α -desmetilase.	55
Tab. 4. Parâmetros físico-químicos de inibidores naturais, sintéticos e medicamentosos de esterol-14- α -desmetilase.....	58
Tab. 5 Propriedades farmacocinéticas in silico da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, AG e outros antifúngicos inibidores da esterol-14- α -desmetilase	59
Tab. 6 Drug Likeness, Drug score e valores de toxicidade para 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, ácidos graxos e fluconazol.....	60
Tab. S1 Dados de RMN, ^1H , ^{13}C e acoplamentos da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona	71

CAPÍTULO 3

Tab. 1 Proporção de cada solvente avaliado em relação ao hexano	76
Tab. 2 Matriz do planejamento de mistura com restrições e respostas obtidas (número de spots) para otimizar as proporções da composição da fase móvel em CCD.....	76
Tab. 3 Frações obtidas do extrato hexânico.....	81
Tab. 4 Deslocamentos RMN de ^1H e de ^{13}C (δ , ppm), e acoplamentos de longa distância (HMBC) que permitiram a diferenciação do ácido oleanólico e ursólico na amostra FP3	86

SUMÁRIO

Introdução geral -----	16
Referências -----	18
CAPÍTULO 1: <i>Bredemeyera</i> Willd.: UMA REVISÃO INTEGRATIVA SOBRE SEUS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS E ASPECTOS QUÍMICOS -----	20
1.1 Introdução -----	22
1.2 Material e método -----	23
1.3 Resultados e Discussão -----	23
1.3.1 Características do gênero-----	28
1.3.2 Aplicações etnobotânicas-----	28
1.3.3 Ensaio biológicos-----	29
1.3.4 Características dos metabólitos secundários encontrados em <i>Bredemeyera</i> Willd.-----	30
1.3.4.1 Xantonas-----	30
1.3.4.2 Saponinas triterpênicas-----	33
1.3.4.3 Flavonoides-----	36
1.4 Conclusões -----	37
Referências -----	38
CAPÍTULO 2: POTENCIAL ANTIFÚNGICO <i>IN VITRO</i> E <i>IN SILICO</i> DE <i>Bredemeyera brevifolia</i> (Benth.) Klotzsch ex A.W. Benn.	43
2.1 Introdução -----	45
2.2 Material e Métodos -----	46
2.2.1 Material vegetal-----	46
2.2.2 Obtenção do extrato orgânico-----	46
2.2.3 Extração e obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (AG)-----	46
2.2.4 Identificação e quantificação dos AG do HBB-----	47
2.2.5 Extração, isolamento, e caracterização da xantona em CBB-----	47
2.2.6 Ensaio <i>in vitro</i> -----	48
2.2.6.1 Estirpes de fungos-----	48
2.2.6.2 Preparação de antifúngicos, extrato e meio de cultura-----	48
2.2.6.3 Preparo do inóculo para o teste de sensibilidade-----	48
2.2.6.3 Ensaio de micro diluição em caldo-----	49
2.2.6.4 Análise de dados-----	49
2.2.6.5 Leitura visual dos resultados-----	50
2.2.7 Experimentos <i>in silico</i> -----	50
2.2.7.1 Pesquisa no Drugbank-----	50

2.2.7.2 Bancos de dados, triagem virtual, ancoragem molecular e ferramentas ADMETox	50
2.3 Resultados e Discussão	51
2.3.1 Identificação e quantificação dos AG na fração hexânica de <i>B. brevifolia</i>	51
2.3.2 Identificação estrutural da xantona	52
2.3.3 Avaliação da atividade antifúngica do extrato hidrometanólico de <i>Bredemeyera brevifolia</i>	53
2.3.4 Ancoragem molecular da Xantona (XA), AG e fármacos	54
2.3.5 Predições <i>in silico</i> das propriedades ADMETox	57
2.4 Conclusões	61
Referências	61
Material suplementar	65
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO, E USO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS EM EXTRATOS DE <i>Bredemeyera brevifolia</i>	72
3.1 Introdução	74
3.2 Material e método	74
3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal	74
3.2.2 Obtenção do extrato vegetal	75
3.2.3 Otimização multivariada com planejamento de mistura	75
3.2.3.1 Seleção de solventes	75
3.2.3.2 Planejamento de misturas para a otimização das proporções dos solventes que compõem a fase móvel (FM)	76
3.2.4 Análises das frações obtidas na CC	77
3.2.5 Isolamento e caracterização de substâncias, a partir das frações HBB2 e HBB3	77
3.2.6 Teste de genotoxicidade <i>in vitro</i> , utilizando o protocolo <i>A. cepa</i>	78
3.3 Resultados e discussão	78
3.3.1 Otimização multivariada	78
3.3.2 Avaliação das frações obtidas	81
3.3.3 Elucidação estrutural de FP2	82
3.3.4 Identificação das substâncias presentes em FP3	84
3.3.5 Teste de genotoxicidade <i>in vitro</i>	87
3.4 Conclusões	88
Referências	89
Material suplementar	91
CONCLUSÃO GERAL	103

Introdução geral

A humanidade utiliza plantas para finalidades diversas, tais como a cura de doenças, alívio de dores, produção de venenos e controle de pragas, desde tempos remotos, em período anterior à era cristã (ARGENTA et al., 2011). Ao longo dos séculos, os povos primitivos foram acumulando e compartilhando os conhecimentos acerca das propriedades de determinados grupos de plantas, tendo como consequência a descoberta de diversas propriedades, entre elas seus os efeitos tóxicos e terapêuticos (SANDEEP; MITTA, 2017).

Os avanços no conhecimento científico, em especial na área da química, associados à medicina tradicional e a farmacopeias consolidadas ao longo do tempo, possibilitou o uso mais seguro das formulações com folhas, raízes, cascas, frutos ou extratos de plantas, por esta razão, até o século XIX os medicamentos eram constituídos predominantemente de plantas medicinais. Posteriormente, com o aprimoramento das técnicas de separação em química, tornou-se possível o isolamento de substâncias bioativas de interesse farmacêuticos, a exemplo da morfina (1806), emetina (1817), quinina (1820), colchicina (1820), salicina (1828), atropina (1831), quinidina (1833), codeína (1848) e efedrina (1887) (YUNES; CECHINEL, 2014).

Ao longo dos anos, a fitoquímica se consolidou como a área da química de produtos naturais responsável pelas pesquisas dos compostos oriundos das plantas, trazendo inovações que vão desde a coleta e preparação das amostras, desenvolvimento de técnicas modernas para a elucidação de estruturas orgânicas, inclusão de avaliação biológica de extratos e substâncias obtidas de fontes naturais, até o uso da química combinatória para a triagem de estruturas viáveis para serem utilizadas como fármacos (MENDOZA; SILVA, 2018). Desta forma, as pesquisas com produtos naturais têm um papel altamente significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Considerando que o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, é de se esperar que neste país, um grande número de famílias vegetais possua espécies que apresentem fitocompostos bioativos com possibilidade de serem utilizados em formulações medicamentosas (FORZZA et al., 2012; VALLI; VANDERLAN, 2019).

Um exemplo é a família Polygalaceae, formada por 27 gêneros, com aproximadamente 1300 espécies distribuídas em várias regiões do globo terrestre. No Brasil, já foram identificados 12 gêneros, totalizando cerca de 200 espécies catalogadas (BFG, 2015; PASTORE; SILVEIRA, 2016; FERREIRA et al., 2017; LIMA et al., 2018).

De acordo com a etnobotânica, plantas da família Polygalaceae são utilizadas na medicina popular para finalidades diversas, tais como expectorante, sedativa, antipsicótica,

antifúngica, analgésica, anti-inflamatória, diurética e antídoto para picada de cobras. As informações sobre o uso tradicional dessas espécies, tem despertado o interesse para o desenvolvimento de pesquisas que visam sua caracterização fitoquímica na busca por novas alternativas medicamentosas (NOGUEIRA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2014).

Levando-se em conta o número de espécies Polygalaceae catalogadas, pode-se inferir que uma parcela considerável delas foi pouco estudada quimicamente, a exemplo da *Bredemeyera brevifolia* (Benth.) Klotzsch ex A. W. Benn., que possui apenas um (1) registro de estudo fitoquímico publicado em periódico especializado, sendo, portanto, uma planta medicinal a ser pesquisada (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2000).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico do extrato hidrometanólico das folhas da espécie *Bredemeyera brevifolia* (Benth.) Klotzsch ex A. W. Benn., por métodos clássicos e por quimiometria (através da metodologia de superfície de respostas), visando o isolamento, a caracterização e a avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in silico* de seus compostos. As informações obtidas neste trabalho se somam aos estudos já existentes sobre o tema, contribuindo desta forma para o conhecimento e caracterização química da espécie em estudo.

Este texto está dividido em três capítulos, no primeiro é feita uma revisão de literatura, apresentada na forma de revisão integrativa, onde são abordados todos os estudos etnobotânicos e fitoquímicos, assim como ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados com extratos e substâncias isoladas do gênero *Bredemeyera* Willd. Ainda no primeiro capítulo são apresentadas as características e rotas biossintéticas dos metabólitos secundários isolados e identificados a partir de extratos de plantas do gênero. O segundo capítulo, trata do estudo fitoquímico realizado com o extrato hidrometanólico das folhas de *B. brevifolia*, e as suas frações hexânica e clorofórmica, sendo que o extrato passou por testes *in vitro* para avaliar sua atividade antifúngica em comparação com a ação de drogas azólicas conhecidas, enquanto as substâncias isoladas e identificadas nas frações foram avaliadas virtualmente em ensaios *in silico*, para avaliar seus potenciais antifúngicos. Por fim, no terceiro capítulo é adotado um planejamento experimental baseado em ferramentas da quimiometria com o objetivo de reduzir o uso de solventes e de etapas experimentais, onde por meio da metodologia de superfície de respostas se obteve uma fase móvel otimizada para o fracionamento da fração hexânica, possibilitando sua semipurificação e posterior separação de substâncias por CLAE semipreparativa.

Referências

- ARGENTA, S. C. et al. Plantas Mediciniais: Cultura Popular Versus Ciência. **Revista Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.
- BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566411>
- FERREIRA, D. M. C.; BARBOSA, J. I. de S.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Polygalaceae. **Rodriguesia**, v. 68, n. 1, p. 251-262, 2017. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768130>
- FORZZA, R. C. et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, p. 39-45, 2012. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.8>
- LIMA, I. G. et al. Flora do Ceará, Brasil: Polygalaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 673-692, 2018. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869229>
- MENDOZA, N.; SILVA, E. M. E. Introduction to phytochemicals: secondary metabolites from plants with active principles for pharmacological importance. In: Asao T, Asaduzzaman M (ed) **Phytochemicals. Source of antioxidants and role in disease prevention**. IntechOpen, London, 2018.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- NOGUEIRA, F. L. P.; FERNANDES, S. O. B.; REIS, G. M.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D.; LAGE, C. L. S.; MENEZES, F. S. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 4, p. 310–315, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400009>
- OLIVEIRA, M. da C. F. de; SILVEIRA, E. R. Penta-oxygenated xanthenes and fatty acids from *Bredemeyera brevifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 847-851, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00286-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00286-7)
- PASTORE, J.F.B.; SILVEIRA, J.B. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Polygalaceae. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5spe, p. 1451–1458, 2016. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667547>
- RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014. https://doi:10.1590/1983-084X/13_059
- SANDEEP, A.; MITTA, A. *Annona squamosa*: Seetaphal: A review. **IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology**, v. 2, n.3, p. 72-81, 2017. <https://doi:10.18231/2456-9542.2017.0001>

VALLI, M.; BOLZANI, V. S. Natural Products: Perspectives and Challenges for use of Brazilian Plant Species in the Bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, (Suppl. 3), artigo ID e20190208, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920190208>

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R. A., CECHINEL FILHO, V. (orgs.). **Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4ª ed., Itajaí, SC: Univali, 2014, p. 12 – 37.

CAPÍTULO 1: *Bredemeyera* Willd.: UMA REVISÃO INTEGRATIVA SOBRE SEUS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS E ASPECTOS QUÍMICOS

RESUMO

Bredemeyera Willd. possui treze espécies com ocorrências do México até a América Tropical, todas encontradas no Brasil, das quais sete são endêmicas. Três espécies têm uso popular, a *Bredemeyera brevifolia* como diurético, para combater inflamação nos rins, influenza, diarreia, dores reumáticas, dor na coluna e gastrite, *B. floribunda* para o tratamento de infecções de pele, disenteria, reumatismo, hipertensão, fadiga, exaustão, picada de serpentes, expectorante e diurético, e *B. laurifolia* usada no tratamento de infecções no útero e ovários. Esta pesquisa trata-se de uma revisão integrativa que tem por objetivo listar e comparar as ações farmacológicas e substâncias química já identificadas em registros na literatura que concerne a espécies do gênero, a fim de descobrir registros de compostos e suas aplicações farmacológicas. Dentre as espécies do gênero, apenas *B. brevifolia* e *B. floribunda* passaram por ensaios biológicos e prospecções fitoquímicas, sendo identificados ácidos graxos, xantonas, saponinas e um flavonoide. Nesta revisão foi possível verificar a existência de estudos promissores em etnobotânica e fitoquímica para três espécies do gênero, assim, considerando o número de publicações encontradas, pode-se afirmar que ainda há um campo promissor para pesquisas visando os potenciais medicamentosos de *Bredemeyera* Willd., o que faz desta revisão uma importante fonte de informações para pesquisas futuras sobre o tema.

Palavras-chave: *B. brevifolia*. *B. floribunda*. *B. laurifolia*. Saponina triterpênica. Xantona. Flavonoide

CHAPTER 1: *Bredemeyera* Willd.: A REVIEW ON POTENTIAL THERAPEUTIC AND CHEMICAL ASPECTS.

ABSTRACT

Bredemeyera Willd. has thirteen species with occurrences from Mexico to Tropical America, all found in Brazil, of which seven are endemic. Three species have popular use, the *Bredemeyera brevifolia* as a diuretic, to combat kidney inflammation, influenza, diarrhea, rheumatic pain, back pain and gastritis, *B. floribunda* for the treatment of skin infections, dysentery, rheumatism, hypertension, fatigue, exhaustion, snake bites, expectorant and diuretic, and *B. laurifolia* used in the treatment of infections in the uterus and ovaries. This research is an integrative review that aims to list and compare the pharmacological actions and chemical substances already identified in records in the literature concerning species of the genus, in order to discover records of compounds and their pharmacological applications. Among the species of the genus, only *B. brevifolia* and *B. floribunda* underwent biological assays and phytochemical prospecting, identifying fatty acids, xanthenes, saponins and a flavonoid. In this review, it was possible to verify the existence of promising studies in ethnobotany and phytochemistry for three species of the genus. which makes this review an important source of information for future research on the subject.

Keywords: *B. brevifolia*. *B. floribunda*. *B. laurifolia*. Triterpenoid saponin. Xanthone. Flavonoid.

1.1 Introdução

O Brasil é um país rico em biodiversidade e possui vasto um número de espécies vegetais, que podem apresentar fitocompostos ativos a serem utilizados em formulações medicamentosas. Essa característica favorece o estudo dos gêneros e espécies de uma determinada família de plantas, que demonstrem características de interesse medicinal, visando sua exploração econômica. Nesse sentido, a coleta, identificação e caracterização fitoquímica de acessos, de linhagens e de variedades de plantas medicinais são relevantes, uma vez que indivíduos de uma mesma espécie podem mostrar alta variabilidade no teor de metabólitos de interesse farmacológico devido a interação dos fatores genéticos e ambientais. Essas atividades são importantes para a conservação dos Recursos Genéticos Vegetais, proporcionando uma melhor compreensão das suas composições fitoquímicas, taxonômicas e possíveis utilizações (PRIYANKA 2021).

Polygalaceae é uma das famílias de plantas que apresenta considerável quantidade de compostos bioativos, composta por 27 gêneros, englobando cerca de 1300 espécies distribuídas em diferentes locais do planeta, principalmente em zonas de clima temperado, quente e tropical (PASTORE; SILVEIRA 2016; FERREIRA et al. 2017). No Brasil, a família conta com aproximadamente 200 espécies distribuídas em 12 gêneros (FERREIRA et al. 2017; LIMA et al. 2018). Espécies da família Polygalaceae são utilizadas para fins terapêuticos em diversas regiões do globo devido as suas atividades expectorante, sedativa, antirreumática, antipsicótica, antifúngica, analgésica, anti-inflamatória e diurética, o que as tornam fontes de interesse para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (NOGUEIRA et al. 2005; RIBEIRO et al. 2014a).

Considerando a diversidade e o número de espécies de Polygalaceae catalogadas, para alguns gêneros são poucos os estudos publicados sobre composição química e aspectos farmacológicos. A exemplo, na região nordeste do Brasil, tem-se alguns relatos na literatura de estudos fitoquímicos de duas espécies que pertencem ao gênero *Bredemeyera* Willd., a *B. brevifolia* (Benth.) Klotzsch ex A. W. Benn. e *B. floribunda* Willd.. Desse modo, ainda se faz necessário explorar mais o potencial do gênero, que se apresenta como um importante recurso genético vegetal. Esta pesquisa é uma revisão integrativa que tem por objetivos listar e comparar as ações farmacológicas e as substâncias químicas já identificadas em registros na literatura que concerne a espécies do gênero *Bredemeyera* Willd., a fim de descobrir registros de compostos e suas aplicações farmacológicas.

1.2 Material e método

Esta pesquisa trata-se de uma revisão integrativa realizada com base nos parâmetros da metodologia PRISMA 2015 (KITCHENHAM; BRERETON, 2013; SHAMSEER et al., 2015) e segue as fases de: planejamento, execução, seleção e inclusão.

Para a condução da revisão foi realizada uma pesquisa bibliográfica nos bancos de dados: Scopus (www.scopus.com), Science Direct (www.sciencedirect.com), Google acadêmico (scholar.google.com.br), Web of Science (www.webofscience.com) e SciELO (www.scielo.org) em novembro de 2022. Na busca por publicações nas bases de dados selecionadas, não houve restrição de idiomas e período de publicação. A palavra-chave *Bredemeyera*, foi usada separadamente, e depois, em conjunto com o operador booleano “and”, nos seguintes termos em inglês: *Bredemeyera* and xanthone, *Bredemeyera* and anti-ophidian, *Bredemeyera* and acid fatty, *Bredemeyera* and saponin, *Bredemeyera* and flavonoid, *Bredemeyera* and antifungal activity, *Bredemeyera* and extract, *Bredemeyera* and venom, e *Bredemeyera* and snakebites.

Após a identificação dos artigos adquiridos de cada base de dados, todas as publicações foram importadas em formatos Bibtex e Ris para o Software StArt (Estado da Arte através da Revisão Sistemática), v. 3.3 Beta 03, desenvolvido pela Universidade Federal de São Carlos, disponível para download ([http://lapes.dc.ufscar.br/tools/start tool](http://lapes.dc.ufscar.br/tools/start%20tool)). Além dos artigos adquiridos nas bases de dados, outras referências relevantes foram adicionadas ao conjunto de publicações que compõem essa revisão.

A partir da organização das referências no software, as duplicações foram removidas, e realizada a etapa de seleção inicial dos artigos com base na análise dos títulos, *abstracts* e *key-words*. Posteriormente, foram aplicados os critérios de inclusão (artigos de pesquisa revisados por pares, que discorrem sobre ação medicinal do gênero *Bredemeyera*) e exclusão (artigos de revisão, pré-prints e artigos que não discorreram sobre atividade medicinal do gênero). A partir do número final dos estudos primários pré-selecionados, foi realizada a análise dos textos completos de cada publicação para a coleta dos dados empíricos e informações quantitativas e qualitativas das pesquisas.

1.3 Resultados e Discussão

A busca bibliográfica nas bases de dados permitiu a obtenção de 183 estudos sobre *Bredemeyera* Willd. A partir da seleção inicial, 37 publicações foram excluídas por serem

identificadas como duplicatas. Dentre os 146 artigos restantes, 127 foram descartados por não corresponderem ao tema proposto nesta revisão. Desta forma, restaram 19 artigos que foram selecionados para compor o banco de dados da revisão (Fig. 1).

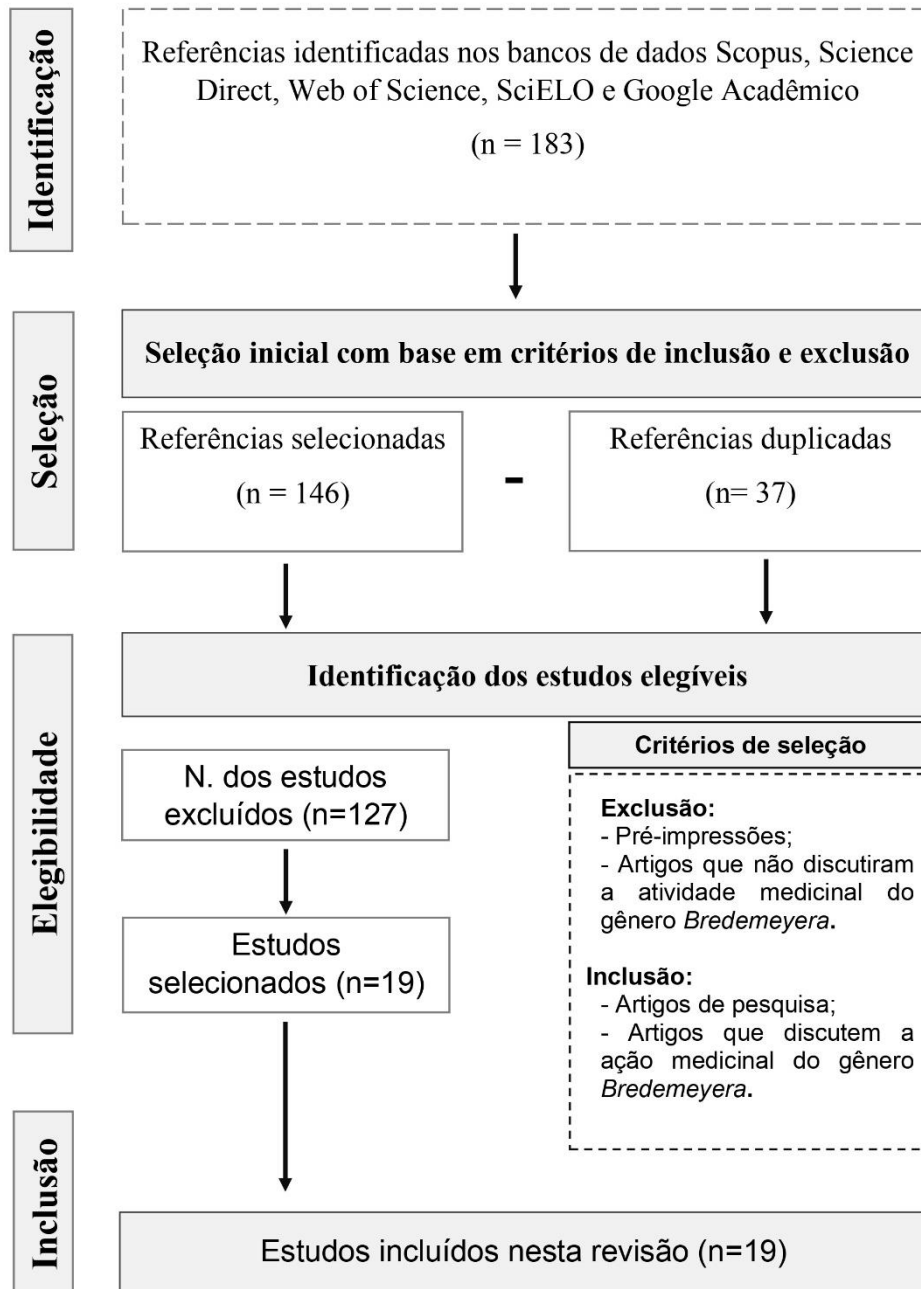


Fig. 1 Fluxograma da seleção de artigos para a revisão integrativa

Entre os artigos selecionados a partir da busca bibliográfica nas bases de dados, a distribuição temporal das publicações mostra que em 1994, 1996 e 2014 houve um maior número de pesquisas publicadas sobre o tema, sendo que a maior frequência de publicações ocorreu após os anos 2000 (Fig. 2).

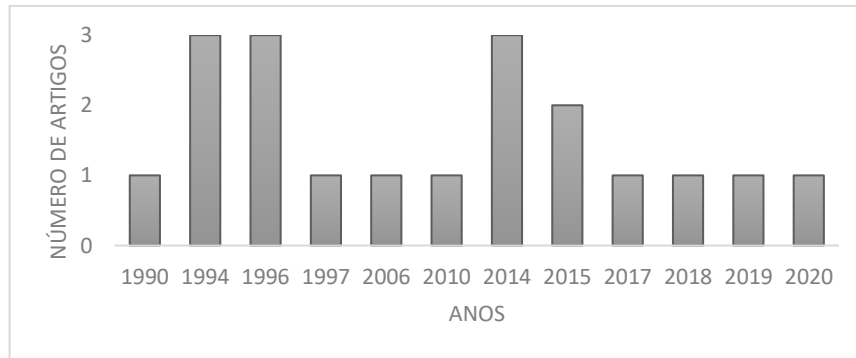


Fig. 2 Distribuição temporal dos anos referentes às publicações incluídas

A nuvem de palavras que reflete os 100 termos mais citados nos títulos das publicações aceitas demonstra que os termos *Bredemeyera*, *Floribunda*, Efeito, Medicinais e Plantas estão entre os com maior destaque devido a sua alta frequência nos títulos (Fig. 3).



Fig. 3 Nuvem de palavras com os 100 termos mais citados nos títulos dos estudos

O mapa da distribuição geográfica dos locais onde foram conduzidos os estudos incluídos nessa revisão demonstra que a maior parte das pesquisas foram produzidas em sete estados brasileiros. Os estados que se destacam com maior número de pesquisas sobre o potencial medicinal de espécies do gênero *Bredemeyera* são o Ceará, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A *B. floribunda* Willd. foi a espécie com maior número de estudos realizados no Brasil (Fig. 4).

O levantamento bibliográfico, focado na classificação botânica do gênero *Bredemeyera* Willd. permitiu a observação da distribuição geográfica das espécies no planeta, a Tab. 1 apresenta uma compilação dos dados extraído desses trabalhos, permitindo uma visualização clara sobre as espécies do gênero e suas ocorrências, até então registradas (MARQUES 1980; MOTA; PASTORE 2018; MOTA 2020).

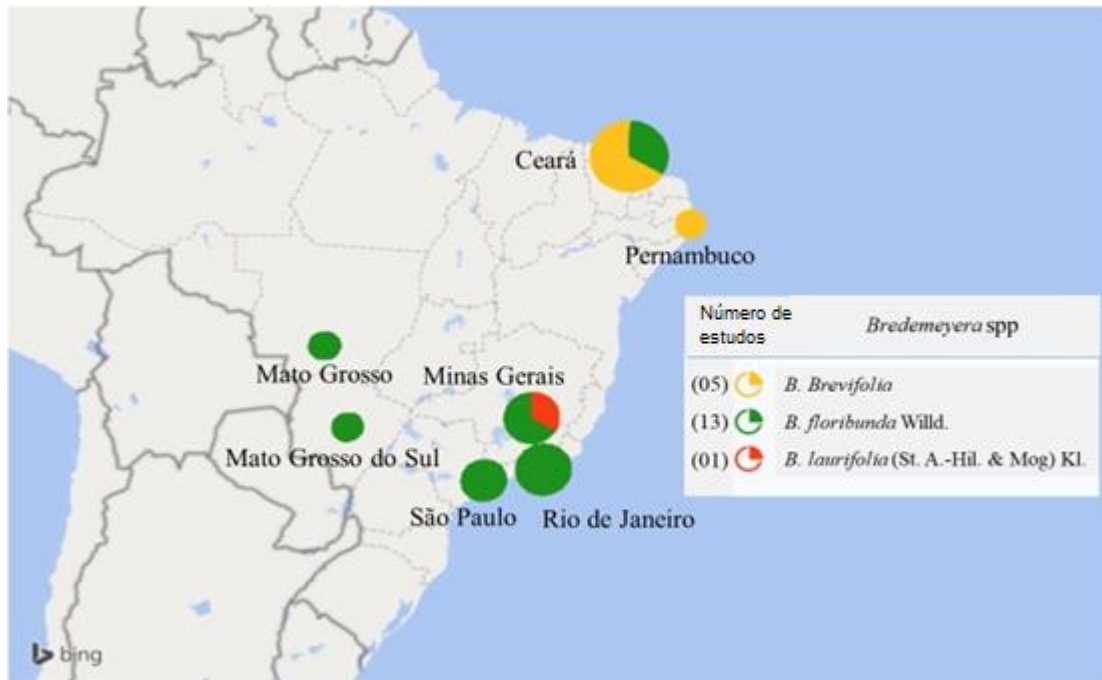


Fig. 4 Distribuição dos estudos por estado brasileiro.

Tab. 1 *Bredemeyera* Willd. registros de ocorrência

Espécie	Distribuição geográfica	Ocorrência no Brasil
<i>B. atlantica</i> M.Mota & J.F.B.Pastore	Brasil	Espírito Santo e Rio de Janeiro
<i>B. barbeyana</i> Chod.	Brasil	Bahia, Goiás e Minas Gerais
<i>B. bracteata</i> Klotzsch ex Hassk	Peru, Guiana e Brasil	Acre, Amazonas, Rondônia, Roraima
<i>B. brevifolia</i> (Benth.) Klotzsch ex A.W.Benn.	Bolívia, Brasil	Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Goiás e Minas Gerais
<i>B. cuneata</i> Klotzsch ex Hassk.	Guiana, Brasil	Roraima
<i>B. divaricata</i> (DC.) J.F.B.Pastore	Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Trinidad-Tobago, Venezuela	Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso

<i>B. ericifolia</i> M.Mota & J.F.B.Pastore	Brasil	Piauí
<i>B. floribunda</i> Willd.	Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Paraguai, Peru, Venezuela	Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina
<i>B. hebeclada</i> (DC.) J.F.B.Pastore	Brasil	Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe, Distrito Federal, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo
<i>B. laurifolia</i> (A.St.-Hil. & Moq.) Klotzsch ex A.W.Benn.	Brasil	Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná
<i>B. martiana</i> A.W. Benn.	Brasil	Bahia e Minas Gerais
<i>B. myrtifolia</i> (A.W.Benn.) Marques	Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela	Acre, Amazonas, Pará, Rondônia
<i>B. petiolata</i>	Brasil	Bahia e Piauí

Fonte: (MARQUES 1980; LIMA et al. 2018; MOTA; PASTORE 2018; MOTA 2020).

