



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM  
BIOTECNOLOGIA**

**ANDREI DA SILVA ALEXANDRE**

**TRITERPENOS, ESTEROIDES E FENÓLICOS ISOLADOS DOS EXTRATOS DE  
*Minquartia guianensis* Aubl. (COULACEAE) E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

**MANAUS – AM**

**2023**

**ANDREI DA SILVA ALEXANDRE**

**TRITERPENOS, ESTEROIDES E FENÓLICOS ISOLADOS DOS EXTRATOS DE  
*Minquartia guianensis* Aubl. (COULACEAE) E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biotecnologia

**Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez**

**MANAUS – AM**

**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A381t Alexandre, Andrei da Silva  
Triterpenos, esteroides e fenólicos isolados dos extratos de  
Minuartia guianensis Aubl. (Coulacea) e atividade antibacteriana /  
Andrei da Silva Alexandre . 2023  
109 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do  
Amazonas.

1. Rmn. 2. -amirina. 3. -amirin-3-ona. 4. Galato de metila. 5. Ácido  
hipoprotocetrário. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de trilhar os caminhos da vida sempre com um propósito e uma visão. Tudo é Dele e para Ele.

À minha família, em especial aos meus pais Julia Castro e Josimar Alexandre, por toda dedicação, amor, compreensão, incentivo e apoio, não só nesta fase, mas durante toda a minha vida. E por estarem sempre comigo, me alegrando e transmitindo confiança, mesmo que estejamos em cidades diferentes.

À minha irmã Joice Alexandre por ter estado comigo desde que nos mudamos para Manaus, e por sempre ter me ajudado durante esse tempo.

À minha orientadora, Dra. Cecilia Veronica Nunez, pela oportunidade, ensinamentos e inestimáveis contribuições acadêmicas. E sobretudo pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica. Muito obrigado pelo apoio e incentivo desde que cheguei ao seu laboratório no mestrado até essa etapa do doutorado.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA: David, Kalynne, Lesliê, Weison e Taísa. Obrigado por se dedicarem a compartilhar comigo seus conhecimentos e pelos bons momentos vividos dentro e fora do laboratório. Que a nossa amizade continue por muitos anos.

Aos meus amigos que sempre me apoiam e me garantem momentos de alegria e felicidade no meu dia a dia, estando perto ou longe, muito obrigado: Leomara, Lana Cynthia, Andréia e Kledson.

Aos técnicos da CA-LTQPN (Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais), em particular ao Magno e a Sabrina, sempre pacientes e prestativos. Muito obrigado pelos cuidados com que vocês sempre tiveram ao analisar as amostras do trabalho.

À Universidade do Federal do Amazonas e ao PPGBiotec pela oportunidade de realizar o doutorado em Biotecnologia.

Ao INPA pelo espaço físico de trabalho e por me permitir desenvolver uma pesquisa num lugar tão lindo próximo a natureza.

À FAPEAM e a CAPES pela concessão da bolsa, o que tornou possível a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este objetivo fosse alcançado.

*“O conflito não é entre o bem e o mal,  
mas entre o conhecimento e a ignorância”.*

*Buda*

## RESUMO

*Minquartia guianensis* é uma espécie vegetal pertencente à família Coulaceae, que, de acordo com a literatura, produz substâncias de interesse biotecnológico, como terpenos e substâncias fenólicas. Esses metabólitos são considerados recursos terapêuticos essenciais em prol da saúde humana, principalmente no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias patogênicas e multirresistentes. Ao longo dos anos, os esforços têm se concentrado na prospecção de plantas produtoras de substâncias bioativas. Entretanto, mesmo apresentando potencial biotecnológico para a produção de novas substâncias químicas, a pesquisa com plantas ainda é uma linha de investigação carente de estudos. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico dos extratos dos galhos e folhas de *M. guianensis* (Coulaceae) e avaliar seu potencial antibacteriano. A coleta do material vegetal foi realizada na Reserva Ducke, Manaus, Amazonas. O material vegetal foi seco, moído e extraído com hexano (Hex) e metanol (MeOH). Os extratos obtidos foram submetidos a análises cromatográficas e apresentaram principalmente terpenos e fenólicos. A partir do fracionamento do extrato MeOH dos galhos, foi possível isolar e identificar a mistura de esteroides:  $\beta$ -sitosterol (1) e estigmasterol (2); e triterpenos: lupeol (3) e  $\beta$ -amirina (4); lupen-3-ona (5) e  $\beta$ -amirin-3-ona (6), além de um derivado fenólico: galato de metila (7), e uma depsidona: ácido hipoprotocetrárico (8). Do fracionamento do extrato MeOH das folhas, foi isolada a mistura de triterpenos: taraxerol (9) e lupeol (3). Esses mesmos extratos metanólicos foram ativos contra bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, e bactérias Gram-negativas, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens*, com porcentagens de inibição variando de 63% a 70%. Em conclusão, o estudo da *M. guianensis* revelou seu potencial como fonte de compostos de alto valor biotecnológico com propriedades antibacterianas significativas. A análise química dos extratos de galhos e folhas proporcionou *insights* sobre a ampla variedade de metabólitos presentes nessa planta, incluindo algumas substâncias não relatadas anteriormente na família Coulaceae, como  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -amirin-3-ona, galato de metila e ácido hipoprotocetrárico. A atividade antibacteriana demonstrada contra uma variedade de bactérias, incluindo cepas multirresistentes, destaca o potencial terapêutico desses metabólitos. Esta pesquisa não apenas oferece perspectivas para o desenvolvimento de novos antibióticos, mas também ressalta a importância da preservação e exploração da biodiversidade da Floresta Amazônica para possíveis aplicações médicas.

**Palavras-chaves:** RMN,  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -amirin-3-ona, Galato de metila, Ácido hipoprotocetrárico.

## ABSTRACT

*Minquartia guianensis* is a plant species belonging to the Coulaceae family, which, according to the literature, produces biotechnologically interesting substances such as terpenes and phenolic compounds. These metabolites are considered essential therapeutic resources for the benefit of human health, particularly in the treatment of infectious diseases caused by pathogenic and multi-resistant bacteria. Over the years, efforts have been focused on the prospecting of plants that produce bioactive substances. However, even presenting biotechnological potential to produce new chemical substances, research with plants still constitutes a line of investigation lacking in research. Thus, this work aimed to carry out the chemical study of the extracts from the branches and leaves of *M. guianensis* (Coulaceae) and to evaluate their antibacterial potential. The collection of plant material was carried out in the Ducke Reserve, Manaus, Amazonas. The plant material was dried, ground, and extracted with hexane (Hex) and methanol (MeOH). The obtained extracts were subjected to chromatographic analyses and presented mainly terpenes and phenolics. From the fractionation of the MeOH extract of the branches, it was possible to isolate and identify the mixture of steroids:  $\beta$ -sitosterol (1) and stigmasterol (2); and triterpenes: lupeol (3) and  $\beta$ -amyrin (4); lupenone (5) and  $\beta$ -amyrone (6), in addition to a phenolic derivative: methyl gallate (7), and a depsidone: hypoprotocetraric acid (8). From the fractionation of the MeOH extract of the leaves, the mixture of triterpenes: taraxerol (9) and lupeol (3) was isolated. These same methanolic extracts were active against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*, with inhibition percentages of 63 to 70%. In conclusion, the study of *M. guianensis* has unveiled its potential as a source of biotechnologically valuable compounds with significant antibacterial properties. The chemical analysis of extracts from both branches and leaves has provided insights into the diverse range of metabolites present within this plant, including some substances previously unreported within the Coulaceae family like  $\beta$ -amyrin,  $\beta$ -amyrone, methyl gallate, and hypoprotocetraric acid. The demonstrated antibacterial activity against a spectrum of bacteria, including multi-resistant strains, underscores the therapeutic promise of these metabolites. This research not only offers prospects for the development of novel antibiotics but also highlights the importance of preserving and exploring the Amazon rainforest's biodiversity for potential medical applications.

**Keywords:** NMR,  $\beta$ -amyrin,  $\beta$ -amyrone, Methyl gallate, Hypoprotocetraric acid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de alguns terpenos de ocorrência em plantas .....	15
Figura 2 - Estrutura química de algumas substâncias fenólicas de ocorrência em plantas. ....	17
Figura 3 - Mapa da distribuição mundial da família Coulaceae.....	28
Figura 4 - Estruturas químicas das substâncias isoladas de espécies da família Coulaceae ...	29
Figura 5 - <i>Minquartia guianensis</i> .....	31
Figura 6 - Distribuição geográfica da espécie <i>M. guianensis</i> no mundo.....	31
Figura 7 - Estruturas químicas de algumas substâncias isoladas da espécie <i>M. guianensis</i> .....	33
Figura 8 - Imagem da área de coleta da Reserva Ducke .....	36
Figura 9 - Fluxograma apresentando a metodologia geral utilizada para a obtenção dos extratos das folhas e dos galhos de <i>M. guianensis</i> .....	37
Figura 10 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos e obtenção das substâncias <b>1</b> a <b>6</b> .....	42
Figura 11 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos e obtenção da substância <b>7</b> .....	44
Figura 12 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos e obtenção da substância <b>8</b> .....	46
Figura 13 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH das folhas e obtenção da substância <b>9</b> e <b>3</b> .....	48
Figura 14 - Placas de CCDC dos extratos hexânicos das folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> . (A) ext.Hex.Fo, (B) ext.Hex.Ga. Sistema: DCM 100%.....	51
Figura 15 - Placas de CCDC dos extratos metanólicos das folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> . (C) ext.MeOH.Fo, (D) ext.MeOH.Ga. Sistema: DCM/MeOH (9:1) .....	51
Figura 16 - Estrutura das substâncias ( <b>1</b> ) $\beta$ -sitosterol e ( <b>2</b> ) estigmasterol.....	52
Figura 17 - Cromatoplasmas de CCDC da fração 4 reveladas em anisaldeído sulfúrico (esquerda) e Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (direita). Sistema: DCM/AcOEt (9:1).....	52
Figura 18 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura dos esteroides $\beta$ -sitosterol ( <b>1</b> ) e estigmasterol ( <b>2</b> ) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz).....	54
Figura 19 - Estrutura das substâncias lupeol ( <b>3</b> ) e $\beta$ -amirina ( <b>4</b> ).....	55
Figura 20 - Cromatoplasmas de CCDC da fração 5 revelada em anisaldeído sulfúrico (esquerda) e Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (direita). Sistema: DCM 100% .....	55
Figura 21 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura dos triterpenos lupeol ( <b>3</b> ) e $\beta$ -amirina ( <b>4</b> ) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz) .....	59
Figura 22 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da mistura de triterpenos lupeol ( <b>3</b> ) e $\beta$ -amirina ( <b>4</b> ) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz) .....	60
Figura 23 - Espectro DEPT 135° da mistura dos triterpenos lupeol ( <b>3</b> ) e $\beta$ -amirina ( <b>4</b> ) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz) .....	61
Figura 24 - Estrutura das substâncias lupen-3-ona ( <b>5</b> ) e $\beta$ -amirin-3-ona ( <b>6</b> ) .....	62
Figura 25 - Cromatoplasma de CCDC da fração 0-1 revelada em anisaldeído sulfúrico. Sistema: hexano/AcOEt (95:5).....	62
Figura 26 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H dos triterpenos lupen-3-ona ( <b>5</b> ) e $\beta$ -amirin-3-ona ( <b>6</b> ) (Clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz) .....	66
Figura 27 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C dos triterpenos lupen-3-ona ( <b>5</b> ) e $\beta$ -amirin-3-ona ( <b>6</b> ) (Clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz) .....	67



Figura 28 - Espectro de DEPT 135° da mistura dos triterpenos lupen-3-ona ( <b>5</b> ) e β-amirin-3-ona ( <b>6</b> ) (Clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz) .....	68
Figura 29 - Estrutura das substâncias taraxerol ( <b>9</b> ) e lupeol ( <b>3</b> ) .....	69
Figura 30 - Cromatoplaça de CCDC da fração 11 revelada em anisaldeído sulfúrico. Sistema: hex/AcOEt (9:1) .....	69
Figura 31 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura dos triterpenos taraxerol ( <b>9</b> ) e lupeol ( <b>3</b> ) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz) .....	73
Figura 32 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da mistura dos triterpenos taraxerol ( <b>9</b> ) e lupeol ( <b>3</b> ) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz) .....	74
Figura 33 - Espectro DEPT 135° da mistura de triterpenos taraxerol ( <b>9</b> ) e lupeol ( <b>3</b> ) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz) .....	75
Figura 34 - Estrutura química da substância galato de metila ( <b>7</b> ) .....	76
Figura 35 - Cromatoplaças de CCDC da fração 20-21 reveladas em luz UV 254 nm (esquerda), NP/PEG (centro), FeCl <sub>3</sub> (direita). Sistema: DCM/MeOH (9:1) .....	76
Figura 36 - Algumas correlações de HMBC da substância <b>7</b> (galato de metila) .....	78
Figura 37 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância galato de metila ( <b>7</b> ) (metanol deuterado, 300 MHz) .....	79
Figura 38 - Mapa de correlação HSQC da substância galato de metila ( <b>7</b> ) (metanol deuterado, 300 MHz) .....	80
Figura 39 - Mapa de correlação HMBC da substância galato de metila ( <b>7</b> ) (metanol deuterado, 300 MHz) .....	81
Figura 40 - Espectro de massas da substância galato de metila ( <b>7</b> ) (fonte ESI modo negativo). .....	82
Figura 41 - Estrutura da substância ácido hipoprotocetrárico ( <b>8</b> ) .....	83
Figura 42 - Cromatoplaças de CCDC da fração 7-9 reveladas em luz UV 254 nm (esquerda), FeCl <sub>3</sub> (centro), anisaldeído sulfúrico (direita). Sistema: AcOEt/MeOH (8:2) .....	83
Figura 43 - Correlações de HMBC observadas na substância <b>8</b> .....	85
Figura 44 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância ácido hipoprotocetrárico ( <b>8</b> ) (metanol deuterado, 300 MHz) .....	86
Figura 45 - Mapa de correlação HSQC da substância ácido hipoprotocetrárico ( <b>8</b> ) (metanol deuterado, 300 MHz) .....	87
Figura 46 - Mapa de correlação HMBC da substância ácido hipoprotocetrárico ( <b>8</b> ) (metanol deuterado, 300 MHz) .....	88
Figura 47 - Espectro de massas com a fragmentação da substância <b>8</b> (ESI modo negativo) ...	89
Figura 48 - Perda de CO <sub>2</sub> na fragmentação da substância <b>8</b> (ESI modo negativo) .....	89
Figura 49 - Gráfico indicando o percentual de inibição dos extratos de <i>M. guianensis</i> frente a cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positiva .....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Um exemplo de cada uma das principais classes de metabólitos secundários e alguns relatos recentes de exemplos de atividades biológicas.....	14
Tabela 2 - Terpenos de origem vegetal com atividade antimicrobiana descrita na literatura ..	20
Tabela 3 - Substâncias fenólicas de origem vegetal com atividade antimicrobiana descrita na literatura.....	22
Tabela 4 - Cepas das bactérias utilizadas no ensaio antibacteriano e suas respectivas identificações.....	38
Tabela 5 - Sistemas de solvente utilizados no refractionamento da fração Ga.FAc.F4-7 .....	41
Tabela 6 - Sistemas utilizados e frações coletadas no refractionamento da fração Ga.FAc.F12-13 .....	43
Tabela 7 - Sistemas utilizados e frações coletadas no refractionamento da fração Ga.FAc.F14-15 .....	45
Tabela 8 - Sistemas utilizados e frações coletadas no refractionamento da fração 7-10.....	47
Tabela 9 - Rendimento dos extratos obtidos a partir da extração das folhas e dos galhos de <i>M. guianensis</i> .....	50
Tabela 10 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias $\beta$ -sitosterol ( <b>1</b> ) e estigmasterol ( <b>2</b> ) comparados com a literatura em $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz (PEDROZA et al., 2020) .....	53
Tabela 11 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) da substância lupeol ( <b>3</b> ) comparados com a literatura, ambos obtidos em $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2012) .....	57
Tabela 12 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) da substância $\beta$ -amirina ( <b>4</b> ) comparados a literatura, ambos obtidos em em $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz (SHAN et al., 2014).....	58
Tabela 13 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) da substância lupen-3-ona ( <b>5</b> ) comparados com a literatura, ambos em $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2012) .....	64
Tabela 14 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) da substância $\beta$ -amirin-3-ona ( <b>6</b> ) comparados com a literatura, ambos em $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz (SHAN et al., 2014) .....	65
Tabela 15 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) da substância taraxerol ( <b>9</b> ) comparados com a literatura, ambos obtidos em $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2012).....	71
Tabela 16 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) do lupeol ( <b>3</b> ) comparados com a literatura, ambos obtidos em $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2012).....	72
Tabela 17 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e HMBC (ppm) da substância <b>7</b> (galato de metila) comparados com a literatura em $\text{CD}_3\text{OD}$ , $^1\text{H}$ (500 MHz) e $^{13}\text{C}$ (125 MHz) (TAN, CHAN e LIM, 2015).....	78
Tabela 18 - Dados de RMN 1D e 2D (ppm) da substância <b>8</b> (ácido hipoprotocetrárico) em comparação com a literatura em $\text{DMSO}-d_6$ , $^1\text{H}$ (270 MHz) e $^{13}\text{C}$ (25 MHz) (HUNECK e YOSHIMURA, 1996).....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – acetato de etila

BOD – *Biochemical Oxygen Demand*

CCA – cromatografia em coluna aberta

CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa

CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado

CD<sub>3</sub>OD – metanol deuterado

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm – centímetro

COSY – *Correlation Spectroscopy*

DCM – diclorometano

FeCl<sub>3</sub> – cloreto férrico

Hex – hexano

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Coherence*

DMSO – dimetilsulfóxido

DMSO-*d*<sub>6</sub> – dimetilsulfóxido deuterado

g – grama

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MeOH – metanol

mg – miligrama

nm – nanômetro

ppm – partes por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

SiO<sub>2</sub> – sílica

UV – ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Metabólitos secundários de origem vegetal.....	13
2.2 Terpenos.....	15
2.3 Substâncias fenólicas.....	16
2.4 Metabólitos secundários bioativos e microrganismos resistentes.....	18
2.5 Atividade antibacteriana.....	26
2.6 Família Coulaceae.....	28
2.6.1 Características químicas da família Coulaceae.....	28
2.6.2 Atividade biológica de espécies da família Coulaceae.....	30
2.6.3 <i>Minuartia guianensis</i> Aubl.....	30
2.6.4 Características químicas e biológicas da <i>M. guianensis</i> .....	32
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
4 METODOLOGIA.....	36
4.1 Procedimentos gerais.....	36
4.2 Coleta do material vegetal.....	36
4.3 Preparo do material vegetal e obtenção dos extratos.....	37
4.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos.....	37
4.5 Análises químicas dos extratos vegetais de folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> .....	39
4.6 Fracionamento do extrato metanólico dos galhos de <i>M. guianensis</i> .....	40
4.6.1 Partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de <i>M. guianensis</i> .....	40
4.6.2 Fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico dos galhos.....	40
4.7 Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>M. guianensis</i> .....	46
4.8 Caracterização estrutural das substâncias isoladas.....	49
4.8.1 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	49
4.8.2 Espectrometria de massas.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Rendimento dos extratos das folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> .....	50
5.2 Análise por CCDC dos extratos brutos das folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> .....	50
5.3 Identificação das substâncias isoladas.....	52
5.3.1 Esteroides.....	52

5.3.1.1 Substâncias 1 e 2: $\beta$ -sitosterol e estigmasterol .....	52
5.3.2 Triterpenos .....	55
5.3.2.1 Substâncias 3 e 4: Lupeol e $\beta$ -amirina .....	55
5.3.2.2 Substâncias 5 e 6: Lupen-3-ona e $\beta$ -amirin-3-ona .....	62
5.3.2.3 Substância 9: Taraxerol e lupeol .....	69
5.3.3 Substâncias fenólicas.....	76
5.3.3.1 Substância 7: Galato de metila .....	76
5.3.3.2 Substância 8: Ácido hipoprocetrário .....	83
5.4 Ensaio antibacteriano dos extratos de folhas e galhos de <i>M. guianensis</i> .....	90
CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse por pesquisas que buscam substâncias bioativas de origem natural tem crescido atualmente. Isso deve-se em parte ao aumento do número de microrganismos resistentes aos diversos medicamentos empregados no tratamento de doenças patogênicas. A obtenção de moléculas bioativas a partir de plantas é uma alternativa para o combate aos patógenos resistentes. Entretanto, o uso de plantas com essa finalidade ainda constitui uma linha de pesquisa carente de investigação mesmo com o crescente número de estudos desenvolvidos na área (BARBIERI, 2017; ATANASOV et al., 2021).