1.3.1 Características do gênero

As espécies pertencentes ao gênero *Bredemeyera* Willd. apresentam-se como arbustos escandentes a lianas, e ramos cilíndricos; folhas alternas, pecioladas e subdecorrentes; flores alvas ou amareladas e semente amarela-serícea e pequena. *Bredemeyera* Willd. é um dos vinte e sete gêneros que formam a família Polygalaceae, e sua primeira descrição foi registrada em 1801, época em que era composto apenas da espécie *B. floribunda* Willd. Atualmente o gênero é reconhecido por possuir 13 espécies, de ocorrência do México até a América Tropical. No Brasil, todas as suas espécies já foram identificadas, sendo sete delas endêmicas, com ocorrência em quase todo o território nacional (exceto no estado do Rio Grande do Sul), encontradas em matas, cerrados, caatingas e restingas, dos estados do Amazonas até Minas Gerais. Na região sul do Brasil apenas observa-se a ocorrência da espécie *B. floribunda* Willd. (MARQUES 1980; SILVEIRA et al. 1995; MARQUES; GOMES 2002; PASTORE; SILVEIRA 2016; FERREIRA et al. 2017; MOTA; PASTORE 2018; MOTA 2020).

1.3.2 Aplicações etnobotânicas

Na medicina popular, as raízes de *B. floribunda* são comumente usadas no tratamento de infecções de pele, disenteria amebiana, reumatismo, hipertensão arterial, fadiga, exaustão, como expectorante, diurético e no tratamento de picada de serpentes (RIBEIRO et al. 2014a; RIBEIRO et al. 2014b; BIESKI et al. 2015; TSCHINKEL et al. 2020). Ainda existe um registro sobre a ação tônica e estimulante da *B. floribunda*, sendo suas raízes empregadas no preparo de xarope e vinho com ação antileucorreico no combate ao corrimento vaginal (MARQUES; GOMES 2002).

Para a espécie *B. laurifolia*, conhecida popularmente como “joão-da-costa”, foi encontrado apenas um levantamento etnobotânico publicado em 2006, onde foi registrado seu uso popular no tratamento de infecções no útero e ovários, e para engravidar (BOTREL et al. 2006).

Na literatura tem-se relatados aplicações das raízes, cascas e folhas de *B. brevifolia* como diurético, para combater inflamação nos rins, tratamento da influenza, diarreia, dores reumáticas, dor na coluna e gastrite (CARTAXO et al. 2010; RIBEIRO et al. 2014a; RIBEIRO et al. 2014b; MACÊDO et al. 2015; MACEDO et al. 2018).

1.3.3 Ensaios biológicos

O extrato etanólico da raiz de *B. floribunda* foi avaliado quanto a sua capacidade protetora contra a formação de lesões gástricas induzidas por etanol e ácido acetilsalicílico em ratos, e contra úlceras gástricas induzidas por histamina em cobaias. Os resultados dessa avaliação, mostraram que na dosagem de 200 mg.kg⁻¹, o extrato foi capaz de prevenir quase completamente o efeito deletério do etanol na mucosa gástrica de ratos e reduziu consideravelmente o escore médio de lesões produzidas pelo ácido acetilsalicílico. Entretanto, o extrato não foi capaz de prevenir úlceras gástricas induzidas pela histamina (RAO et al. 1990).

Em estudos realizados com ratos e com peles de rãs (*Rana catesbeiana*), foi avaliado o efeito diurético e hipotensor do extrato etanólico bruto de raízes de *B. floribunda*, sendo observado que a administração intravenosa do extrato em doses entre 20-40 mg.kg⁻¹, foi capaz de induzir efeito hipotensor reversível, enquanto doses mais elevadas causaram bradicardia, podendo evoluir para a morte dos animais. Em doses que não alteravam a pressão arterial, o extrato foi capaz de melhorar a função renal aumentando de forma imediata e reversível a dose dependente de água na excreção renal do sódio e potássio, indicando que o efeito renal do extrato não se deve à sua ação hipotensora sistêmica, corroborando com o uso terapêutico popular da infusão do extrato da raiz como diurético (BEVEVINO et al. 1994). Da investigação com peles de rãs, a atividade diurética do extrato foi investigada a partir do transporte absorptivo de água basal estimulado por hormônios da pele isolada do animal, os resultados da pesquisa apoiam o uso popular da infusão do extrato da raiz como diurético (BEVEVINO; SANIOTO 1994). Em outro estudo, foi avaliada a ação do extrato na melhora da função renal, por meio do seu efeito na taxa de filtração glomerular e função tubular renal de ratos, onde a administração intravenosa do extrato (0,05 mg/min/100 g) não alterou significativamente a pressão arterial média, mas o fluxo urinário, a taxa de filtração glomerular, a excreção fracionada de água e sódio, e a clearance de solutos aumentaram significativamente nos grupos de animais avaliados (BEVEVINO; AIRES 1994).

Testes utilizando veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos demonstraram que o extrato das raízes de *B. floribunda*, rico em rutina e saponinas, possui atividade anti-hemorrágica, antinecrótica, antifosfolipásica, antiedematogênica e antiproteolítica (ALVES et al. 2019), enquanto as saponinas bredemeyerosídeo B, bredemeyerosídeo C e bredemeyerosídeo D, também isoladas desta espécie, apresentaram atividade antiofídica contra o veneno de *Bothrops jararaca* (DAROS et al. 1996; PEREIRA et al. 1996; RUPPELT et al. 1996; SINGH et al. 2017).

Em estudo realizado com o objetivo de selecionar saponinas não hemolíticas para serem utilizadas como adjuvantes em vacinas, as saponinas encontradas em *B. floribunda*, *Periandra mediterranea*, *Smilax officinalis* e *Agave sisalana* foram avaliadas quanto à sua atividade hemolítica em eritrócitos humanos e comparados com adjuvantes comumente usados na vacinação de animais e humanos: saponina de Riedel De Haën's, hidróxido de alumínio, adjuvante completo de Freund e adjuvante incompleto de Freund. Entre as substâncias testadas, as que apresentaram menor caráter hemolítico foram as saponinas triterpênicas obtidas de *B. floribunda* e *P. mediterranea*, inclusive, quando foram retiradas as gliconas presentes nas saponinas triterpênicas das duas espécies, o caráter hemolítico foi anulado, mantendo apenas sua característica adjuvante, desta forma, tais substâncias têm potencial para serem utilizadas com segurança como adjuvante de vacinas (SANTOS et al. 1997).

1.3.4 Características dos metabólitos secundários encontrados em *Bredemeyera* Willd.

Prospecções fitoquímicas com algumas espécies da família Polygalaceae revelaram a presença de vários metabólitos secundários de interesse farmacológico, dentre eles, ácido cafeico, ácido *trans*-ferúlico, saponinas, pironas, xantonas, cumarinas, flavonoides, antraquinonas, alcaloides e esteróis (QUANG et al. 2018; ROCHA et al. 2018; SULEIMAN et al. 2018; TIZZIANI et al. 2018a; TIZZIANI et al. 2018b; ZHOU et al. 2018; ALVES et al. 2019; QUANG et al. 2019).

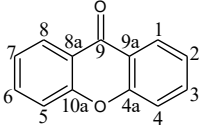
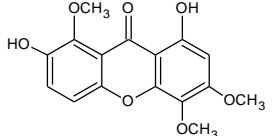
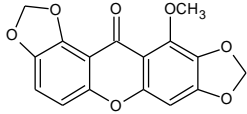
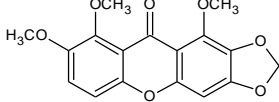
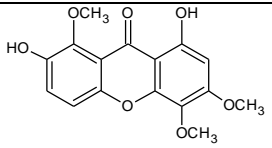
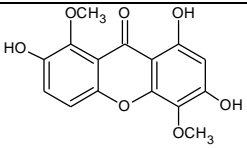
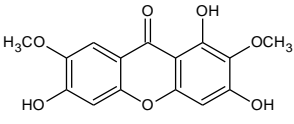
Dentre as espécies do gênero *Bredemeyera* Willd., constatou-se que apenas a *B. floribunda* e a *B. brevifolia* foram, até o momento, alvo de prospecções fitoquímicas na busca por metabólitos secundários que apresentem potencial para uso farmacológico.

1.3.4.1 Xantonas

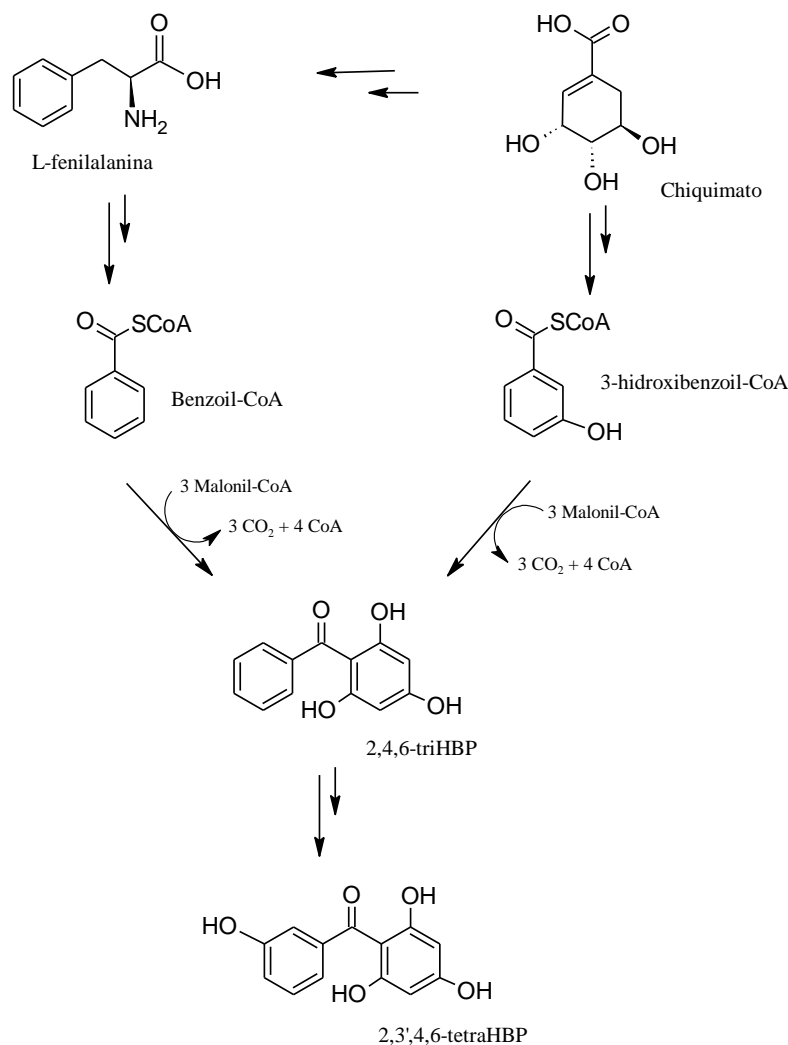
B. brevifolia e *B. floribunda* apresentam registros de estudos fitoquímicos com o isolamento de xantonas ou 9H-xanten-9-ona (Tab. 2). Essa classe de metabólitos secundários caracteriza-se estruturalmente por dois anéis benzênicos (A e B) ligados a uma γ -pirona (C) central, em um arranjo C₆-C₁-C₆, o que lhe proporciona uma estrutura simétrica que possibilita uma série de substituições, resultando em diferentes respostas biológicas, sendo considerada, desta forma, uma estrutura promissora para o desenvolvimento de novas drogas. Estudos relatam seu potencial como agente antibacteriano, antifúngico, antidiabético, antiviral, antioxidante, antiobesidade, anti-inflamatório, anticoagulante e antitumoral (RESENDE et al. 2020; REMALI et al. 2022).

Dos extratos hexânico e etanólico de raízes de *B. brevifolia*, coletadas no estado do Ceará-BR, foram identificadas as xantonas 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona, 1-metoxi-2,3,7,8-dimetilenodioxixantona, 1,7,8-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona (Tab. 2a), e alguns ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido lignocérico, ácido linoleico e ácido behênico) (OLIVEIRA; SILVEIRA 2000). Também há o registro do isolamento e identificação das xantonas 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona, 1,3,7-trihidroxi-4,8-dimetoxixantona e 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona, obtidas a partir dos extratos clorofórmico e etanólico das raízes de *B. floribunda*, coletadas no município de Viçosa do Ceará-BR (Tab. 2b) (SILVEIRA et al. 1995).

Tab. 2 Xantonas isoladas do espécies de *Bredemeyera* Willd.

 <p>Xantona - estrutura básica</p>	
<i>B. brevifolia</i>^(a)	
 <p>1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona</p>	 <p>1-metoxi-2,3,7,8-dimetilenodioxixantona</p>
 <p>1,7,8-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona</p>	
<i>B. floribunda</i>^(b)	
 <p>1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona</p>	 <p>1,3,7-trihidroxi-4,8-dimetoxixantona</p>
 <p>1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona</p>	

A proposta de rota biosintética indica que o anel A do esqueleto básico da xantona é derivado do malonil-CoA, enquanto o anel B é derivado da via do chiquimato. A partir do chiquimato, e subsequente a L-fenilalanina, sob múltiplas etapas que envolvem intermediários e enzimas, produz a 2,4,6-trihidroxibenzofenona (2,4,6-triHBP), e posterior 2,3',4,6-tetrahidroxibenzofenona (2,3',4,6-tetraHBP), precursor chave da síntese das xantonas. Pela via do chiquimato, o 3-hidroxibenzoil-CoA e pela via dependente de fenilalanina, o benzoil-CoA são condensados a três unidades de malonil-CoA levando a formação do 2,3',4,6-tetraHBP (REMALI et al. 2022).



Fonte: (Adaptado de REMALI et al. 2022)

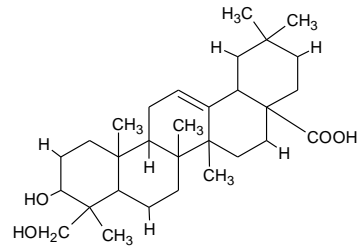
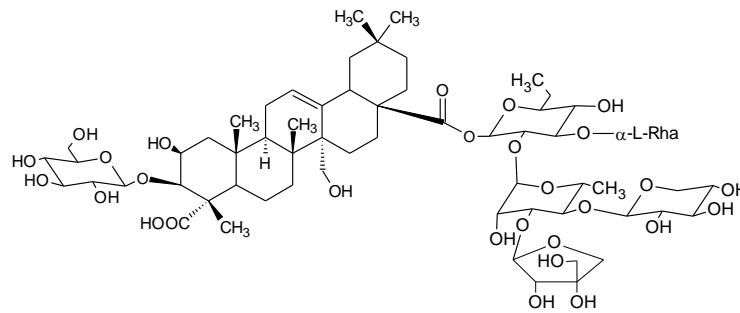
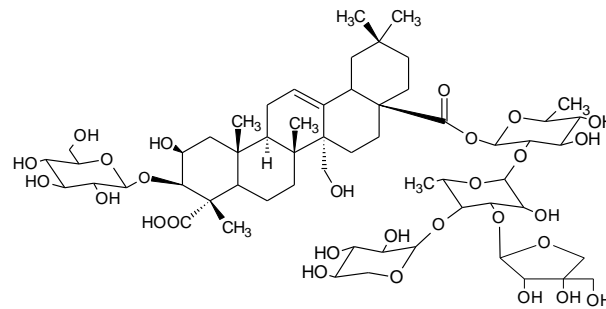
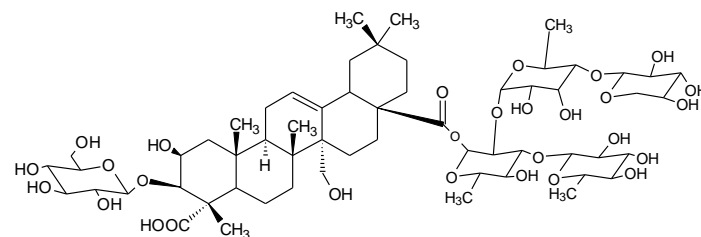
Fig. 5 Representação simplificada de etapas da biossíntese de xantonas em plantas superiores

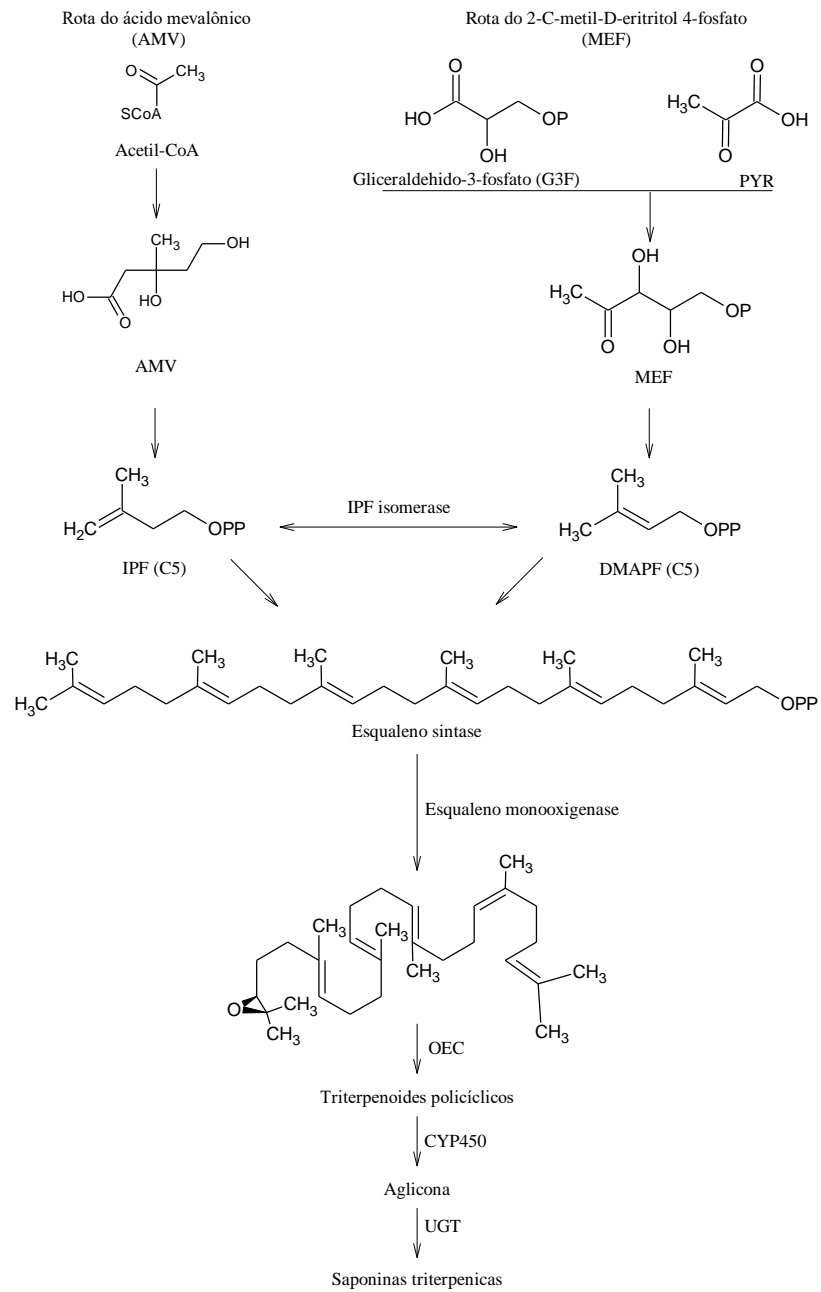
1.3.4.2 Saponinas triterpênicas

Do ponto de vista químico, as saponinas triterpênicas são glicosídeos de triterpenos policíclicos, cuja estrutura é formada por uma parte lipofílica conhecida como sapogenina (aglicona), e outra parte com característica hidrofílica em decorrência da presença de açúcares (glicona) e possuem ampla distribuição no reino vegetal. Farmacologicamente têm aplicações diversas, podendo ser usadas como antioxidantes, antivirais, bactericida, antimicrobianas, antienvhecimento, estimulante da função cognitiva, estimulante do sistema nervoso, além de atuarem como importantes moléculas antineoplásicas (BISWAS; DWIVEDI 2019).

O primeiro registro da presença de saponinas em um extrato preparado a partir cascas e raízes de *B. floribunda* foi entre os anos 1948/49, as quais foram identificadas anos mais tarde como ácido bredemólíco (Figura 6a) e ácido tenuifólíco. Entretanto, o ácido tenuifólíco não teve sua estrutura elucidada. Com base nos dados obtidos na época os autores sugeriram apenas a sua provável fórmula empírica como $C_{30}H_{44-46}O_8$ (TSCHESCHE; GUPTA, 1960). Saponinas até então consideradas inéditas, foram isoladas e identificadas no ano de 1996 a partir do extrato hidrometanólico das raízes de espécimes de *B. floribunda* coletadas em Tianguá/Ceará-BR, nomeadas como bredemeyrosídeo B, bredemeyrosídeo C e bredemeyrosídeo D (Figura 6^{b-d}) (DAROS et al. 1996; PEREIRA et al. 1996; RUPPELT et al. 1996).

Uma proposta de rota biossintética para a classe dos terpenoides (Fig. 7), mostra que esta ocorre via rota do ácido mevalônico (AMV) e 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEF). O início do processo pode ocorrer pela via do AMV ou MEF, onde se dá a formação dos blocos básicos de cinco átomos de carbono, o isopentenil pirofosfato (IPF) e o dimetilalil pirofosfato (DMAPF). Na sequência, seis blocos de construção são condensados para formar o 2,3-oxidoesqualeno, que é ciclizado pela enzima oxidoesqualeno ciclase (OEC) gerando triterpenoides policíclicos. Essas moléculas sofrem oxidação a agliconas pela ação das enzimas citocromo P450 monooxigenase (CYP450), posteriormente as agliconas são glicosiladas pela uridina difosfato glicuronosiltransferase (UGT) para formar as saponinas triterpenoides (PULIDO et al. 2012; ZHAO; LI 2018; BISWAS; DWIVEDI 2019).

Ácido bredemólico ^(a)Bredemeyerosideo B ^(b)Bredemeyerosideo C ^(c)Bredemeyerosideo D ^(d)**Fig. 6** Triterpeno e saponinas isoladas de *Bredemeyera floribunda*



Fonte: PULIDO et al. 2012; ZHAO; LI 2018; BISWAS; DWIVEDI 2019.

Fig. 7 Representação simplificada da biossíntese de saponinas triterpênicas

1.3.4.3 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias polifenólicas amplamente distribuídas na natureza. Por conta de sua estrutura, são capazes de doar hidrogênio ou elétrons para a estabilização de radicais, apresentando desta forma, importante ação antioxidante (SILVA et al. 2010). Na saúde humana, são utilizados como anticancerígeno, antibacteriano, antidiabético, antifúngico, antimicrobiano, antiviral, antiangiogênico, antimalárico, antioxidante, anti-inflamatório, neuroprotetor, imunomodulador e cardioprotetor (JUCÁ et al. 2018; ULLAH et al. 2020). Esses polifenóis apresentam baixo peso molecular, sendo formados por 15 átomos de carbono, no qual duas fenilas (A e B) encontram-se ligadas entre si por meio de uma cadeia de três carbonos, dispostos em uma estrutura C6-C3-C6.

Até o momento o único flavonoide isolado de plantas do gênero *Bredemeyera* Willd. foi a rutina (Fig. 8), obtida a partir do extrato hidrometanólico das raízes de *B. floribunda* (DAROS et al. 1996; ALVES et al. 2019).

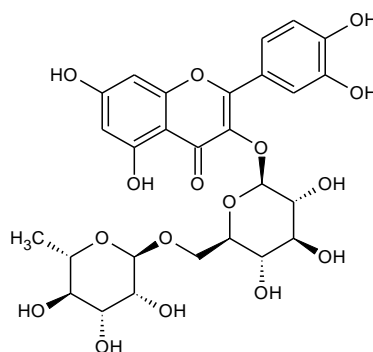
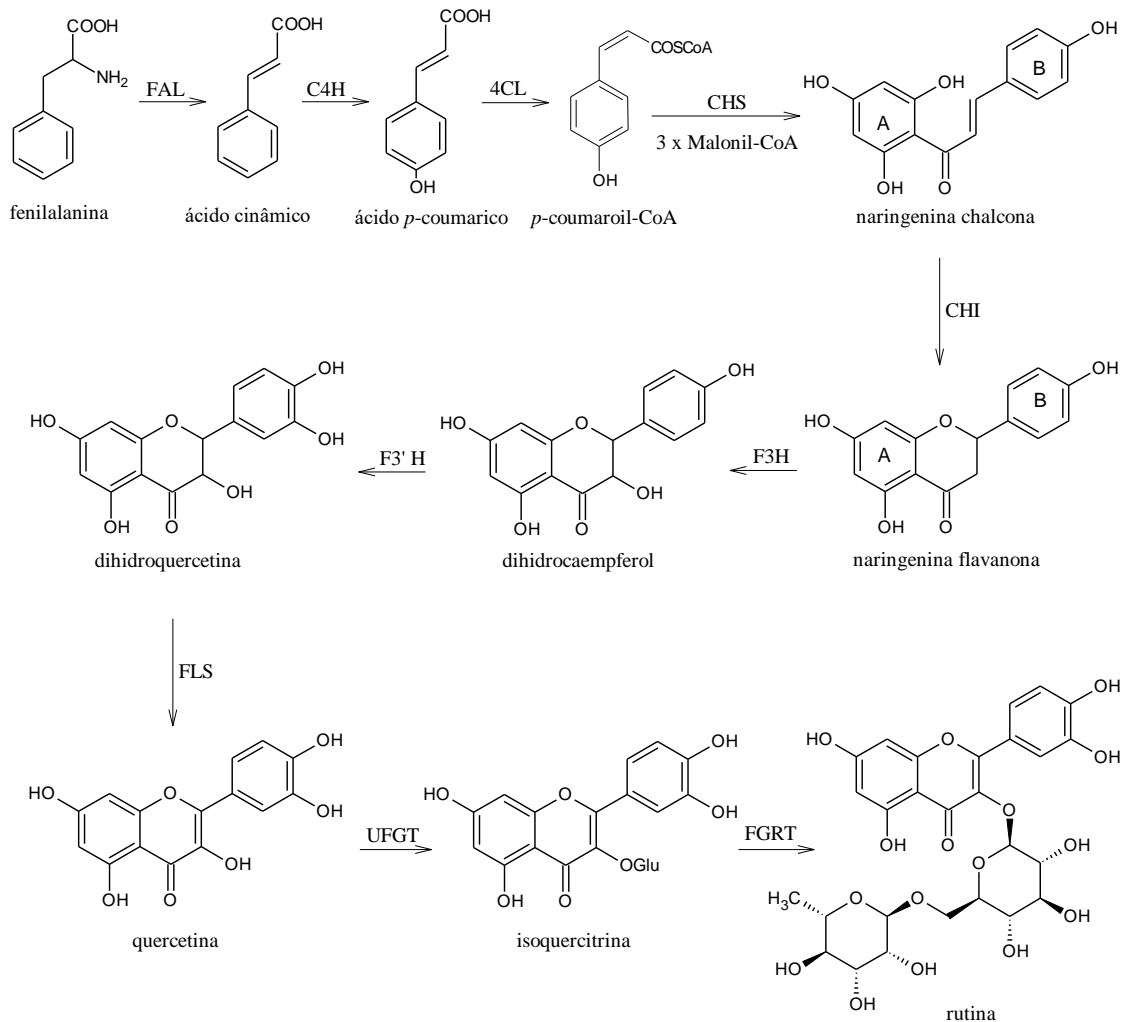


Fig. 8 Estrutura química do flavonoide rutina, isolado de *B. floribunda*.

A biossíntese da rutina, que é catalisada por enzimas específicas (Fig. 9), tem início na via dos fenilpropanoides, onde a fenilalanina dá origem ao ácido cinâmico, que é hidroxilado formando o ácido *p*-cumárico, posteriormente convertido à *p*-cumaroil-CoA. Em seguida, o *p*-cumaroil-CoA é convertido em chalcona naringenina dando origem aos anéis fenólicos A e B do flavonoide. O heterociclo central da estrutura (anel C), é formado pela ação catalítica da chalcona isomerase e, desta forma, tem-se a formação naringenina, que por sua vez, sofre hidroxilação gerando o dihidrocaempferol, com a consequente conversão à dihidroquercetina. A oxidação da dihidroquercetina leva a formação de quercetina, que é transformada em isoquercitrina, que dará origem à rutina.



FAL: fenilamina amônia liase. C4H: cinamato 4-hidroxilase. 4CL: 4-cumaroil CoA ligase. CHS: chalcona sintase. CHI: chalcona isomerase. F3H: flavanona 3 β -hidroxilase. F3'H: flavonoide 3'-hidroxilase. FLS: flavonol sintase. UFGT: UDP glicose flavonoide 3-*O*-glucosil transferase. FGRT: flavonol-3-*O*-glicosídeo L-ramnosiltransferase

Adaptado de Nabavi et al. 2020; Park et al. 2010

Fig. 9 Representação simplificada da biossíntese da rutina

1.4 Conclusões

Embora exista um considerável número de publicações envolvendo pesquisas sobre a família Polygalaceae, para o gênero *Bredemeyera* Willd. os estudos etnobotânicos, etnofarmacológicos e fitoquímicos são escassos, e abrangem apenas três de suas treze espécies, a *B. brevifolia* (Benth.) Klotzsch ex A. W. Benn., a *B. floribunda* Willd e a *B. laurifolia*. Salienta-se que no caso da *B. laurifolia*, ainda não foi realizada nenhuma pesquisa na área da fitoquímica, o único estudo que foi publicado aborda aspectos etnobotânicos.

Desta forma, pode-se afirmar que existe uma carência de informações sobre os potenciais químicos e medicamentosos do gênero *Bredemeyera* Willd., sendo, portanto, um gênero que ainda precisa ser pesquisado, fazendo desta revisão uma importante fonte de informação sobre o tema. Considerando que mais da metade dos representantes de *Bredemeyera* Willd. são endêmicas do Brasil, as atividades de pesquisa podem ser importantes aliadas para a conservação desses recursos genéticos vegetais no território brasileiro.

Referências

- ALVES, N. T. Q. et al. Anti-ophidian activity of *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) root extract on the local effects induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 1, e7581, 2019. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187581>
- BEVEVINO, L. H.; AIRES, M. M. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* Willd. II. Effect on glomerular filtration rate and renal tubular function of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, n. 3, p. 203-207, 1994. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90044-2)
- BEVEVINO, L. H.; SANIOTO, S. M. L. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* Willd. III. Effect on hormone-stimulated water transport in isolated frog skin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, n. 3, p. 209-215, 1994. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90045-0)
- BEVEVINO, L. H. et al. Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* Willd. I. Effect on arterial blood pressure and renal excretion in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, n. 3, p.197-201. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90043-4)
- BIESKI, I. G. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383-423, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.025>
- BISWAS, T.; DWIVEDI, U. N.; Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, in vitro production, and pharmacological relevance. **Protoplasma**, v. 256, p. 1463–1486, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01411-0>
- BOTREL, R. T. et al. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 143-156, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000100014>
- BREITLING, R. et al. Metabolomics for Secondary Metabolite Research. **Metabolites**, v. 3, n. 4, p. 1076-1083, 2013. <https://doi.org/10.3390/metabo3041076>
- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. S.; CARDOSO, F. C.I. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620190201>

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.003>

DAROS, M. R.; MATOS, F. J. A.; PARENTE, J. P. A.; New Triterpenoid Saponin, Bredemeyeroside B, from the Roots of *Bredemeyera floribunda*. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 523-527, 1996. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957962>

FERREIRA, D. M. C.; BARBOSA, J. I. S.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Polygalaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. 251-262, 2017. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768130>

JUCÁ, M. M. et al. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. **Natural Product Research**, n. 34, v. 5, p. 692-705, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588>

KITCHENHAM, B.; BRERETON, P. A systematic review of systematic review process research in software engineering. **Information and Software Technology**, v. 55, n. 12, p. 2049–2075, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.infsof.2013.07.010>

LIMA, I. G. et al. Flora do Ceará, Brasil: Polygalaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 2, p. 673-692, 2018. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869229>

MACÊDO, D. G. et al. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.14, n.6, p. 491 – 508, 2015.

MACEDO, J. G.F. et al. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, artigo ID 6769193, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6769193>

MARQUES, M. C. M. Revisão das espécies do gênero *Bredemeyera* Willd. (Polygalaceae) do Brasil. **Rodriguésia**, v. 32, n. 54, p. 269-321, 1980. <https://doi.org/10.1590/2175-78601980325416>

MARQUES, M. C. M.; GOMES, K. Polygalaceae In: WANDERLEY MGL.; SHEPHERD GJ, GIULIETTI AM, MELHEM TS, BITTRICH V, KAMEYAMA C (ed). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2002. v. 2. p. 229-260.

MOTA, M. C. A. *Bredemeyera* in **Flora e Funga do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB20531>>. Acesso 05 Nov. 2022.

MOTA, M.; PASTORE, J. F. B. Two new species of *Bredemeyera* (Polygalaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 351, n. 2, p. 171–175, 2018. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.351.2.5>

- NABAVI, S. M. et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 38, artigo ID 107316, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.005>
- NG, T. H. et al. Triterpenoid saponins and phenylpropanoid glycosides from the roots of *Polygala japonica* Houtt. with anti-inflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v. 24, p. 60–66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.01.008>
- NOGUEIRA, F. L. P. et al. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira Farmacognosia** v. 15, n. 4, p. 310–315, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400009>
- OLIVEIRA, M. C. F.; SILVEIRA, E. R. Pentaoxygenated xanthenes and fatty acids from *Bredemeyera brevifolia*. **Phytochemistry**, n. 55, v. 7, p. 847-851, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00286-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00286-7)
- PAGARE, S. et al. Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, v. 3, p. 293-304, 2015. <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ctbp&volume=9&issue=3&article=011>
- PASTORE, J. F. B.; SILVEIRA, J. B. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Polygalaceae. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, p. 1451–1458, 2016. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667547>
- PEREIRA, B. M. R. et al. Bredemeyeroside D, a Novel Triterpenoid Saponin from *Bredemeyera floribunda*: A Potent Snake Venom Antidote Activity on Mice. **Phytotherapy Research**, v.10, n. 8, p.666-669, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199612\)10:8<666::AID-PTR937>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199612)10:8<666::AID-PTR937>3.0.CO;2-H)
- PRIYANKA, V. et al. Germplasm Conservation: Instrumental in Agricultural Biodiversity—A Review. **Sustainability**, v. 13, n. 12, p. 6743, 2021. <https://doi.org/10.3390/su13126743>
- PULIDO, P.; PERELLO, C.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. New Insights into Plant Isoprenoid Metabolism. **Molecular Plant**, v. 5, n. 5, p. 964–967, 2012. <https://doi.org/10.1093/mp/sss088>
- QUANG, T. H. et al. Oleanane-type triterpenoid saponins from the roots of *Polygala aureocauda* Dunn. **Phytochemistry Letters**, 34: 59–64, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.09.010>
- RAO, V. S. N. et al. Experimental evaluation of *Bredemeyera floribunda* in acute gastric lesions induced by ethanol, acetylsalicylic acid and histamine. **Fitoterapia**, v. 61, n. 1, p. 9–12, 1990.
- REMALI, J.; SAHIDIN, I.; AIZAT, W. M. Xanthone Biosynthetic Pathway in Plants: A Review. **Frontiers in Plant Science**, v.13, artigo ID 809497, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.809497>

RESENDE, D. I. S. P. et al. Recent advances in the synthesis of xanthenes and Azaxanthenes. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 7, n. 19, p. 3027–3066, 2020.

<https://doi.org/10.1039/D0QO00659A>

RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014a. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_059

RIBEIRO, D. A. et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 155(3): 1522-1533, 2014b. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.042>

ROCHA, J. L. C. et al. *Asemeia ovata* (Polygalaceae): Quantitative determination and evaluation in silico of identified substances by HPLC-DAD. **Computational Biology and Chemistry**, v. 75, p. 65–73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.04.018>

RUPPELT, B. M. et al. Bredemeyeroside C, a new saponin from *Bredemeyera floribunda*. **Fitoterapia**, v. 67, n. 4, p. 323-328, 1996.

SANTOS, W. R. et al. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 15, n. 9, p. 1024-1029, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(96\)00292-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00292-7)

SHAMSEER, L. et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (prisma-p): Elaboration and explanation. **British Medical Journal**, v. 349, artigo ID g7647, 2015. <https://doi.org/10.1136/bmj.g7647>

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p669>

SILVEIRA, E. R. et al. Penta-oxygenated xanthenes from *Bredemeyera floribunda*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1433-1436, 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00103-E](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00103-E)

SINGH, P. et al. Review on Venom Enzymes Neutralizing Ability of Secondary Metabolites from Medicinal Plants. **Journal Pharmacopuncture**, v. 20, n. 3, p. 173-178, 2017. <https://doi.org/10.3831/kpi.2017.20.020>

SULEIMAN, A. U. et al. Acute toxicity studies and phytochemical screening of aqueous and ethyl acetate stem bark extracts of *Securidaca longipedunculata* Fresen (Polygalaceae). **International Journal of Pharmacological Research**, v. 8, n. 10, p. 104-107, 2018. <https://doi.org/10.7439/ijpr.v8i10.4932>

TIZZIANI, T. et al. A new xanthone as a chemical marker of four *Polygala* species (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 78, p. 46–48, 2018a. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.03.007> .

TIZZIANI, T. et al. Phytochemical and chemotaxonomic study of *Polygala altomontana* (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 77, p. 1-3, 2018b.

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.12.003>

TSCHESCHE, R.; GUPTA, A. K. S. Über Triterpene, VI. Über die Sapogenine von *Bredemeyera* Willd. **Chemische Berichte**, v. 93, n. 8, p. 1903-1913, 1960.

<https://doi.org/10.1002/cber.19600930832>

TSCHINKEL, P. F. S. et al. *Bredemeyera floribunda* Wild Elemental Content and Comparison with Nutritional Recommendation for Adults: Medicinal Plant Used by the Brazilian Rural Population to Treat Fatigue and Exhaustion. **American Journal of Plant Sciences**, v. 11, n. 3, p. 323-343, 2020. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.113024>

ULLAH, A. et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5243, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>

ZHAO, Y-J.; LI, C. Biosynthesis of Plant Triterpenoid Saponins in Microbial Cell Factories. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 46, p. 12155–12165, 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04657>

ZHOU, L-Y. et al. Structure–Activity Relationship of Xanthenes as Inhibitors of Xanthine Oxidase. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 365, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23020365>

CAPÍTULO 2: POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* E *IN SILICO* DE *Bredemeyera brevifolia* (Benth.) Klotzsch ex A.W. Benn.

RESUMO

Bredemeyera Willd é um gênero pertencente a Polygalaceae com ocorrência na maioria dos estados brasileiros. Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial fitoquímico e antifúngico, *in vitro* e *in silico*, dos extratos de *B. brevifolia*. A identificação dos ácidos graxos por CG/EM e a sua quantificação por CG/DIC mostrou que na fração hexânica estão presentes os ácidos palmítico (36,55 mg.g⁻¹), margárico (3,66 mg.g⁻¹), linoleico (108, 82 mg.g⁻¹), oleico (7,86 mg.g⁻¹), esteárico (41,11 mg.g⁻¹), dihomo- γ -linolênico (85,48 mg.g⁻¹) e araquídico (209,00 mg.g⁻¹). A partir da fração clorofórmica foi isolada e identificada a 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona. O ensaio de atividade antimicrobiana, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima com o extrato hidroalcolico, demonstrou atividade antifúngica por até 96 h contra espécies dos gêneros *Candida*, *Sporothrix* e *Trichophyton* com concentrações variando de 64 - 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O estudo *in silico* com os compostos químicos desta espécie demonstrou potencial para inibição fúngica da esterol-14- α -desmetilase (CYP 51), com destaque para a 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (-8,8 kcal.mol⁻¹) quando comparada com o fluconazol (-8,3 kcal.mol⁻¹), os ácidos graxos interagiram com o sítio ativo da enzima, contudo apresentaram energias $\geq -7,4$ kcal.mol⁻¹. Os compostos isolados desta espécie apresentam potencial farmacocinético para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, além de baixa toxicidade, conforme observado nas predições ADMETox.

Palavras-chave: *Bredemeyera brevifolia*. Ácido graxo. 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona. Lanosterol 14-alfa-desmetilase. Atividade antifúngica. Ancoragem molecular.

CHAPTER 2: *IN VITRO* AND *IN SILICO* ANTIFUNGAL POTENTIAL OF *Bredemeyera brevifolia* (Benth.) Klotzsch ex A.W. Benn.

ABSTRACT

Bredemeyera Willd is a genus belonging to the Polygalaceae that occurs in most Brazilian states. This work aims to evaluate the phytochemical and antifungal potential, *in vitro* and *in silico*, of *B. brevifolia* extracts. The identification of fatty acids by GC/MS and their quantification by GC/DIC showed that the hexane fraction contains palmitic (36.55 mg.g⁻¹), margaric (3.66 mg.g⁻¹), linoleic (108.82 mg.g⁻¹), oleic (7.86 mg.g⁻¹), stearic (41.11 mg.g⁻¹), dihomo- γ -linolenic (85.48 mg.g⁻¹) and arachidic (209.00 mg.g⁻¹) acid. From the chloroform fraction, 1-hydroxy-3,7-dimethoxyxanthone was isolated and identified. The antimicrobial activity assay, by determining the Minimum Inhibitory Concentration with the hydroalcoholic extract, demonstrated antifungal activity for up to 96 h against *Candida*, *Sporothrix* and *Trichophyton* species with concentrations ranging from 64 - 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The *in silico* study with chemical compounds from this species demonstrated potential for fungal inhibition of sterol-14- α -demethylase (CYP 51), with emphasis on 1-hydroxy-3,7-dimethoxyxanthone (-8.8 kcal.mol⁻¹) when compared with fluconazole (-8.3 kcal.mol⁻¹), the fatty acids interacted with the active site of the enzyme, however they presented energies ≥ -7.4 kcal.mol⁻¹. Compounds isolated from this species have pharmacokinetic potential for the development of pharmaceutical formulations, in addition to low toxicity, as observed in ADMETox predictions.

Keywords: *Bredemeyera brevifolia*. Fatty acid. 1-hydroxy-3,7-dimethoxyxanthone. Lanosterol 14-alpha demethylase. Antifungal activity. Molecular docking.

2.1 Introdução

A família Polygalaceae possui 27 gêneros, englobando aproximadamente 1.300 espécies distribuídas em diferentes partes do planeta, principalmente em zonas de clima temperado, quente e tropical. No Brasil são encontrados 12 gêneros desta família, incluindo o *Bredemeyera* Willd (LIMA et al. 2018)

O uso de plantas desse gênero na medicina tradicional inclui: combate a inflamações nos rins, diarreia, reumatismo, dores na coluna e gastrite (MACEDO et al. 2018). Estudos fitoquímicos realizados com *B. floribunda* identificaram a presença de saponinas triterpênicas (Bredemeyerosideo B, C e D), xantonas (1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona, 1,3,7-trihidroxi-4,8-dimetoxixantona e 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona), e um flavonoide (rutina) (DAROS et al. 1996; PEREIRA et al. 1996a; PEREIRA et al. 1996b; SILVEIRA et al. 1995). Um estudo com a espécie *B. brevifolia* relata a presença de xantonas: 1-metoxi-2,3,7,8-dimetilenodioxixantona, 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona e 1,7,8-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona, além dos ácidos palmítico, oleico, esteárico, beênico, linoleico e lignocérico (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2000).

Embora não se tenha registro do uso popular de *Bredemeyera* Willd. no tratamento de doenças ou infecções causadas por fungos, duas classes de substâncias isoladas de *B. brevifolia* e *B. floribunda*, as xantonas e os ácidos graxos, apresentam potencial antimicrobiano e suas atividades antifúngicas vem sendo testadas nas pesquisas em busca de novos medicamentos (DAS, 2018; MUTHAMIL et al. 2020; PRASATH et al. 2021; TENE et al. 2008; WANG et al. 2021). No que diz respeito às xantonas, elas apresentam estrutura química formada por dois anéis benzênicos (A e B) fundidos a uma γ -pirona (C) central, caracterizando uma estrutura simétrica, com grande variabilidade de possíveis substituições, resultando em um conjunto de moléculas com respostas biológicas diversas, e por este motivo consideradas promissoras para o desenvolvimento de novas drogas (RESENDE et al. 2020).

Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico do extrato hidrometanólico das folhas de *B. brevifolia*, a fim de conhecer a composição química, contribuindo assim para a quimiosistemática desta espécie, ainda pouco estudada. E também, avaliar sua atividade antifúngica *in vitro* e *in silico* contra fungos leveduriformes, filamentosos e dermatófitos.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Material vegetal

As folhas de *B. brevifolia* foram coletadas na represa do Rio de Contas, localizada no município de Rio de Contas, Bahia-Brasil. A espécie foi coletada e identificada em fevereiro de 2018. A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, sob número CTBS 3935. O acesso ao patrimônio genético nacional foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), conforme atestado de regularidade de acesso número ADA5ACA.

2.2.2 Obtenção do extrato orgânico

As folhas secas e trituradas (439,24 g) foram maceradas em metanol/água 9:1, resultando no extrato hidroalcolico de *B. brevifolia* (BBB), com 137,53 g, que foi exaustivamente extraído com os solventes orgânicos hexano, clorofórmio e acetato de etila, produzindo as frações HBB (fração hexânica) com 8,441 g, CBB (fração clorofórmica) com 17,377 g e AcBB (fração acetato de etila) com 10,287 g, respectivamente.

2.2.3 Extração e obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (AG)

O HBB (1,0 g) foi filtrado em CC, utilizando 20,0 g de sílica gel 60 como fase estacionária e clorofórmio como fase móvel, resultando em uma denominada HBB-C (584,7 mg). A HBB-C (10mg) foi dissolvida em 100 µL de solução etanólica (5%) de hidróxido de potássio 1,0 mol.L⁻¹, e aquecida em forno micro-ondas doméstico a 5% da potência por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de água e extrações sucessivas com hexano (3 x 300 mL) foram realizadas. A fase aquosa obtida foi acidificada com HCl (1,0 mol.L⁻¹) e os AG livres foram extraídos com acetato de etila (3 x 300 mL). Os AG livres foram derivatizados por esterificação, com 100 µL de BF₃ (14%) em metanol (Sigma Aldrich), a mistura foi centrifugada por 15 minutos, e então colocada em banho-maria (80 °C) por mais 15 minutos. Os ésteres metílicos obtidos foram analisados por Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas (CG -EM) e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas (CG-DIC) (VALLE, 2009; ZARA et al., 2012).

2.2.4 Identificação e quantificação dos AG do HBB

As condições cromatográficas pré-estabelecidas para identificação por CG-EM, foram: temperatura do injetor de 290 °C; fluxo de gás arraste de 1,8 mL.min⁻¹, temperatura do detector de 260 °C e interface de 290 °C; o programa de aquecimento do forno começou em 100 °C (mantido por 1 minuto) até 285 °C (mantido por mais 42 minutos) a uma taxa de 5 °C.min⁻¹. A análise com detector de massas foi realizada na faixa de m/z 40 a 350. O procedimento de CG-EM foi realizado em aparelho Shimadzu modelo GC-QP2010, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida SLB-5MS, 30m x 0,25mm (d.i.) x 0,25µm (J & W Scientific, Folsom, CA), acoplada a um auto-injetor AOC-20i, espectrômetro de massas equipado com detector com fonte de ionização por elétrons (70 eV).

A quantificação foi realizada por cromatografia em fase gasosa, realizada em um equipamento Shimadzu modelo GC-2010 Plus, com detector de ionização de chamas e coluna capilar de sílica fundida Rt-2560 (100 m, 0,25 mm d.i), com N₂ como gás de arraste e H₂ como gás auxiliar. A razão de divisão da amostra foi de 90:10. As temperaturas do injetor e do detector foram de 225 °C e 260 °C, respectivamente. A temperatura da coluna iniciou em 140 °C por 5 minutos, seguida de uma rampa de 3 °C.min⁻¹ até 245 °C por 20 minutos. As injeções foram realizadas em triplicata e os volumes de injeção foram de 1,0 µL. Os ésteres metílicos de AG foram identificados e quantificados comparando seus tempos cromatográficos e áreas de pico com os de um padrão autêntico FAME - Supelco 37 Componente FAME Mix C4-C24, injetado nas mesmas condições da amostra.

2.2.5 Extração, isolamento, e caracterização da xantona em CBB

CBB (16,00 g) foi submetida a CC com sílica gel 60, tendo como fase móvel C₆H₁₄-(CH₃)₂CO em gradientes crescentes de polaridade. Foram obtidas 115 frações, que posteriormente foram agrupadas por similaridade em 7 frações após análise por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) revelada em vanilina ácida.

A fração CBB-2 (3,17 g) foi submetida à filtração em CC, tendo como fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel CH₂Cl₂:MeOH (1:1), obtendo-se a fração CBB-2B (2,98 g), que foi fracionada em CC em sílica gel, com CHCl₃-(CH₃)₂CO em gradiente de polaridade crescente, resultando na substância **8** (10,0 mg), cuja estrutura foi identificada após análise dos dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), bem como comparação com os dados da literatura. Os experimentos de RMN uni e bidimensional foram realizados em um

Espectrômetro INOVA 500, operando a 500 MHz (^1H), usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ como solvente (Merck). Para colaborar na identificação da substância **8**, a amostra também analisada em um espectrômetro de absorção na região do infravermelho, modelo Spectrum Two (FT-IR), Perkin Elmer, com capacidade de funcionamento na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.2.6 Ensaio *in vitro*

2.2.6.1 Estirpes de fungos

As estirpes utilizadas foram obtidas do Grupo de Pesquisa em Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico – Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As estirpes foram de isolados clínicos dos gêneros *Candida* (*C. albicans* MM 46, *C. tropicalis* MM 55, *C. parapsilosis* MM 01 e *C. krusei* MM 06), *Trichophyton* (*T. rubrum* URM 5905, *T. mentagrophytes* URM 6272 e *T. tonsurans* URM 5508) e *Sporothrix* (*S. schenckii* e *S. brasiliensis*), resistentes a azóis, além de cepas da American Type Culture Collection (ATCC) (*Candida albicans* 14053, *Candida tropicalis* 750, *Candida parapsilosis* 22019, *Candida krusei* 6258 e *Aspergillus fumigatus* 204305).

2.2.6.2 Preparação de antifúngicos, extrato e meio de cultura

Foi preparada uma solução estoque do agente antifúngico fluconazol (Pfizer), diluída em RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) com faixas de concentração entre 64 a 0,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O BBB foi dissolvido em DMSO (1%) e 3,5 mL de RPMI, totalizando 4 mL (solvente/RPMI); as concentrações variaram de 2048 a 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), com L-glutamina e bicarbonato de sódio, pH 7,0 \pm 0,1. A preparação ocorreu em água deionizada e esterilizada, a uma concentração de 46,5 g.L^{-1} e tamponada com Ácido Morfolino Propano Sulfônico (MOPS 0,165 mol.L^{-1} ; Sigma-Aldrich). A esterilização foi realizada em filtro biológico (Nalgene Company, Rochester, Nova York) utilizando membrana de 0,22 μm (Milipore, Darmstadt, Alemanha). O meio foi mantido a 40 $^\circ\text{C}$ e utilizado por no máximo três semanas após o preparo (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b).

2.2.6.3 Preparo do inóculo para o teste de sensibilidade

As leveduras e fungos filamentosos foram cultivados em meio de Ágar Dextrose Sabouraud e Ágar Batata Dextrose, mantidos a 35 °C por 24 h e 120 h, respectivamente. Uma suspensão inicial do inóculo foi preparada em 5 mL de solução salina estéril (NaCl; 0,85%) e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala de McFarland 0,5 com transmitância de 90% para leveduras e 70-80% para fungos filamentosos determinada por espectrofotometria, usando uma onda de compressão a 530 nm. Este procedimento forneceu uma concentração padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células.mL⁻¹, seguida de diluição 1:100 e depois diluição 1:20 da suspensão padrão com meio RPMI 1640 para leveduras e 1:50 para fungos filamentosos, resultando em concentrações de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹, cultivadas na temperatura de 37 °C (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b).

2.2.6.3 Ensaio de micro diluição em caldo

A micro diluição foi realizada em placas de fundo plano (TPP; Trasadingen, Suíça) com 96 poços e oito séries distribuídas de A a H (vertical), cada uma com 12 poços (horizontais). A partir da solução estoque de antifúngicos e do extrato BBB, foram preparadas soluções com concentrações dez vezes superiores à concentração final desejada. Assim, para o fluconazol, foram utilizados 0,125-64 µg.mL⁻¹ e para o extrato 4-1048 µg.mL⁻¹. Nas placas de micro diluição foram colocados 100 µL de cada concentração. Posteriormente, estes foram mantidos a -20 °C até o momento do teste, sem exceder o período de 30 dias. Nos dias dos experimentos, as placas foram utilizadas após permanecerem 30 minutos a 25 °C. Nas diferentes concentrações do antifúngico e do extrato contidos nos poços das placas, foram testados 100 µL de suspensões de cepas dos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton* e *Sporothrix*. Os testes foram realizados com um controle positivo contendo 12 diluentes antifúngicos e solução de meio-inóculo nos poços, além de um controle negativo contendo a solução antifúngica e meio-inóculo, e o controle negativo contendo apenas meio RPMI 1640 poço no poço coluna. As placas foram mantidas em estufa a 35° C por até 96 h, de acordo com a espécie. Após esse período, as placas de teste foram observadas e posteriormente interpretadas.

2.2.6.4 Análise de dados

Nas leituras, o crescimento no poço de controle positivo (poços de 12 colunas) foi comparado visualmente com a menor concentração capaz de inibir o crescimento em relação às diferentes concentrações testadas (poços número 1 a 10). Os critérios para definir a

sensibilidade à resistência foram definidos de acordo com os protocolos dos documentos M27-A3 M60 e M38-A2; para o fluconazol, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) $\leq 8,0 \text{ g.mL}^{-1}$ foi aceita como sensível e, nos casos em que as CIMs foram de 16,0 e 32,0 g.mL^{-1} , foram considerados dose-dependentes. Os valores de CIM acima dos números mencionados foram indicados como resistentes. Os valores de CIM do BBB foram avaliados de acordo com os parâmetros determinados em CLSI (2008a), e CLSI (2008b). valores arbitrários, devido à falta de um padrão. A determinação foi baseada na menor concentração que inibiu o crescimento.

2.2.6.5 Leitura visual dos resultados

As leituras foram realizadas em 48 h para *Candida* spp, *Aspergillus* sp., *Sporothrix* sp. e 96 horas para *Trichophyton* sp. Os testes foram realizados em triplicata com três repetições independentes. Após a incubação, foi determinada a concentração fungicida mínima (CFM) para avaliar a capacidade de recuperação do crescimento fúngico após 48 h de contato com a substância teste. Com o auxílio de uma pipeta esterilizada, 10 μL da mistura de cada poço foram adicionados ao Ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 37 °C por até 48 a 96 h, dependendo da espécie fúngica e, após a incubação, observou-se o crescimento de colônias de leveduras.

2.2.7 Experimentos *in silico*

2.2.7.1 Pesquisa no Drugbank

Foi efetuada uma pesquisa na base de dados DrugBank com a palavra-chave: drogas antifúngicas azólicas (antifungal azoles drugs), onde foram selecionadas apenas estruturas de drogas que atuavam seletivamente sobre a esterol-14- α -desmetilase. Os inibidores sintéticos seletivos para esterol-14- α -desmetilase desenvolvidos pela indústria farmacêutica foram selecionados na literatura.

2.2.7.2 Bancos de dados, triagem virtual, ancoragem molecular e ferramentas ADMETox

Todas as moléculas foram verificadas e desenhadas utilizando o software Marvin Sketch. As estruturas moleculares foram baixadas em formato SMILES, e posteriormente, por meio do programa Open babel, foram convertidas para um formato SDF 3D para cálculos de

ancoragem. A estrutura cristalográfica da esterol-14- α -desmetilase (5ZT1) foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB). Todas as simulações de ancoragem foram realizadas com o programa AutoDock Vina. A ancoragem foi realizada entre os ligantes propostos: **8**, lanosterol, ácidos graxos, drogas antifúngicas azóis e o receptor, que foram preparados e convertidos para o formato pdbqt utilizando o programa Autodock tools. Os resultados da docagem e a avaliação de cada complexo receptor-ligante, como a energia de afinidade (Kcal.mol⁻¹) e o posicionamento dos ligantes dentro do sítio ativo da esterol-14- α -desmetilase foram analisados utilizando o programa PyMOL 2.1. Foram geradas nove poses de ligante para cada complexo com suas respectivas energias de afinidade. Posteriormente, as melhores poses ligante-proteína selecionadas foram representadas graficamente usando o programa PyMOL 2.1 e seus respectivos mapas de interação 2D foram gerados usando o programa Discovery Studio 4.5. As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMETox) foram avaliadas pelos programas Data WarriorTM e PkCSMTM.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação e quantificação dos AG na fração hexânica de *B. brevifolia*

A identificação dos AG presentes no HBB foi realizada pela análise em CG-EM (Figura S1, p. 64) dos ésteres metílicos correspondentes, obtidos por procedimentos cromatográficos clássicos e reações de derivatizações. Os tempos de retenção foram correlacionados com os obtidos na análise do padrão FAME, sob as mesmas condições cromatográficas, sendo confirmados pelos valores de m/z e padrão de fragmentação, observados na espectrometria de massas. A Tabela 1 apresenta a composição dos AG identificados a partir de HBB: ácido palmítico (**1**), ácido margárico (**2**), ácido linolelaídico (**3**), ácido oléico (**4**), ácido esteárico (**5**), ácido dihomog- γ -linolênico (**6**) e ácido araquídico (**7**). A análise por CG-DIC permitiu a quantificação dos ácidos graxos presentes, por meio da correlação das áreas dos picos, comparadas com as observadas para o padrão FAME, sendo os constituintes majoritários representados por: **7** (209,00 mg.g⁻¹ de HBB), **3** (108,82 mg.g⁻¹ de HBB) e **6** (85,48 mg.g⁻¹ de HBB). O somatório de massas quantificadas para AG perfaz 49,25% da massa do HBB. No trabalho realizado por Oliveira e Silveira (2000), tem-se o registro da identificação apenas dos ácidos oléico, esteárico e palmítico em extrato hexânico de *B. brevifolia*, sem a quantificação dos mesmos, apenas expressaram suas abundâncias relativas de acordo com o perfil obtido por CG-EM.

Tab. 1 Identificação e quantificação dos AG presentes em *B. brevifolia* por CG-EM e CG-DIC.

Composto	Nome sistemático	TR (min)	Pico base (<i>m/z</i>)	Concentração (mg.g ⁻¹ de HBB)	% AG
1	Ácido palmítico	20,38	74	36,55	3,66
2	Ácido margárico	21,74	73	3,66	0,37
3	Ácido linolelaídico	23,65	67	108,82	10,88
4	Ácido oléico	23,77	41	7,86	0,79
5	Ácido esteárico	24,30	74	41,11	4,11
6	Ácido dihomo- γ - linolênico	25,02	79	85,48	8,55
7	Ácido araquídico	25,53	43	209,00	20,90
					$\Sigma =$
					49,25%

2.3.2 Identificação estrutural da xantona

O composto 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**8**) foi isolado como um sólido amarelo amorfo, e sua elucidação estrutural foi realizada pela análise dos dados de UV, IV e RMN (uni e bidimensional). O espectro de UV revelou absorção máxima em ν_{max} 208, 245, 277 e 308 nm. A análise de IV (Figura S2, p. 65) revelou bandas de absorção em ν_{max} 1653 cm⁻¹ ($\nu_{C=O}$), característico do estiramento de carbonila duplamente conjugada em sistema aromático, as bandas de absorções em ν_{max} 1215, 1165, 1118 cm⁻¹ (ν_{C-H}) e 3435 cm⁻¹ (ν_{O-H}) estão condizentes com o grupo O-H ligado a estrutura aromática. As bandas de absorções em ν_{max} 1454, 1498 e 1594 cm⁻¹ ($\nu_{C=C}$, ArH) e em ν_{max} 3000 cm⁻¹ (ν_{Csp^2-H}), confirmam a presença do sistema aromático, enquanto ν_{max} 810 e 680 cm⁻¹ (δ_{C-H} , ArH) indicam seu padrão com duas ligações C-H e as deformações angulares de éteres nas regiões de 1272 e 1036 cm⁻¹ (δ_{C-O}) são característicos do fragmento aril-éter-aril da molécula.

Os dados obtidos a partir da análise dos espectros de RMN ¹H, HMQC e HMBC (Figuras S3-S5, p. 66-68), permitiram a identificação estrutural da substância **8**. No espectro de RMN de ¹H foi possível observar dois sinais relacionados a metoxilas em δ_H 3,88 e δ_H 3,93 (s); cinco sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, cujos acoplamentos permitiram sugerir a presença de dois anéis aromáticos: os sinais em δ_H 6,32 e δ_H 6,66 (*d*, *J* 2,0 Hz), foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbono do anel aromático com acoplamento em meta (anel

A) e os sinais em δ_H 7,0 (d, J 8,0 Hz), δ_H 7,60 (dd, J 8,0/2,0 Hz) e δ_H 7,72 (sl), atribuídos ao acoplamento dos hidrogênios ligados a carbono do anel aromático trissubstituído (anel B). Foi observada a presença de um singleto em δ_H 12,77 (s), atribuído à hidroxila quelatogênica em C-1. A associação das informações dos espectros de RMN de 1H , HMQC e HMBC (Tabela S1, p. 69) permitiu a atribuição inequívoca dos posicionamentos dos carbonos aromáticos hidrogenados, bem como dos substituintes metoxilas e hidroxilas na estrutura (Figura 1). Os dados de **8** foram comparados aos dados espectrométricos observados em registros anteriores da substância. Embora já tenha sido relatada sua identificação em outras espécies vegetais, esta é a primeira vez que a 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona é isolada no gênero *Bredemeyera* Willd. (MONTE et al. 2001; TENE et al. 2008).