A resistência aos antibióticos é um problema global com riscos crescentes de disseminação. Em 2019 cerca de 3,57 milhões de mortes foram associadas as cepas de bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosae* (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022).

A OMS prevê 10 milhões de mortes anuais até 2050 caso não haja medidas para impedir a propagação da resistência. Segundo especialistas, a pandemia de COVID-19 e o uso excessivo de antibióticos podem piorar a situação. Nesse sentido, as plantas são uma fonte valiosa de substâncias naturais, como alcaloides, terpenos, flavonoides, com atividades biológicas importantes, podendo ser usadas como recursos terapêuticos contra doenças infecciosas (YAGUI, 2018; MARTINEZ, GAMBIN e SIERECKI, 2019; MIETHKE et al., 2021).

A espécie *Minquartia guianensis* Aubl., pertencente à família Coulaceae, está dispersa na América Central e na Bacia Amazônica. No Brasil, esta espécie é encontrada nos Estados do Acre, Amazonas, Roraima, Pará e Amapá. Popularmente é conhecida como acariquara, acariquara-roxa, acari (FLORA DO BRASIL, 2023). Na literatura é relatado o isolamento do ácido minquartinoico com atividades antimalárica e leishmanicida, além de triterpenos isolados pelo nosso grupo de pesquisa (RASMUSSEN, et al., 2000; CURSINO et al., 2009).

Os triterpenos exibem muitas atividades biológicas, entre as quais destacam-se: antitumoral (CHO et al., 2016), anti-inflamatória (BI et al., 2017), antibacteriana (RAGAZONI et al., 2021), antiviral (DARSHANI et al., 2022), tratamento de doenças cardiovasculares (WANG et al., 2016), antimalárico (LISEWSKI et al., 2014) e outros.

Tendo em vista a necessidade de novos agentes antibacterianos de origem natural, o presente estudo realizou a prospecção química e biológica dos extratos de *M. guianensis*, visando metabólitos bioativos contra microrganismos patogênicos. Os estudos com essa finalidade são necessários para a busca por medicamentos de origem natural, fundamentais no combate a doenças humanas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Metabólitos secundários de origem vegetal

As plantas são capazes de produzir uma variedade de substâncias, muito superior a qualquer outro ser vivo (WANG et al., 2019). Algumas espécies produzem um conjunto específico de metabólitos com uma variação particularmente rica, principalmente devido às condições ambientais em que estão inseridas (FERNIE e TOHGE, 2017). Logo, esse conjunto de substâncias concede às plantas um mecanismo eficiente para proteção e condução de estresses ocasionadas por fatores edafoclimáticos e organismos vivos, aos quais estão naturalmente expostas durante a vida. Isto é, regulam a conexão entre as plantas e o ambiente e gerem certos aspectos fisiológicos, tais como o crescimento, reprodução, simbiose e outros (NCUBE e STADEN, 2015).

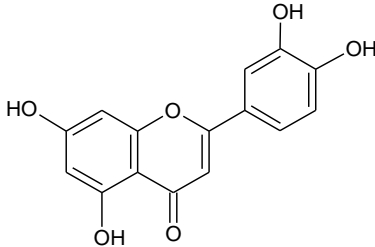
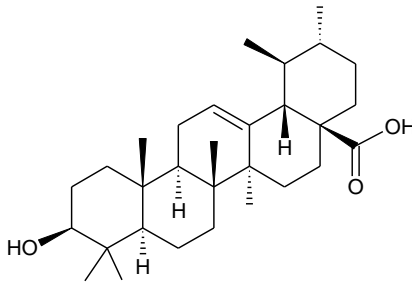
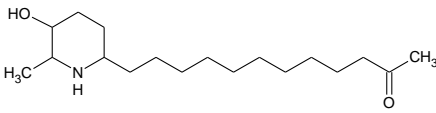
Os metabólitos produzidos por plantas são classificados em primários e secundários. Os metabólitos primários têm um papel fundamental na sobrevivência da espécie, desempenhando uma função ativa na fotossíntese e respiração, como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos e ácidos graxos (MAEDA, 2019). Os metabólitos secundários são formados partir dos metabólitos primários e não são fundamentais para os processos básicos, porém desempenham funções essenciais na adaptação, sobrevivência e interação da planta, ocorrendo em baixas concentrações, em células específicas ou órgãos da planta, e exercer efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos em humanos ou animais (BOUGARD et al., 2001; AZMIR et al., 2013).

Os metabólitos secundários são constituídos por uma variedade de moléculas, algumas são mais específicas e ocorrem em uma espécie ou grupo taxonômico particular (FANG, FERNIE e LUO, 2019). No entanto, devido ao progresso de técnicas para identificação de substâncias químicas, foi possível caracterizar inclusive as substâncias encontradas em baixas concentrações nas plantas, evidenciando a diversidade e complexidade química sintetizada pelos vegetais. Essas substâncias são geradas através da coevolução entre plantas, insetos, microrganismos e mamíferos, levando à síntese de metabólitos com funções de defesa ou atração (RHODES, 1994).

Devido à rica diversidade estrutural, os metabólitos secundários são classificados de acordo com sua rota biossintética, que inclui três grupos principais: terpenos (como voláteis de plantas, glicosídeos cardíacos, carotenoides e esteróis), fenólicos (como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonoides, taninos e lignina) e compostos contendo nitrogênio (como alcaloides e glicosinolatos) (BOURGAD et al., 2001).

Os metabólitos secundários presentes nessas diferentes classes químicas são um grupo heterogêneo de substâncias de origem natural, que são utilizados também para identificar novas moléculas bioativas oriundas de espécies vegetais (ANAND et al., 2019). Em função dessas propriedades, diversos estudos são desenvolvidos avaliando quanto à eficácia biológica dessas substâncias, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Um exemplo de cada uma das principais classes de metabólitos secundários e alguns relatos de atividades biológicas

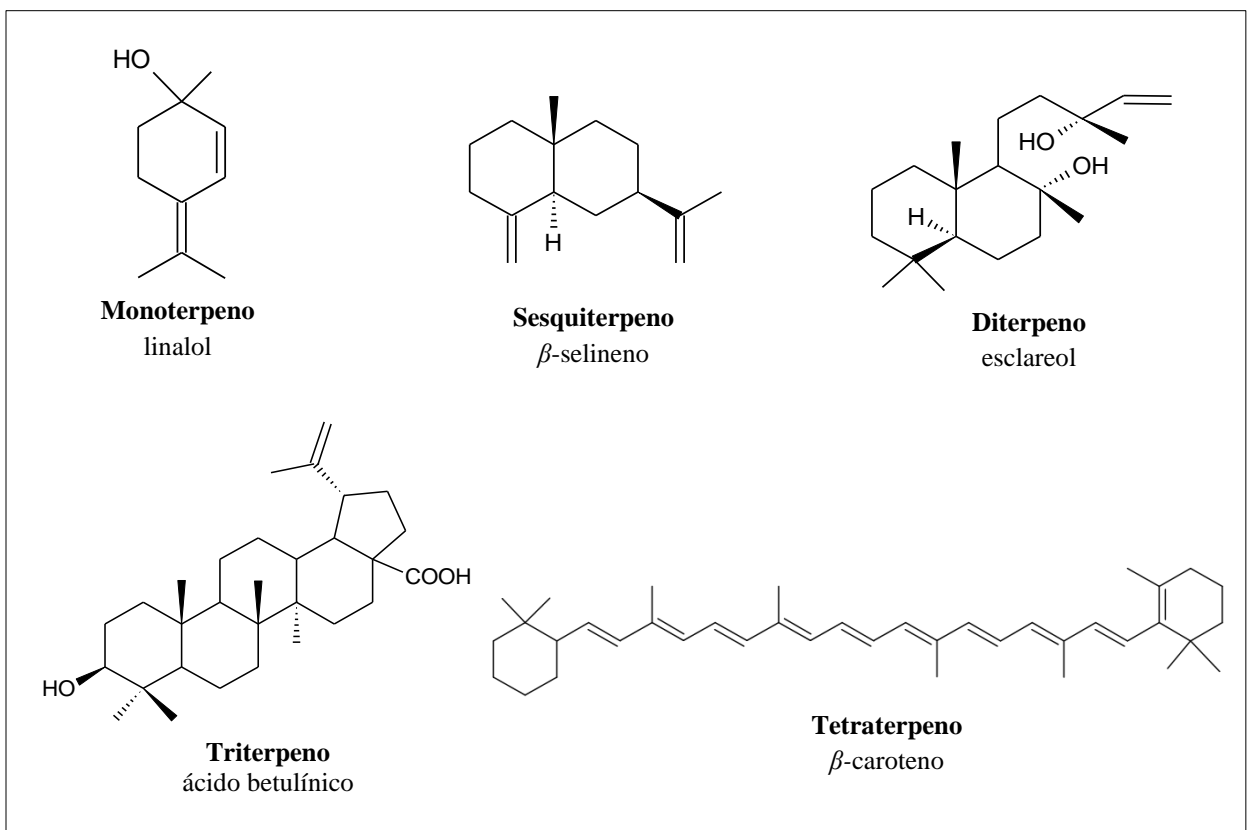
Classe	Substância	Atividade	Referências
Flavonoide	 <p style="text-align: center;"><b>Luteolina</b></p>	Antitumoral Anti-inflamatório Alelopático Antiangiogênico Neuroprotetor	Imran et al. (2019) Aziz et al. (2018) Wang et al. (2018) Zang et al. (2017) Patil et al. (2014)
Terpeno	 <p style="text-align: center;"><b>Ácido ursólico</b></p>	Antifúngico Antimicrobiano e antioxidante Antileshimania Anti-herpes Antituberculose	Shu et al. (2019) Nascimento et al. (2014) Yamamoto et al. (2014) Bag et al. (2012) Woldemichael et al. (2003)
Alcaloide	 <p style="text-align: center;"><b>(-)-cassina</b></p>	Antiproliferativo Antimalárico Anti-inflamatório e antinociceptivos Antimicrobiano	Pereira et al. (2017) Pivatto et al. (2014) Silva et al. (2012) Sansores-Peraza et al. (2000)



## 2.2 Terpenos

Os terpenos ou terpenoides constituem um dos maiores e estruturalmente diversos grupos de metabólitos secundários. É uma classe de produtos naturais derivada de duas vias independentes, a via do mevalonato (MVA), que opera no citosol das plantas, e pela via do 2-C-metil-D-eritriol-4-fosfato (MEP), encontrada nos plastídios. Os terpenos consistem em várias unidades estruturais de isopreno ( $C_5$ ), com base no número de unidades eles são classificados principalmente em monoterpeno ( $C_{10}$ ), sesquiterpeno ( $C_{15}$ ), diterpeno ( $C_{20}$ ), triterpeno ( $C_{30}$ ), tetraterpeno ( $C_{40}$ ) e politerpeno ( $C > 40$ ), etc (Figura 1) (LIAO et al., 2016).

Figura 1 - Estrutura química de alguns terpenos de ocorrência em plantas



Os terpenos são amplamente encontrados nas plantas, estando principalmente presentes na forma de vários compostos derivados contendo oxigênio, incluindo álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, cetonas, ésteres e glicosídeos (QIU, SMUTS e SCHUG, 2017).

Nos últimos anos, com o aprofundamento das pesquisas sobre terpenoides (especialmente em plantas), verificou-se que tais substâncias desempenham um papel cada vez mais proeminente no campo medicamentos e possuem diversas atividades biológicas como antitumoral, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antimalárico, promotor a absorção

transdérmica, prevenindo e tratando doenças cardiovasculares, diminuindo o açúcar no sangue e outros efeitos (YANG et al., 2020).

Os triterpenos possuem amplo espectro de atividades biológicas e do ponto de vista de sua formação, podem ser pensados como a ciclização do esqualeno de diferentes formas, o esqualano é formado pela condensação cauda-cauda do pirofosfato de farnesol. A maioria dos triterpenos consiste em 30 átomos de carbono e pode ser considerado um composto de 6 unidades estruturais de isopreno. Os triterpenoides e suas saponinas estão distribuídos em monocotiledôneas e plantas dicotiledôneas, especialmente em plantas dicotiledôneas. Os triterpenos livres existem principalmente em Compositae, Leguminosae, Euphorbiaceae, Meliaceae, Euonymus, Rubiaceae, Labiatae, entre outras plantas (MENG, HUANG e LIU, 2008; SIDDIQUE e SALEEM, 2011).

Os triterpenoides são estruturalmente diversos, e o seu esqueleto básico já foi encontrado em diversas espécies vegetais. Triterpenos tetracíclicos e triterpenos pentacíclicos são as duas principais categorias de triterpenos. Muitos estudos mostraram que os triterpenos pentacíclicos têm uma ampla gama de efeitos farmacológicos e importante atividade biológica, especialmente na regulação anti-inflamatória, hepática, antitumoral e imune (GEETHA e VARALAKSHMI, 2001; HU et al., 2013; PELÁEZ et al., 2013; FUKUMITSU, 2016). Os triterpenoides pentacíclicos são classificados principalmente como tipo  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, oleanano, friedelina, lupano e triterpenoides do tipo hopano (TANTILLO, 2011).

Os terpenos paclitaxel e artemisinina têm sido amplamente utilizados na prática clínica. Devido a isso, a pesquisa sobre a atividade biológica dos terpenoides pode contribuir para a seleção de fármacos e aprimoramento de métodos de tratamento, fornecendo um aporte teórico base para o desenvolvimento de novos medicamentos, que tem chamado a atenção de muitos pesquisadores (YANG et al., 2020).

### **2.3 Substâncias fenólicas**

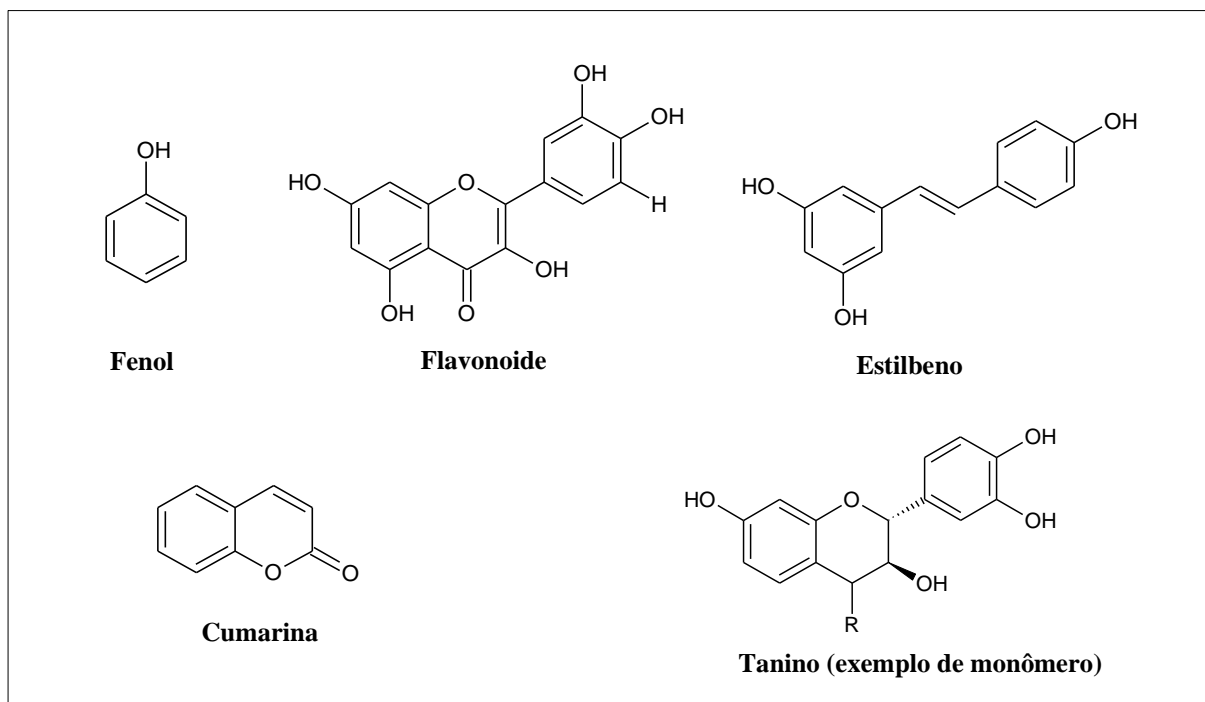
A produção de substâncias fenólicas pode acontecer por meio da Acetil-CoA (Acetilcoenzima A), entretanto, a principal via de síntese desses metabólitos é a rota do ácido chiquímico, na qual a junção de uma molécula de ácido fosfoenolpirúvico (PEP) originada da glicólise e a eritrose-4-fosfato (derivada da pentose fosfato) produzem um açúcar de sete carbonos conhecido como DAHP (3-desoxi-d-arabino-heptulosônico-7-fosfato), que é convertido em ciclo e reduzido para produzir o chiquimato. A via do ácido chiquímico também é responsável pela geração de proteínas, as quais desempenham papéis cruciais nos tecidos

vegetais, diretamente envolvidas na síntese de fenólicos (KARAKAYA, 2004; COHEN e KENNEDY, 2010).