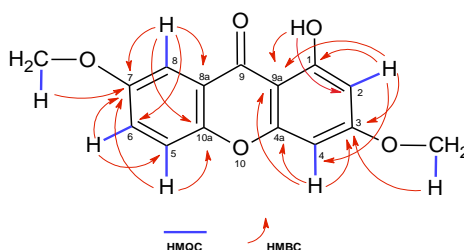


Fig. 1 Correlações observadas no espectro HMBC da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona

2.3.3 Avaliação da atividade antifúngica do extrato hidrometanólico de *Bredemeyera brevifolia*

Nos ensaios *in vitro*, os resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) atestam o potencial antifúngico do extrato BBB. O BBB inibiu 100% das espécies de *Sporothrix* em 48 h, com CIM variando de 256 a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entre os fungos dermatófitos, houve inibição contra *Trichophyton rubrum* e *T. tonsurans* (1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em 96 h. Entre as espécies de *Candida*, a inibição ocorreu em 24 h na faixa de 64 a 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi observado que as espécies selvagens de *Candida* apresentaram CIM maior do que o determinado contra cepas padrão, conforme Tabela 2. Ainda não há consenso sobre valores CIM aceitáveis para extratos e frações de material vegetal (HOLETZ et al. 2002; LAMBERT et al. 2011; WEBSTER et al. 2008). No entanto, Webster et al. (2008) sugerem que qualquer concentração inferior a 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é considerada satisfatória, o que inclui os valores de CIMs do extrato BBB contra os fungos utilizados neste estudo.

Tab. 2 Resultados do ensaio CIM, realizado com o extrato hidrometanólico das folhas de *Bredemeyera brevifolia*

Cepas (leveduriformes)	BBB (24h) µg.mL ⁻¹	Fluconazol (24h) µg.mL ⁻¹
<i>Candida albicans</i> (ATCC14053)	64 (100%)	0,5
<i>C. albicans</i> (MM 46)**	512 (100%)	0,5
<i>C. krusei</i> (ATTC6258)	128 (100%)	2,0
<i>C. krusei</i> (MM 06)**	512 (100%)	2,0
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC22019)	128 (100%)	0,5
<i>C. parapsilosis</i> (MM 01)**	1024(100%)	0,5
<i>C. tropicalis</i> (ATCC750)	256 (100%)	0,5
<i>C.tropicalis</i> (MM 55)**	512 (100%)	1,0
Cepas (filamentosos)	BBB (48h) µg.mL ⁻¹	Itraconazol (48h) µg.mL ⁻¹
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC204305)	NI	4,0
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (URM 8074)	1024 (100%)	4,0
<i>S. brasiliensis</i> (URM 7969)	512 (100%)	4,0
<i>S. brasiliensis</i> (URM 8078)	256 (100%)	2,0
<i>S. schenckii</i> (URM 8080)	256 (100%)	2,0
Cepas (dermatofitos)	BBB (96h) µg.mL ⁻¹	Itraconazol (96h) µg.mL ⁻¹
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (URM 6272)	NI	4,0
<i>T. rubrum</i> (URM 5905)	1024 (100%)	0,5
<i>T. tonsurans</i> (URM 5508)	1024 (100%)	2,0

BBB: Extrato hidroalcolico das folhas de *B. brevifolia*, **NI:** não inibiu.

** Linhagens coletadas de pacientes com infecções sistêmicas resistentes internados na UTI do Hospital de Pernambuco.

2.3.4 Ancoragem molecular da Xantona (XA), AG e fármacos

O resultado da ancoragem molecular indica que a xantona interage com os aminoácidos do sítio ativo da enzima esterol-14- α -desmetilase comparado com os fármacos azólicos, ligando-se a 6 (Tyr-118, Tyr-132, Gly-307, His-377, Ser-378 e Met-508) dos 13 resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, importantes na entrada e posicionamento para pré-catálise e catálise de substratos como o lanosterol eburicol (KENIYA et al. 2018). Em termos de energia de afinidade, a xantona (-8.8 kcal.mol⁻¹) apresentou melhor afinidade do que o fluconazol (-8.3 kcal.mol⁻¹), valor que ainda pode ser otimizado com modificações químicas na estrutura da xantona. Os AG presentes no HBB interagiram com os aminoácidos do sítio ativo da enzima, energias < -7.4 kcal.mol⁻¹, entretanto apresentam características químicas que podem ser otimizadas para melhorar afinidade a esta enzima (Tabela 3) (HARGROVE et al. 2017).

Alguns autores sugerem que mutações no aminoácido Tyr-132 podem estar diretamente associado ao mecanismo de resistência de *Candida sp* ao fluconazol, fármaco utilizado como modelo nos ensaios microbiológicos de inibição fúngica (ALVAREZ-RUEDA et al. 2016). Os compostos naturais (xantona e ácidos graxos) investigados apresentam afinidade a este

aminoácido, com ligações de Van de Waals diferente daquela apresentada pelo fluconazol (Tabela 3). Os ensaios de inibição fúngica com o extrato, foram realizados em linhagens clínicas de *Candida sp* resistentes a fármacos azólicos sendo, portanto, promissores em estratégias envolvendo a modelagem destas moléculas para melhorar suas características de afinidade intermolecular no sítio ativo da enzima presente nestas linhagens resistentes a fármacos antifúngicos (ROSAM et al. 2021).

Tab. 3 Interações intermoleculares da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, e do Ácido dihomog- γ -linolênico no sítio da esterol-14- α -desmetilase.

Energia de afinidade	Lanosterol	Xantona*	Fluconazol	Ácido DH γ L
EF	-9.4	-8.8	-8.3	-7.4
Tyr-64	Vw	-	-	-
Tyr-118	PLS	IPPT/PIA	IPPT	PIA
Tyr-132	-	Vw	CH/TS	Vw
Glu-142	-	-	-	-
Met-306	-	-	-	-
Gly-307	-	CH	Vw	Vw
Pro-375	-	-	-	-
His-377	Vw	-	-	LH
Ser-378	Vw	CH	-	Vw
Tyr-505	-	Vw	-	-
Ser-506	Vw	-	-	-
Ser-507	-	-	-	Vw
Met-508	IA	PLS	PLS	IA

EF (Kcal / Mol): energia de afinidade; **Vw:** Interação de Van der Waals; **IPPT:** interação Pi-Pi configuração em T; **LH:** ligação de hidrogênio; **IA:** Interação Alquil; **PIA:** Pi- Interação Alquil; **PLS:** Pi-ligação sigma; **CH:** ligação carbono-hidrogênio. **ácido DH γ L:** Ácido dihomog- γ -linolênico; **Xantona*:** 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona; * Resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade enzimática.

Apesar dos AG apresentarem em torno de 20 carbonos na sua estrutura química e terem cadeias maiores quando comparados à xantona, que apresenta menor peso molecular, eles não apresentaram melhores energias de afinidade. Contudo, a xantona tem em sua estrutura núcleos aromáticos que favorecem a ligação com aminoácidos no sítio hidrofóbico da enzima lanosterol-14- α -desmetilase, se aproximando em termos de similaridade química dos fármacos azólicos. Os AG vêm sendo estudados por conta da sua ação inibitória contra fungos filamentosos e leveduriformes (*Aspergillus spp.* e *Candida albicans*) e os indícios de atividade no sítio ativo da lanosterol-14- α -desmetilase podem ser o ponto de partida para exploração do potencial dos compostos isolados do extrato de *B. brevifolia* contra fungos de interesse biomédico (ALTIERI et al. 2007; MUTHAMIL et al. 2020; PRASATH et al. 2021; WANG et al. 2021).

A família Polygalaceae tem sido estudada como uma fonte reconhecida de xantonas poli-oxigenadas, consideradas um quimiomarcador taxonômico para o gênero *Bredemeyera* (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2000; PERES; NAGEM, 1997; SILVEIRA et al. 1995). Estes compostos oxigenados tem potencial antimicrobiano descrito em outras espécies ricas em xantonas, tais como espécies do gênero *Anthocleista* (ANYANWU et al. 2015). A 1-hydroxy-3,7-dimethoxixantona demonstrou atividade antifúngica contra *Candida parapsilosis* com CIM de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (TENE et al. 2008).

Por não haver registros da atividade antimicrobiana de xantonas poli-oxigenadas e AG em espécies do gênero *Bredemeyera*, este estudo se configura como o primeiro registro da atividade antifúngica dos extratos e compostos desta espécie. A compreensão do mecanismo de interação molecular dessas substâncias, com os resíduos de aminoácidos testados neste trabalho, permitirá a construção de uma biblioteca de análogos da Xantona e dos AG, como uma estratégia de Drug design para compostos com a atividade inibitória promissora frente aos fármacos azólicos, no tratamento de infecções fúngicas.

Assim como os fármacos comerciais e o lanosterol (Fig. S6, p. 70), a xantona tem uma forte interação com a Tyr-118 (Pi-Pi configuração em T), a qual não foi observada com a maioria dos ácidos graxos, exceto o ácido araquídico. No entanto, o que pode explicar a forte interação da xantona são as interações do tipo carbono-hidrogênio com os resíduos de Gly-303 e Gly-307 (Fig. S6) presentes na hélice I da enzima que, por sua vez, está relacionada à interação com os azólicos (HARGROVE et al. 2017), além da interação do mesmo tipo com a Ser-378, não observada com os fármacos comerciais exceto para o fluconazol (Tabela 3).

Portanto, a ausência de interações fortes com esses resíduos citados acima e outros como a Met-508, pode explicar a fraca interação dos ácidos graxos apesar dos tamanhos de suas

cadeias. Todos os AG fazem uma interação de hidrogênios com a His-377, um resíduo bem conservado na filogenia dos fungos e ausente nas proteínas CYP51 humanas, o que pode conferir certa especificidade dos AG pela enzima fúngica (ZHANG et al. 2019).

Os AG de *B. brevifolia* se ligam ao resíduo de His-377 (Fig. S4), com energia intermolecular de ligações de hidrogênio, mais forte quando comparada à ligação de Van Der Walls realizada pelo lanosterol, um ligante endógeno específico da enzima esterol 14- α -desmetilase (HARGROVE et al. 2017). Os AG têm sido investigados quanto a sua atividade antifúngica contra fungos leveduriformes e filamentosos, sendo considerados compostos com potencial para a construção de bibliotecas de análogos semissintéticos a partir de estruturas naturais com ação seletiva para o alvo molecular (DAS, 2018; MUTHAMIL et al. 2020; PRASATH et al. 2021; WANG et al. 2021).

2.3.5 Predições *in silico* das propriedades ADMETox

As predições *in silico* para os parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona e AG isolados de *B. brevifolia*, demonstraram que estes compostos apresentam boa absorção oral e biodisponibilidade, de acordo com a regra dos cinco de Lipinski (2001) (Tabela 4). A xantona apresentou uma baixa área de superfície polar (ASPT), alta taxa de absorção intestinal (95,14%) e um melhor perfil de lipossolubilidade (cLogP) quando comparada ao fluconazol (81,52%) e ao lanosterol (89,97%) (DEBRUYNE, 1997). Devido ao seu elevado volume de distribuição (VDss = -0,083) e ligação às proteínas plasmáticas, esta molécula revelou uma elevada capacidade de distribuição nos tecidos, demonstrada pela baixa fração de fármaco não ligado no plasma sanguíneo (Fu = 0,126) quando comparado ao fluconazol (Fu = 0,154). Desta forma, a 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona tem um perfil promissor para distribuição em tecidos infectados, em comparação com ao fluconazol (Tabela 5) (MONTERO-GEI, 1993). Os AG identificados de *B. brevifolia*, apresentaram comportamentos físico-químicos e farmacocinéticos similares ao lanosterol, com destaque para a taxa de absorção gastrointestinal entre 88,07-89,59%, alto volume de distribuição tecidual e baixa fração não ligada, se aproximando do valor fisiológico do lanosterol. Não apresentaram hepatotoxicidade e apresentaram um bom perfil de excreção renal quando comparados ao fluconazol e ao lanosterol (Tabela 4) (KABLY et al. 2022).

Tab. 4. Parâmetros físico-químicos de inibidores naturais, sintéticos e medicamentosos de esterol-14- α -desmetilase

Moléculas	EF	MM	cLogP	ALH	DLH	RO5	RB	ASPT
Lanosterol	-9,4	426,726	8,4216	1	1	1	4	20,23
1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona	-8,8	272,255	2,8809	5	1	0	2	64,99
Fluconazol	-8,3	306,275	-0,109	7	1	0	5	81,65
DHyL	-7,4	306,488	7,1235	2	1	1	15	37,3
LNLD	-7,2	280,45	6,4669	2	1	1	14	37,3
OLC	-7,1	282,466	6,7191	2	1	1	15	37,3
ARQ	-7,1	312,536	7,8801	2	1	1	18	37,3
EST	-6,8	284,482	6,9713	2	1	1	16	37,3
MRG	-6,6	270,455	6,5169	2	1	1	15	37,3
PMT	-6,3	256,428	6,0625	2	1	1	14	37,3

EF (Kcal / Mol): energia de afinidade; **ALH:** aceptores de ligações de hidrogênio **DLH:** doadores de ligações de hidrogênio, **cLogP:** lipossolubilidade, **MM (g/Mol):** massa molecular, **ASPT (Å):** área superficial polar topológica, **RO5:** Regra dos cinco de Lipinski; **DHyL acid:** Ácido dihomog- γ -linolênico, **LNLD:** Ácido linolelaídico, **OLC:** ácido oléico, **ARQ:** Ácido araquídico, **EST:** Ácido esteárico, **MRG:** Ácido margárico, **PMT:** Ácido palmítico.

A 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona e os AG não interferem na atividade enzimática da CYP3A4, principal enzima do complexo microsomal hepático, responsável por metabolizar a grande maioria das substâncias químicas administradas por via oral, indicando uma facilidade de biotransformação, favorecendo o processo de eliminação e desintoxicação do organismo (Tabela 5) (CHENG et al. 2012). A 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, em especial, não demonstrou hepatotoxicidade e apresentou uma maior taxa de clearance renal (0,64 log mg.kg⁻¹/dia), quando comparada ao fluconazol (0,465 log mg.kg⁻¹/dia), podendo ser mais facilmente excretada. Devido à sua característica lipofílica, tanto a xantona quanto os AG podem vir a sofrer reabsorção passiva nos túbulos renais, o que pode favorecer a meia-vida (T_{1/2}), além da vida biológica destes compostos no organismo durante o tratamento de processos infecciosos mais persistentes (Tabela 5) (KABLY et al. 2022).

Tab. 5 Propriedades farmacocinéticas *in silico* da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, AG e outros antifúngicos inibidores da esterol-14- α -desmetilase

Moléculas	%Abs	VDe	FnL	1A2	2C19	2C9	2D6	3A4	Hept.	TCR
Lanosterol	89,97	0,546	0	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,403
1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona	95,14	-0,083	0,126	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	0,64
Fluconazol	81,52	-0,404	0,154	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	0,465
DHyL	89,59	-0,406	0,005	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	2,048
LNLd	89,77	-0,355	0,041	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	1,932
OLC	89,26	-0,323	0,04	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	1,88
ARQ	88,07	-0,316	0,009	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	1,896
EST	88,76	-0,292	0,039	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	1,828
MRG	89,10	-0,288	0,062	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	1,793
PMT	89,44	-0,289	0,091	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	1,759

% Abs: porcentagem absorvida, VDe: volume de distribuição estática ($\log L.kg^{-1}$), FnL: fração não ligada, 1A2 = CYP1A2; 2C19 = CYP2C19; 2C9 = CYP2C9; 2D6 = CYP2D6; 3A4 = CYP3A4: se a molécula é um inibidor de CYP, Hept.: hepatotoxicidade, TCR: taxa de clearance renal ($\log mg.kg^{-1}/dia$), DHyL: Ácido dihomog- γ -linolênico, LNLd: Ácido linolelaídico, OLC: ácido oléico, ARQ: Ácido araquídico, EST: Ácido esteárico, MRG: Ácido margárico, PMT: Ácido palmítico.

A taxa de produção de metabólitos pode aumentar ou diminuir de acordo com o comportamento do composto, seja ele indutor ou inibidor enzimático, este comportamento pode afetar o perfil de biodisponibilidade de substâncias ativas ou fármacos, administrados concomitantemente durante o tratamento terapêutico. Neste caso, a xantona demonstrou um perfil inibitório para as enzimas CYP1A2 similar ao fluconazol, sendo um substrato para o metabolismo através da CYP2C19 e CYP2C9 o que pode favorecer a sua eliminação do organismo (GOA; BARRADELL, 1995).

De acordo com o perfil de toxicidade, valores de DL₅₀ e a toxicidade máxima tolerada em humanos (DMTR), observada para a 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona e AG estão numa faixa segura para a ingestão humana, em especial para os valores de toxicidade oral crônica em ratos

(TOCR) quando comparados ao fluconazol, os compostos naturais têm faixa de segurança melhor para uso em doses crônicas (Tabela 6) (SRIVASTAVA et al. 2022). Por se tratarem de estruturas químicas autênticas, os valores de Drug Likeness (DL) e Drug Score (DS) para a 1-hidroxi-3,7-dimetoxantona e AG diferem daqueles apresentados pelo fluconazol, demonstrando potencial para desenvolvimento de novos compostos semissintéticos derivados de suas estruturas químicas naturais (KALAIMATHI et al. 2022).

Além disso, a 1-hidroxi-3,7-dimetoxantona, apresentou na predição *in silico*, um perfil de toxicidade mutagênico em linhagens de *Salmonella typhimurium*, além de toxicidade para o sistema reprodutivo (MATSUSHIMA et al. 1985). Para o fluconazol também se tem registrado o efeito de variação genômica que pode induzir a resistência fúngica (WANG et al. 2022). Os ácidos oléico, esteárico e palmítico demonstraram perfil de toxicidade mutagênica, tumorogênica e irritativo, não sendo observados efeitos similares no fluconazol. Contudo, o uso deste fármaco na prática clínica, em infecções fúngicas resistentes podem apresentar alertas toxicológicos, efeitos secundários e reações adversas (Tabela 6) (KABLY et al. 2022). Apesar da presença de alertas toxicológicos para os compostos naturais, seu potencial antifúngico pode ser explorado em ensaios com os compostos isolados e seu perfil toxicológico comprovado em cultivos celulares e modelos *in vivo* (WILDFEUER et al. 1997). Além disso, estes compostos podem ser utilizados como novas estratégias de associação entre produtos naturais e fluconazol (HAJI et al. 2022; SRIVASTAVA et al. 2022).

Tab. 6 Drug Likeness, Drug score e valores de toxicidade para 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, ácidos graxos e fluconazol.

Moléculas	DL	DS	Mut	Tu	Rep	Irrit	LD ₅₀	TOCR	DMTR
Lanosterol	-4,13	0,05	não	não	alto	alto	2,003	0,695	-0,84
1- hidroxi-3,7-dimetoxixantona	-0,92	0,22	alto	não	baixo	não	1,849	1,967	0,18
Fluconazol	3,04	0,90	não	não	não	não	2,384	1,006	0,465
DH γ L	-25,56	0,21	não	não	não	não	1,951	3,075	-0,627
LNL D	-25,56	0,24	não	não	não	não	1,885	2,994	-0,497
OLC	-28,97	0,05	alto	alto	não	alto	1,887	3,066	-0,445
ARQ	-25,22	0,18	não	não	não	não	1,933	3,291	-0,452

EST	-25,22	0,05	alto	alto	não	Alto	1,888	3,138	-0,392
MRG	-25,22	0,23	não	não	não	não	1,869	3,062	-0,348
PMT	-25,22	0,09	não	alto	não	alto	1,855	2,988	-0,293

DL: Drug likeness, **DS:** Drug score, **Mut:** mutagenicidade, **Tum:** tumorigenicidade, **Rep:** efeitos no sistema reprodutivo **Irrit:** efeitos irritantes, **LD₅₀:** toxicidade aguda oral em ratos (mol.kg⁻¹), **TOCR:** toxicidade crônica oral em ratos (log mg.kg⁻¹_bw.dia⁻¹), **DMTR:** dose máxima tolerada recomendada (log mg.kg⁻¹/dia). **DH γ L:** Ácido dihomo- γ -linolênico, **LNLD:** Ácido linolelaídico, **OLC:** ácido oléico, **ARQ:** Ácido araquídico, **EST:** Ácido esteárico, **MRG:** Ácido margárico, **PMT:** Ácido palmítico.

2.4 Conclusões

O estudo fitoquímico das frações das folhas de *B. brevifolia* utilizando métodos cromatográficos e espectroscópicos, permitiu isolar e identificar uma xantona trioxigenada (1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona), até então inédita para o gênero *Bredemeyera* Willd., e sete ácidos graxos (palmítico, margárico, linolelaídico, oleico, esteárico, dihomo- γ -linolênico e o araquídico), todos com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos obtidos de fontes naturais. A integração de dados fitoquímicos, *in vitro* e *in silico*, permitiu confirmar a hipótese que estes compostos podem se comportar como inibidores, responsáveis pela atividade sobre a enzima esterol-14- α -desmetilase, importante para manutenção da homeostase fúngica e uma das responsáveis pela resistência a fármacos azólicos (fluconazol). O uso de ferramentas de química computacional (*in silico*) permitiram delinear um perfil físico-químico, farmacocinético e toxicológico promissor para o desenvolvimento de novos fármacos através dos compostos avaliados. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho fornecem novas informações adicionais sobre a *B. brevifolia*, colaborando com a caracterização química e atividade biológica da planta estudada. Novos ensaios devem ser projetados para investigar e comprovar o potencial antifúngico da xantona e ácidos graxos em modelos *in vitro* em fungos de interesse biomédico.

Referências

ALTIERI, C. et al. Inhibition of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by Fatty Acids and Their Monoglycerides. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 5, p. 1206-1212, 2007. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1206>

ALVAREZ-RUEDA, N. et al. The amino acid substitution N136Y in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase is involved in fluconazole resistance. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 764-775, 2016. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw023>

ANYANWU, G. O. et al. Medicinal plants of the genus *Anthocleista*—A review of their ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 648-667, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.032>

CHENG, F. et al. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099-3105, 2012. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M27-A3 [ISBN 1-56238-666-2]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A2 [ISBN 1-56238-668-9]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008.

DAROS, M.R.; MATOS, F. J.A.; PARENTE, J.P. A New Triterpenoid Saponin, Bredemeyeroside B, from the Roots of *Bredemeyera floribunda*. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 523-527, 1996. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957962>

DAS, U. N. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 57-66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.001>

DEBRUYNE D. Clinical Pharmacokinetics of Fluconazole in Superficial and Systemic Mycoses. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 33, p 52-77, 1997. <https://doi.org/10.2165/00003088-199733010-00005>

GOA, K. L.; BARRADELL, L. B. Fluconazole. **Drugs**, v. 50, p. 658-690, 1995. <https://doi.org/10.2165/00003495-199550040-00007>

HAJI, M. H. et al. A Review of Antifungal Activity of Combined Plant Extracts or Plant Exudates from Medicinal Plants either together or with Known Antifungal Agents. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 33, n. 8, p. 16-47, 2022. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2022/v33i830483>

HARGROVE, T. Y. et al. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, p. 6728-6743, 2017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778308>

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

KABLY, B. et al. Antifungal Drugs TDM: Trends and Update. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 44, n. 1, p. 166-197, 2022. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000952>

KALAIMATHI, K. *In Vitro* and *In Silico* Strategies for the Assessment of Fungicidal Compounds from the Bark of *Bauhinia racemosa* Against Dermatitis: Clinical Isolates. **Integrative Medicine Reports**, v. 1, n. 1, p. 76-85, 2022. <https://doi.org/10.1089/imr.2021.0022>

KENIYA, M. V. et al. Crystal Structures of Full-Length Lanosterol 14 α -Demethylases of Prominent Fungal Pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata* Provide Tools for Antifungal Discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, e01134-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/AAC.01134-18>

LAMBERT, M. L. et al. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.11, n.1, p. 30-38, 2011. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70258-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70258-9)

LIMA, I.G. et al. Flora of Ceará, Brazil: Polygalaceae. **Rodriguesia**, v. 69, n 2, p. 673-692, 2018. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869229>

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).

MACEDO, J. G. F. et al. Analysis of the Variability of Therapeutic Indications of Medicinal Species in the Northeast of Brazil: Comparative Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, artigo ID 6769193, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6769193>

MATSUSHIMA, T. et al. Mutagenicities of xanthone derivatives in *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA97, and TA2637. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 150, n. 1-2, p. 141-146, 1985. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(85\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(85)90111-3)

MONTE, F. J. Q.; SOARES, F. P.; BRAZ-FILHO, R. A xanthone from *Shultesia guianensis*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 715-716, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00297-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00297-0)

MONTERO-GEI, F. Fluconazole: pharmacokinetics and indications. **Archives of Medical Research**, v. 24, n. 4, p 377-385, 1993

MUTHAMIL, S. et al. Global proteomic analysis deciphers the mechanism of action of plant derived oleic acid against *Candida albicans* virulence and biofilm formation. **Scientific Reports**, v. 10, artigo ID 5113, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61918-y>

OLIVEIRA, M. C. F. de; SILVEIRA, E. R. Pentaoxygenated xanthenes and fatty acids from *Bredemeyera brevifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 847-851, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00286-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00286-7)

PEREIRA, B. M. R. et al. Bredemeyeroside C, a new saponin from *Bredemeyera floribunda*. **Fitoterapia**, v. 67, n. 4, p. 323-328, 1996a.

PEREIRA, B. M. R. et al. Bredemeyeroside D, a Novel Triterpenoid Saponin from *Bredemeyera floribunda*: A Potent Snake Venom Antidote Activity on Mice. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 666-669, 1996b. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199612\)10:8<666::AID-PTR937>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199612)10:8<666::AID-PTR937>3.0.CO;2-H)

PERES, V.; NAGEM, T. J. Naturally occurring pentaoxygenated, hexaoxygenated and dimeric xanthenes: a literature survey. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 388-397, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000400009>

PRASATH, K. G. et al. Anti-inflammatory potential of myristic acid and palmitic acid synergism against systemic candidiasis in *Danio rerio* (Zebrafish). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, artigo ID 111043, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111043>

RESENDE, D. I. S. P. et al. Recent advances in the synthesis of xanthenes and azaxanthenes. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 7, n. 19, p. 3027–3066, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0QO00659A>

ROSAM, K.; MONK, B. C.; LACKNER, M. Sterol 14 α -Demethylase Ligand-Binding Pocket-Mediated Acquired and Intrinsic Azole Resistance in Fungal Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 1, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7010001>

SILVEIRA, E.R. et al. Pentaoxygenated xanthenes from *Bredemeyera floribunda*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1433-1436, 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00103-E](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00103-E)

SRIVASTAVA, D. et al. Efficacy of Flavonoids in Combating Fluconazole Resistant Oral Candidiasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 28, n. 21, p. 1703-1713, 2022. <https://doi.org/10.2174/1381612828666220324140257>

TENE, M. et al. Anthocleistenolide, A New Rearranged Nor-Secoiridoid Derivative from the Stem Bark of *Anthocleista vogelii*. **Planta Medica**, v. 74, n. 1, p. 80-83, 2008. <https://doi.org/10.1055/s-2007-993781>

VALLE, P. W. P. A. do. Produção de Biodiesel Via Transesterificação do Óleo de Nabo Forrageiro. 2009. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química). UGMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2009.

WANG, W-Y. et al. Genomic Variation-Mediating Fluconazole Resistance in Yeast. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 845, 2022. <https://doi.org/10.3390/biom12060845>

WANG, Y. et al. Long-chain unsaturated fatty acids are involved in the viability and itraconazole susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 585, n. 31, p. 82-88, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.033>

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.014>

WILDFEUER, A. et al. Fluconazole: comparison of pharmacokinetics, therapy and in vitro susceptibility. **Mycoses**, v. 40, n. 7-8, p. 259-265, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1997.tb00230.x>

ZARA, R. F. et al. Preparation of Fame by Microwave Irradiation Using Boron Trifluoride as a Catalyst. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 288-294, 2012. <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2012.34039>

ZHANG, J. et al. The Fungal CYP51s: Their Functions, Structures, Related Drug Resistance, and Inhibitors. **Frontiers in Microbiology**, v.10, artigo ID 691, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00691>

Material suplementar

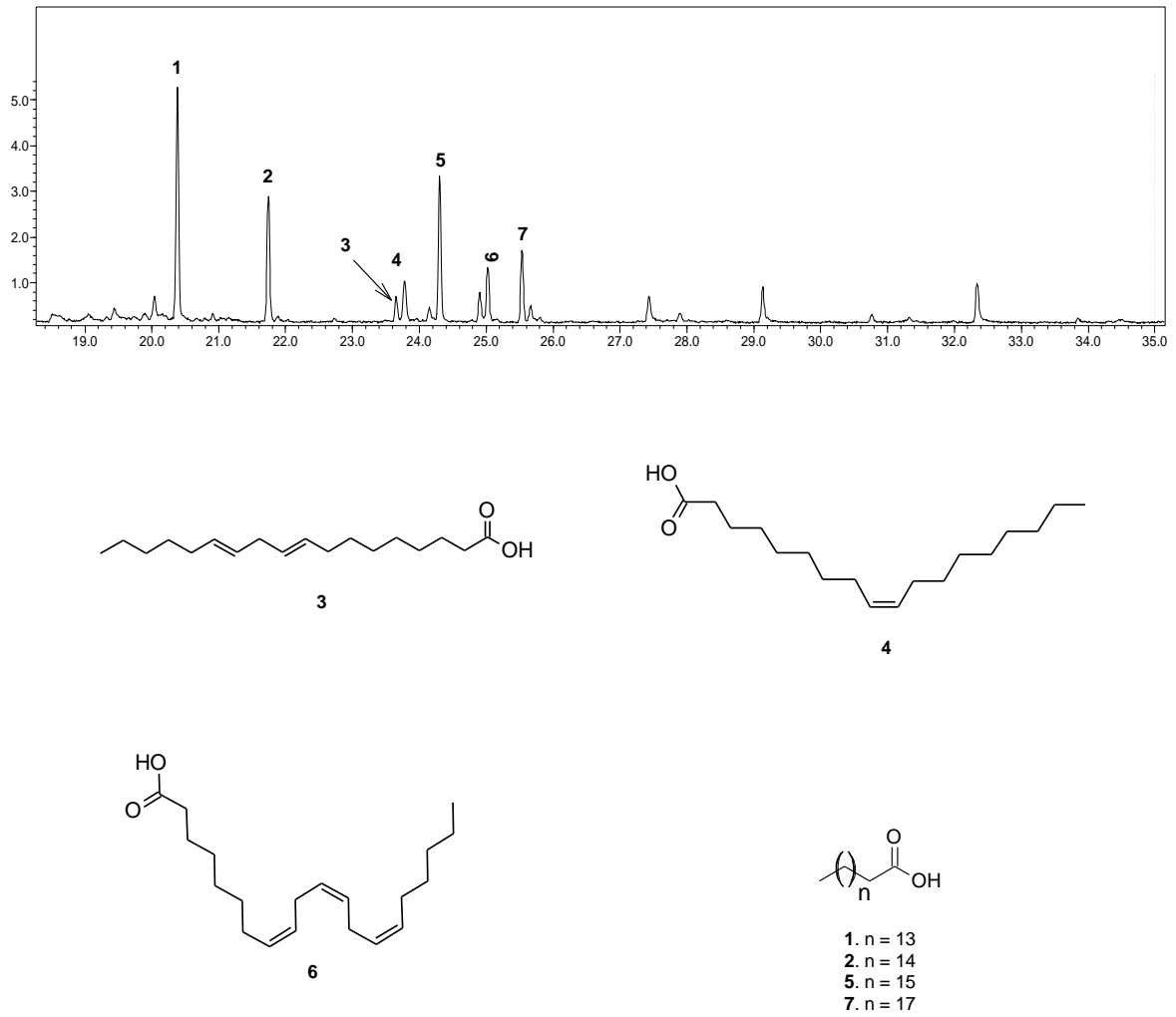


Fig. S1 Cromatograma de íons totais dos ésteres metílicos de ácidos graxos de HBB-C.

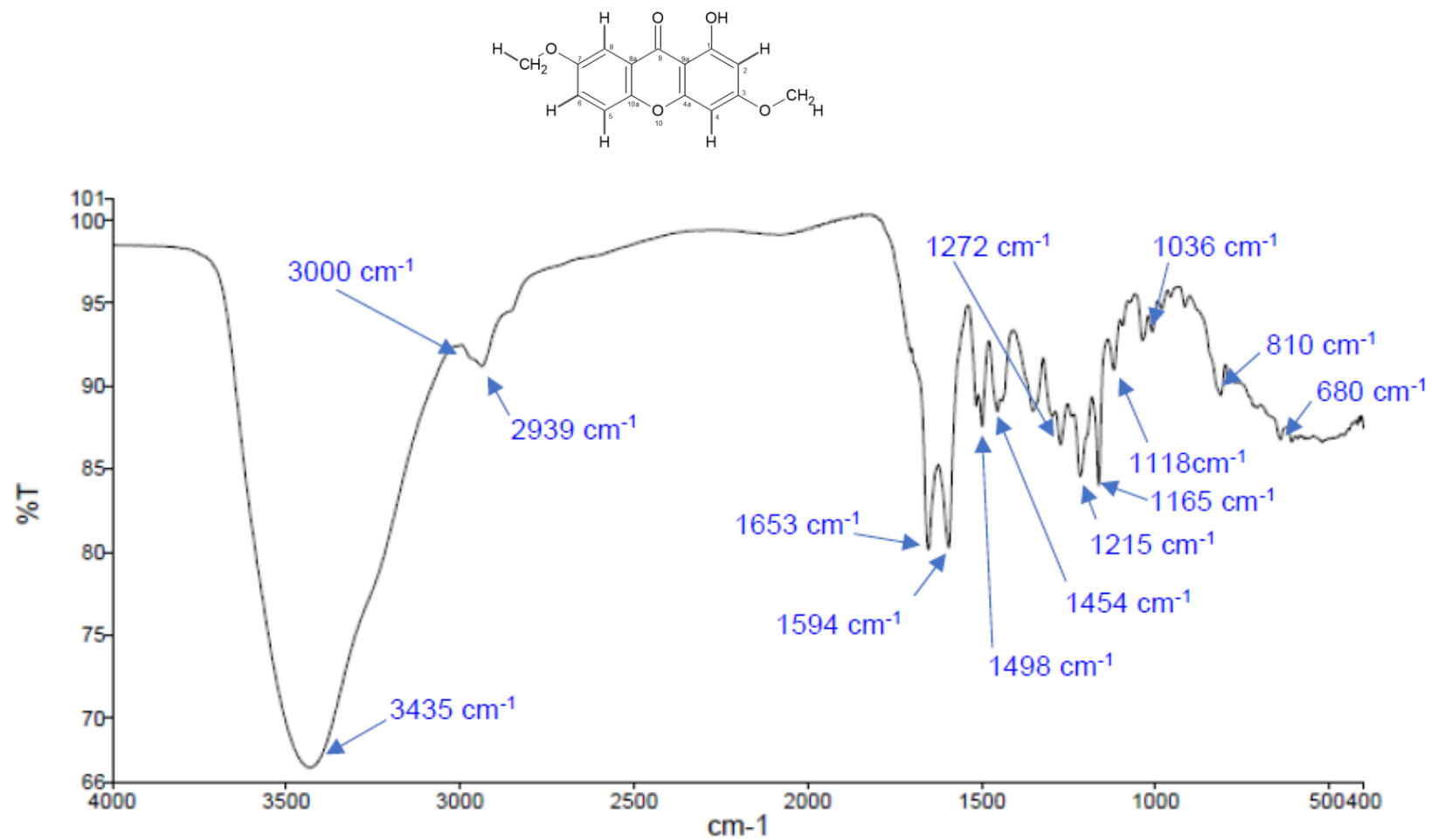


Fig. S2 Espectro IVTF (KBr) da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona

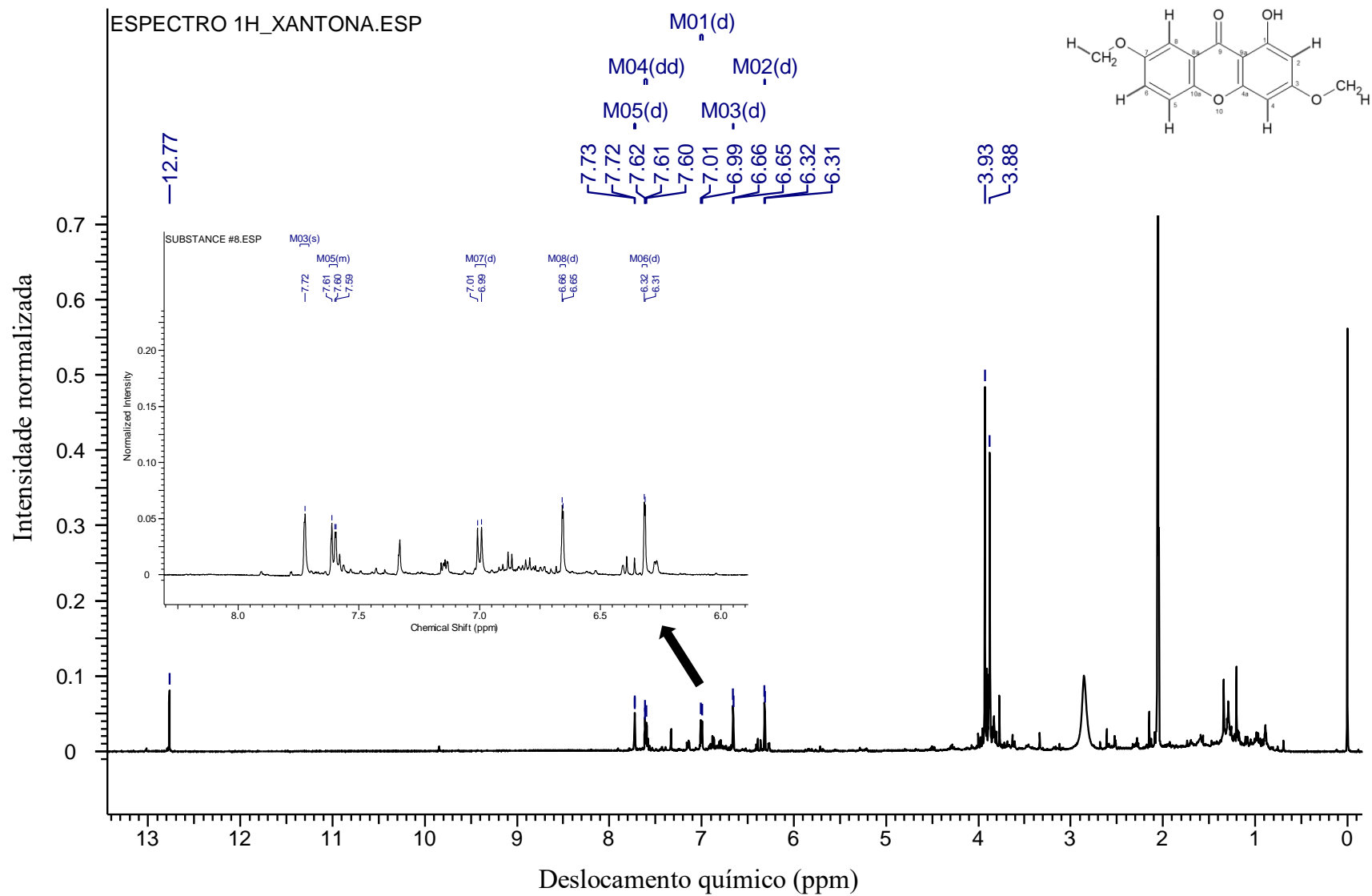


Fig. S3 Espectro RMN ^1H da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 500 MHz, δ (ppm)

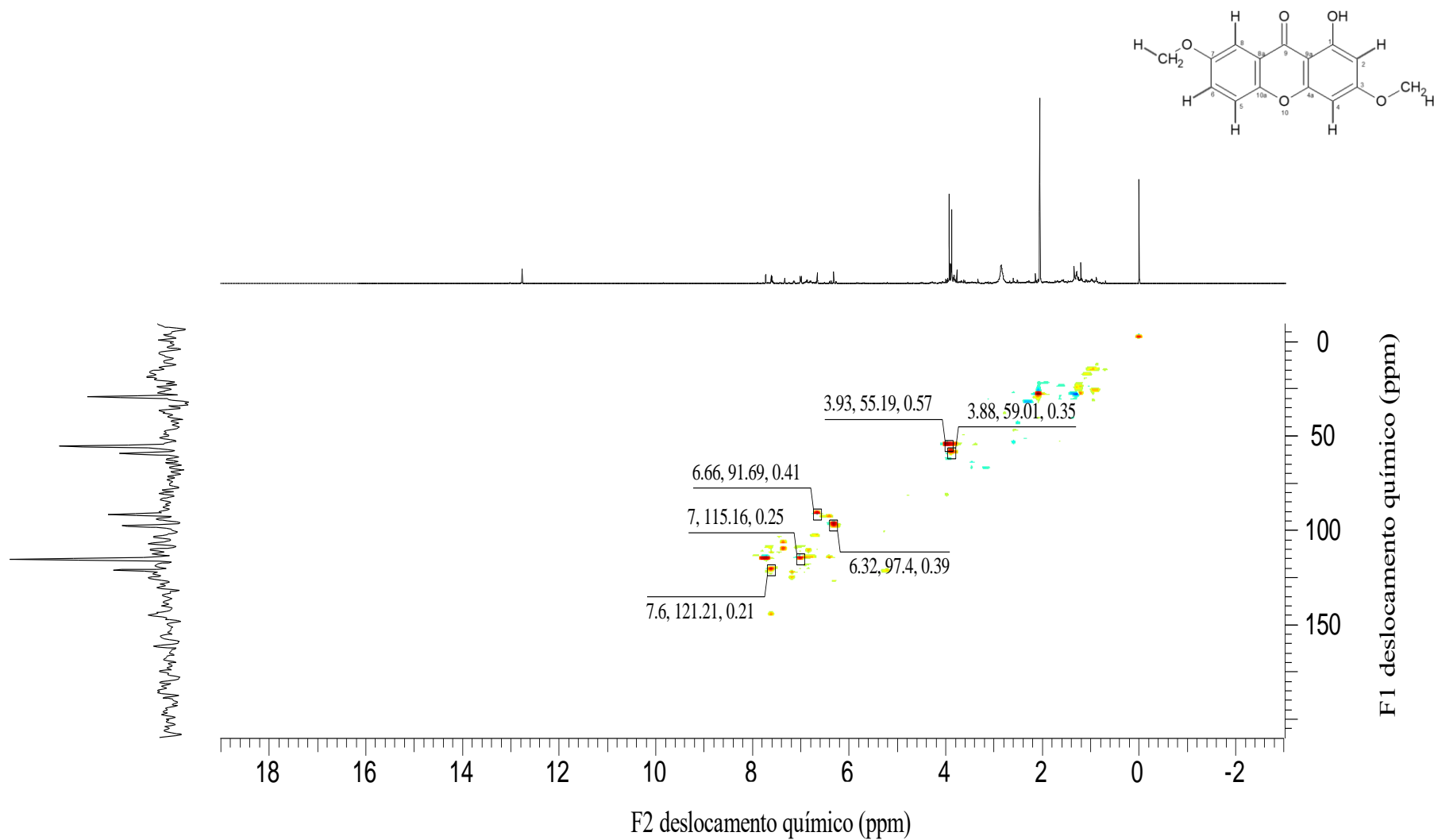


Fig. S4 Espectro RMN HMQC da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 500/125 MHz, δ (ppm)

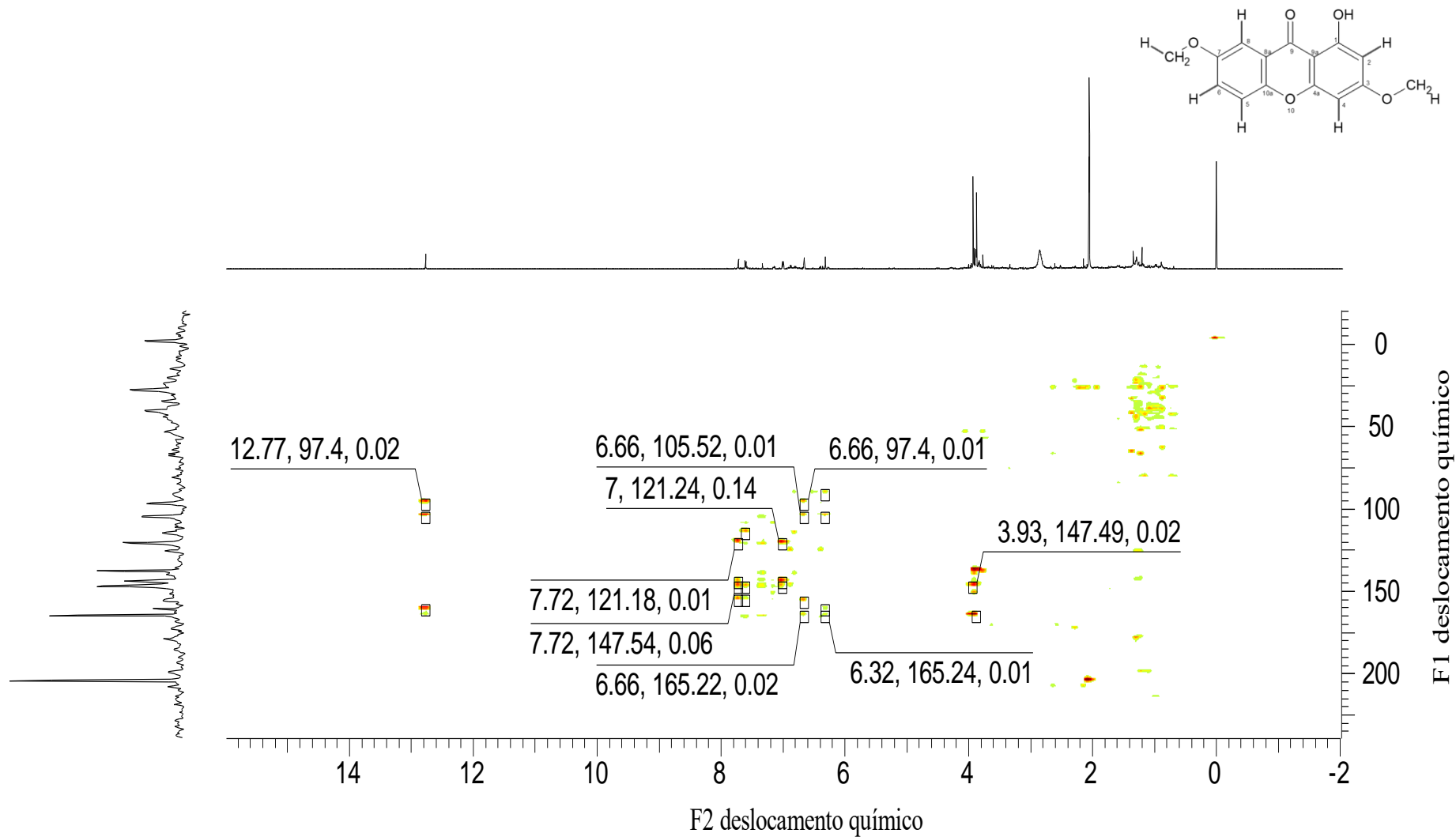
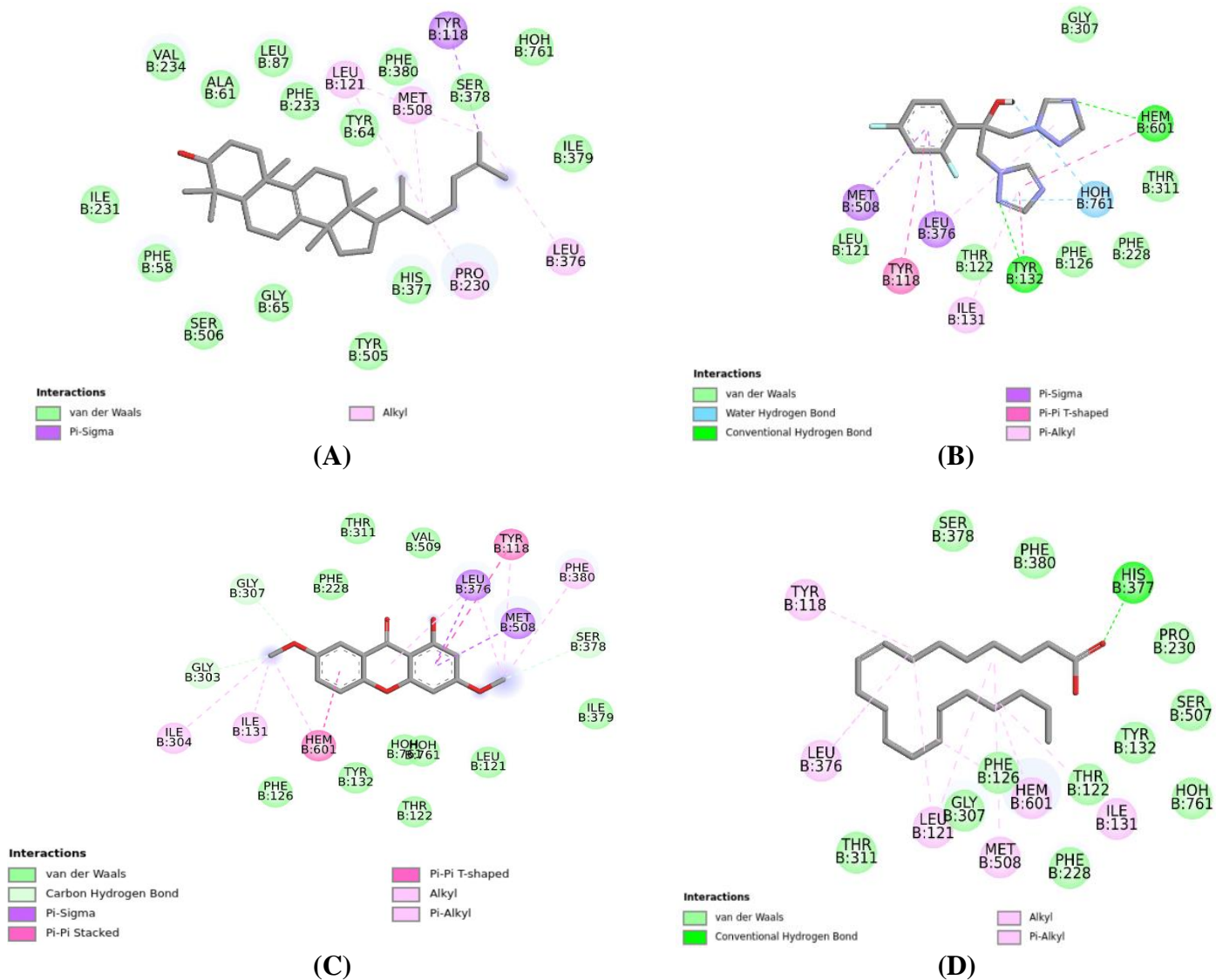


Fig. S5 Espectro RMN HMBC da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 500/125 MHz, δ (ppm)



(A) Lanosterol; (B) Fluconazol; (C) 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona; (D) ácido dihomo- γ -linolênico.

Fig. S6 Mapas de interações 2D entre aminoácidos no sítio ativo da esterol-14- α -desmetilase com padrões e constituintes isolados de *Bredemeyera brevifolia*.

Tab. S1 Dados de RMN, ^1H , ^{13}C e acoplamentos da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona

	HMQC	^1H	HMBC
Posição	^{13}C		
(H ₃ CO-3)	55,2	3,88 (3H, s)	165,2
(H ₃ CO-7)	59,0	3,93 (3H, s)	147,5
2	97,4	6,32 (1H, d, 2,0 Hz)	91,7; 105,5; 161,6; 165,2
4	91,7	6,66, (1H, d, 2,0 Hz)	97,4; 105,5; 156,7; 165,2
6	121,2	7,60 (1H, dd, 8,0/2,0 Hz)	115,2; 147,5, 155,8
5	115,2	7,00 (1H, d, 8,0 Hz)	121,2; 144,8; 147,5
8	115,1	7,72 (1H, sl)	121,2; 144,8; 147,5; 155,8
9a	105,5		
8a	144,8		
7	147,5		
10a	155,8		
4a	156,7		
(HO-1)	161,6	12,77 (1H, s)	97,4; 105,5; 161,6
3	165,2		

Análise feita em espectrômetro a 500 MHz (^1H), utilizando acetona deuterada como solvente.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO, E USO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS EM EXTRATOS DE *Bredemeyera brevifolia*

RESUMO

No presente trabalho um planejamento de misturas com o estabelecimento de restrições e metodologia de superfícies de resposta foram aplicados na otimização das proporções dos solventes que compõem a fase móvel em cromatografia líquida. Avaliou-se o uso de uma fase móvel otimizada para o fracionamento de uma fração hexânica obtida de folhas de *B. brevifolia*. Também foi testado o potencial genotóxico do extrato hidrometanólico e fração hexânica de *B. brevifolia* pelo protocolo *Allium cepa*. Pelo planejamento experimental proposto, foi possível obter uma fase móvel com as proporções ideais entre seus componentes, as quais foram 21, 64,5, 9,5 e 5% respectivamente de clorofórmio, hexano, acetona e metanol, viabilizando o processo de separação cromatográfica dos constituintes da fração hexânica de *B. brevifolia*, partindo de uma amostra que apresentou um *fingerprint* em CLAE/DAD com muitos picos sobrepostos, após a utilização da fase móvel otimizada em CC, com sílica gel foram obtidas frações semipurificadas viáveis para uso em CLAE semipreparativa. Desta forma, a metodologia se mostrou viável para a otimização da fase móvel selecionada, reduzindo o tempo, a quantidade de solventes e etapas no processo de isolamento de substâncias. Por meio da estratégia adotada, foi possível pela primeira vez, separar e identificar triperpenos de *B. brevifolia*, os conhecidos ácidos oleanólico e ursólico, além de um inédito, o ácido 3 β ,26,27-trihidroiolean-12-en-23,28-diólico, que teve sua estrutura elucidada com o auxílio de dados de RMN e de EM. No ensaio de genotoxicidade, não foram observadas anormalidades, indicando que o material testado não apresenta genotoxicidade frente a espécie *A. cepa*.

Palavras-chave: *B. brevifolia*. Planejamento de misturas. Metodologia de superfícies de resposta. Triterpenos. Ácido 3 β ,26,27-triidroiolean-12-en-23,28-diólico

CHAPTER 3: EVALUATION OF THE GENOTOXIC POTENTIAL, AND USE OF THE SURFACE METHODOLOGY OF RESPONSES IN EXTRACTS OF *Bredemeyera brevifolia*

ABSTRACT

In the present work, mixture planning with the establishment of restrictions and response surface methodology were applied to optimize the proportions of solvents that make up the mobile phase in liquid chromatography. The use of an optimized mobile phase for the fractionation of a hexane fraction obtained from *B. brevifolia* leaves was evaluated. The genotoxic potential of the hydromethanolic extract and hexane fraction of *B. brevifolia* was also tested by the *Allium cepa* protocol. By the proposed experimental planning, it was possible to obtain a mobile phase with the ideal proportions between its components, which were 21, 64.5, 9.5, and 5% respectively of chloroform, hexane, acetone, and methanol, enabling the chromatographic separation process of the constituents of the hexane fraction of *B. brevifolia*, starting from a sample that presented a fingerprint in HPLC/DAD with many overlapping peaks, after using the optimized mobile phase in CC, with silica gel, semi-purified fractions were obtained, viable for use in semi-preparative HPLC. In this way, the methodology proved to be viable for optimizing the selected mobile phase, reducing time, the amount of solvents and steps in the process of isolating substances. Through the strategy adopted, it was possible for the first time to separate and identify triperpenes from *B. brevifolia*, the well-known oleanolic and ursolic acids, as well as an unprecedented one, the 3 β ,26,27-trihydroxyolean-12-en-23,28-dioic, which had its structure elucidated with the aid of NMR and EM data. In the genotoxicity test, no abnormalities were observed, indicating that the tested material does not present genotoxicity against the *A. cepa* species.

Keywords: *B. brevifolia*. Mix planning. Response surface methodology. Triterpenes. 3 β ,26,27-trihydroxyolean-12-en-23,28-dioic acid.

3.1 Introdução

A ciência está sempre evoluindo, num processo de transformação contínuo em busca de estratégias mais eficientes para otimizar seus processos. Neste sentido, uma área que tem avançado nas últimas décadas é a Quimiometria, que se caracteriza por utilizar ferramentas estatísticas e matemáticas para otimizar as condições experimentais a serem usadas em laboratórios de Química (NOVAES et al. 2017). A utilização de ferramentas quimiométricas multivariadas apresenta algumas vantagens como a redução do número de experimentos, menor consumo de reagentes e de tempo de trabalho (FERREIRA et al. 2007; NOVAES et al. 2018).

Devido a sua alta eficiência, poder de modelagem e capacidade de exploração dos sistemas estudados, uma das técnicas multivariadas de otimização mais utilizadas é a metodologia de superfícies de respostas (MSR). Ela é uma combinação de técnicas de planejamento de experimentos, análise de regressão e métodos de otimização, que tem como base o ajuste de modelos matemáticos empíricos a dados experimentais obtidos segundo uma determinada matriz experimental com o objetivo de descrever o comportamento destes dados e fazer previsões estatisticamente válidas (HANRAHAN; LU, 2006; NOVAES et al. 2018; ORLANDINI, 2014).

Buscando verificar a viabilidade da aplicação da MSR em experimentos de fracionamento cromatográfico de extratos vegetais, essa técnica foi aplicada para obtenção de uma fase móvel otimizada por MSR para o particionamento da fração hexânica obtida de folhas de *B. brevifolia*, uma planta nativa do Brasil (LIMA et al. 2018), que fora estudada anteriormente por técnicas convencionais, sendo identificadas na ocasião três xantonas pentaoxigenadas e alguns ácidos graxos (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2000). Considerando que a espécie *B. brevifolia* é utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamação dos rins, influenza, diarreia, reumatismo, dores na coluna e gastrite (MACÊDO et al. 2015; MACEDO et al. 2018; RIBEIRO et al. 2014), e que faltam informações sobre os efeitos tóxicos da espécie, neste trabalho também foi avaliado o potencial genotóxico do extrato hidroalcolólico e da fração hexânica de *B. brevifolia*, através do protocolo *Allium cepa*.

3.2 Material e método

3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta das folhas de *B. brevifolia* foi realizada na represa do Rio de Contas, na cidade de Rio de Contas - BA. Após identificação da espécie, a exsicata foi depositada na Universidade

Federal do Paraná, sob número CTBS 3935. O acesso ao patrimônio genético foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), conforme atestado de regularidade de acesso número ADA5ACA.

3.2.2 Obtenção do extrato vegetal

O material vegetal foi seco em estufa até peso constante (439,24g). As folhas secas foram pulverizadas em liquidificador industrial, e em seguida maceradas em metanol/água 9:1. Após dez dias com trocas de solventes a cada 48h, o extrato hidrometanólico foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo, resultando em 137,53 g do extrato vegetal bruto de *B. brevifolia* (BBB).

O BBB foi solubilizado em 400 mL de solução hidroalcolica (metanol/água 9:1), e particionado com hexano (200 mL, 5 vezes). A fase hexânica foi concentrada em evaporador rotativo e depois seca em capela de exaustão, resultando em 8,44 g de fração hexânica de *B. brevifolia* (HBB).

3.2.3 Otimização multivariada com planejamento de mistura

3.2.3.1 Seleção de solventes

Os solventes a serem utilizados na otimização multivariada foram inicialmente testados em sistemas de cromatografia em camada delgada (CCD), para checar a interação destes com a HBB. Nas análises as placas de gel de sílica (Lemandou Chemicals) foram reveladas por aspersão de solução de vanilina perclórica, seguida de aquecimento.

A avaliação dos eluentes foi feita inicialmente com os solventes puros e depois modulando sua força com adição de hexano (força = 0) em diferentes proporções buscando a obtenção do maior número de *spots* com fatores de retenção (R.F) entre 0,2 e 0,8 nas placas de CCD (NYIREDY, 2002). Os solventes utilizados foram o diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol, metanol e acetonitrila, para cada sistema de eluente (Tabela 1) foram realizadas três corridas em CCD, visando a obtenção do valor médio de R.F.

Tab. 1 Proporção de cada solvente avaliado em relação ao hexano

Nº da placa	solvente avaliado: hexano
1	10:0
2	9:1
3	8:2
4	7:3
5	1:1
6	3:7
7	2:8
8	1:9

3.3.3.2 Planejamento de misturas para a otimização das proporções dos solventes que compõem a fase móvel (FM)

As misturas de solventes que apresentaram a maior quantidade de *spots* com RF entre 0,2 e 0,8, foram selecionadas para dar continuidade ao processo. Para otimizar as proporções dos solventes que iriam compor a FM, foi utilizado um planejamento de misturas com restrições para as proporções máximas e mínimas de solventes (NOVAES et al. 2018). O estabelecimento de restrições é importante nesses experimentos, pois há a necessidade da presença de pelo menos uma quantidade mínima e um valor máximo de cada componente para que o experimento seja realizado. Com auxílio do software Statistica, as restrições foram aplicadas para clorofórmio (5 a 40%), hexano (50 a 67,5%), acetona (5 a 40%) e metanol (5 a 40%). O número de spots foi adotado como resposta a ser otimizada. A matriz experimental obtida, juntamente com a resposta, é apresentada na Tabela 2.