A partir do processo de biossíntese, ocorre a formação de ácidos fenólicos, que são fenóis simples contendo apenas um grupo carboxila, e que podem atuar como precursores para outras substâncias ou serem gerados a partir de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano, iniciando a via do fenilpropanoide (DIAS et al., 2016). A produção desses aminoácidos é regulada por um mecanismo de resposta cujo objetivo é regular os fluxos metabólicos. Um aumento na produção de triptofano, por exemplo, irá direcionar o fluxo de carbono para a síntese de fenilalanina e tirosina (VERPOORTE et al., 1999).

Estruturalmente, o grupo de fenólicos apresenta um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila, variando de simples moléculas fenólicas até substâncias altamente polimerizadas (BRAVO, 1998). Suas estruturas químicas podem variar muito, incluindo fenóis simples ( $C_6$ ), como derivados do ácido hidrobencóico e catecóis, bem como polímeros de cadeia longa com alto peso molecular, como melaninas catecol ( $(C_6)_6$ ), ligninas ( $(C_6-C_3)_n$ ) e taninos condensados ( $(C_6-C_3-C_6)_n$ ). Os estilbenos ( $C_6-C_2-C_6$ ) e os flavonoides ( $C_6-C_3-C_6$ ) são substâncias fenólicas de peso molecular intermediário que apresentam diversas atividades farmacológicas e biológicas (Figura 2). Os flavonoides, incluindo antocianinas, flavonóis (como quercetina e miricetina), isoflavonas (como daidzeína e genisteína) e outras são formadas por múltiplos ramos biossintéticos que se originam da chalcona (SHAHIDI e AMBIGAIPALN, 2018).

Figura 2 - Estrutura química de algumas substâncias fenólicas de ocorrência em plantas.



As substâncias fenólicas além de exercerem função no crescimento, desenvolvimento e defesa das plantas, estão entre as principais substâncias ativas com diferentes propriedades biológicas e farmacológicas tais como: antioxidantes, anti-inflamatórios, anticâncer, antimicrobiano, antialérgico, antiviral, cardioprotetor, entre outros (TUNGMUNNITHUM et al., 2018).

#### **2.4 Metabólitos secundários bioativos e microrganismos resistentes**

A resistência bacteriana é definida como a resistência de uma bactéria no tratamento com antibióticos que eram originalmente utilizados no combate de infecções causadas por esses microrganismos. É um fator que representa uma ameaça à saúde pública global e uma importante questão econômica devido aos maiores custos de saúde e ao aumento da duração da doença, do tratamento e da hospitalização quando comparada com infecções comuns não resistentes. Esta resposta dos microrganismos faz com que infecções persistam em acometer os pacientes, colocando-os em um quadro clínico de alto risco, podendo resultar em sua morte (MANDAL et al., 2014; KHAMENEH et al., 2019).

Em 2019 os seis principais patógenos causadores de mortes associadas à resistência antimicrobiana (RAM) foram *Escherichia coli*, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, os quais foram responsáveis por 929.000 mil mortes atribuíveis à RAM e 3,57 milhões mortes associadas a RAM. Em uma combinação patógeno-medicamento, *S. aureus* resistente à meticilina causou mais de 100.000 mortes atribuíveis à RAM em 2019, enquanto mais seis causaram 50.000 a 100.000 mil mortes: multirresistentes, excluindo tuberculose extensivamente resistente a medicamentos, *E. coli* resistente a cefalosporina de terceira geração, *A. baumannii* resistente a carbapenem, *E. coli* resistente a fluoroquinolona, *K. pneumoniae* resistente a carbapeneme, *K. pneumoniae* resistente à cefalosporina de terceira geração (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022).

Considerando que a resistência bacteriana é um problema multifatorial, impulsionado por muitos fatores interconectados, a Organização Mundial da Saúde sugere uma série de ações concertadas e coordenadas. Essas ações vão desde a prevenção da transmissão de infecção, principalmente em hospitais e clínicas, até a promoção da pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos para infecção. No entanto, a descoberta de novos antibióticos é muito cara e demorada, levando cerca de dez anos para lançar um novo antibiótico no mercado (WHO, 2020). Assim, a busca por substâncias antibacterianas derivadas de produtos naturais, como

fitoquímicos, tem ganhado grande importância, juntamente com a descoberta de novas substâncias químicas sintéticas com propriedades antibióticas (MANDAL et al., 2014; ATANASOV et al., 2021).

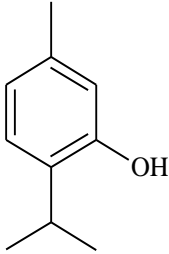
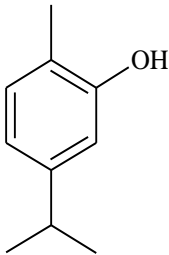
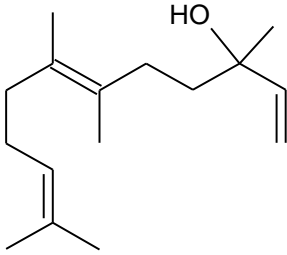
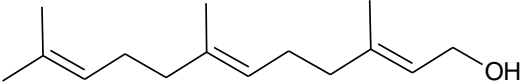
Nas últimas três décadas, milhares de metabólitos com diferentes mecanismos de ação foram listados como antibacterianos, graças a uma série de estudos sobre sua atividade realizados em todo o mundo, especialmente na América Latina. Desde então, centenas de artigos foram publicados com esse tema (IZZO et al., 1995; CRUZ et al., 1996; PAWAR e PAL, 2002; HANNAN et al., 2008; DAGLIA, 2012; ERDEM et al., 2015; NABAVI et al., 2015; MAHMOUD et al., 201; KHAMENEH et al., 2019).

Com o aumento de “superbactérias” resistentes aos antibióticos, o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos é crucial, e os extratos de plantas são uma fonte alternativa para novos medicamentos. Aproximadamente mais de 1.000 fitoquímicos diferentes de origem natural, mostraram atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral contra vários patógenos humanos. Além disso, nos últimos anos o conhecimento a respeito desse tema tem aumentado amplamente e a atividade antibacteriana tem sido relatada com diferentes mecanismos de ação, como a capacidade de causar danos à membrana bacteriana, supressão de alguns fatores de virulência, incluindo enzimas e toxinas, e inibição da formação de biofilme bacteriano (BARBIERI et al., 2017).

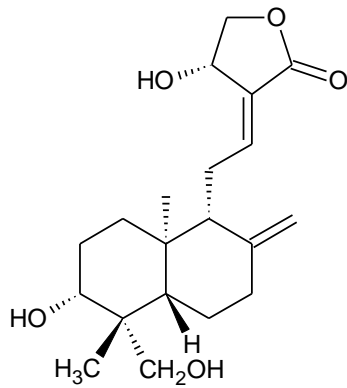
Alguns fitoquímicos, além de possuírem uma atividade antimicrobiana direta, foram relatados com efeito sinérgico *in vitro* quando testados em combinação com antibióticos convencionais, modificando os mecanismos de resistência bacteriana, sugerindo assim que esses metabólitos podem ser usados em combinação com antibióticos para aumentar a atividade e diminuir suas doses (TOUANI et al., 2014; SANTIAGO et al., 2015).

Nas Tabelas 2 e 3 podem ser encontrados metabólitos de origem vegetal com atividade antimicrobiana descritos na literatura.

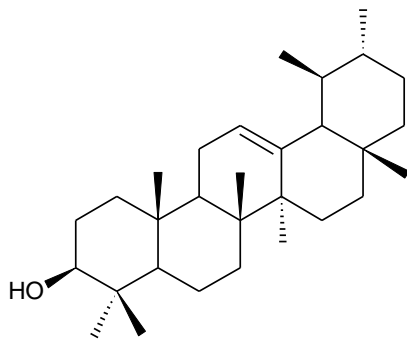
Tabela 2 - Terpenos de origem vegetal com atividade antimicrobiana descrita na literatura

Substância	Microrganismo patogênico	Referência
<p><b>Timol</b></p> 	<p><i>S. typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>M. tuberculosis</i></p>	<p>Andrade-Ochoa et al. (2015) Chauhan e Kang (2014) Liu et al. (2015)</p>
<p><b>Carvacrol</b></p> 	<p><i>M. tuberculosis</i> <i>S. aureus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>E. faecium</i> <i>S. enterica</i> <i>P. aeruginosa</i></p>	<p>Ait-Ouazzou et al. (2013) Andrade-Ochoa et al. (2015) Espina et al. (2011, 2015) Fisher e Phillips (2008) Laird et al. (2012)</p>
<p><b>Nerolidol</b></p> 	<p><i>S. aureus</i></p>	<p>Togashi et al. (2010)</p>
<p><b>Farnesol</b></p> 	<p><i>S. aureus</i></p>	<p>Togashi et al. (2010)</p>

---

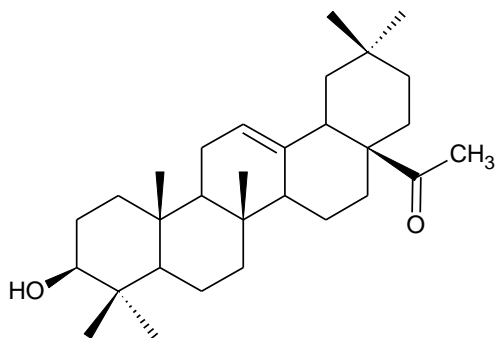
**Andrografoilide**
*P. aeruginosa*

Banerjee et al. (2017)

 **$\alpha$ -amirina**

MRSA e MSSA

Chung et al. (2014)

**Ácido oleanólico***M. tuberculosis**B. cereus e*

Cunha et al., (2010)

*S. pneumonia*

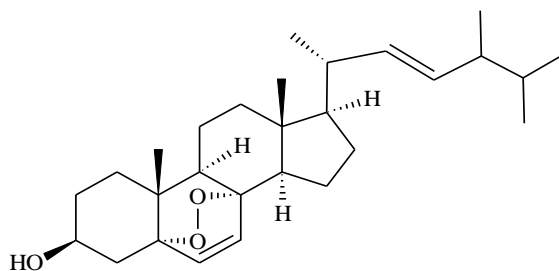
Jiménez-Arellanes et al.

*Planktonic cariogenic*

(2013);

*microorganisms*

Zhou et al. (2013)

*L. monocytogenes***Peróxido ergosterol***M. tuberculosis*

Duarte et al. (2007)

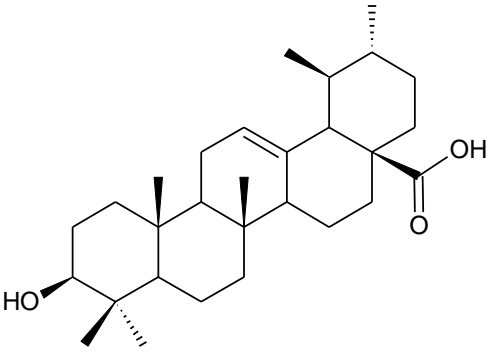
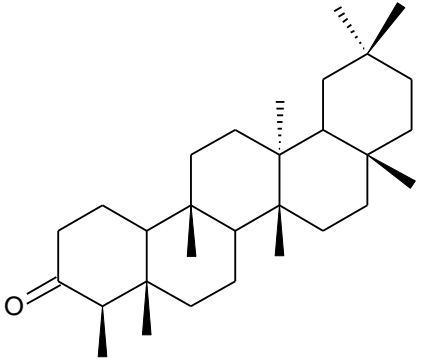
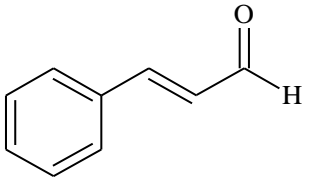
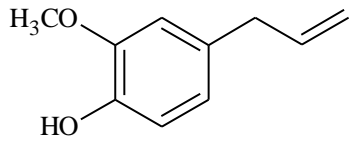
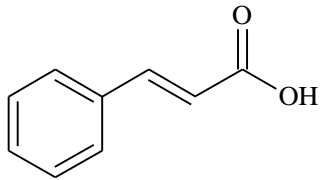
<p style="text-align: center;"><b>Ácido ursólico</b></p> 	<p><i>M. tuberculosis</i> <i>B. cereus</i> <i>S. mutans e S. sobrinus</i> <i>L. monocytogenes</i></p>	<p>Cunha et al. (2010) Jiménez-Arellanes et al., (2013) Kurek et al. (2010) Zhou et al. (2013) Zou et al. (2014)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Friedelina</b></p> 	<p><i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Bacillus Calmette Guerin (BCG)</i></p>	<p>Salih et al. (2018) Mann et al. (2011)</p>

Tabela 3 - Substâncias fenólicas de origem vegetal com atividade antimicrobiana descrita na literatura

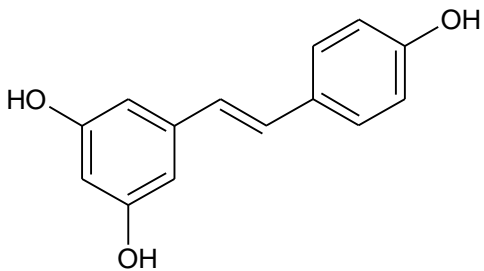
Substância	Microrganismo patogênico	Referência
<p style="text-align: center;"><b>Cinamaldeído</b></p> 	<p><i>S. typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>M. tuberculosis</i></p>	<p>Andrade-Ochoa et al. (2015) Liu et al. (2015)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Eugenol</b></p> 	<p><i>S. typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i></p>	<p>Liu et al. (2015)</p>



---

**Ácido cinâmico***M. tuberculosis*

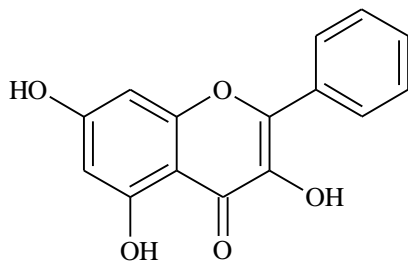
Andrade-Ochoa et al. (2015)

**Resveratrol***M. smegmatis*

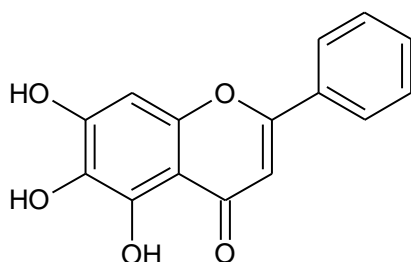
Klancnik et al. (2017)

*Campylobacter jejuni*

Lechner et al. (2008)

**Galangina***K. pneumoniae*

Chen e Huang (2011)

**Baicaleína***M. smegmatis*

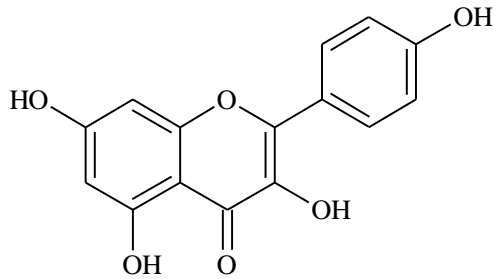
Lechner et al. (2008)

*S. aureus* multirresistente

Chan et al. (2011)

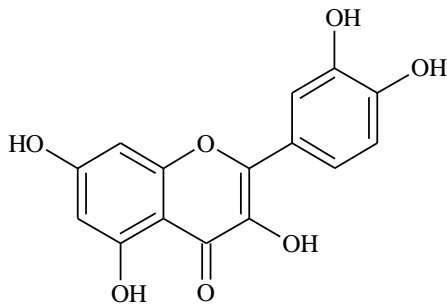
*C. albicans*

Huang et al. (2008)

**Kaempferol**

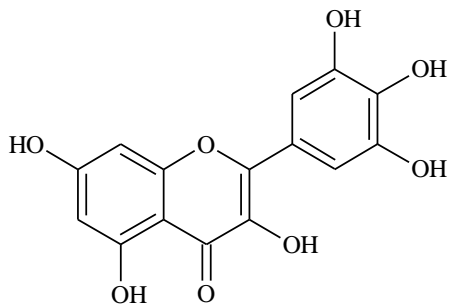
*K. pneumonia*  
*S. aureus*

Chen e Huang (2011)  
Huang et al. (2015)

**Quercetina**

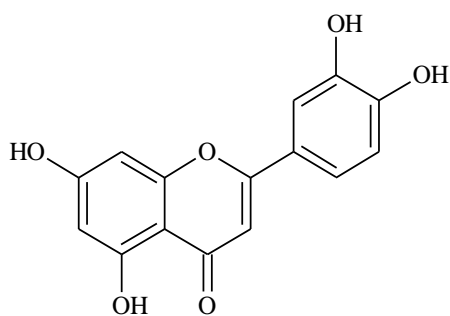
*K. pneumonia*  
*S. aureus*  
*S. haemolyticus*  
*E. coli*  
*S. pyogenes*

Chen e Huang (2011)  
Lee et al. (2010)  
Liu et al., (2010)  
Siriwong et al. (2015)

**Miricetina**

*K. pneumonia*  
*S. aureus*

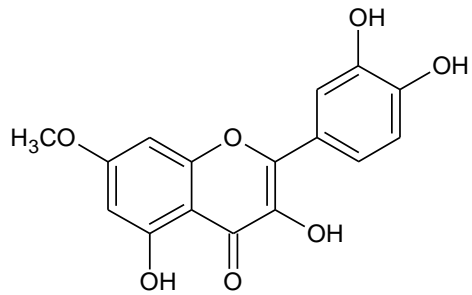
Chen e Huang (2011)  
Huang et al. (2015)

**Luteoloína**

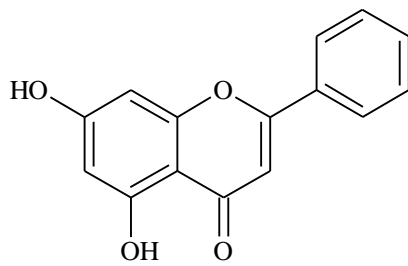
*S. pyogenes*  
*S. aureus*  
*E. coli*  
*vesicatoria*  
*A. tumefaciens*  
*P. lachrymans*  
*B. subtilis*  
*S. haemolyticus*

Siriwong et al. (2015)

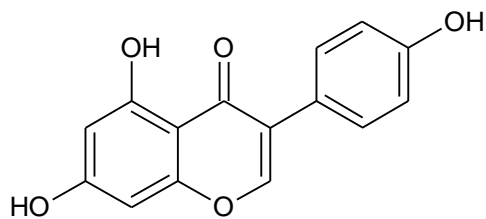
---

**Rhamentin***S. aureus*

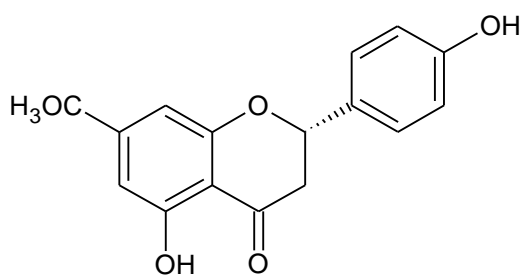
Brown et al. (2015)

**Crisina***S. aureus**E. coli*

Liu et al. (2010)

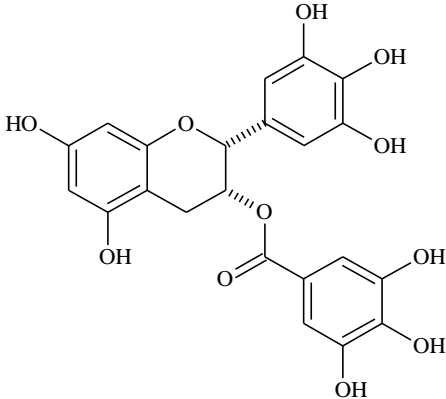
*vesicatoria**A. tumefaciens**P. lachrymans**B. subtilis**S. haemolyticus***Genesteína***S. aureus*

Morel et al. (2003)

**Sakuranetina***H. pylori*

Zhang et al. (2008)

---

<b>Epigallocatequina-galato (ECGC)</b>		
	<i>S. aureus</i> <i>S. mutans</i> <i>S. pyogenes</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. coli</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. thypi</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i>	Asahi et al. (2014) Betts et al. (2015) Cho et al. (2011) Cui et al. (2012) Jeon et al., (2014) Lee et al. (2009a) Lee e Tan (2015) Xu et al. (2011) Yoda et al. (2004)

---

## 2.5 Atividade antibacteriana

A pesquisa de atividade antibacteriana refere-se a diferentes técnicas ou métodos laboratoriais *in vitro*, os quais são utilizados para determinar o potencial antimicrobiano de um determinado agente. Esses agentes antibacterianos podem manifestar sua atividade por meio de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese de ácidos nucleicos, entre outros (LAW, SHAABAN e RAHMAN, 2019).

Em geral, as substâncias antibacterianas naturais ou sintéticas podem ser classificadas como bactericidas, quando matam completamente o microrganismo, ou bacteriostáticas, quando impedem o crescimento dele. No caso das drogas bacteriostáticas, o hospedeiro se defende por si, utilizando mecanismos como a fagocitose e a produção de anticorpos, normalmente destruindo o microrganismo. No caso das drogas bactericidas, essas agem interferindo na síntese de peptídeoglicano, responsável pela integridade da parede bacteriana (HASSAN, 2012; SILVA et al., 2013).

Existem muitas evidências sugerindo que os metabólitos de origem natural são muito eficazes no tratamento de doenças infecciosas. Algumas dessas substâncias já mostraram atividade antibacteriana intrínseca e atividades modificadoras da resistência a antibióticos em microrganismos resistentes. Embora alguns não sejam eficazes por si só como um fármaco específico para um microrganismo, quando combinados com antibióticos, podem superar a resistência de bactérias a esses medicamentos (KHAMENEH et al., 2019).

A coadministração de substâncias naturais juntamente com antibióticos leva a redução dos valores de concentração inibitória mínima e a efeitos sinérgicos. Semelhante à coadministração de antibióticos com diferentes mecanismo de ação, como amoxicilina com clavulanato e isoniazida-rifampicina-pirazinamida-etambutol, a combinação de antibióticos convencionais e substâncias naturais que atuam nos diferentes locais-alvos de bactérias leva a uma eficácia superior, podendo ser bastante sucedida, especialmente em suprimir o desenvolvimento da resistência bacteriana por meio de diferentes mecanismos de ação (VANDEVELDE et al., 2016; KHAMENEH et al., 2016).

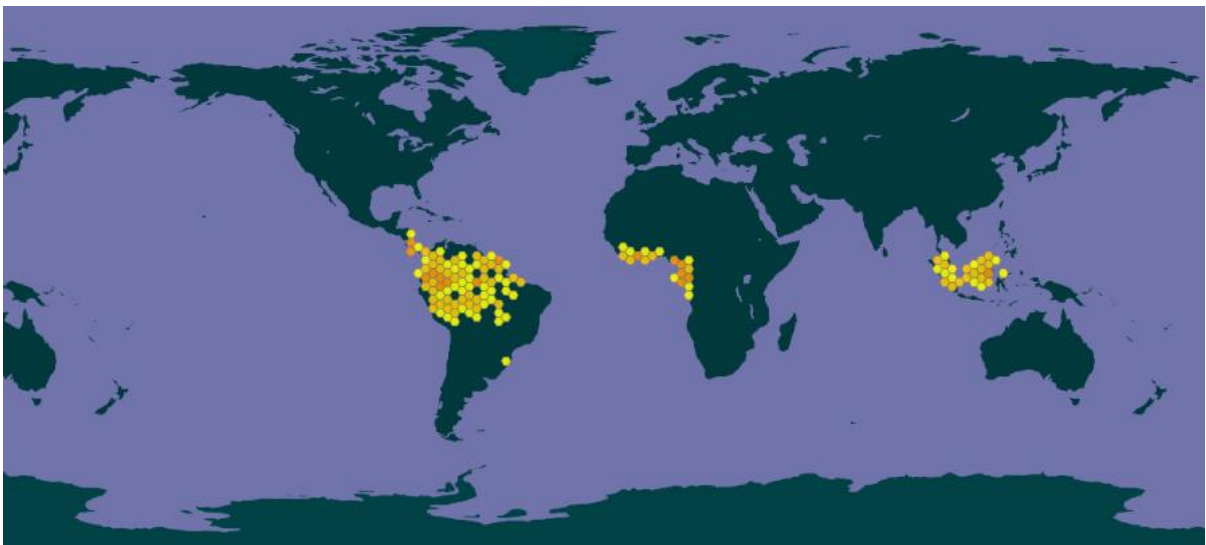
A berberina, por exemplo, é um importante fitoquímico com propriedades antibacterianas com potencial para o tratamento de infecções, interrompendo a colonização bacteriana ou a formação de biofilme através da ligação com proteínas amiloides (CHU et al., 2014). Cumarina, alicina, andrografolida, glabridina e vasicina acetato são alguns outros exemplos de fitoquímicos relatados com propriedades antibacterianas (GUPTA et al., 2008; IGNACIMUTHU e SHANMUGAM, 2010; KONTOGIORGIS, DETSI e HADJIPAVLOU-LITINA, 2012; SINGH, HUSSAIN e VERMA, 2013), bem como algumas classes de terpenoides (CANTRELL et al., 2001; TOGASHI et. al, 2010), fisalinas (PIETRO et al., 2000; JANÚARIO et al., 2002) e fenólicos (RANDHAWA et al., 2016; KLANCNIK et al., 2017).

Quanto aos métodos de triagem atualmente disponíveis para detecção da atividade antibacteriana de produtos naturais, estão inclusas técnicas qualitativas como ensaios de difusão em disco e ensaios semiquantitativos ou quantitativos como métodos de diluição (micro e macrodiluição em caldo). A técnica de microdiluição oferece diversas vantagens em relação a outras metodologias, tais como sensibilidade, confiabilidade, reprodutibilidade, economia de espaço, a capacidade de utilizar placas comerciais e sistemas automatizados de leitura e ainda ser acessível financeiramente. Consequentemente, a aplicação dessa técnica na avaliação da concentração inibitória mínima de drogas e compostos é amplamente difundida (SANTOS-FILHO et al., 2019). No entanto, faltam métodos padronizados para testes *in vitro* e pontos de interrupção para facilitar a interpretação adequada dos resultados, e em condições *in vivo* para garantir a seleção de substâncias eficazes com baixos efeitos colaterais adversos (BARBIERI et al., 2017).

## 2.6 Família Coulaceae

Coulaceae Tiegh. é uma das famílias recentemente segregadas de Olacaceae. A família inclui apenas três gêneros monotípicos que ocorrem nas áreas tropicais do globo: *Coula* Baill. (com *Coula edulis* Baill.), que ocorre no oeste da África; *Minquartia* Aubl. (com *M. guianensis* Aubl.), que ocorre na América Central e do Sul; e *Ochanostachys* Mast. (com *Ochanostachys amentacea* Mast.) que ocorre no oeste da Malásia (Figura 3) (NICKRENT et al., 2010; COSTA-LIMA e CHAGAS, 2023).

Figura 3 - Mapa da distribuição mundial da família Coulaceae



Fonte: Global Biodiversity Information Facility (2023)

### 2.6.1 Características químicas da família Coulaceae

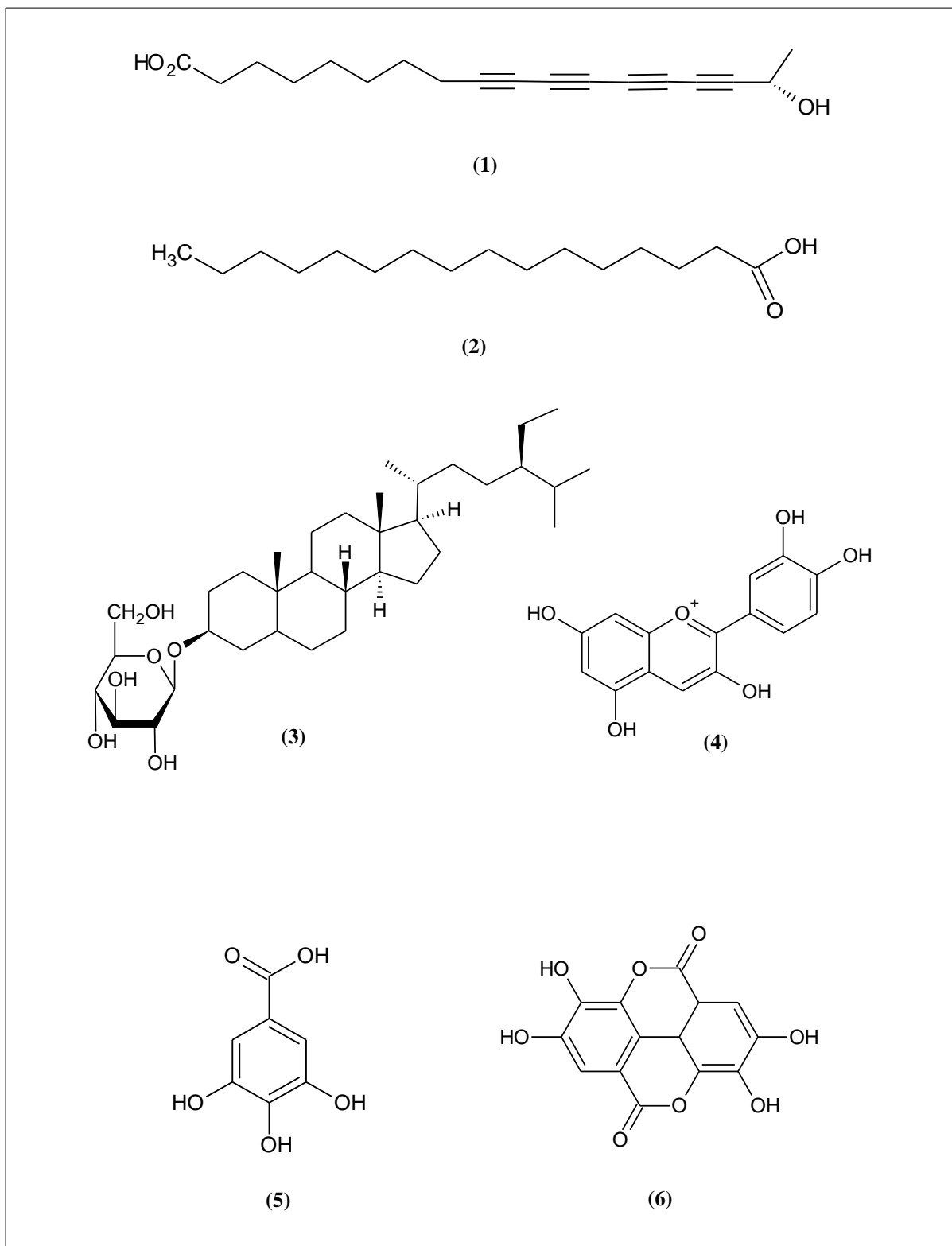
Na família Coulaceae já foi encontrado um poliacetileno denominado ácido minquartinoico (**1**) na espécie *Ochanostachys amentacea* (RASHID et al. 2001).

Já foram isolados do extrato DCM-MeOH das cascas do caule de *Coula edulis* o ácido *n*-hexadecanoide (**2**) e o 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de sitosterol (**3**) (TAMAKOU, 2011).

O estudo fitoquímico das cascas do caule de *C. edulis* também resultou no isolamento do ácido minquartinoico, bem como dos fenólicos cianidina (**4**), ácido gálico (**5**) e ácido elágico (**6**) (FORT et al., 2000).

Todas as estruturas químicas das substâncias isoladas das espécies pertencentes a Coulaceae podem ser vistas na Figura 4.

Figura 4 - Estruturas químicas das substâncias isoladas de espécies da família Coulaceae



### 2.6.2 Atividade biológica de espécies da família Coulaceae

Os extratos e as substâncias obtidas de espécies de Coulaceae possuem registros de atividades biológicas, como o ácido minquartinoico isolado de *Ochanostachys amentaceae* que apresentou atividade anti-HIV (RASHID et al., 2001). Também isolado de *M. guianensis* (MARLES, FARNSWORTH e NEILL, 1989) ele mostrou atividade frente ao *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* (RASMUSSEN et al., 2000).

Da espécie *C. edulis* o extrato etanólico das cascas do caule e de folhas foram ativos frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* e *C. albicans* (ADEBAYO-TAYO e AJIBESIN, 2008). O extrato metanólico das cascas do caule apresentou atividade atiplasmódica e citotóxica (ZOFOU et al., 2011). O extrato metanólico das sementes foi ativo frente a *E. coli* AG102 e *K. pneumoniae* K2a (32 µg/mL) (DZOTAM e KUETE, 2017). O extrato DCM-MeOH das cascas do caule apresentaram atividade antidermatofídica frente a *Microsporum audouinii* e *Trichophyton mentagrophytes*, desse extrato foram isolados as substâncias 3-O-β-D-glicopiranosídeo de sitosterol e a mistura de β-sitosterol, estigmasterol e ácido n-hexadecanoico que também apresentaram essa mesma atividade (TAMAKOU et al., 2011). O extrato aquoso e extrato em acetona das sementes apresentaram atividade em ensaio antioxidante de DPPH e Fe<sup>3+</sup>/fenantrolina (ITA e NDUKWE, 2017).

### 2.6.3 *Minquartia guianensis* Aubl.

*M. guianensis* (Figura 5), também conhecida popularmente por acariquara-roxa, acariquara, acari, é uma planta pertencente à família Coulaceae que tem ocorrência geográfica associada com florestas neotropicais. É encontrada na América Central: Nicarágua, Costa Rica e Panamá, em algumas ilhas do Caribe e no norte da América do Sul: nas Guianas, Suriname, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia e Brasil (Figura 6). As sinonímias dessa espécie são: *Eganthus poeppigi*, *Endusa punctata*, *Minquartia punctata*, *M. macrophylla*, *M. parvifolia* e *Secretania loranthacea* (CAMARGO e FERRAZ, 2004; COSTA-LIMA e CHAGAS, 2023).

Apresenta distribuição geográfica no Brasil nas regiões: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Maranhão) e Centro-oeste (Mato Grosso). Pode ser encontrada em floresta ciliar ou galeria, floresta de igapó e floresta de terra firme (ROSSI, 2015; COSTA-LIMA e CHAGAS, 2023).

O uso principal da *M. guianensis* provém de sua madeira, já que ela apresenta uma alta resistência mecânica e alta durabilidade mesmo em ambientes aquáticos, marinhos ou fluviais (RIBEIRO et al., 1999; CAMARGO e FERRAZ, 2004).



Figura 5 - *Minquartia guianensis*



Autor (2022)

Figura 6 - Distribuição geográfica da espécie *M. guianensis* no mundo



Fonte: Flora do Brasil (2023)

#### 2.6.4 Características químicas e biológicas da *M. guianensis*

Estudos com o extrato metanólico das cascas dessa espécie relatam a toxicidade contra *Artemia franciscana* (QUIGNARD et al., 2003). Outro estudo relata a atividade do extrato hidroalcoólico contra *Plasmodium falciparum* (RUIZ et al., 2011).

A partir do fracionamento do extrato clorofórmico das cascas do caule já foi descrito o isolamento do poliacetileno ácido (-)-17-hidroxi-9,11,13,15-octadecatetraenoico, também conhecido como ácido minquartinoico (7), que apresentou atividade citotóxica frente a células de leucemia linfocítica P-388 (MARLES, FARNSWORTH e NEILL, 1989). Essa substância também foi isolada das cascas do caule de *M. guianensis*, onde o ácido minquartinoico após ser submetido a um bioensaio frente a *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major*, agentes etiológicos da malária e leishmaniose, respectivamente, demonstrou atividade moderada *in vitro* (RASMUSSEN et al., 2000).

Em outro estudo com cascas do caule da *M. guianensis* é relatada a identificação da xantona lichexantona (8), e dos triterpenos: eritrodiol (9) e eritrodiol esterificado com ácidos graxos (10), betulina (11) e betulina esterificada com ácidos graxos (12), ácido minquartinoico, éter derivado do eritrodiol (13) e 13,28-epoxi-3-acetoxi-11-oleaneno (14) (EL-SEEDI et al., 1994). O estudo do extrato metanólico das cascas do caule descreveu o isolamento do triterpeno policarpol (15) (JAYASURIYA et al., 2005).