Tab. 2 Matriz do planejamento de mistura com restrições e respostas obtidas (número de *spots*) para otimizar as proporções da composição da fase móvel em CCD

Ex]	% Clorofórmio	%Hexano	%Acetona	%Metanol	N. de spots
1	5	50	5	40	3
2	5	50	40	5	0
3	5	85	5	5	3
4	40	50	5	5	3
5	5	50	22,5	22,5	2
6	5	67,5	5	22,5	8
7	5	67,5	22,5	5	8
8	22,5	50	5	22,5	3
9	22,5	50	22,5	5	5

10-	22,5	67,5	5	5	10
10-	22,5	67,5	5	5	12
10-	22,5	67,5	5	5	10
11	5	61,7	16,7	16,7	5
12	16,7	50	16,7	16,7	4
13	16,7	61,7	5	16,7	7
14-	16,7	61,7	16,7	5	8
14-	16,7	61,7	16,7	5	8
14-	16,7	61,7	16,7	5	8

3.2.4 Análises das frações obtidas na CC

Após definição da FM otimizada, foi realizada a cromatografia em coluna (CC) em modo isocrático para o fracionamento de HBB (2,00g), tendo como fase estacionária gel de sílica 60, Acros, 0,063-0,200 mm (40,00g).

Os *fingerprints* das frações oriundas da separação por CC foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um equipamento modelo HPLC 1260 Infinity II, marca Agilent Technologies, equipado com uma bomba quaternária de distribuição de solventes, um amostrador automático, uma coluna analítica ZORBAX RX-SIL C-18 (4,6x250mm x 5,00 μ m) da Agilent, acondicionada a uma temperatura de 25°C e um detector de arranjo de diodos (DAD). O volume de injeção das amostras foi de 10 μ L, enquanto o sistema de eluição em gradiente binário foi formado por um solvente A (água ultrapura) e um solvente B (acetonitrila, grau HPLC), o programa de gradiente do solvente B é mostrado na Figura 1, e sua vazão foi de 1,0 mL min⁻¹. O comprimento de onda de detecção foi definido em 240 nm.

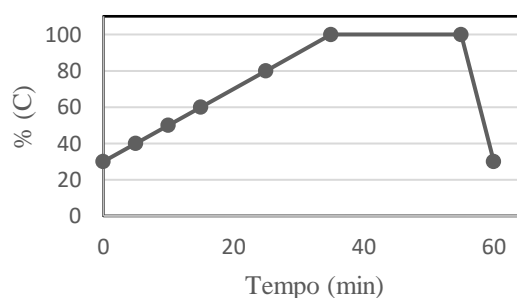


Fig. 1 Programa de gradiente do solvente B

3.2.5 Isolamento e caracterização de substâncias, a partir das frações HBB2 e HBB3

O isolamento de substâncias foi realizado por CLAE semipreparativa no mesmo equipamento descrito anteriormente, utilizando uma coluna semipreparativa ZORBAX RX-SIL C-18 (9,6x250mm x 5,00 μ m) da Agilent, acondicionada a uma temperatura de 25°C. O volume de injeção das amostras foi de 100 μ L, enquanto o sistema de eluição em gradiente binário foi

formado por um solvente A (água ultra pura) e um solvente B (acetonitrila, grau HPLC), o programa de gradiente do solvente B seguiu conforme mostrado na Figura 1, e sua vazão foi de 1,0 mL min⁻¹.

As frações purificadas (**FP2** e **FP3**) que se apresentaram viáveis para análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram encaminhadas para análise. Os experimentos de RMN de ¹H e de ¹³C (1 e 2D) foram realizados em Espectrômetro INOVA 500, operando a 500 MHz (¹H) e 125 MHz (¹³C), usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e (CD₃)₂CO ou CD₃OD como solvente (Merck).

Para confirmar a estrutura proposta para **FP2**, a amostra foi analisada por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (EM-ESI), em modo negativo. O equipamento utilizado foi um espectrômetro LCQ Fleet da marca Thermo, constituído por um Cromatógrafo a líquidos de alta eficiência e um Espectrômetro de massas do tipo *ion trap*.

3.2.6 Teste de genotoxicidade *in vitro*, utilizando o protocolo *A. cepa*

Sementes de *A. cepa* germinaram em placas de Petri com papel filtro previamente umedecido com água destilada a temperatura ambiente. Após a germinação, meristemas radiculares com tamanhos a partir 2,0 cm de comprimento foram selecionados e conservados em álcool. Microtubos foram preparados com as concentrações de 50mg.mL⁻¹, 100mg.mL⁻¹, 150 mg.mL⁻¹, 200mg.mL⁻¹ e 400mg.mL⁻¹ de BBB, ou de HBB. Para controle negativo um microtubo foi separado com água destilada e para controle positivo com DMSO. Os meristemas foram retirados da conserva e cada microtubo recebeu 03 unidades do tecido vegetal, que permaneceram em contato com as soluções por 48h. Encerrado o tempo de contato com os extratos, foram retirados dos frascos e fixados em solução de Carnoy modificada por 24h, transferidos para novos recipientes contendo álcool 70% e mantidos a 7°C até o momento da análise microscópica. No preparo das lâminas, foi utilizada orceína acética a 2%. A captação das imagens foi feita em um microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E200 iluminado com luz de LED, com objetiva em 40x (MENDES et al. 2012).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Otimização multivariada

A otimização multivariada com o planejamento de mistura foi usada para obter as proporções ótimas entre os componentes da fase móvel. O número de spots obtidos após cada corrida na placa de CCD foi usado como resposta a ser otimizada para maximizar a separação. Funções (lineares e quadráticas) foram ajustadas a esta resposta para descrever o comportamento dos dados e prever as condições experimentais ótimas a serem utilizadas (BEZERRA et al. 2008; NOVAES et al. 2017; 2018).

As Figuras 2(a) e 2(b) mostram duas superfícies de resposta obtidas ajustando uma função linear e uma função quadrática aos dados experimentais usando o método dos mínimos quadrados. Nota-se visualmente que o modelo linear (cuja superfície gerada é um plano inclinado), não se aproximam dos pontos que representam as respostas em relação ao modelo quadrático.

Utilizando os parâmetros de análise de variância (ANOVA), foram realizados os testes de significância estatística de regressão (Eq. 1) e de falta de ajuste (Eq. 2).

$$F = MS_{\text{Reg}}/MS_{\text{res}} \quad (1)$$

$$F = MS_{\text{faj}}/M_{\text{Sep}} \quad (2)$$

Onde:

F- Distribuição de Fisher (teste F)

MS_{Reg} - média quadrática de regressão

MS_{res} - média da soma quadrática do resíduo

MS_{faj} - média da soma quadrática da falta de ajuste

MS_{ep} - média da soma quadrática do erro puro

Adotando um nível de confiança de 95%, foi possível comprovar que o modelo quadrático é superior em descrever o comportamento dos dados em relação ao modelo linear. O modelo quadrático apresentou regressão significativa ($F_{\text{calculado}} = 14,38 > F_{\text{tabelado}} = 3,39$) e falta de ajuste não significativa ($F_{\text{calc}} = 2,99 < F_{\text{tab}} = 6,39$) enquanto, ao contrário, o modelo linear quase não apresentou regressão significativa ($F_{\text{calc}} = 3,5$ ligeiramente maior que $F_{\text{tab}} = 3,4$, recomenda-se que este valor seja dez vezes maior) e falta de ajuste significativa ($F_{\text{calc}} = 15,3 > F_{\text{tab}} = 5,96$) (BEZERRA et al. 2008).

A análise dos gráficos de valores observados *versus* valores preditos, assim como dos gráficos de resíduos (Fig. 2), são outras evidências da melhor qualidade do modelo quadrático em relação ao linear. O modelo quadrático tem uma melhor correlação com o modelo predito e deixa resíduos menores e menos dispersos do que o modelo linear (SILVA; MATTOS, 2017). Assim, o melhor modelo foi escolhido para estabelecer as proporções ótimas entre os componentes da fase móvel.

A superfície obtida no modelo quadrático possui um ponto máximo e suas coordenadas representam as condições ótimas para obter a resposta máxima. Desta forma, as proporções ótimas da FM para o fracionamento de HBB foram as seguintes: 21% de clorofórmio, 64,5% hexano, 9,5% acetona e 5% metanol, respectivamente.

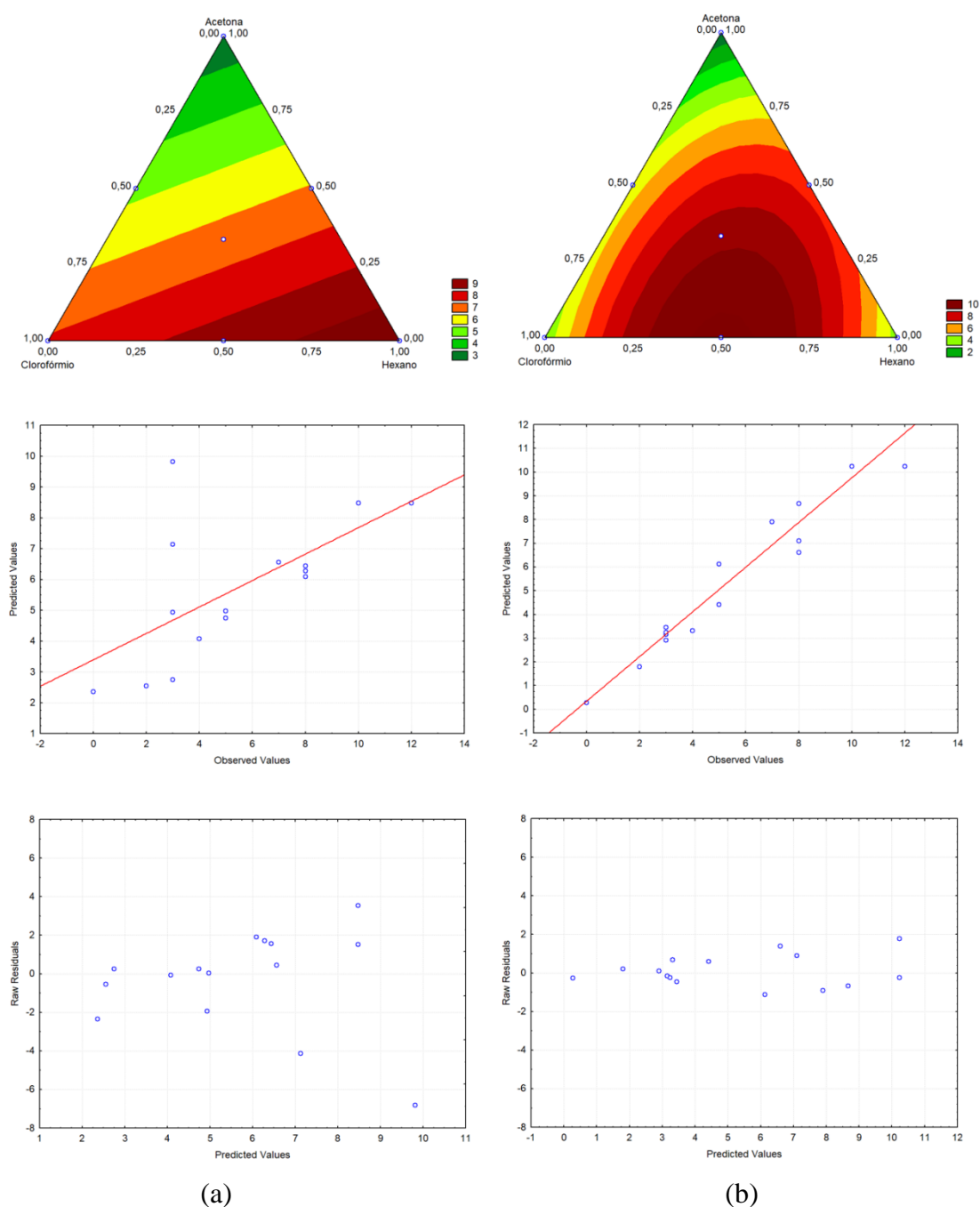


Fig. 2 (a) modelo linear, gráficos preditos versus observados e de resíduos, (b) modelo quadrático, gráficos preditos versus observados e de resíduos. Para obter as superfícies, a proporção de metanol foi fixada em 5%.

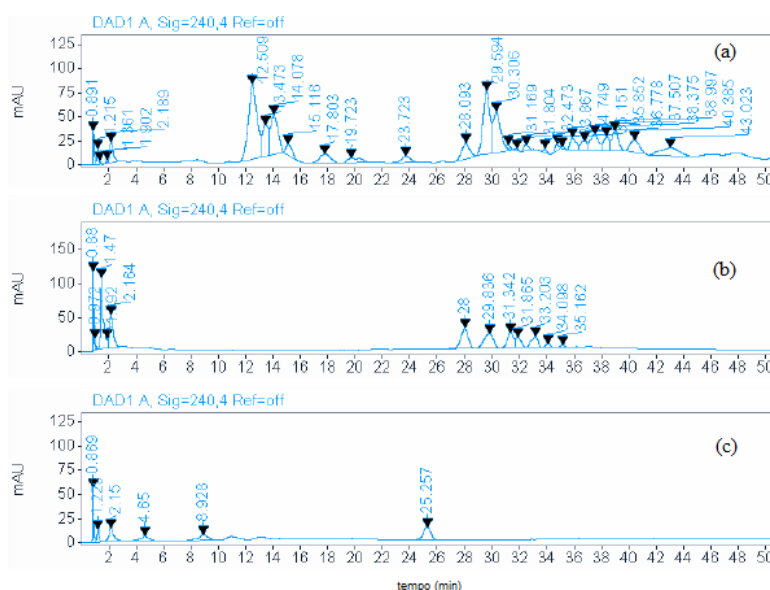
3.3.2 Avaliação das frações obtidas

Foram obtidas 59 frações semipurificadas de HBB, que posteriormente foram reagrupadas por similaridade em CCD, gerando 4 novas frações (Tab. 3).

Tab. 3 Frações obtidas do extrato hexânico

Código	Frações agrupadas	Massa (mg)
HBB 1	1 a 7	324,4
HBB 2	8 a 28	85,4
HBB 3	29 a 46	403,8
HBB 4	47 a 59	789,8
Σ		1603,4

Nas análises de HBB e suas frações semipurificadas por CLAE/DAD, o comprimento de onda no qual os analitos melhor absorveram a radiação ultravioleta foi o de 240nm, por este motivo, os resultados serão apresentados apenas para esta região do espectro. O cromatograma com o *fingerprint* do HBB é mostrado na Figura 3(a), onde é possível observar que se trata de uma amostra complexa e de difícil separação visto que existem muitos picos sobrepostos, sendo, portanto, necessárias etapas de pré-purificação por meio de técnicas cromatográficas para melhorar a eficiência da separação dos componentes do extrato.



(a) Cromatograma da fração HBB. (b) cromatograma da fração HBB2. (c) cromatograma da fração HBB3

Fig. 3 Cromatogramas de HBB em $\lambda = 240\text{nm}$

Dentre as 4 frações semipurificadas resultantes, aquelas que apresentaram melhores perfis de separação foram as HBB2 e HBB3, seus cromatogramas estão apresentados na Fig. 3 (b e c). Nesses cromatogramas, é possível observar que houve uma melhora significativa na separação dos picos quando comparados aos de HBB.

As frações HBB2 e HBB3 foram selecionadas para dar seguimento ao processo de separação por CLAE/DAD preparativa. De HBB2 se obteve uma fração purificada, que em CCD (revelada com vanilina perclórica) apresentou potencial para ser encaminhada para análise em RMN e por EM-ESI. A fração foi nominada como **FP2**, que quando seca apresentou aspecto amorfo e cor branca, com uma massa de 23mg. De HBB3, também foi obtida uma fração purificada (**FP3**), com aspecto amorfo e branca quando seca, de massa igual a 20mg, que foi encaminhada para análise por RMN.

3.3.3 Elucidação estrutural de FP2

As informações obtidas a partir do espectro de RMN de ^1H (Fig. S1, p.90) levaram a observação de quatro singletos integrados para três hidrogênios cada, com deslocamentos entre $\delta_{\text{H}} 0,97 - 1,24$, indicativo de grupos metílicos. O sinal em $\delta_{\text{H}} 5,24$ (1H, *t*, $J = 12$ Hz) é relativo a um hidrogênio olefínico, e em $\delta_{\text{H}} 3,68$ (1H, *dd*, $J = 4/12$ Hz) a um hidrogênio oximetínico, cujos acoplamentos são relativos as posições *axial-axial* e *axial-equatorial*. Tais informações condizem com dados obtidos na literatura para moléculas triterpênicas pentacíclicas do tipo olean-12-eno, com a hidroxila em 3 com orientação β (QUANG et al, 2011; BALDÉ et al, 2021). Além disso, foram observados hidrogênios oximetilênicos em $\delta_{\text{H}} 3,43$ e $\delta_{\text{H}} 4,06$, com correlação no HMQC $^1J_{\text{C,H}}$, com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 65,4$ e em $\delta_{\text{H}} 3,39$ e $\delta_{\text{H}} 3,23$, correlacionados ao sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 68,8$, sugestivo da presença de hidrogênios diastereotópicos na molécula (Fig. S2, p. 91) (WOO et al, 2015).

A partir dos espectros de ^{13}C e DEPT 135 (Fig. S3 - S4, p. 92-93), foram observados 30 sinais de carbono, **04 metílicos** com deslocamentos em $\delta_{\text{C}} 19,6$ (C-24), 17,3 (C25), 28,0 (29), 24,9 (C30); **10 metilênicos** 41,0 (C1), 24,5 (C2), 21,7 (C6), 41,8 (C7), 24,6 (C11), 26,3 (C15), (C16), 44,0 (C19), 32,7 (C21), 32,7 (C22); **03 metínicos** 52,1 (C5), 49,3 (C9); 42,11 (C18); **02 olefínicos** 123,9 (C12), 144,0 (C13); **06 não hidrogenados** 46,9 (C4), 40,4 (C8), 40,5 (C10), 43,2 (C14), 40,3 (C17), 42,14 (C20), **02 oximetilênicos** 65,4(C26), 68,8 (C27); **01 oximetínico** 75,2 (C3) e **02 carbonílicos** 172,8 (C23), 180 (C28); corroborando com a indicação de que se

trata de um triterpeno pentacíclico olean-12-eno. As correlações $^1J_{C,H}$ do espectro HMQC (Fig. S2, p.91) também permitiram a atribuição do sinal de carbono oximetínico em C3, dado a correlação de δ_H 3,68 e o carbono em δ_C 75,2; para atribuição dos carbonos olefínicos em C12 e C13, verifica-se a correlação do δ_H 5,24 e os carbonos em δ_C 123,9 e δ_C 144,0, respectivamente, característicos do anel olen-12-enos.

A análise do espectro de HMBC (Fig. S5, p. 94) revela correlações heteronucleares a longa distância $^nJ_{C,H}$. Os dados permitiram observar o sinal do hidrogênio oximetínico em δ_H 3,68 (H3) acoplado ao sinal de carbono na posição C2 ($^2J_{C,H}$). O posicionamento dos grupos metila na estrutura em C24, C25, C29 e C30 foi possibilitado pela observação do sinal em δ_H 1,03 (H24) acoplado ao sinal de carbono em C23 ($^3J_{C,H}$), permitindo o posicionamento do grupo carbonílico em δ_C 172,8 na posição C23; em δ_H 0,97 (H25) acoplado aos sinais de carbono em C1 ($^3J_{C,H}$), C10 ($^2J_{C,H}$); em δ_H 1,24 (H29) acoplado a C30 ($^3J_{C,H}$) e o hidrogênio δ_H 1,1 (H30) acoplado ao sinal de C19 ($^3J_{C,H}$). Os hidrogênios oximetilênicos diastereotópicos foram posicionados em C26 e C27, dado a observação dos hidrogênios em δ_H 3,40 e δ_H 4,06 (H26) acoplados aos carbonos nas posições C8 ($^2J_{C,H}$) e C14 ($^3J_{C,H}$), e dos hidrogênios em δ_H 3,23 e δ_H 3,42 (H27) acoplados a C8 ($^3J_{C,H}$). A Figura 4 ilustra as correlações observadas no espectro HMBC que permitiram propor a estrutura do triterpeno.

A substância foi identificada como 3 β ,26,27-trihidroiolean-12-en-23,28-dióico e possui uma estrutura similar a aglicona das saponinas (bredeymerosídeo B, C e D) encontrados na espécie *B. floribunda*. As principais diferenças entre elas ocorrem nas posições C3 e C28, onde os substituintes nos bredemeyerosídeos são gliconas e nas posições C2 e C26, onde tem-se uma hidroxila e uma metila, respectivamente (DAROS et. al, 1996; PEREIRA et. al, 1996; RUPPELT et. al, 1996b). O padrão de substituição incomum e a ausência de glicona torna a substância isolada inédita na natureza.

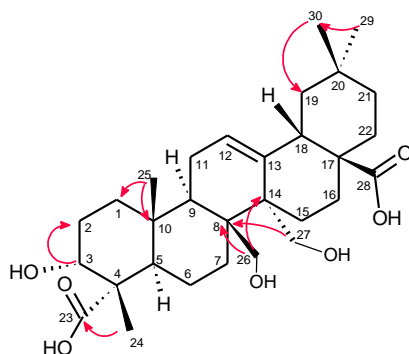


Fig. 4 Correlações observadas no espectro HMBC para o triterpeno 3 β ,26,27-triidroiolean-12-en-23,28-dióico

Os espectros de EM-ESI em modo negativo, obtidos para a substância **FP2** são apresentados na Figura S6 (p. 95).

No espectro (*EM*) correspondente a primeira fragmentação, é possível verificar o sinal do íon principal em m/z 517 ($M-H^+$) e os fragmentos a m/z 503, 489, 474 e 437. No espectro *EM2*, referente ao segundo ciclo de fragmentação do íon molecular obtido no *EM* (m/z 517), se verifica a presença de sinais em m/z 499, 487, 473, 455 e 439 indicativos da perda de molécula de água (m/z 499: $|(M-H)-H_2O|^+$), de CH_2O (m/z 487: $|(M-H)-CH_2O|^+$), de CO_2 (m/z 473: $|(M-H)-CO_2|^+$), perda de H_2O e CO_2 (m/z 455: $|(M-H)-H_2O-CO_2|^+$), de H_2O e de $2CH_2O$ (m/z 439: $|(M-H)-H_2O-2CH_2O|^+$), respetivamente. Na terceira fragmentação do íon molecular (m/z 517), é possível observar no espectro *EM3*, a presença de dois sinais a m/z 457 e 455, os quais podem estar relacionados a saída de quatro grupos metila (m/z 457: $|(M-H)-4CH_3|^+$) e de dois CH_2OH (m/z 455: $|(M-H)-2CH_2OH|^+$) (LOURENÇO et al, 2021; UDDIN et al. 2022).

No terceiro ciclo de fragmentação, para o “íon filho” majoritário em *EM3* (m/z 455), conforme mostrado no segundo espectro *EM3*, é possível observar a presença de sinais em m/z 441, 439, 424, 409 e 391, que podem corresponder a fragmentações referentes a perda respectiva de CH_2 (m/z 441: $|(M-H)-CH_3|^+$), de CH_2 e H_2 (m/z 439: $|(M-H)-CH_2-H_2|^+$), de CH_2OH (m/z 424: $|(M-H)-CH_2OH|^+$), de $HCOOH$ (m/z 409: $|(M-H)-HCOOH|^+$), e de H_2O e $HCOOH$ (m/z 391: $|(M-H)-H_2O-HCOOH|^+$). Em *EM3* é verificada ainda a presença de sinais em m/z 264 e 256, cujo padrão possivelmente corresponde à fragmentação retro Diels-Alder (FrRDA) do anel C observada para triterpenoides pentacíclicos do tipo 12-oleanenos, além dos sinais em m/z 219, 205 e 135, que podem se referir à decomposição de m/z 264, com uma perda de $COOH$ (m/z : 219: $|(M-H)-COOH|^+$), seguido da saída de CH_2 (m/z : 205: $|(M-H)-CH_2|^+$) ou de $C_5H_{10}O$ (m/z : 135: $|(M-H)-C_5H_8O|^+$) (LOURENÇO et al, 2021; UDDIN et al. 2022).

Desta forma, as fragmentações observadas corroboraram com a proposta estrutural da 3 β ,26,27-triidroiolean-12-en-23,28-dióico, seu possível padrão de fragmentação é descrito na Figura S7 (p. 96).

3.3.4 Identificação das substâncias presentes em FP3

A identificação das substâncias presentes em **FP3** foi feita a partir dos dados obtidos dos espectros de RMN de 1H , ^{13}C , DEPT 135, HMQC e HMBC (Figuras S8 -S12, p. 97-101), e comparação com dados espectroscópicos da literatura. As informações obtidas a partir do espectro de RMN de 1H levaram a observação de sete singletos indicativos da presença de

grupos metila, cujos deslocamentos ficaram entre δ_H 0,98 – 1,26. A identificação de um hidrogênio oximetínico em δ 3,45 (*d*, *J* = 11 Hz, 1H) indica a presença de uma hidroxila na posição H-3, enquanto o singlete largo em δ 5,29 (1H) é característico de um hidrogênio olefínico em H-12. A partir dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 foi possível identificar a presença de 30 sinais de carbono, consistindo em **07 metílicos** em: δ_C 28,4 (C-23), 19,9 (C-24), 17,4 (C-25), 24,4 (C-26), 24,8 (C-27), 26,2 (C-29) e 26,2 (C-30); **10 metilênicos**: 41,0 (C-1), 26,7 (C-2), 22,1 (C-6), 31,7 (C-7), 24,6 (C-11), 33,07 (C-15), 25,0 (C-16), 43,1 (C-19), 40,6 (C-21), 33,11 (C-22); **04 metínicos**: 75,7 (C-3), 52,7 (C-5), 50,0 (C-9), 40,5 (C-18); **02 olefínicos**: 124,7 (C-12), 144,0 (C-13); e **07 não hidrogenados**: 41,1 (C-4), 42,6 (C-8), 38,2 (C-10), 40,9 (C-14), 47,5 (C-17), 36,5 (C-20), e o último em 181,9 (C-28) pertencente a um grupo carboxila, indicando que a substância isolada é um ácido triterpênico pentacíclico do tipo olean-12-eno (MAHATO; KUNDU, 1994). Os dados de HMQC confirmam a atribuição do carbono oximetínico em δ_C 75,7 (δ_H 3,45) à posição C3, bem como δ_C 124,7 (δ_H 5,29) e δ_C 144,0, aos carbonos olefínicos em C12 e C13, respectivamente. Pelo HMBC foi possível confirmar o acoplamento heteronuclear a longa distância entre o hidrogênio do carbono olefínico δ_H 5,29 (H12) e o C18, o acoplamento entre os hidrogênios H11 (δ_H 1,87) e os carbonos C12 ($^2J_{C,H}$) e C13 ($^3J_{C,H}$), entre o H18 e os carbonos C14 ($^3J_{C,H}$), C16 ($^3J_{C,H}$) e C19 ($^2J_{C,H}$), além do acoplamento entre o hidrogênio oximetímico δ_H 3,45 (H3) e os carbonos nas posições C1 ($^3J_{C,H}$) e C4 ($^2J_{C,H}$). Com base nesses dados, a estrutura da substância presente em **FP3** foi elucidada, e trata-se do triterpeno conhecido como ácido oleanólico (A.O) (MAHATO; KUNDU, 1994; NGO *et al.*, 2018; BANARASE; KAUR, 2021).

É muito comum que frações obtidas de extratos de plantas não estejam completamente puras, e os espectros de RMN obtidos a partir delas acabem retratando sinais de misturas de substâncias. É o caso observado nos espectros de RMN obtidos para **FP3**, que trazem outras informações além das obtidas para o A.O. Como se sabe, o A.O possui um isômero conhecido como ácido ursólico (A.U), cuja diferença na estrutura dá-se apenas pela mudança do grupo metila da posição C29 que no A.O encontra-se ligado ao C20, enquanto no A.U está ligado ao C19 do anel E. Essa característica faz com que as duas substâncias possam ser identificadas no mesmo conjunto de espectros. Desta forma, a partir dos espectros de RMN (Figuras S8 -S12, p. 97-101) foi possível elencar valores de acoplamentos distintos que contribuíram para a diferenciação das duas substâncias presentes na amostra (Tab. 4).

Tab. 4 Deslocamentos RMN de ^1H e de ^{13}C (δ , ppm), e acoplamentos de longa distância (HMBC) que permitiram a diferenciação do ácido oleanólico e ursólico na amostra **FP3**.

	Substância 1 (A.O)			Substância 2 (A.U)		
	δ_{C}	δ_{H}	HMBC	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
C						
11	24,6	1,87	C12, C13	24,6	1,87	C12, C13
12	124,7	5,29	C18	124,1	5,24	C18
18	40,5	2,73	C14, C16, C19	42,6	2,07	C12, C13, C14 e C16
28	181,9			175,2		

Na Tabela 4, se observa a presença de dois tripletos pertencentes a hidrogênios olefínicos (H12) distintos, onde o primeiro tem uma altura que corresponde a 38,4% da observada para o segundo. De acordo com os dados de HMQC, o segundo tripleto (δ_{H} 5,29 ppm) está relacionado ao C12 do A.O, enquanto o primeiro (δ_{H} 5,24 ppm) correlaciona com um C12 (δ_{C} 124,1 ppm) de outra substância. Como os dois sinais são bem diferenciados, não se sobrepõem e apresentam uma diferença considerável de deslocamento (0,05ppm), de acordo com a literatura, a substância desconhecida pode ser identificada como A.U (PALU *et al.*, 2019). Ainda corrobora com a identificação, o registro de um hidrogênio H18 (δ_{H} 2,07 ppm) correlacionado via HMQC a um carbono atribuído à posição C18 (δ_{C} 42,6 ppm), o mesmo H18 também está acoplado via HMBC com os carbonos C12 ($^3J_{\text{C,H}}$), C13 ($^2J_{\text{C,H}}$), C14 ($^3J_{\text{C,H}}$) e C16 ($^3J_{\text{C,H}}$), diferentemente do observado para o A.O. Outras correlações HMBC da segunda substância ocorrem entre o hidrogênio H12 e o C18 ($^3J_{\text{C,H}}$), entre os hidrogênio H11 com o C12 ($^1J_{\text{C,H}}$) e C13 ($^2J_{\text{C,H}}$), o último em comum para as duas substâncias (δ_{C} 144,0). Por fim, para o C28 é observado um outro sinal carboxila a 175,2 ppm. Essas informações confirmam que a segunda substância presente na amostra é o ácido ursólico (KONTOGIANNI *et al.*, 2009; PALU *et al.*, 2019). A Figura 5 ilustra as correlações observadas no espectro HMBC que permitiram propor as estruturas do A.O e A.U.