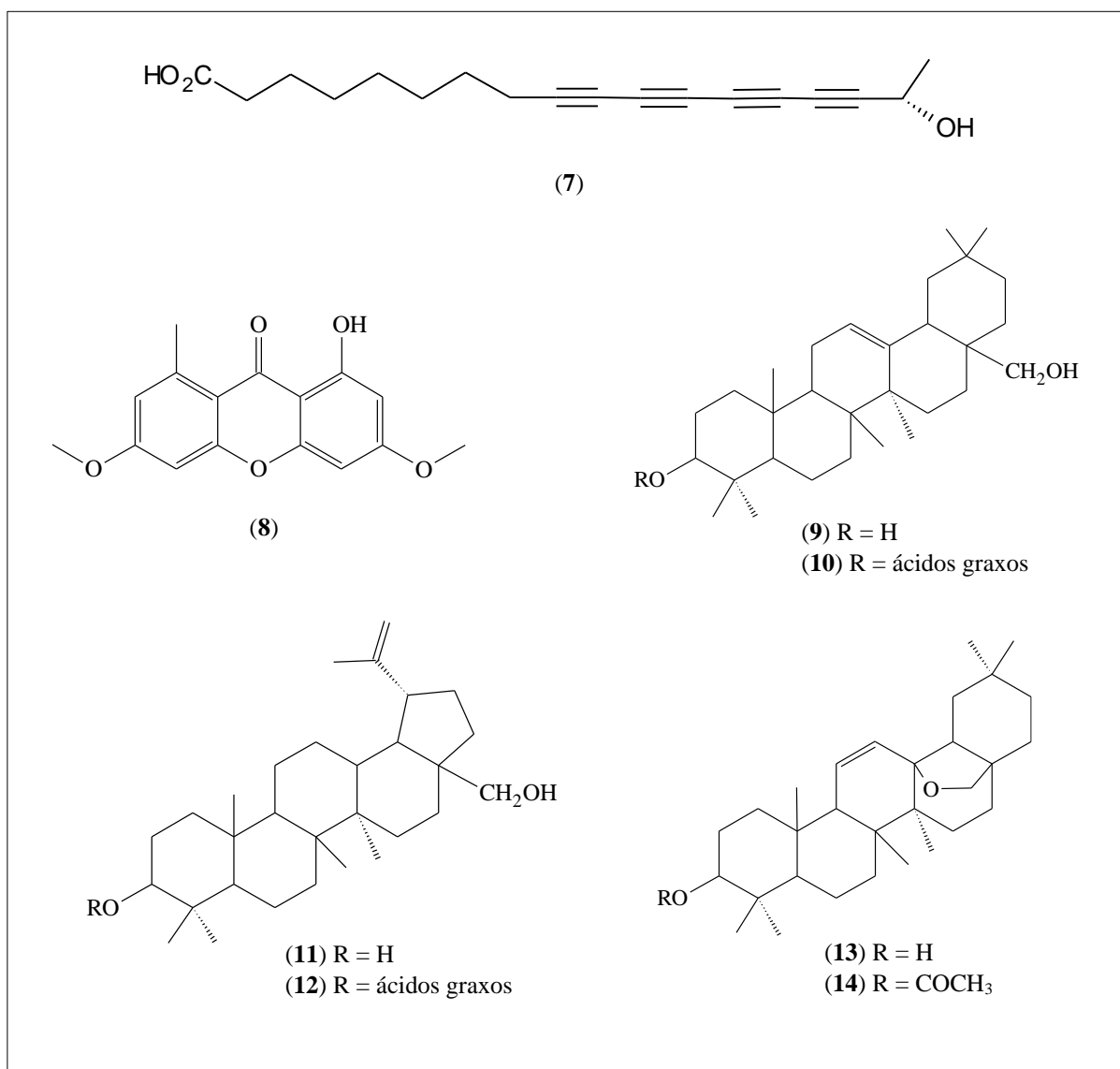
Os triterpenos lupeol (16), taraxerol (17), lupen-3-ona (18) e esqualeno (19) foram isolados do extrato diclorometânico das folhas de *M. guianensis* (CURSINO et al., 2009). O triterpeno ácido oleanólico (20) também foi isolado partir do extrato diclorometânico das folhas, e o extrato diclorometânico dos galhos possibilitou o isolamento do triterpeno 3 $\beta$ -metoxi-lup-20(29)-eno (21). O esqualeno e o taraxerol (previamente isolados) foram avaliados por ensaio *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, demonstrando uma atividade parcial como resultado (CURSINO et al., 2012). As estruturas químicas dessas substâncias podem ser visualizadas na Figura 7.

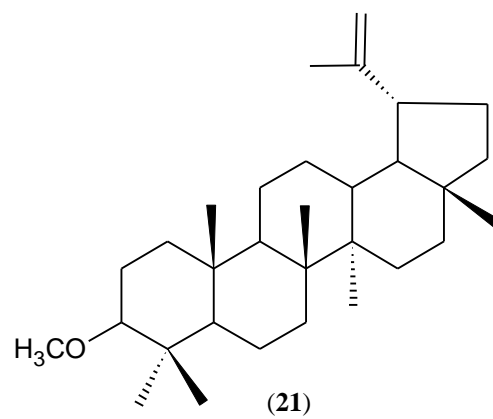
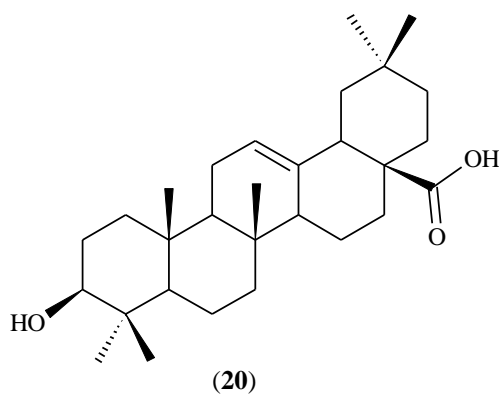
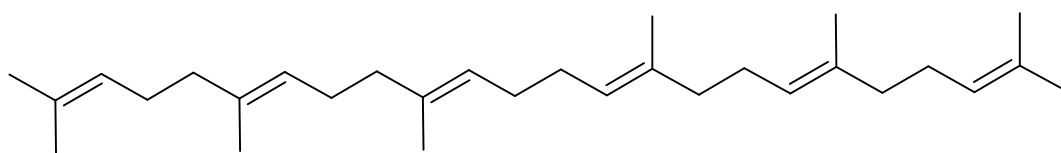
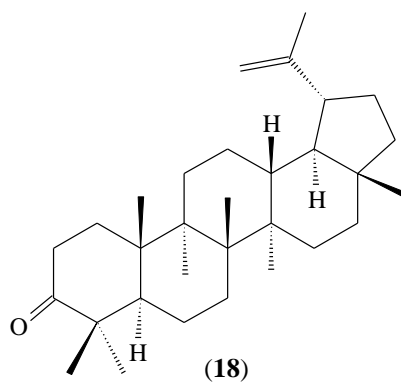
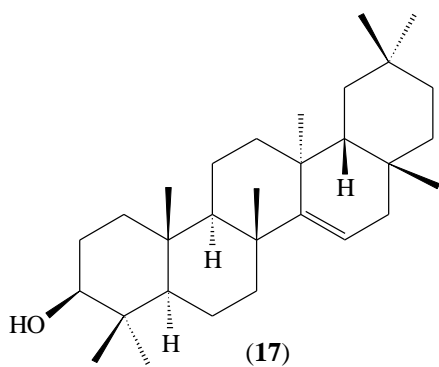
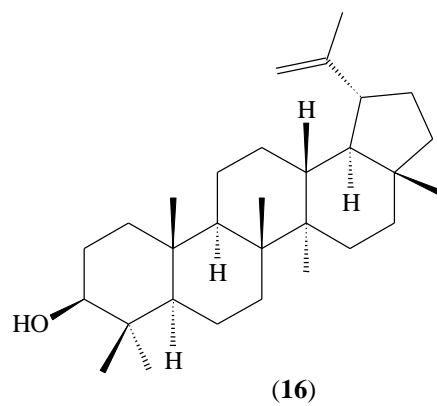
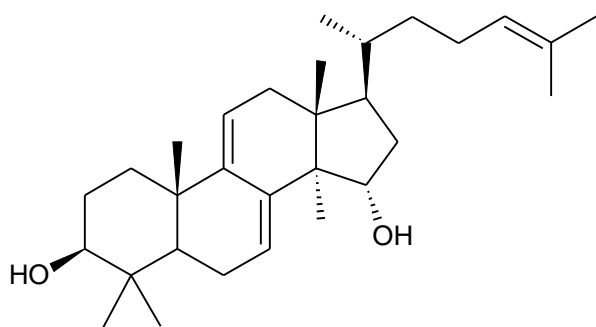
Os extratos hexânicos das folhas e galhos de *M. guianensis* também se mostraram ativos frente à *S. aureus* e o extrato metanólico dos galhos foi ativo frente à *Candida albicans* por meio da técnica de difusão em ágar. Por meio do método de microdiluição apresentaram CIM (concentração inibitória mínima) superior a 1 mg/mL para *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans* (CAMARGO, 2011).

Em outro estudo, o ácido minquartinoico isolado foi sugerido como sendo o responsável pelo potencial antifúngico contra o patógeno *Cryptococcus gattii* (CURSINO, 2011a). Cursino et al. (2011b) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de *M. guianensis* frente às

bactérias Gram-negativas (*Shigella flexneri* M90T, *Salmonella choleraesuis* 6958, *E. coli* E2348/69) e Gram-positivas (*S. aureus* 33591 e *S. aureus* 25923 sensíveis a metilina, *Bacillus cereus* 9634, *Bacillus liquefaciens*). O extrato que obteve maior desempenho de inibição sobre a maioria dos microrganismos testados foi o DCM das folhas. Desse extrato já haviam sido isolados quatro triterpenos, que não puderam ser testados devido à baixa quantidade de massa (CURSINO et al., 2009).

Figura 7 - Estruturas químicas de algumas substâncias isoladas da espécie *M. guianensis*





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Isolar substâncias bioativas dos extratos de *Minquartia guianensis* contra bactérias patogênicas de interesse clínico.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar o perfil químico dos extratos de folhas e galhos de *M. guianensis*.
- Avaliar a atividade dos extratos de *M. guianensis* frente a bactérias patogênicas.
- Isolar as substâncias presentes nos extratos ativos de *M. guianensis*.
- Identificar ou elucidar a estrutura química das substâncias isoladas de *M. guianensis*.

## 4 METODOLOGIA

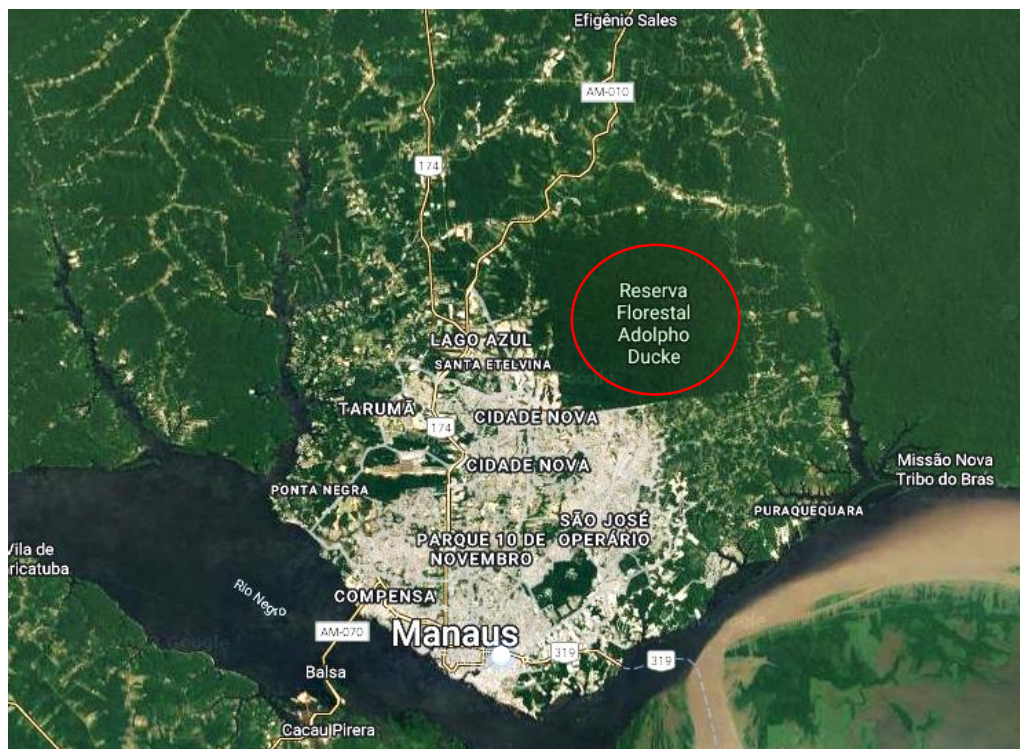
### 4.1 Procedimentos gerais

No presente projeto foi realizada a bioprospecção dos extratos de *M. guianensis*. Para isso, foi feita inicialmente a coleta da planta, extração com solventes orgânicos e avaliação dos extratos vegetais em ensaio antibacteriano. Os extratos ativos foram fracionados, e as substâncias isoladas e identificadas. Todo o desenvolvimento da metodologia foi realizado no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

### 4.2 Coleta do material vegetal

O material vegetal (folhas e galhos) foi coletado na Reserva Florestal A. Ducke (Figura 8), localizada no Km 26, rodovia AM 010, município de Manaus - AM, no dia 19 de dezembro de 2018, GPS: S 02°56.005' W 059°57.960'. Uma exsicata foi preparada e enviada para identificação taxonômica no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica (CPBO) do INPA, onde foi comparada com uma exsicata previamente depositada sob o número 179.806. O estudo conta com o registro SISGEN sob o número ACCD2F4.

Figura 8 - Imagem da área de coleta da Reserva Ducke

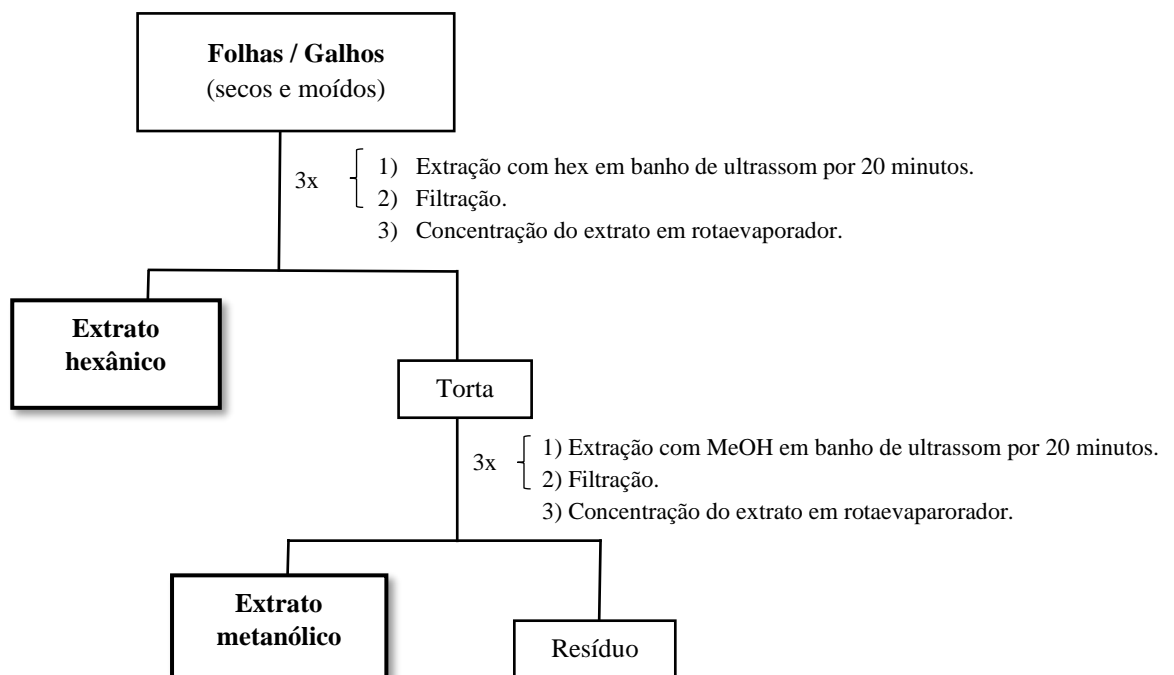


Google Maps (2023)

### 4.3 Preparo do material vegetal e obtenção dos extratos

Primeiramente o material vegetal foi separado em folhas e galhos. Posteriormente foram secos em estufa de circulação a 40 °C (TE – 394/2, Tecnal), as folhas foram moídas em moinho de facas (SL – 31, Solab) e os galhos em moinho de martelo (DPM – 4, Nogueira). Após essa etapa cada material seco e moído (1,3 kg de folhas e 1,2 kg de galhos) foi acondicionado em frascos Erlenmeyer e extraído em banho de ultrassom na frequência de 40 kHz (Unique, modelo Ultra Cleaner, Brasil), utilizando o solvente hexano (Hex) e em seguida metanol (MeOH) (Figura 9). Foram realizadas três extrações consecutivas com duração de 20 minutos para cada solvente utilizado. Após extração, o extraído obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (Fisatom, modelo 550, Brasil) a 60 rotações por minuto (rpm) sob a temperatura de 30 °C, posteriormente pesados em balança de precisão analítica.

Figura 9 - Fluxograma apresentando a metodologia geral utilizada para a obtenção dos extratos das folhas e dos galhos de *M. guianensis*



### 4.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos

Esse bioensaio foi realizado no próprio Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB) do INPA. As cepas utilizadas (Tabela 4) foram cedidas pelo Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz.

Tabela 4 - Cepas das bactérias utilizadas no ensaio antibacteriano e suas respectivas identificações

Coloração de Gram	Bactérias	Cepas
Gram-negativa	<i>Aeromonas hydrophila</i> (-)	CBAM 0162
	<i>Citrobacter freundii</i> (-)	CBAM 0702
	<i>Edwardsiella tarda</i> (-)	CBAM 1594
	<i>Escherichia coli</i> (-)	CBAM 0006
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	CBAM 0051
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	CBAM 0519
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (-)	CBAM 1352
	<i>Serratia marcescens</i> (-)	CBAM 0069
	<i>Salmonella enteridis</i> (-)	CBAM 6951
Gram-positiva	<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	CBAM 0026

#### Preparação do inóculo

Os microrganismos testes foram repicados em 10 mL de caldo *Müeller-Hinton* (MH), posteriormente a suspensão foi incubada durante um período de 16 a 24 h, para a reativação. Após turvação do caldo MH, foram preparadas as suspensões bacterianas ajustando-se a turbidez da cultura em caldo em crescimento ativo com solução salina estéril ou caldo, a concentração do inóculo foi padronizada comparando a turbidez com a solução padrão 0,5 da escala de McFarland em espectrofotômetro no  $\lambda$  625 nm (FENTOM – Cirrus 80ST), obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,10 equivalente a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

#### Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos pelo método de microdiluição em caldo

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços seguindo a metodologia adaptada da CLSI (2015). Após a padronização do inóculo, diluiu-se a suspensão em caldo na proporção de 1:20, para que após a inoculação cada poço contivesse aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Foi efetuada a diluição das amostras (10 mg) em DMSO a 2,5% na concentração de 1000  $\mu$ g/mL, em seguida 100  $\mu$ L de cada diluição dos extratos foram adicionados nos poços da placa em triplicata, cada poço foi inoculado com 10  $\mu$ L da suspensão bacteriana previamente preparada. Foi utilizado como controle positivo oxitetraciclina na concentração de 125  $\mu$ g/mL (antibiótico + microrganismo), como controle negativo (DMSO 2,5% + microrganismo) e como controle de esterilidade do caldo (três poços contendo apenas o caldo).



Após a inoculação das placas, foi feita uma primeira leitura de absorvância no  $\lambda$  de 625 nm em espectrofotômetro tipo ELISA (Thermo scientific, modelo Multiskan GO). Posteriormente as placas foram incubadas por 24 h a  $35 \pm 2$  °C em estufa de crescimento microbiano. Após o período de incubação foi feita uma segunda leitura no espectrofotômetro sob as mesmas condições da primeira. A atividade inibitória foi avaliada pela diferença das densidades ópticas entre as duas leituras. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) simples, seguido da comparação de média pelo teste Dunnet, considerando um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Também foi adicionado junto aos poços 40  $\mu$ L de revelador (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóleo) e aguardando 30 minutos em temperatura ambiente. Onde houvesse crescimento bacteriano, os poços seriam revelados em vermelho, e onde não houvesse crescimento, os poços permaneceriam incolores.

#### **4.5 Análises químicas dos extratos vegetais de folhas e galhos de *M. guianensis***

Os extratos brutos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) para se obter informações sobre as classes químicas presentes. Para isso, alíquotas dos extratos solubilizados (10 mg/mL) foram aplicadas, com auxílio de capilares de vidro, em placas cromatográficas de sílica gel (5 x 5 cm, da Alugram® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>). Posteriormente, as cromatoplasmas foram eluídas em cuba cromatográfica previamente saturada (por 5 a 10 min) com diferentes sistemas de solventes orgânicos em combinações binárias e conforme a polaridade da amostra.

Após a seleção do sistema de eluição mais eficiente, as cromatoplasmas foram observadas em câmara de luz ultravioleta (revelador físico) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) 254 e 365 nm, e em seguida reveladas com reagentes químicos como: anisaldeído sulfúrico para detecção de terpenos e outras classes, sulfato cérico [ $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ] para detecção de terpenos, cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ , solução etanólica 10%) para detecção de substâncias fenólicas, e NP/PEG (solução metanólica 1% de difenilboriloxietilamina/solução etanólica 5% de polietilenoglicol 4000) para confirmar a presença de flavonoides. Assim, conseqüentemente, foi possível estabelecer uma estratégia para a separação e purificação de suas substâncias.

Os extratos também foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  para se obter informações a respeito das classes químicas presentes, e dessa forma estabelecer uma estratégia para o fracionamento e purificação das moléculas.

## **4.6 Fracionamento do extrato metanólico dos galhos de *M. guianensis***

### **4.6.1 Partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de *M. guianensis***

Após análises por CCDC e do ensaio biológico, o extrato metanólico dos galhos foi submetido a técnica de partição líquido-líquido, visando uma semipurificação das substâncias em grupos de coeficientes de partição semelhantes.

A amostra foi solubilizada na proporção de 1:25 (1 g de extrato para 25 mL de solvente) numa mistura de MeOH e água destilada (1:1), sendo extraída três vezes com acetato de etila (AcOEt) e posteriormente concentrada em evaporador rotatório a 30 °C, resultando na fase AcOEt. Por fim, a fase hidrometanólica resultante foi seca em *SpeedVac*.

### **4.6.2 Fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico dos galhos**

Para a seleção da fase estacionária, uma pequena alíquota da fase AcOEt foi solubilizada em MeOH, analisada por CCDC em diferentes sistemas de solvente e diferentes reveladores químicos, e com base nas informações obtidas foi possível propor qual fase estacionária seria mais adequada para o fracionamento.

Foram realizados dois fracionamentos por cromatografia em coluna aberta (CCA) da fase AcOEt (5 g), utilizando duas colunas abertas empacotadas com Sephadex LH-20 (h x  $\phi$  = 47 cm x 3 cm).

No topo de cada coluna empacotada foram aplicados 2,5 g de fase AcOEt, seguida de eluição em modo isocrático com MeOH 100%. Foram coletadas 25 frações de 20 mL em cada coluna. Após análise do perfil químico por CCDC, as frações da primeira coluna foram reunidas com as suas equivalentes da segunda.

### **Refracionamento da fração Ga.FAc.F4-7**

A fração Ga.FAc.F4-7 (1,6 g) foi refracionada em coluna aberta de SiO<sub>2</sub> (Macherey-Negal, 0,04-0,063 mm/230-400 *mesh* ASTM) com os sistemas descritos na Tabela 5, foram coletadas 40 frações com volumes de 25-50 mL.

Todos os fracionamentos realizados a partir dessa fração podem ser observados na Figura 10, página 42.

Tabela 5 - Sistemas de solvente utilizados no refractionamento da fração Ga.FAc.F4-7

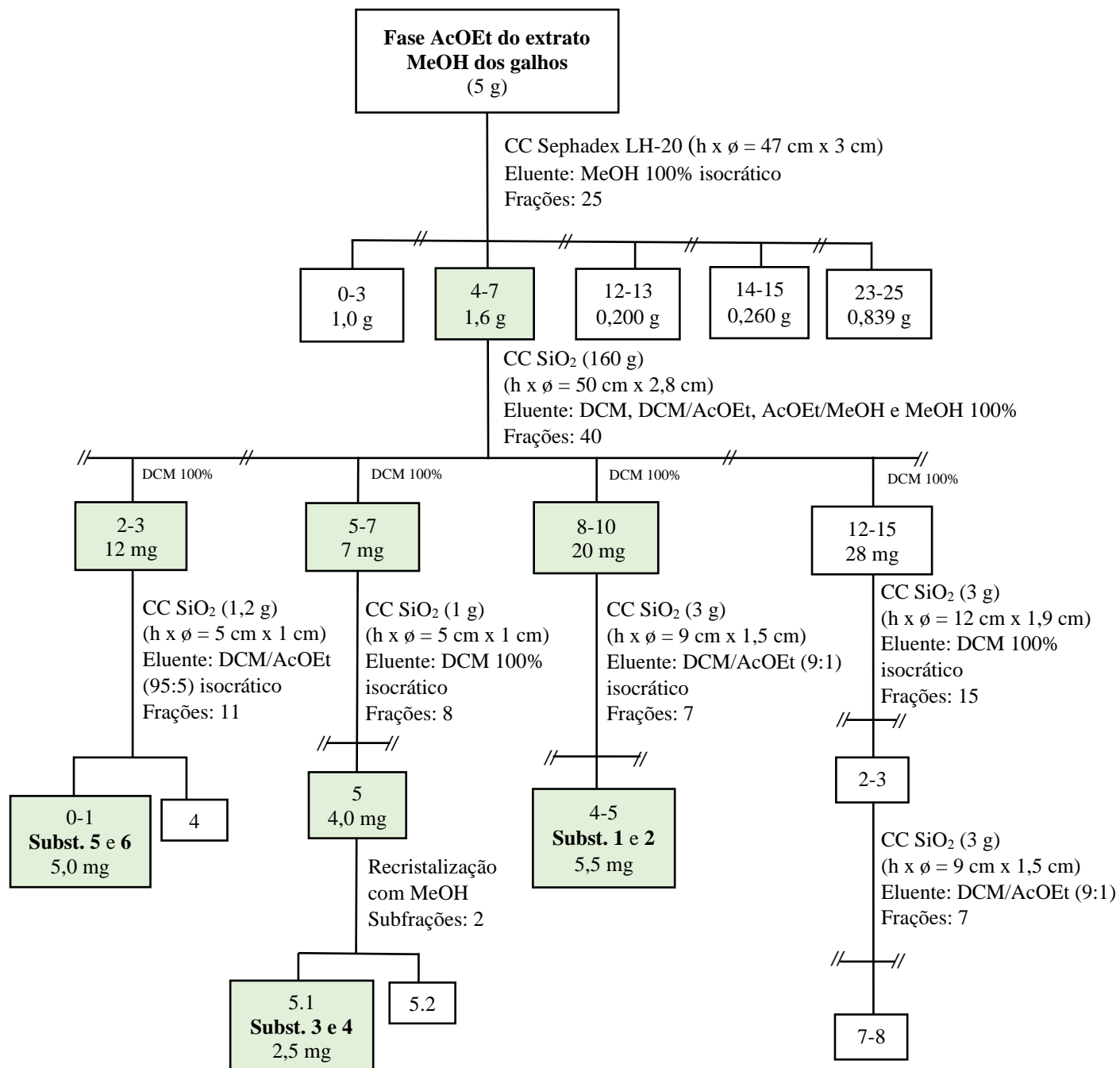
Sistemas	Frações coletadas
DCM 100%	F0-15
DCM/AcOEt (95:5)	F16-17
DCM/AcOEt (8:2)	F18-19
DCM/AcOEt (7:3)	F20-21
DCM/AcOEt (1:1)	F22-26
AcOEt 100%	F29-30
AcOEt/MeOH (7:3)	F31-37
AcOEt/MeOH (6:4)	F38-39
AcOEt/MeOH (1:1)	F40

A fração Ga.FAc.F4-7.F8-10 (20 mg) foi refractionada em coluna aberta de SiO<sub>2</sub>, resultando na coleta de 7 frações com volumes de 10 mL. Na análise de CCDC a fração **4-5** (5,5 mg) apresentou uma banda de coloração roxa em anisaldeído sulfúrico e lilás em Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, com R<sub>f</sub> = 0,48 (Figura 10). Após ser analisada por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, foi denominada como a mistura de **substâncias 1 e 2**.

A fração Ga.FAc.F4-7.F5-7 (7 mg) foi refractionada em coluna aberta de SiO<sub>2</sub>, da qual 8 frações de aproximadamente 5 mL foram coletadas. Após análise por CCDC, a fração **5** foi recristalizada, adicionando 0,5 mL de MeOH na amostra e em seguida a aquecendo até que os cristais solubilizassem. Posteriormente a fração foi mantida no freezer por 24 h e após esse tempo foi feita a coleta do sobrenadante com o auxílio de uma pipeta *pasteur*, resultando em duas subfrações: a subfração **5.1** (2,5 mg) que formou cristais brancos; e a subfração **5.2** (o sobrenadante coletado). Os cristais, após apresentarem um banda de coloração roxa (R<sub>f</sub> = 0,38) em anisaldeído e lilás em Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> na análise por CCDC, foram analisados por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e em seguida denominados como mistura das **substâncias 3 e 4**.

Após análise de CCDC, a fração Ga.FAc.F4-7.F2-3 (12 mg) foi refractionada em coluna aberta de SiO<sub>2</sub>, resultando em 11 frações de 5 mL. Na análise por CCDC, as frações **0-1** (5 mg) foram reunidas pois apresentaram uma banda de coloração amarela quando reveladas em anisaldeído. Essa fração foi enviada para análise de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e posteriormente denominada como a mistura de **substâncias 5 e 6**.

Figura 10 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos e obtenção das substâncias 1 a 6



### Refracionamento da fração Ga.FAc.F12-13

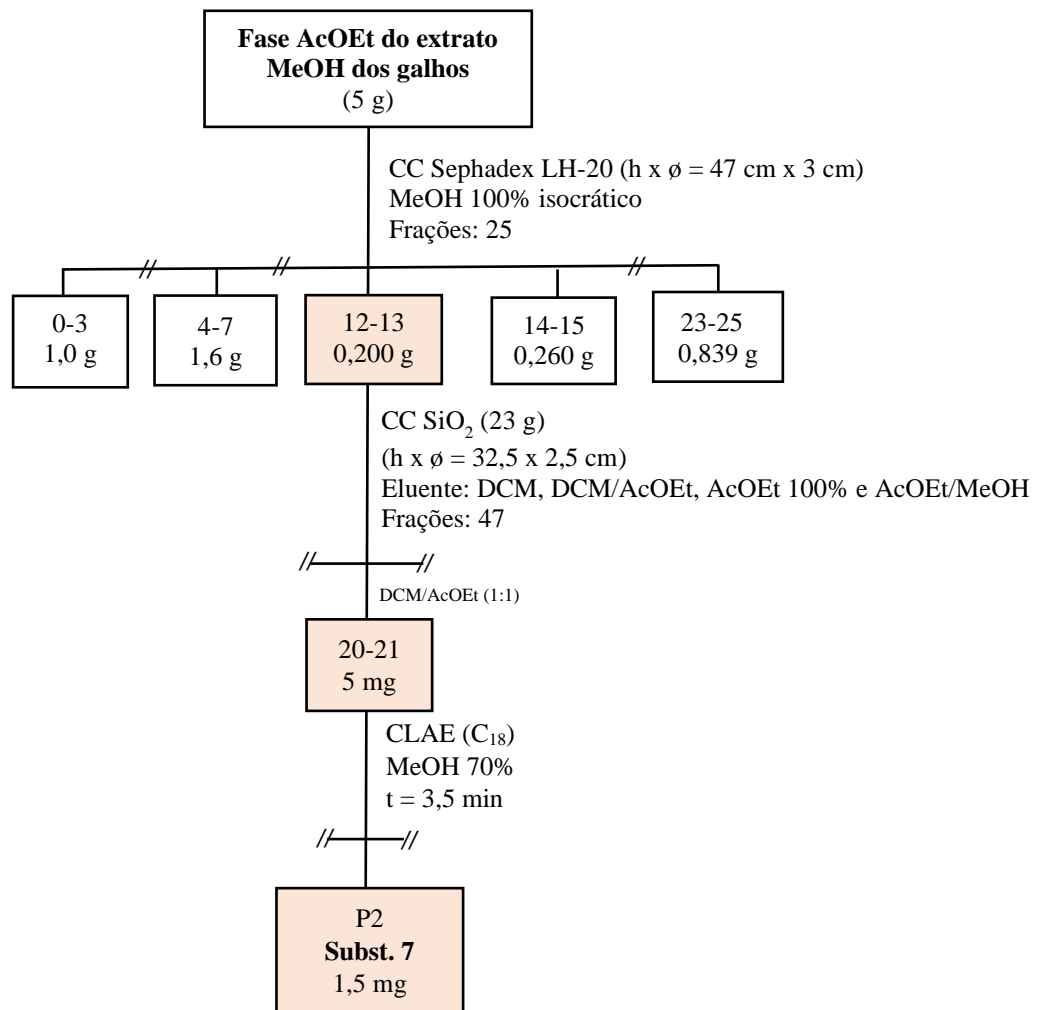
A fração reunida Ga.FAc.F12-13 (200 mg) foi refraçionada em coluna aberta de SiO<sub>2</sub> com os sistemas descritos na Tabela 6. Foram coletadas 47 frações com volumes de 25 mL, que forma analisadas por CCDC e reunidas.

Tabela 6 - Sistemas utilizados e frações coletadas no refraçionamento da fração Ga.FAc.F12-13

Sistemas	Frações coletadas
DCM 100%	F0-4
DCM/AcOEt (9:1)	F5-9
DCM/AcOEt (8:2)	F10-12
DCM/AcOEt (7:3)	F13-15
DCM/AcOEt (6:4)	F16-17
DCM/AcOEt (1:1)	F18-22
DCM/AcOEt (4:6)	F23-27
DCM/AcOEt (2:8)	F28-31
DCM/AcOEt (1:9)	F32-33
AcOEt 100%	F34-35
AcOEt/MeOH (9:1)	F36-40
AcOEt/MeOH (8:2)	F41-42
AcOEt/MeOH (7:3)	F43-44
AcOEt/MeOH (6:4)	F45-46
AcOEt/MeOH (1:1)	F47-48

Na análise por CCDC a fração 20-21 apresentou uma mancha escura de  $R_f = 0,51$  quando revelada com FeCl<sub>3</sub> e fluorescência intensa em NP/PEG quando observada em câmara de luz UV em 365 nm. Essa fração foi purificada por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) em coluna semipreparativa (250 x 10,0 mm) Luna 5 $\mu$  C<sub>18</sub>(2) 100A (Phenomenex), com fluxo analítico de 4,7 mL/min., MeOH 70% e pH 5, sendo a fração P2 denominada como **substância 7**, após análise RMN de <sup>1</sup>H uni e bidimensionais (Figura 11).