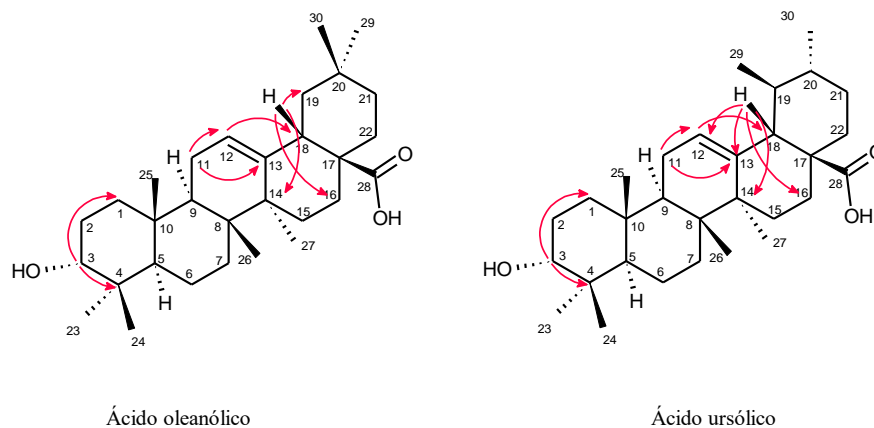


Fig. 5 Correlações observadas no espectro HMBC para os ácidos oleanólico e ursólico.

3.3.5 Teste de genotoxicidade *in vitro*

As células foram examinadas microscopicamente em busca de cromátides quebradas ou pontes anáfases, formação de micronúcleo ou mitose atípica, e outras alterações cromossômicas que poderiam ocorrer durante o processo de divisão celular, que seriam indicativas de genotoxicidade do material testado (RANK, 2003).

As fotos da análise microscópica do meristema radicular de *A. cepa* exposto ao controle negativo e ao controle positivo, são apresentadas na Figura 6. Para o controle negativo com água destilada, Fig.6(a), não foi observada nenhuma alteração na amostra, por outro lado, para o controle positivo com DMSO, Fig. 6(b), observou-se a presença de células com bi nucleação conforme destacado pelas setas.

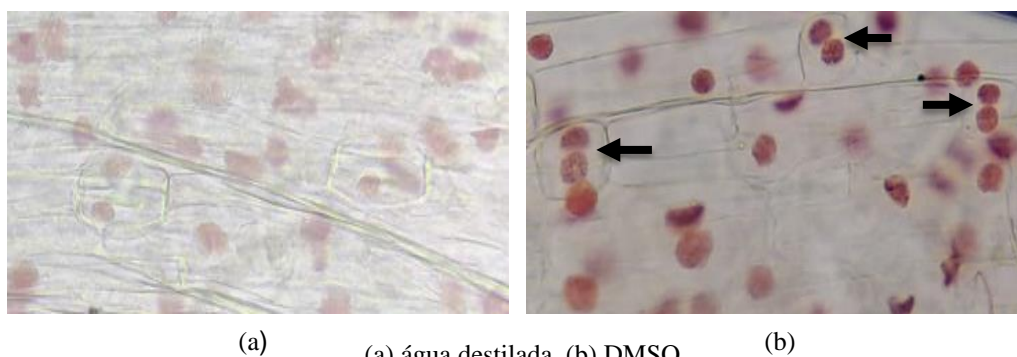
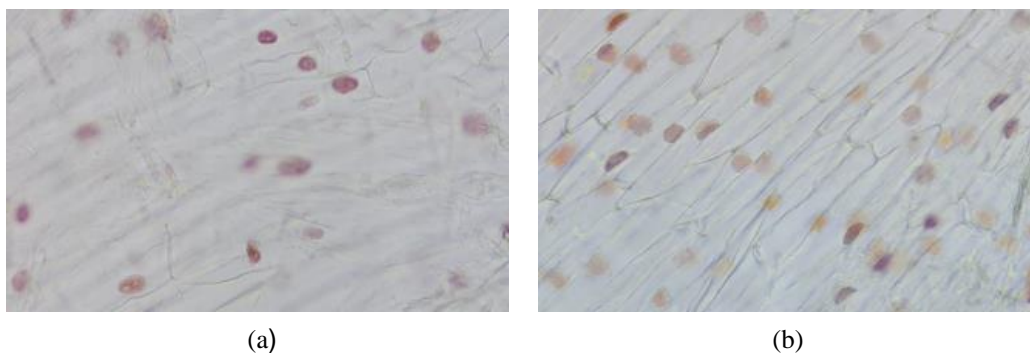


Fig. 6 Fotografia microscópica de fragmentos de meristemas de *A. cepa*.

As imagens microscópicas obtidas para os materiais vegetais expostos aos extratos de maior concentração (400 mg. mL^{-1}), são apresentadas na Figura 7. A avaliação das lâminas contendo os meristemas que foram mantidos em contato com o extrato BBB, e a fração HBB,

indicam que para todas as concentrações trabalhadas, os núcleos são uniformes, sem nenhuma nucleação, mitose atípica ou formação de fibras de fuso, ou seja, o material apresentou padrão nuclear típico.



(a)BBB; (b) HBB

Fig. 7 Fotografia microscópica de fragmentos de meristemas de *A. cepa*.

3.4 Conclusões

A partir do planejamento experimental utilizando a metodologia de superfícies de resposta, foi possível obter uma fase móvel otimizada com as proporções ideais entre seus componentes, viabilizando o processo de fracionamento cromatográfico da fração hexânica de *B. brevifolia*. As proporções ótimas da FM obtidas para o fracionamento foram: 21% de clorofórmio, 64,5% hexano, 9,5% acetona e 5% metanol, respectivamente.

Partindo de uma fração (HBB) que precisava passar por várias etapas de pré-purificação, visto que apresentava um *fingerprint* em CLAE/DAD com muitos picos sobrepostos, a execução de apenas uma corrida em CC, com eluição isocrática usando a fase móvel otimizada, possibilitou a obtenção de frações semipurificadas viáveis para o processo de separação por CLAE semipreparativo. Desta forma, o uso da MSR se mostra viável para a definição da composição das fases móveis a serem utilizadas nos procedimentos de separação cromatográfica utilizados na área da Fitoquímica, reduzindo o tempo, a quantidade de solventes e o número de etapas utilizadas no processo de isolamento de substâncias.

Por meio da estratégia adotada, pela primeira vez foi possível separar e identificar triperpenos de *B. brevifolia*. Ao todo foram três substâncias, a primeira delas inédita na natureza, o ácido 3 β ,26,27-triidroiolean-12-en-23,28-dióico que teve sua estrutura elucidada com o auxílio de dados de RMN e de EM, além dos já conhecidos ácido oleanólico e ácido ursólico.

No ensaio de genotoxicidade *in vitro*, não foram observadas anormalidades durante o processo de divisão celular, indicando que o extrato hidrometanólico (BBB) e a fração hexânica

(HBB) não apresentam genotoxicidade frente a espécie *A. cepa*, o que é muito relevante, visto que a espécie estudada é utilizada para fins terapêuticos na medicina popular, e até então não havia nenhum registro na literatura a respeito da sua toxicidade.

Referências

- BALDÉ, M. A. et al. Antiplasmodial Oleanane Triterpenoids from *Terminalia albida* Root Bark. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 3, p. 666–675, 2021. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01119>
- BANARASE, N. B.; CHANCHAL, D. K. Economically viable isolation and characterization of oleanolic acid from *Eugenia caryophyllus* (Spreng.). **Kuwait Journal of Science**, v. 48, n. 1, p. 78-86, 2021. <https://doi.org/10.48129/kjs.v48i1.8620>
- BEZERRA, M. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v.76, n. 05, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- DAROS, M. R.; MATOS, F. J. A.; PARENTE, J. P. A.; New Triterpenoid Saponin, Bredemeyeroside B, from the Roots of *Bredemeyera floribunda*. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 523-527, 1996. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957962>
- FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179-186, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- HANRAHAN, G.; LU, K. Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, n. 3-4, p. 141-151, 2006. <https://doi.org/10.1080/10408340600969478>
- KONTOGIANNI, V. G. et al. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy - Comparison with HPLC methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 2, p. 188-195, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.021>
- LIMA, I.G. et al. Flora of Ceará, Brazil: Polygalaceae. **Rodriguesia**, v. 69, n 2, p. 673-692, 2018. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869229>
- LOURENÇO, A.; MARQUES, A. V.; GOMINHO, J. The Identification of New Triterpenoids in *Eucalyptus globulus* Wood. **Molecules**, v. 26, n. 12, 3495, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26123495>
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89569-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89569-2)

- NGO, Q-M. T. Cytotoxic Triterpenoids from the Fruits of *Ligustrum japonicum*. **Natural Product Sciences**, v. 24, n. 2, p. 93 – 98, 2018. <https://doi.org/10.20307/nps.2018.24.2.93>
- NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Respostas - Parte II: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170070>
- NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Respostas - Parte II: Variáveis de Mistura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 393-420, 2018. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180030>
- NYIREDY, S. Planar Chromatographic Method Development Using the PRISMA Optimization System and Flow Charts. **Journal of Chromatographic Science**, v. 40, n. 10, p. 553–563, 2002. <https://doi.org/10.1093/chromsci/40.10.553>
- OLIVEIRA, M. C. F. de; SILVEIRA, E. R. Pentaoxygenated xanthenes and fatty acids from *Bredemeyera brevifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 847-851, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00286-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00286-7)
- ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 290-307, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.014>
- PALU, D. et al. Identification and Quantitation of Ursolic and Oleanolic Acids in *Ilex aquifolium* L. Leaf Extracts Using ¹³C and ¹H-NMR Spectroscopy. **Molecules**, v. 24, n. 23, 4413. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24234413>
- PEREIRA, B. M. R. et al. Bredemeyeroside D, a Novel Triterpenoid Saponin from *Bredemeyera floribunda*: A Potent Snake Venom Antidote Activity on Mice. **Phytotherapy Research**, v.10, n. 8, p.666-669, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199612\)10:8<666::AID-PTR937>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199612)10:8<666::AID-PTR937>3.0.CO;2-H)
- QUANG, T. H. et al. Anti-inflammatory Triterpenoid Saponins from the Stem Bark of *Kalopanax pictus*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 9, p. 1908–1915, 2011. <https://doi.org/10.1021/np200382s>
- RUPPELT, B. M. et al. Bredemeyeroside C, a new saponin from *Bredemeyera floribunda*. **Fitoterapia**, v. 67, n. 4, p. 323-328, 1996.
- SILVA, V. M.; MATTOS, V. L. D. O método dos mínimos quadrados no ajuste de um modelo polinomial. **Scientia Plena**, v 13, n. 4, 2017. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2017.049910>
- UDDIN, J. et al. Structure–fragmentation study of pentacyclic triterpenoids using electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (ESI-QTOFMS/MS). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 36, n. 4, e9243, 2022. <https://doi.org/10.1002/rcm.9243>

Material suplementar

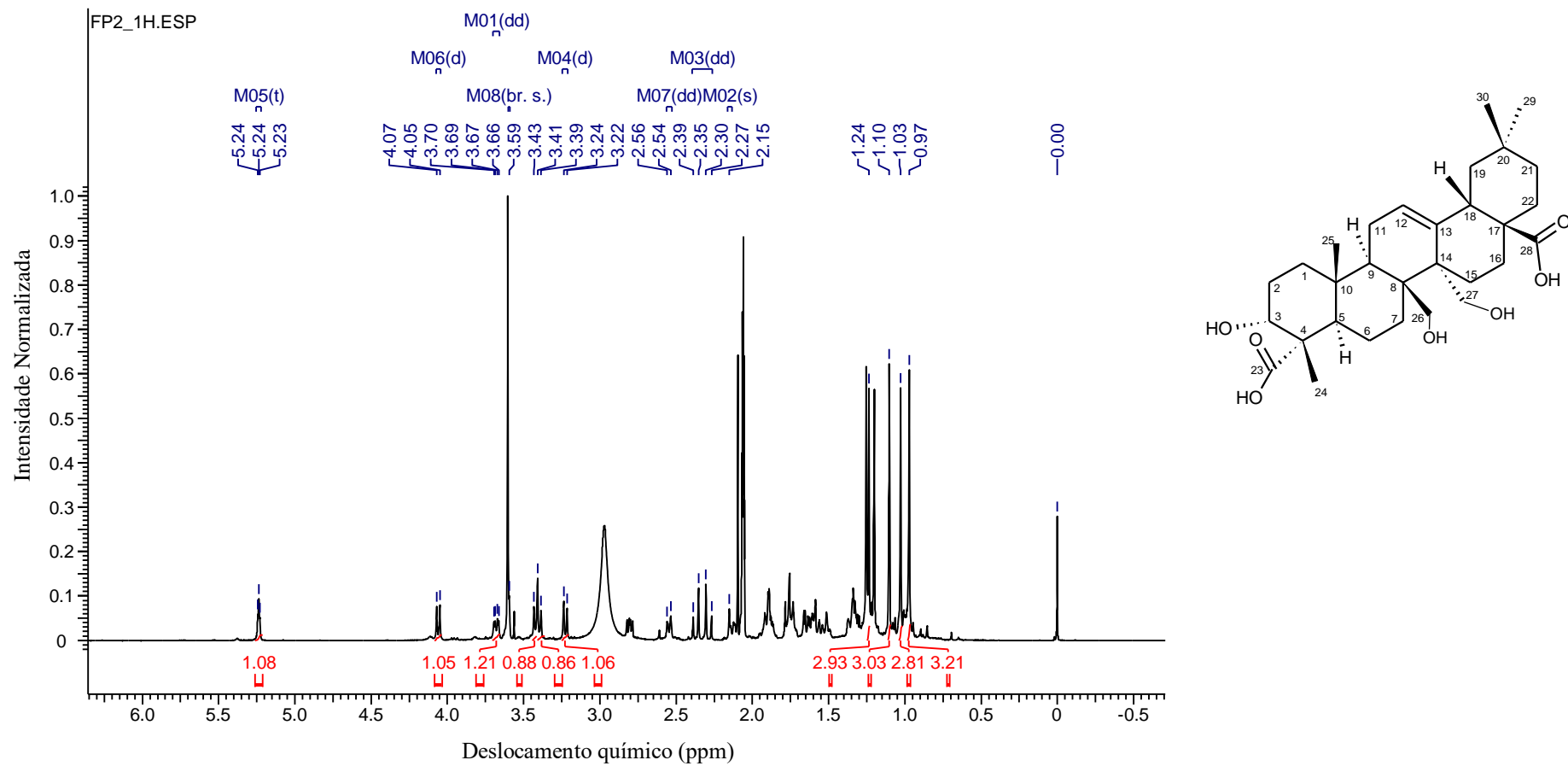


Fig. S1 Espectro RMN ^1H de **FP2**, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 500 MHz, δ (ppm)

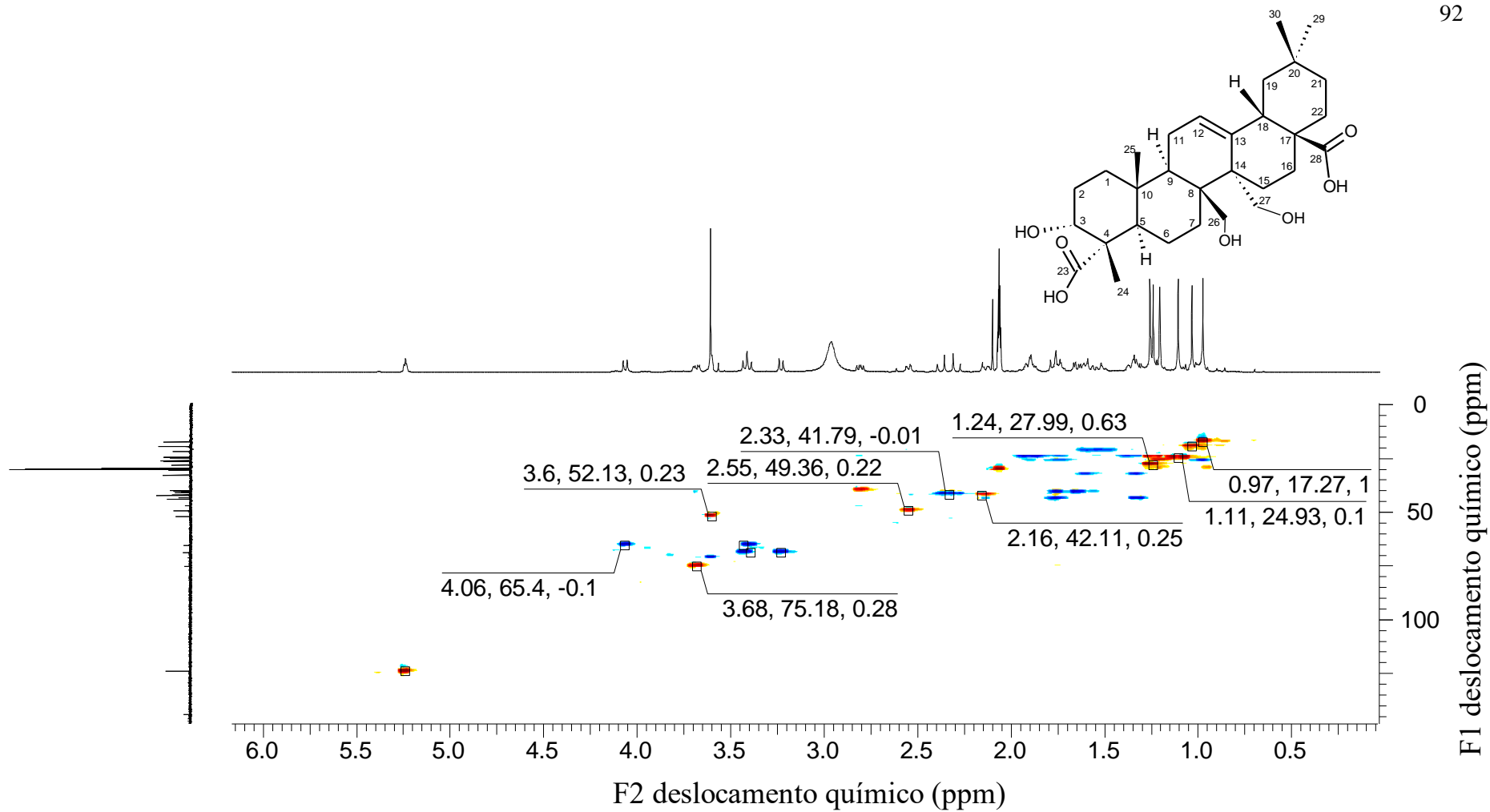


Fig. S2 Espectro HMQC de **FP2**, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 500/125 MHz, δ (ppm)

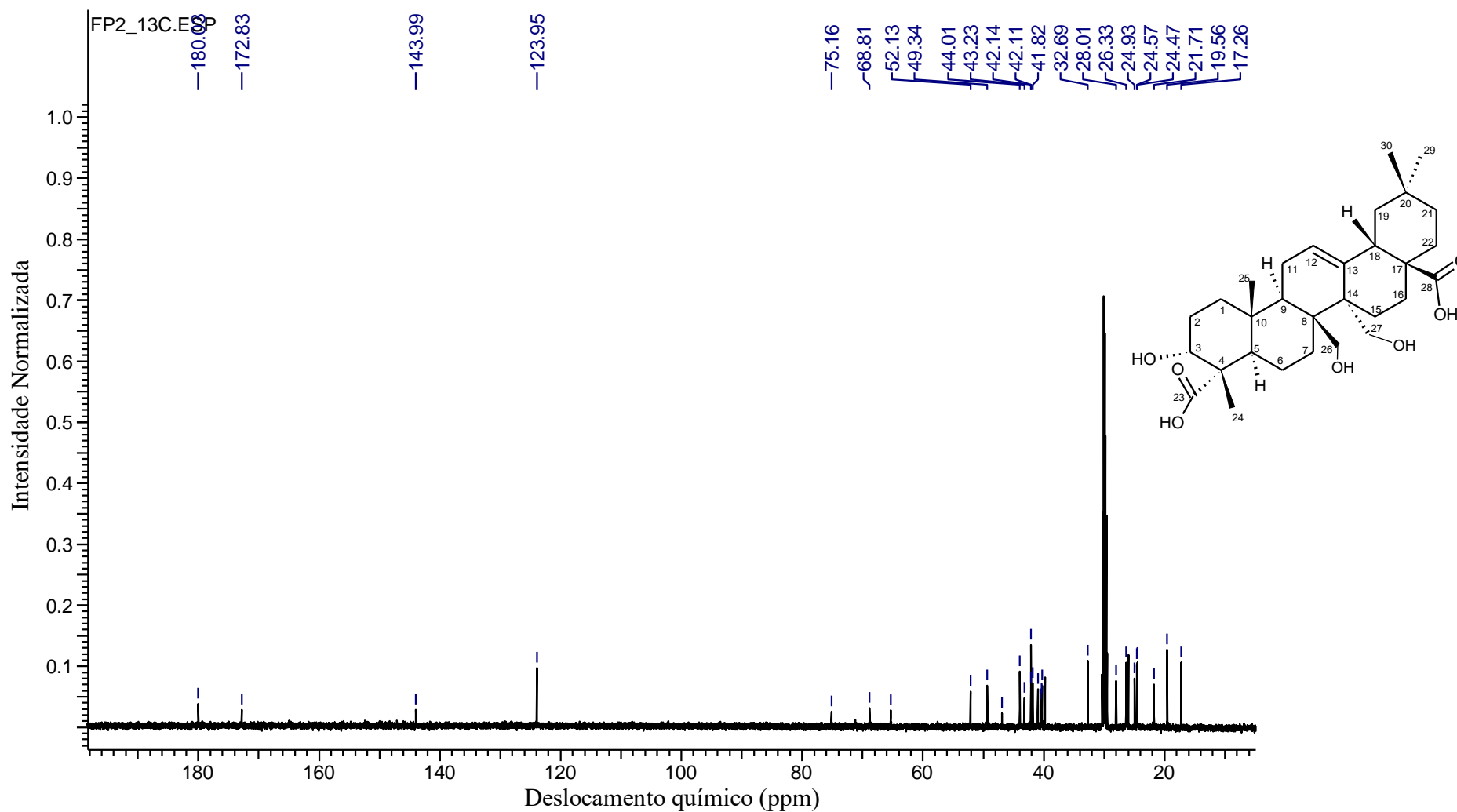


Fig. S3 Espectro RMN ^{13}C de **FP2**, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 125 MHz, δ (ppm)

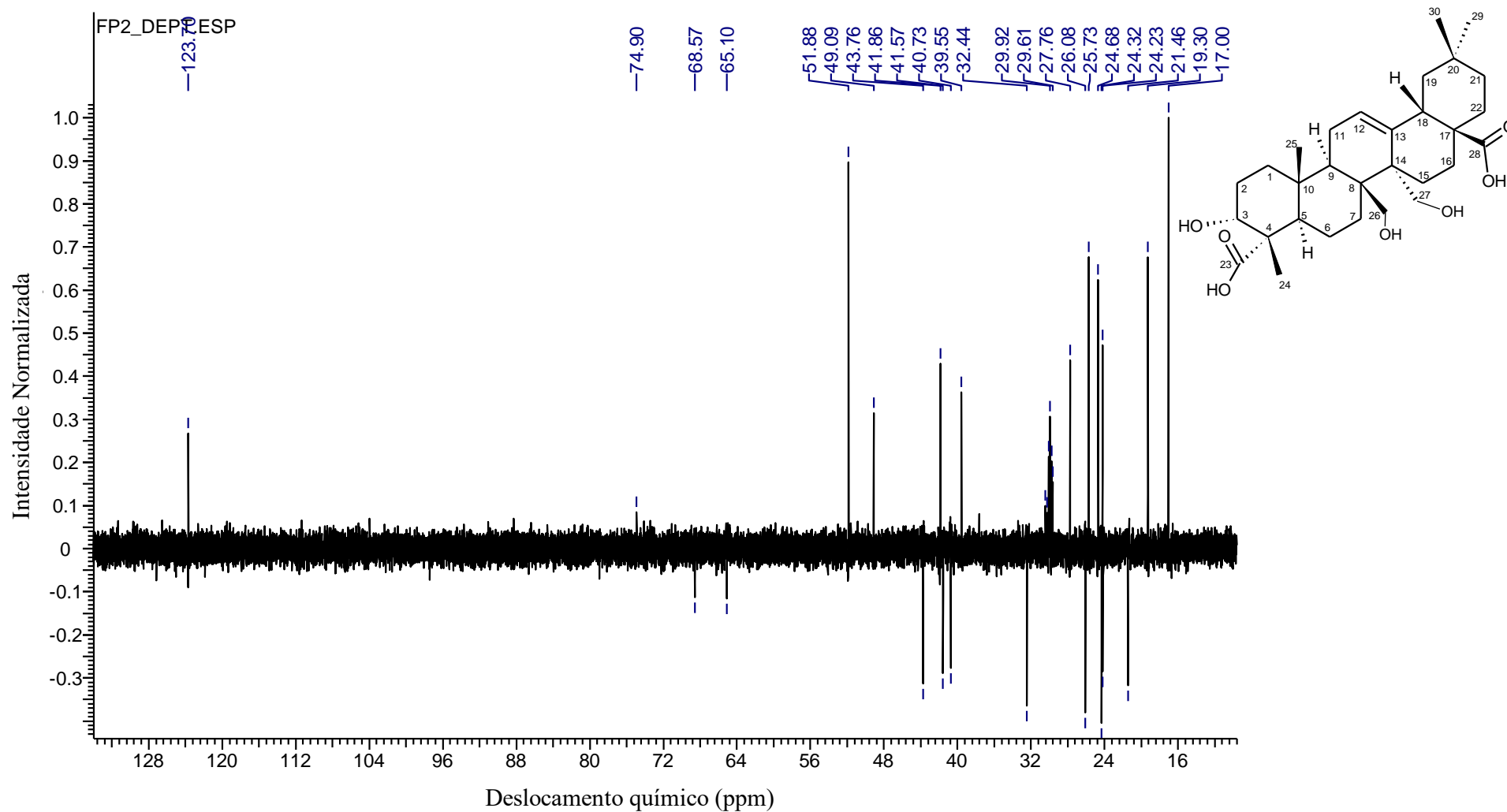


Fig. S4 Espectro DEPT 135 de **FP2**, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 125 MHz, δ (ppm)

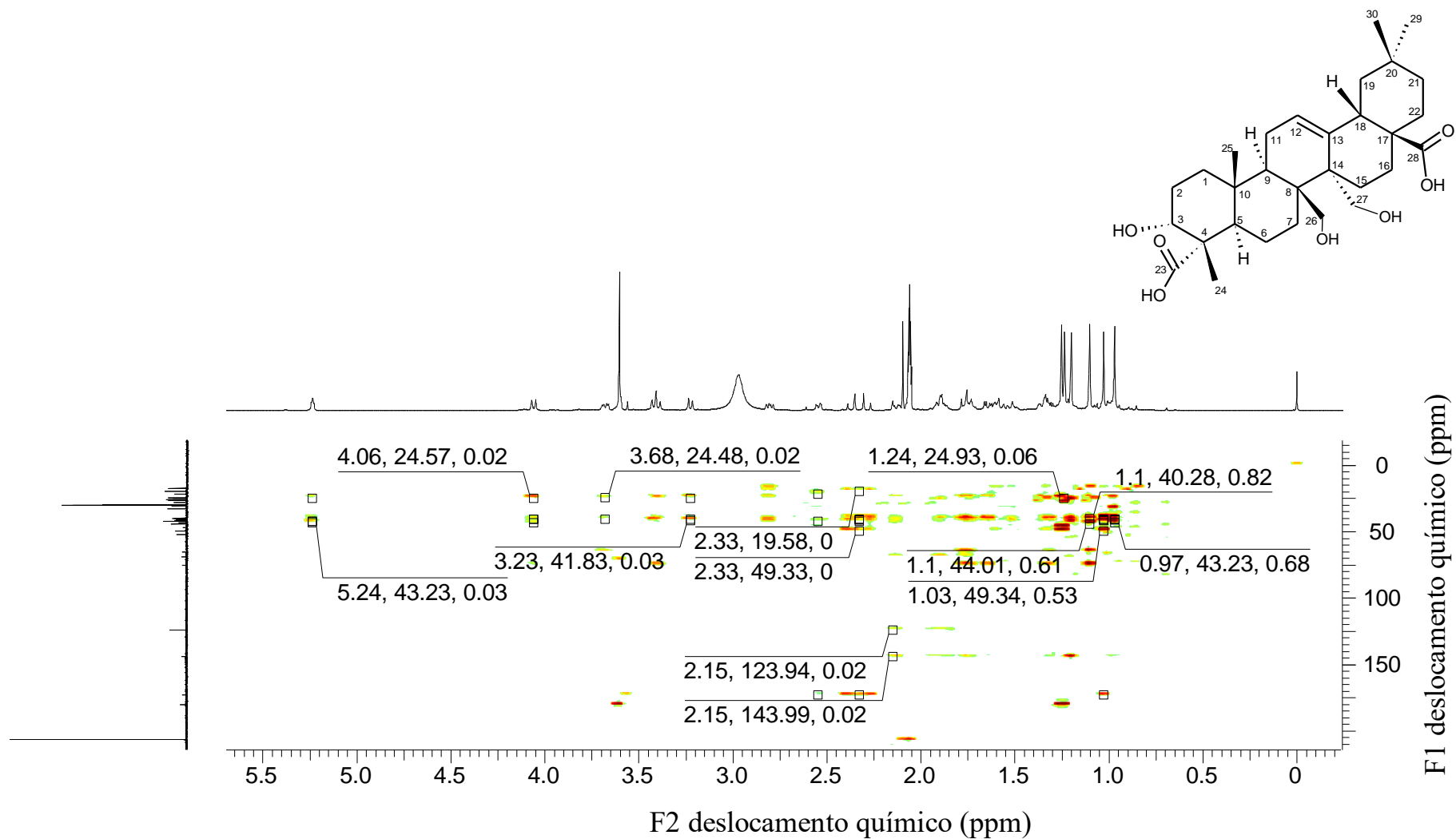


Fig. S5 Espectro HMBC de **FP2**, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, a 500/125 MHz, δ (ppm)