Figura 11 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos e obtenção da substância 7



### Refracionamento da fração Ga.FAc.F14-15

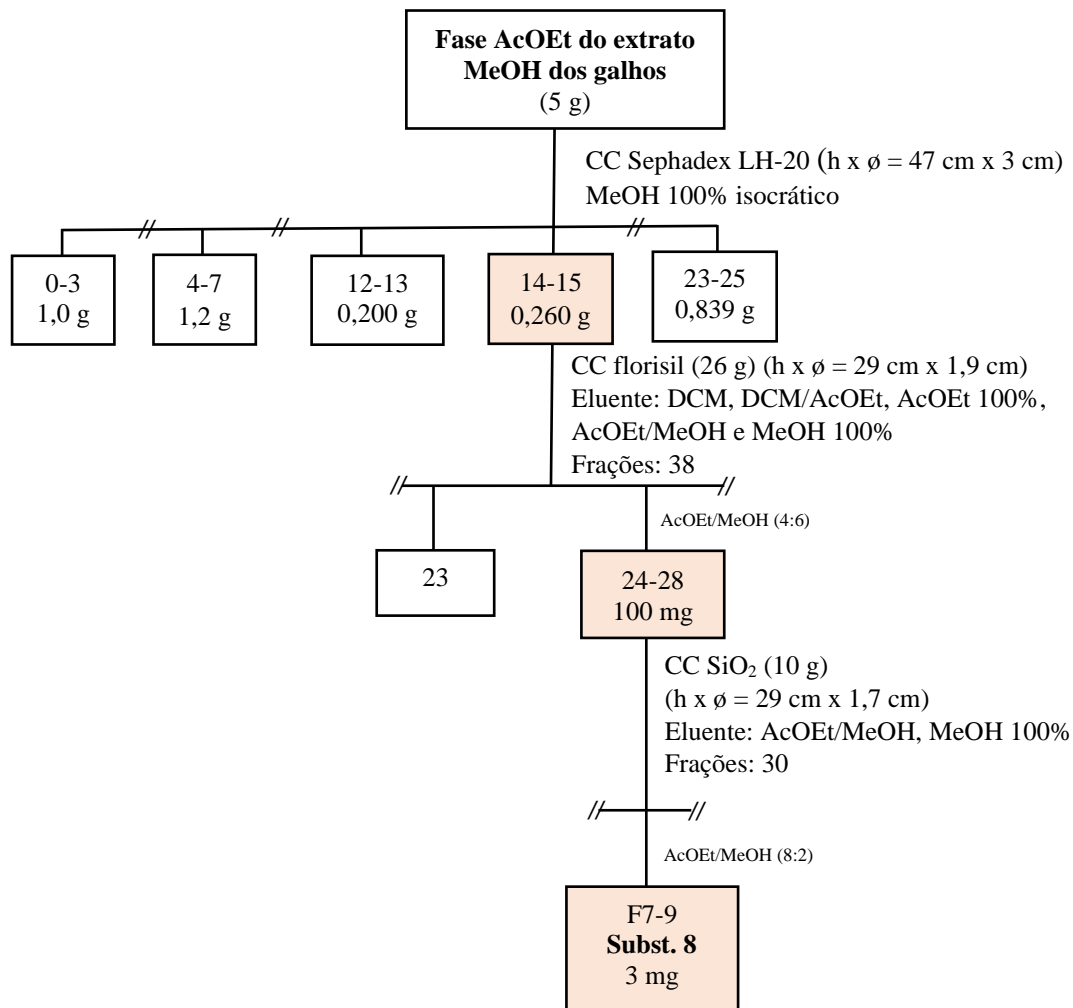
A fração Ga.FAc.F14-15 (260 mg) foi refracionada em uma coluna aberta de florisil (60-100 *mesh* – Macherey-Nagel) (Figura 12) com os sistemas de solvente descritos na Tabela 7. Foram coletadas 48 frações com volumes de 50 mL.

Tabela 7 - Sistemas utilizados e frações coletadas no refractionamento da fração Ga.FAc.F14-15

Sistemas	Frações coletadas
DCM 100%	F0-2
DCM/AcOEt (1:1)	F3-5
DCM/AcOEt (3:7)	F6-7
AcOEt 100%	F8-10
AcOEt/MeOH (9:1)	F11-13
AcOEt/MeOH (8:2)	F14-16
AcOEt/MeOH (7:3)	F17-19
AcOEt/MeOH (1:1)	F20-23
AcOEt/MeOH (4:6)	F24-28
AcOEt/MeOH (3:7)	F29-33
AcOEt/MeOH (2:8)	F34-38
AcOEt/MeOH (1:9)	F39-41
MeOH 100%	F42-48

Após análise por CCDC, a fração 24-27 (100 mg) foi refractionada em coluna aberta de SiO<sub>2</sub> com os sistemas AcOEt/MeOH (9:1) até MeOH 100%. Desse fracionamento, a fração **7-9** em análise por CCDC, apresentou uma mancha escura quando observada em câmara UV no comprimento de onda de 254 nm, uma mancha escura quando revelada com FeCl<sub>3</sub> e uma mancha de coloração vermelha em anisaldeído sulfúrico, R<sub>f</sub> = 0,58. Essa fração foi enviada para análise de RMN <sup>1</sup>H uni e bidimensionais, e posteriormente denominada como **substância 8**.

Figura 12 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos e obtenção da substância 8



#### 4.7 Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *M. guianensis*

##### 4.7.1 Partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas

Após análise por CCDC, o extrato metanólico das folhas foi submetido a uma partição líquido-líquido. Foram utilizados 20 g do extrato solubilizados na proporção 1:25 numa mistura de MeOH e água destilada (1:1). Foram feitas três extrações com AcOEt e posteriormente concentração da fase AcOEt em evaporador rotatório a 60 rpm sob a temperatura de 30 °C e posteriormente pesada em balança de precisão analítica. A fase hidrometanólica das folhas foi seca em *SpeedVac*. Ambas as fases foram analisadas por CCDC.



#### 4.7.2 Fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH das folhas

A fase AcOEt das folhas foi submetida a um fracionamento em coluna filtrante. A massa total dessa fase foi de 12,5 g, que foi dividida em três partes iguais com 4,16 g cada. Foram realizadas três colunas filtrantes com a massa dividida da fase AcOEt das folhas.

Em um funil de Büchner foram adicionados 254,2 g de SiO<sub>2</sub> em seguida foram aplicados 4,16 g da fase AcOEt das folhas, previamente prepara como pastilha (amostra + SiO<sub>2</sub>). Foram utilizados como fase móvel os sistemas DCM 100%, DCM/AcOEt (1:1), AcOEt 100%, AcOEt/MeOH (1:1) e MeOH 100%. Após o fracionamento com o auxílio de bomba a vácuo, foram coletadas 5 frações. Esse mesmo processo foi feito com as outras duas partes divididas da fase AcOEt das folhas, que foram reunidas com as frações equivalentes coletadas anteriormente. As cinco frações coletadas foram analisadas por CCDC e reveladas em câmara de luz UV 254 e 365 nm, e com os reagentes anisaldeído sulfúrico, Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e FeCl<sub>3</sub> e NP/PEG.

#### Refracionamento da fração Fo.FAc.F1-2

Após análise por CCDC, a fração Fo.FAc.F1-2 (657 mg) foi refracionada em coluna de Sephadex LH-20, utilizando como eluente MeOH 100% em modo isocrático. Foram coletadas 21 frações de 50 mL, as quais foram analisadas por CCDC. Desse fracionamento a fração 7-10 foi reunida e refracionada em uma coluna aberta de SiO<sub>2</sub> utilizando os sistemas de solvente descritos na Tabela 8. As 24 frações coletadas (volume de 30 mL) foram analisadas por CCDC.

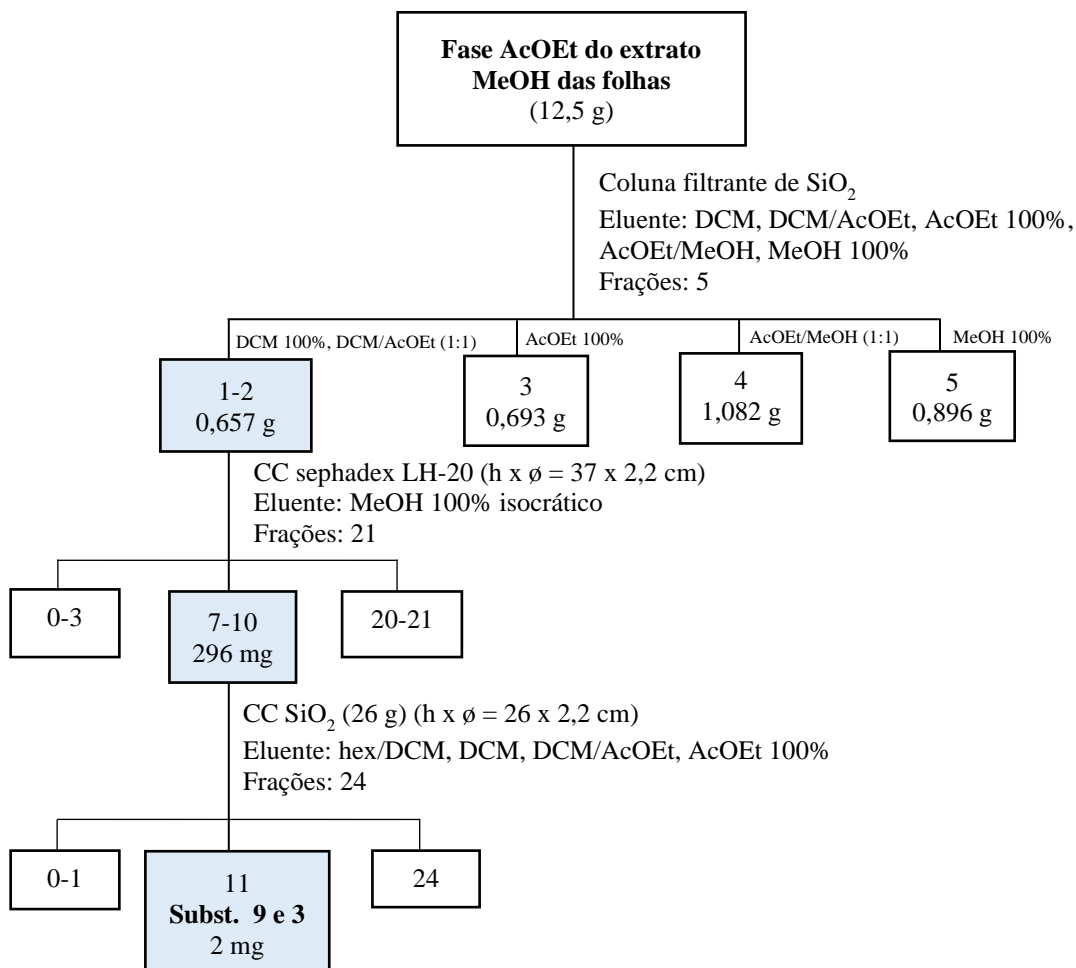
Tabela 8 - Sistemas utilizados e frações coletadas no refracionamento da fração 7-10

Sistemas	Frações coletadas
hex/DCM (1:1)	F0-8
hex/DCM (4:6)	F9-12
hex/DCM (3:7)	F13-14
hex/DCM (25:75)	F15-25
hex/DCM (2:8)	F26-38
hex/DCM (15:85)	F39-40
hex/DCM (1:9)	F41-43
DCM 100%	F46-47
DCM/AcOEt (95:5)	F48-49
DCM/AcOEt 9:1)	F50-57
DCM/AcOEt (8:2)	F58-59

DCM/AcOEt (7:3)	F60-62
DCM/AcOEt (1:1)	F63-64
AcOEt 100%	F65-70

Na análise por CCDC foi possível observar indícios da presença de terpenos na fração 11 quando revelada com anisaldeído sulfúrico, havendo formação de uma mancha de coloração lilás ( $R_f = 0,40$ ) na cromatoplaça (Figura 18). A fração 11 foi enviada para análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e depois denominada a mistura de substâncias **9** e **3**.

Figura 13 - Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH das folhas e obtenção da substância **9** e **3**.



## 4.8 Caracterização estrutural das substâncias isoladas

### 4.8.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As substâncias foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ , *Cambridge Isotope Laboratories*) e metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ , *Cambridge Isotope Laboratories*). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em equipamento Fourier 300 (*Bruker*) na Central analítica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  uni e bidimensionais como COSY (*Correlated Spectroscopy*) e HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$  [*Broad Band Decoupling (BBD)* e *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) 135°*]. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em unidades de partilha por milhão (ppm), e as constantes de acoplamentos (J) foram expressas em Hz para se referir às multiplicidades dos picos, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

### 4.8.2 Espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas na fonte de ionização ESI (*Eletron Spray Ionization*) nos modos positivo e negativo. As análises em LC-DAD-MS (Cromatografia Líquida Ultra Rápida Acoplada a Detector por Arranjo de Diodos e a Espectrômetro de Massas) foram obtidas pelo cromatógrafo Prominense UFLC (*Shimadzu*), equipado com bomba binária LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPDM-20A e injetor automático SIL-20A, assim como espectrômetro de massas MicroTOF-Q II (*Bruker*) de alta resolução.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento dos extratos das folhas e galhos de *M. guianensis*

Os rendimentos obtidos dos extratos brutos das folhas e dos galhos podem ser observados na Tabela 9. Os extratos metanólico de folhas e galhos apresentaram rendimentos acima de 4,5%, enquanto os extratos hexânicos tiveram rendimentos entre 0,6 e 1,1%. Esses rendimentos da extração corroboram com outros trabalhos desenvolvidos que utilizam solventes com essa polaridade. Pode-se destacar que os extratos metanólicos se sobressaem aos rendimentos dos extratos hexânicos devido a diferença na polaridade dos solventes, com o metanol possuindo maior grau de extração (TRUONG et al., 2019).

Tabela 9 - Rendimento dos extratos obtidos a partir da extração das folhas e dos galhos de *M. guianensis*

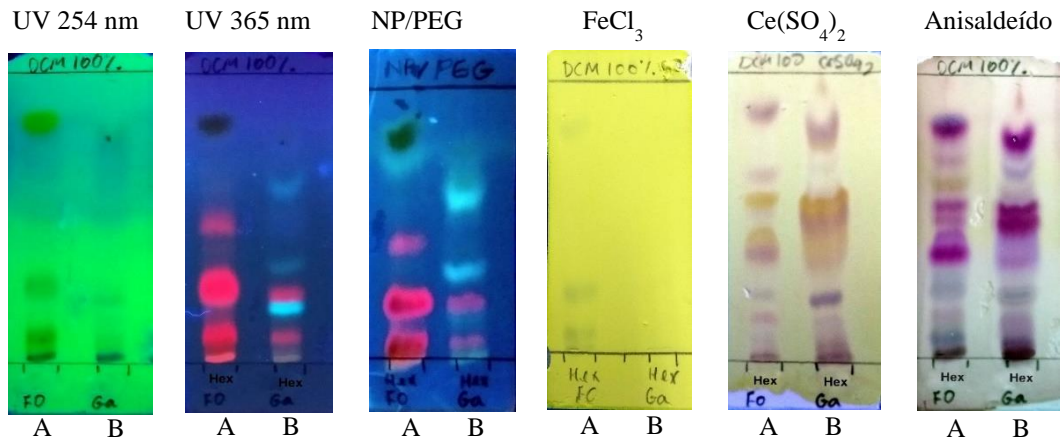
Material vegetal coletado	Material vegetal seco (kg)	Extrato	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas	1,4	Ext.Hex.Fo	15,6	1,11
		Ext.MeOH.Fo	86,0	6,14
Galhos	1,5	Ext.Hex.Ga	9,0	0,64
		Ext.MeOH.Ga	64,0	4,57

Ext.Hex.Fo: extrato hexânico das folhas; Ext.MeOH.Fo: extrato metanólico das folhas; Ext.Hex.Ga: extrato hexânicos dos galhos; Ext.MeOH.Ga: extrato metanólico dos galhos

### 5.2 Análise por CCDC dos extratos brutos das folhas e galhos de *M. guianensis*

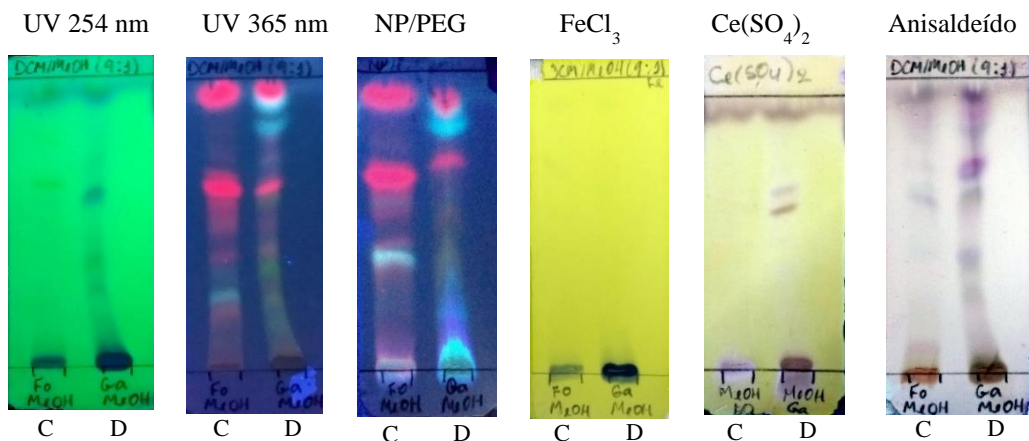
De acordo com a análise de CCDC (Figura 20), os extratos hexânicos das folhas e dos galhos possuem a presença de substâncias características de terpenos por apresentarem bandas de coloração roxa/lilás quando revelados com o reagente anisaldeído sulfúrico, e coloração roxa e laranja quando revelados com  $Ce(SO_4)_2$ . As fluorescências visualizadas em  $\lambda$  365 nm indicam a presença de moléculas com duplas ligações conjugadas. Quando esses extratos foram revelados com  $FeCl_3$  verificou-se que não há presença de substâncias fenólicas, pois não houve formação de mancha escura, característica nesse reagente quando há a presenças dessa classe de substâncias.

Figura 14 - Placas de CCDC dos extratos hexânicos das folhas e galhos de *M. guianensis*. (A) ext.Hex.Fo, (B) ext.Hex.Ga. Sistema: DCM 100%



Como observado na Figura 21, os extratos MeOH das folhas e dos galhos mostraram a presença de substâncias fenólicas quando revelados com  $\text{FeCl}_3$ , sendo possivelmente taninos hidrolisáveis pela cor azulada. Quando reveladas com NP/PEG foi observado a possível presença de flavonoides, pois ao analisar sob luz UV  $\lambda$  365 nm observou-se intensificação das fluorescências ao longo da cromatoplaca. Os extratos, principalmente o MeOH dos galhos, ao serem revelados com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  e anisaldeído sulfúrico apresentaram algumas bandas de coloração roxa/lilás, indicando possivelmente a presença de terpenos.