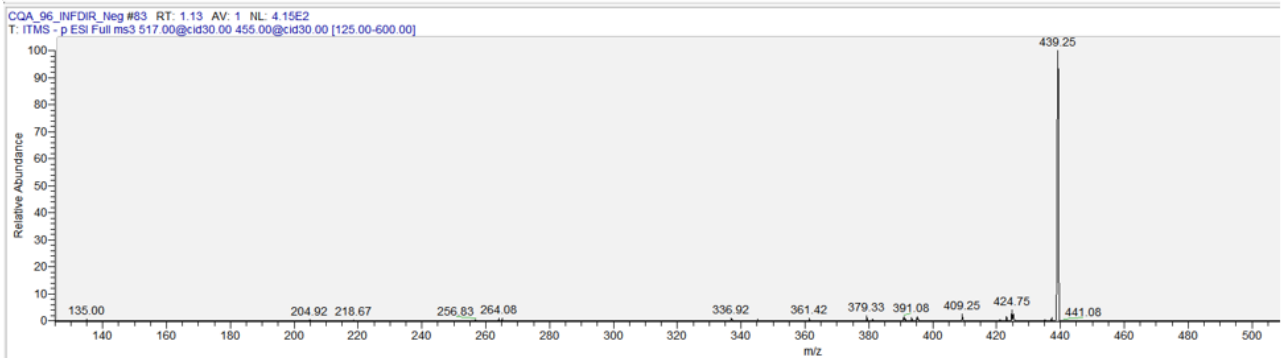
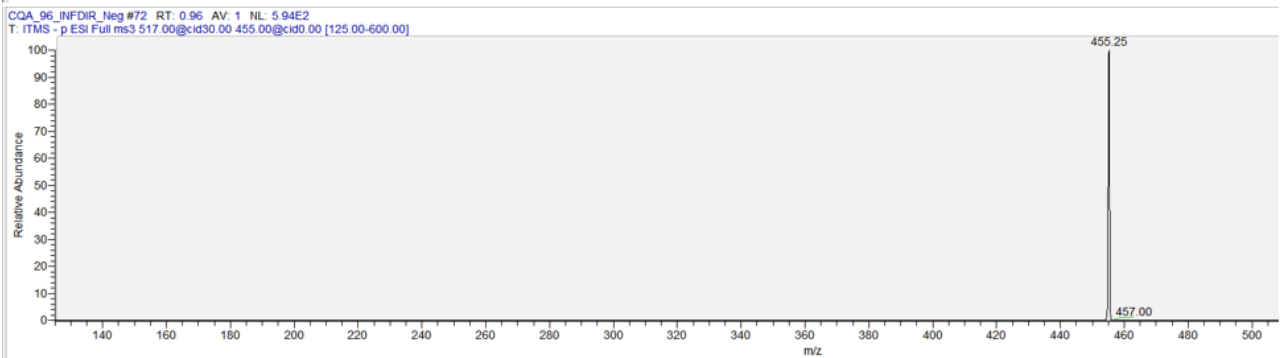
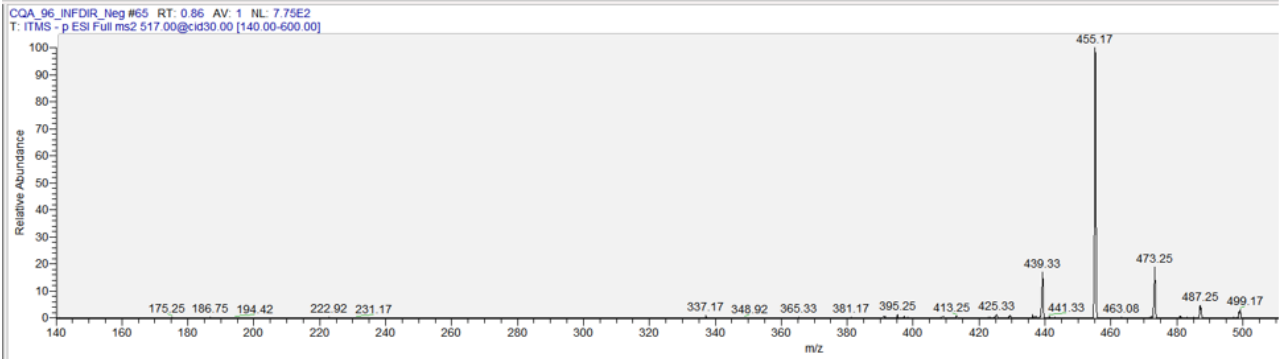
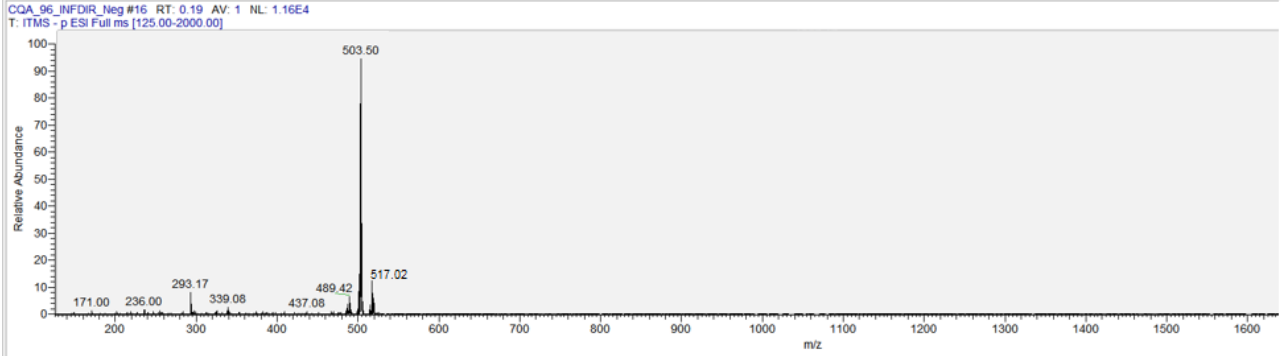
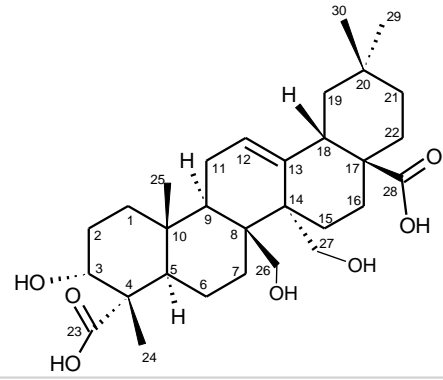


Fig. S6 Espectros de EM-ESI em modo negativo, obtidos para a **FP2**

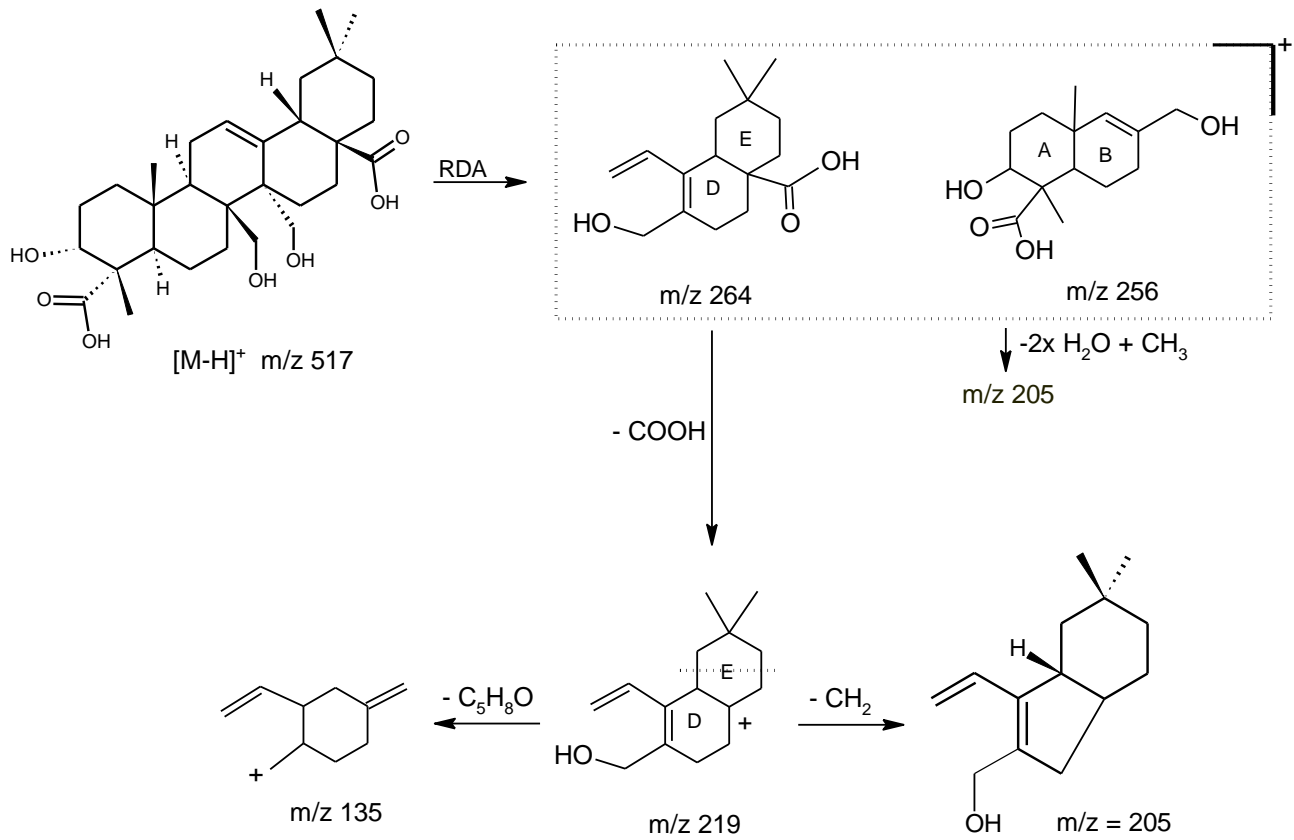


Fig. S7 Padrão de fragmentação proposto para o 3 β ,26,27-triidroiolean-12-en-23,28-dióico, a partir dos dados de EM-ESI em modo negativo

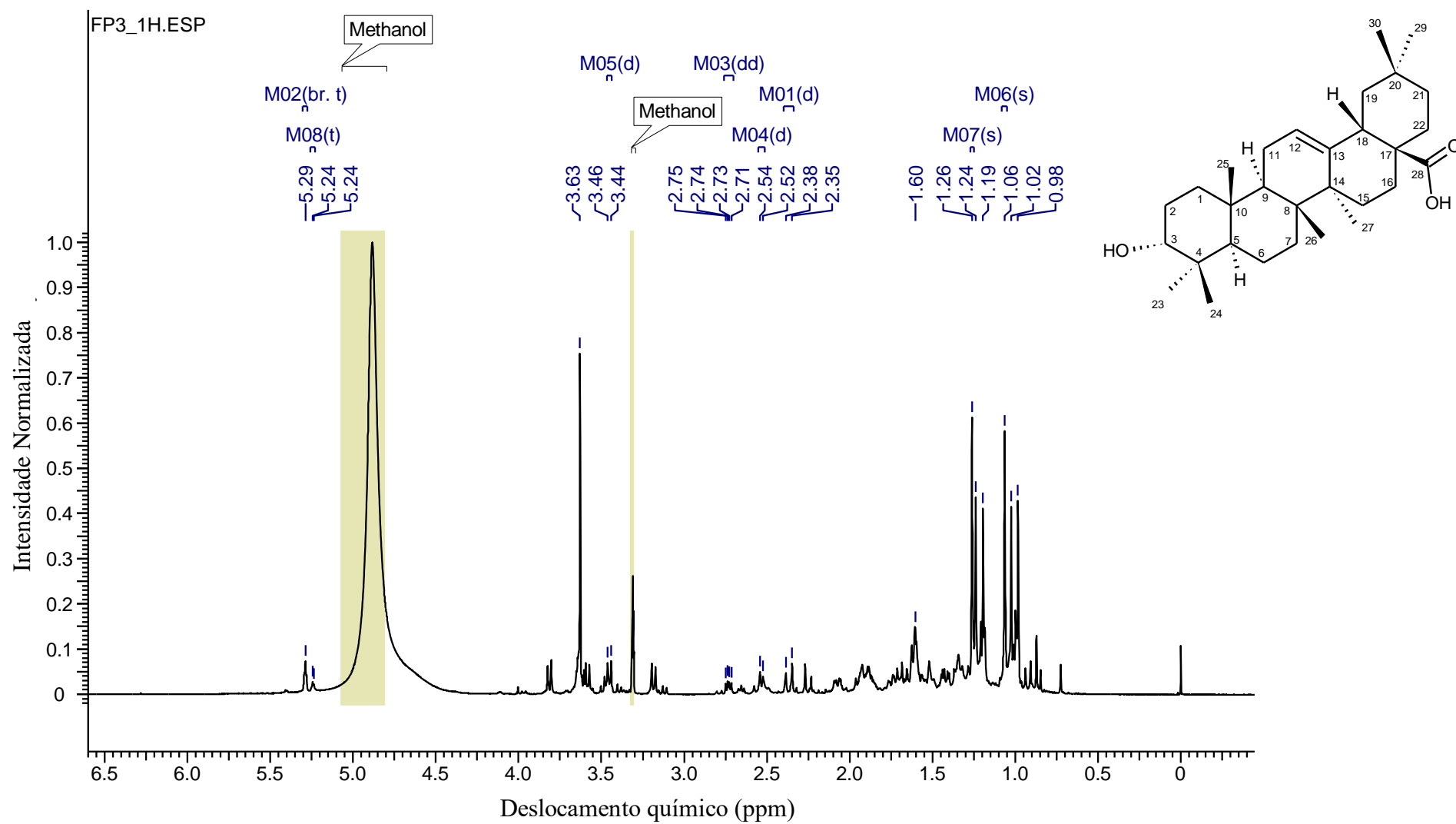


Fig. S8 Espectro RMN ^1H de FP3, $(\text{CD}_3)\text{OD}$, a 500 MHz, δ (ppm)

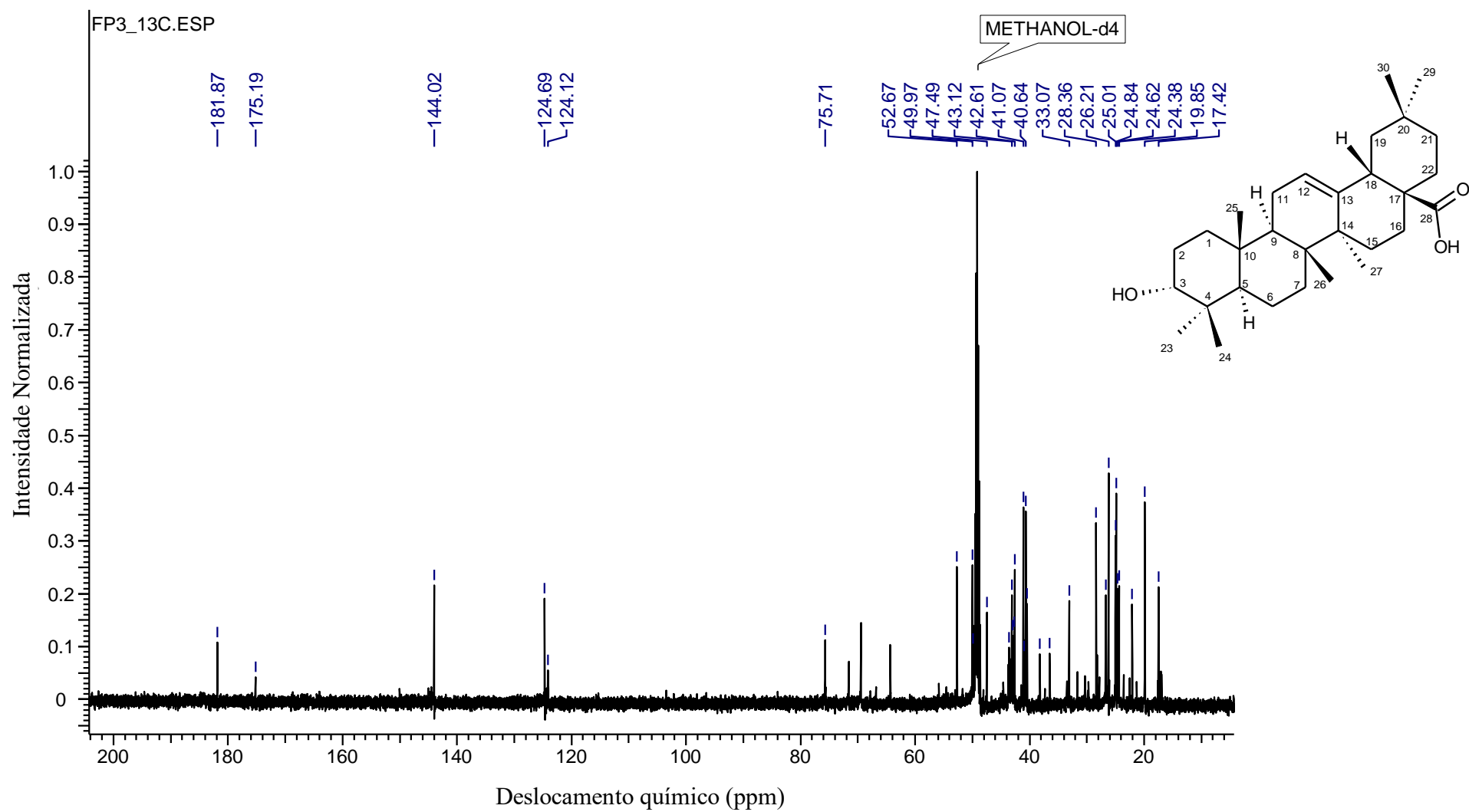


Fig. S9 Espectro RMN ^{13}C de FP3, (CD_3OD) , a 125 MHz, δ (ppm)

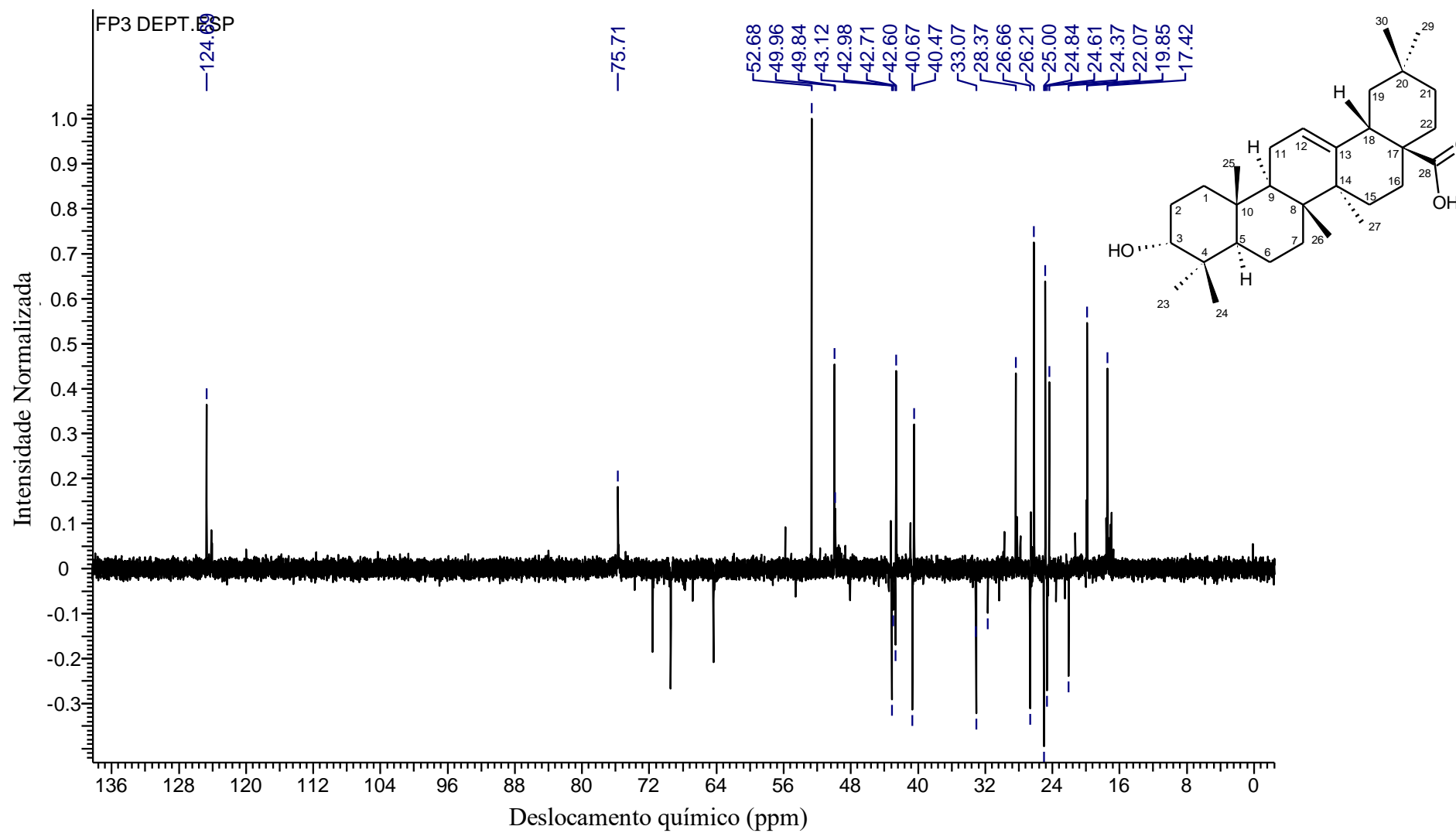


Fig. S10 Espectro RMN DEPT 135 de **FP3**, (CD₃)OD, a 125 MHz, δ (ppm)

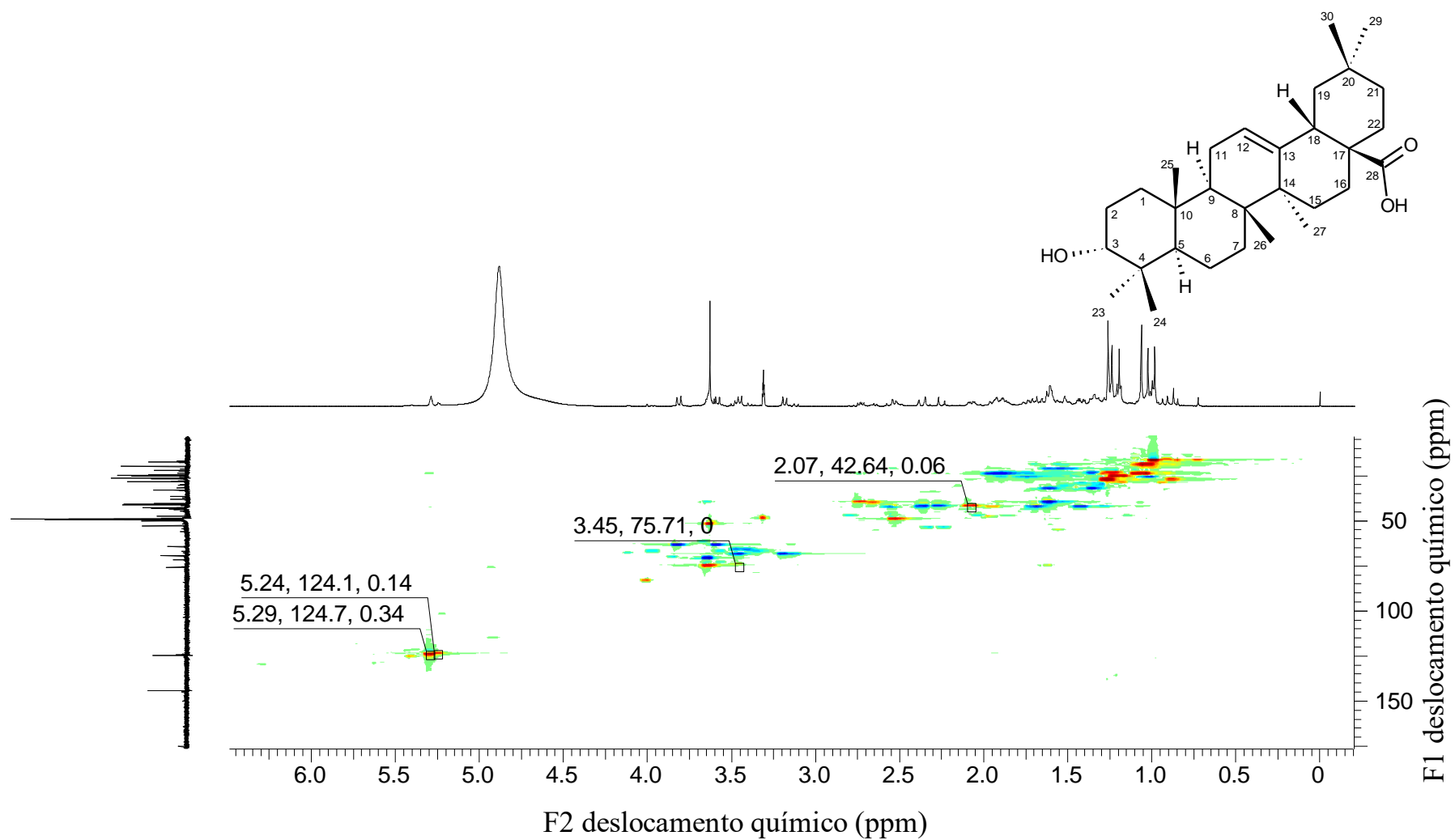


Fig. S11 Espectro RMN HMQC de **FP3**, (CD₃)OD, a 500/125 MHz, δ (ppm)

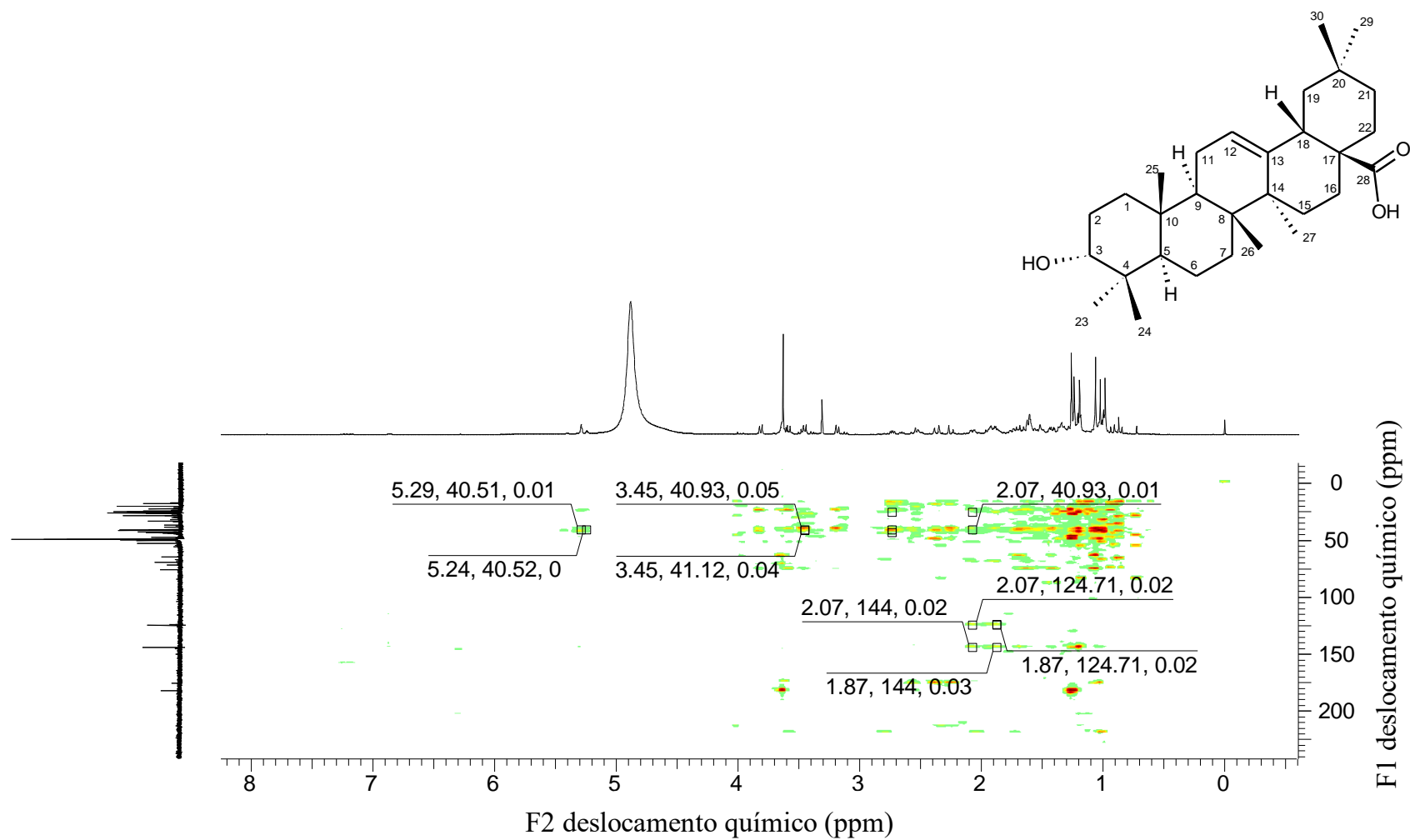


Fig. S12 Espectro RMN HMBC de **FP3**, (CD₃)OD, a 500/125 MHz, δ (ppm)

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho se estabelece como uma fonte importante de informações sobre *Bredemeyera* Willd., trazendo pela primeira vez uma revisão integrativa sobre o tema, agrupando todas as informações disponíveis na literatura sobre o gênero, proporcionando uma melhor compreensão sobre sua composição fitoquímica, potenciais etnobotânicos e farmacológicos. A partir do trabalho de revisão realizado, é possível afirmar que ainda há um campo promissor para pesquisas visando os atributos medicamentosos de *Bredemeyera* Willd.

O estudo fitoquímico de *B. brevifolia* revelou a existência de uma xantona e ácidos graxos ainda não relatados para a espécie. Os resultados dos testes antifúngicos *in vitro* e *in silico*, revelaram que tanto o extrato hidrometanólico, quanto as substâncias isoladas apresentam potencial para o desenvolvimento de fitofármacos e análogos semissintéticos com ação antifúngica.

Este trabalho também trouxe uma estratégia pouco explorada dentro da área de produtos naturais, o uso de ferramentas quimiométricas para o planejamento experimental do fracionamento de extratos e frações orgânicas. Desta forma, por meio da aplicação da metodologia de superfície de respostas, se obteve uma fase móvel otimizada para a fração hexânica, onde foi possível reduzir o número de etapas do processo de fracionamento, diminuindo o tempo e uso de solventes, conseqüentemente otimizando o processo. Possibilitando o isolamento de três triterpenos, sendo um deles inédito.

Em um segundo ensaio *in vitro*, foi demonstrado que tanto o extrato hidrometanólico quanto a fração hexânica das folhas de *B. brevifolia* não apresentaram genotoxicidade no teste com *A. cepa*, esta informação é muito relevante, visto que a espécie é utilizada popularmente para fins terapêuticos e até então não havia nenhum registro na literatura sobre a sua toxicidade.

Portanto, pode-se afirmar que as informações obtidas no presente estudo se somam a de outros já existentes, contribuindo desta forma para o conhecimento e caracterização química desta importante espécie de nossa flora, com ocorrência nas regiões da caatinga, cerrado e mata atlântica. Por fim, vale ressaltar a importância do fomento e fortalecimento da pesquisa com os recursos genéticos vegetais para fins terapêuticos no Brasil, visto que dispomos da maior biodiversidade do planeta e muitas de nossas espécies ainda não foram estudadas, ou seja, temos uma infinidade de metabólitos secundários que podem apresentar potencial terapêutico que ainda precisam ser explorados.