Figura 15 - Placas de CCDC dos extratos metanólicos das folhas e galhos de *M. guianensis*. (C) ext.MeOH.Fo, (D) ext.MeOH.Ga. Sistema: DCM/MeOH (9:1)

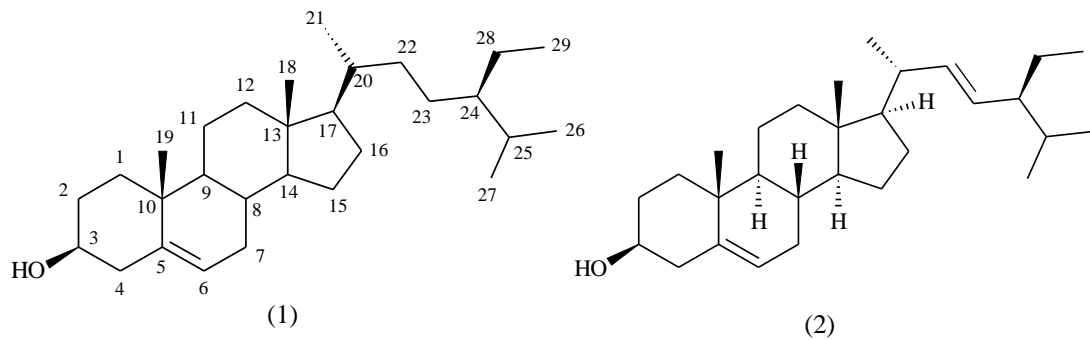


### 5.3 Identificação das substâncias isoladas

#### 5.3.1 Esteroides

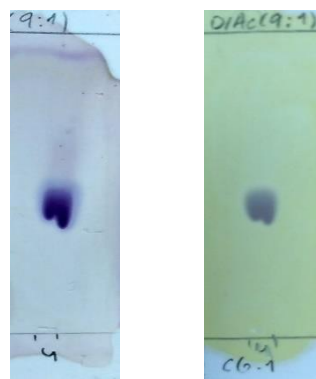
##### 5.3.1.1 Substâncias 1 e 2: $\beta$ -sitosterol e estigmasterol

Figura 16 - Estrutura das substâncias (1)  $\beta$ -sitosterol e (2) estigmasterol



A mistura das substâncias **1** e **2** foi obtida da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos como cristais brancos. Na análise por CCDC foi observada uma macha roxa/lilás em anisaldeído sulfúrico e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , com  $R_f = 0,48$  (Figura 17).

Figura 17 - Cromatoplaças de CCDC da fração 4 reveladas em anisaldeído sulfúrico (esquerda) e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (direita). Sistema: DCM/AcOEt (9:1)



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18) apresentou sinais nas regiões entre  $\delta$  0,69 a 2,33, referentes a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, característicos de triterpenos e esteroides, com a presença do sinal em  $\delta$  0,69, um simpleto largo com integral para três hidrogênios, que é característico dos esteroides estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Apresentou

também um multiplete em  $\delta$  3,52 atribuído a um hidrogênio ligado a carbono carbinólico, H-3 de ambos os esteroides. Em  $\delta$  5,35 (2H, *dl*,  $J = 5,1$  Hz), atribuído ao hidrogênio olefínico na posição H-6 de ambos os esteroides, e ainda dois duplos dupletos em  $\delta$  5,15 (1H,  $J = 15,2$  e  $8,4$  Hz) e em  $\delta$  5,01 (1H, *dd*,  $J = 15,2$  e  $8,6$  Hz) referentes aos hidrogênios H-22 e H-23 do esteroide estigmasterol, diferenciando-se assim o  $\beta$ -sitosterol. A comparação dos dados espectroscópicos (Tabela 10) obtidos com os descritos na literatura permitiu confirmar que se tratava da mistura constituída pelos esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (PEDROZA et al., 2020).

As percentagens aproximadas dos dois constituintes na mistura foram calculadas com base na integração dos sinais correspondentes a H-6 e H-22 e H-23, e permitiram deduzir que a mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol está na proporção (1,5:1).

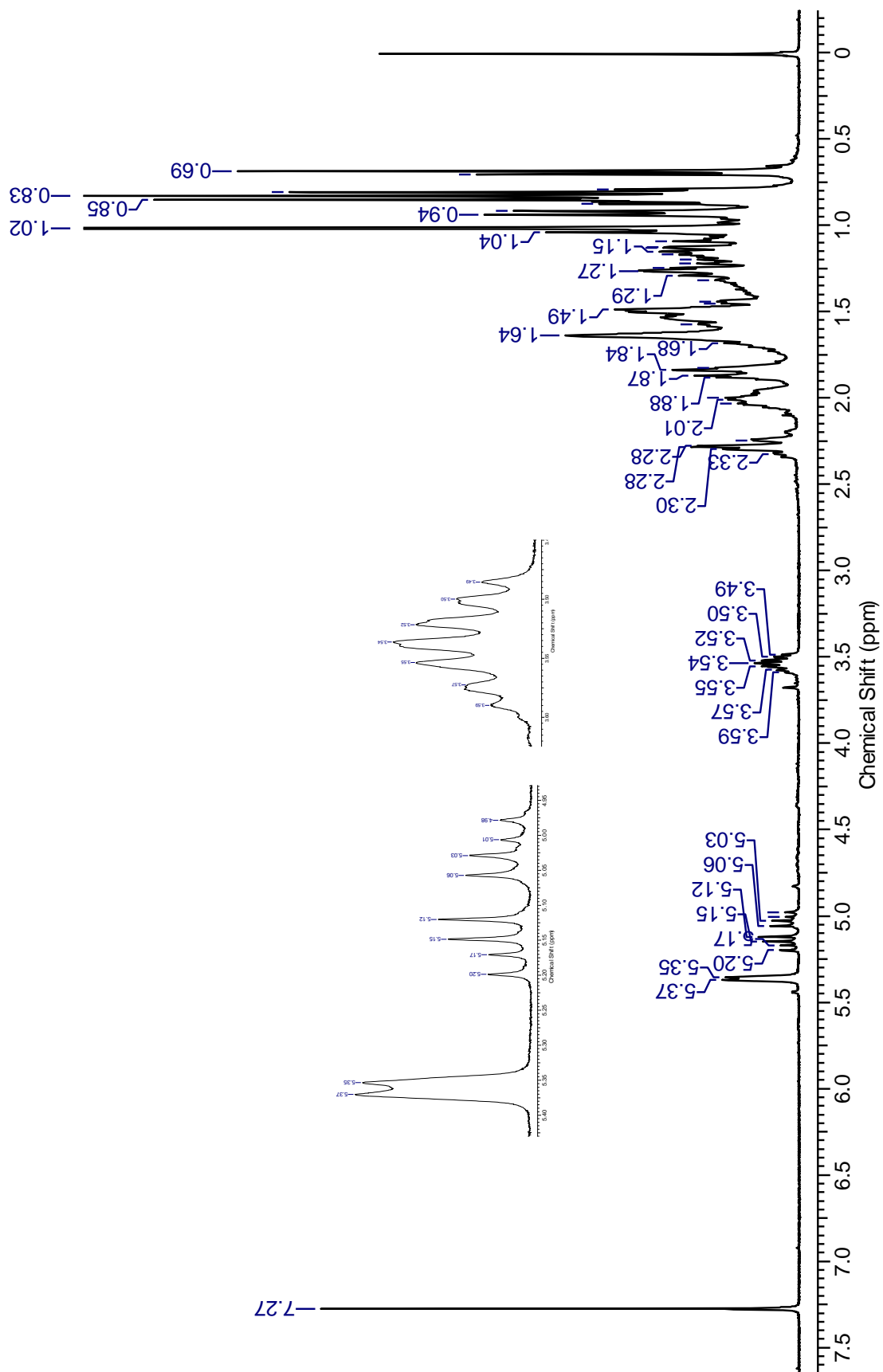
Tabela 10 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias  $\beta$ -sitosterol (1) e estigmasterol (2) comparados com a literatura em  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz (PEDROZA et al., 2020)

Hidrogênios	1 - $\delta\text{H}$	2 - $\delta\text{H}$	$\delta\text{H}$
	Observado	Observado	Literatura
Hidrogênios metílicos H-19	( <i>s</i> ) 0,69	( <i>s</i> ) 0,69	( <i>s</i> ) 0,69
H-3	( <i>m</i> ) 3,52	( <i>m</i> ) 3,52	( <i>m</i> ) 3,52
H-6	( <i>dl</i> ) 5,35	( <i>dl</i> ) 5,35	( <i>dl</i> ) 5,35
H-22	-	( <i>dd</i> ) 5,15	( <i>dd</i> ) 5,15
H-23	-	( <i>dd</i> ) 5,01	( <i>dd</i> ) 5,01

Revisões de numerosas espécies de plantas e metabólitos ativos com atividade antimicobacteriana, indicam o  $\beta$ -sitosterol e o estigmasterol como componentes fitoquímicos importantes nesse processo (CHINSEMBU, 2016; TIWARI et al., 2019).

A capacidade de inibição do crescimento de *M. tuberculosis* já foi relatada na literatura com CIM de 25 e 100  $\mu\text{g/mL}$  para  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, respectivamente (SUJA, 2017); CIM de 128  $\mu\text{g/mL}$  para  $\beta$ -sitosterol e 32  $\mu\text{g/mL}$  para estigmasterol (SALUDES et al., 2002). Lozano et al. (2020) relatam o isolamento e identificação da mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol a partir de um extrato AcOEt de calos friáveis, o qual foi ativo contra *M. tuberculosis*.

Figura 18 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura dos esteroides  $\beta$ -sitosterol (1) e estigmasterol (2) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz).

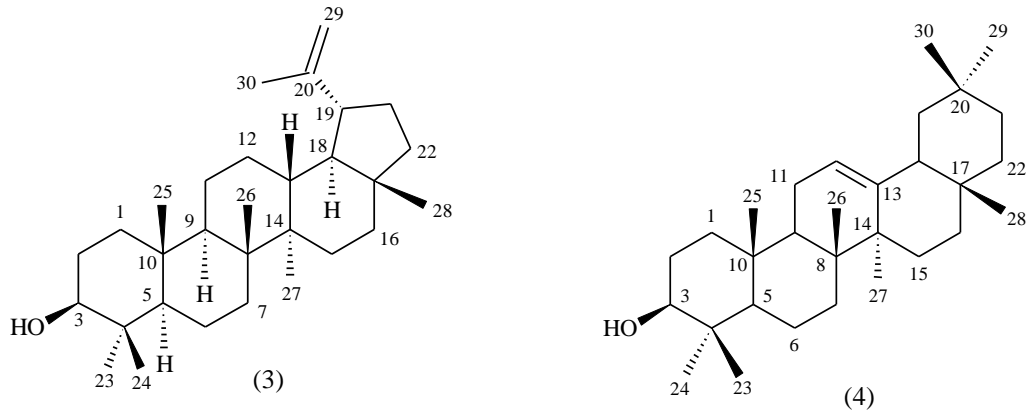




### 5.3.2 Triterpenos

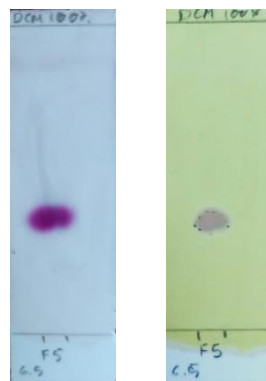
#### 5.3.2.1 Substâncias 3 e 4: Lupeol e $\beta$ -amirina

Figura 19 - Estrutura das substâncias lupeol (3) e  $\beta$ -amirina (4)



A mistura das substâncias **3** e **4** foi obtida da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos como cristais brancos. Na análise por CCDC foi observada uma mancha roxa/lilás em anisaldeído sulfúrico e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , com  $R_f = 0,38$  (Figura 20).

Figura 20 - Cromatoplasas de CCDC da fração 5 revelada em anisaldeído sulfúrico (esquerda) e  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (direita). Sistema: DCM 100%



Para o triterpeno **3**, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 21), foi possível observar seis simples em  $\delta$  0,76, 0,79, 0,83, 0,94, 0,97 e 1,03, característicos de hidrogênios de metilas. Foi observado outro simpleto em  $\delta$  1,68 indicativo de hidrogênios de metilas ligado ao carbono insaturado. Outros sinais em destaque são um duplete em  $\delta$  4,69 (1H, *d*,  $J = 2,4$  Hz) e um duplo

duplete em  $\delta$  4,57 (1H, *dd*,  $J = 2,4$  Hz) referentes aos hidrogênios vinílicos H-29 da ligação dupla terminal, e um sinal em 3,19 (*m*, 1H) atribuído ao H-3 e característico de um hidrogênio carbinólico indicando a presença da configuração  $\beta$  da OH do lupeol. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 26) e DEPT 135° (Figura 27) foi possível verificar a presença de sete carbonos metílicos, onze metilênicos e seis metínicos. Um sinal em  $\delta$  79,0 confirmou a presença de carbono metínico oxigenado, o sinal em  $\delta$  151,0 foi atribuído ao carbono quaternário C-20 e em  $\delta$  109,3 foi atribuído ao carbono terminal C-29, característicos de triterpenos com esqueleto lupano (CURSINO et al., 2009).

O triterpeno **4**, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 21), apresentou um sinal em  $\delta$  5,18 (*t*, 1H,  $J = 3,6$  Hz) referente ao hidrogênio olefínico (H-12) enquanto outro sinal em  $\delta$  3,18 (*dd*,  $J = 11,0$  e  $5,0$  Hz) foi atribuído a H-3 indicando a presença de outro triterpeno oleanano. Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 22) e DEPT 135°  $^{13}\text{C}$  (Figura 23) apresentaram sinais em  $\delta$  79,0 de C-3 e na região dos olefínicos foram observados dois sinais em  $\delta$  145,2 (C) e 121,7 (CH), indicando a presença da  $\beta$ -amirina (SHAN et al., 2014).

A comparação dos dados de RMN com os da literatura (Tabela 11 e 12) possibilitou identificar as substâncias como sendo a mistura dos triterpenos: lupeol e  $\beta$ -amirina. Esta identificação foi baseada na metodologia que indica que sinais de intensidades semelhantes são da mesma substância (OLEA e ROQUE, 1990).

O lupeol é considerado um dos mais abundantes triterpenos, sendo identificado em diferentes espécies de plantas conhecidas, incluindo a *M. guianensis* (CURSINO et al., 2009; PUEBLA et al., 2010; SIDDIQUE e SALEEM, 2011; OLIVEIRA et al., 2016, BESERRA et al., 2018). Essa substância apresenta uma importante relevância, devido ao seu amplo espectro de atividades farmacológicas, como atividade antibacteriana (PATIL et al., 2018). De acordo com pesquisas já realizadas e associadas a recentes estudos, a síntese química do lupeol melhora sua bioatividade para obtenção de substâncias promissoras e propriedades desejáveis (MOLINOWSKA et al., 2019).

A  $\beta$ -amirina é um dos metabólitos mais importantes da classe dos triterpenos, sendo mais potente que a aspirina, inibindo a agregação plaquetária induzida por colágeno. Além disso, a  $\beta$ -amirina possui aplicações que incluem cuidados com a pele, anti-irritante, ação anti-inflamatória, bem como potencializador do fator de proteção em protetores solares orgânicos, efeito emoliente e atividade antibacteriana (KWEIFIO-OKAI et al., 1995; CHING et al., 2010). Na família Coulaceae essa é a primeira vez que a  $\beta$ -amirina está sendo relatada.

Tabela 11 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) da substância lupeol (**3**) comparados com a literatura, ambos obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2009)

<b>Posição</b>	<b><math>\delta\text{c}</math> Observado</b>	<b><math>\delta\text{c}</math> Literatura</b>	<b>DEPT</b>
<b>1</b>	38,7	38,7	$\text{CH}_2$
<b>2</b>	27,4	27,4	$\text{CH}_2$
<b>3</b>	79,0	78,9	CH
<b>4</b>	38,8	38,8	C
<b>5</b>	55,2	55,3	CH
<b>6</b>	18,3	18,3	$\text{CH}_2$
<b>7</b>	34,2	34,2	$\text{CH}_2$
<b>8</b>	40,8	40,8	C
<b>9</b>	50,4	50,4	CH
<b>10</b>	37,1	37,1	C
<b>11</b>	20,9	20,9	$\text{CH}_2$
<b>12</b>	25,1	25,1	$\text{CH}_2$
<b>13</b>	38,0	38,0	CH
<b>14</b>	42,8	42,8	C
<b>15</b>	27,4	27,4	$\text{CH}_2$
<b>16</b>	35,5	35,5	$\text{CH}_2$
<b>17</b>	42,8	43,0	C
<b>18</b>	48,2	48,0	CH
<b>19</b>	47,9	47,9	CH
<b>20</b>	151,0	150,9	C
<b>21</b>	29,8	29,8	$\text{CH}_2$
<b>22</b>	39,9	40,0	$\text{CH}_2$
<b>23</b>	27,9	28,0	$\text{CH}_3$
<b>24</b>	15,3	15,4	$\text{CH}_3$
<b>25</b>	16,1	16,1	$\text{CH}_3$
<b>26</b>	15,9	15,9	$\text{CH}_3$
<b>27</b>	14,5	14,5	$\text{CH}_3$
<b>28</b>	18,0	18,0	$\text{CH}_3$
<b>29</b>	109,3	109,3	$\text{CH}_2$
<b>30</b>	19,3	19,3	$\text{CH}_3$

Tabela 12 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) da substância  $\beta$ -amirina (**4**) comparados a literatura, ambos obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz (SHAN et al., 2014)

Posição	$\delta\text{c}$ Observado	$\delta\text{c}$ Literatura	DEPT
1	38,7	38,3	CH <sub>2</sub>
2	27,4	27,3	CH <sub>2</sub>
3	79,0	79,1	CH
4	38,5	39,9	C
5	55,2	55,3	CH
6	18,3	18,5	CH <sub>2</sub>
7	32,6	32,7	CH <sub>2</sub>
8	38,8	38,9	C
9	47,6	47,7	CH
10	37,1	37,0	C
11	23,6	23,6	CH <sub>2</sub>
12	121,7	121,8	CH
13	145,2	145,3	C
14	41,7	41,8	C
15	26,1	26,2	CH <sub>2</sub>
16	26,9	27,0	CH <sub>2</sub>
17	32,4	32,6	C
18	47,2	47,2	CH
19	46,8	46,9	CH <sub>2</sub>
20	31,0	31,2	C
21	34,7	34,8	CH <sub>2</sub>
22	37,1	37,2	CH <sub>2</sub>
23	28,4	28,2	CH <sub>3</sub>
24	15,5	15,7	CH <sub>3</sub>
25	15,6	15,6	CH <sub>3</sub>
26	16,7	16,9	CH <sub>3</sub>
27	26,0	26,1	CH <sub>3</sub>
28	28,4	28,5	CH <sub>3</sub>
29	33,3	33,5	CH <sub>3</sub>
30	23,6	23,8	CH <sub>3</sub>

Figura 21 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura dos triterpenos lupeol (3) e  $\beta$ -amirina (4) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz)

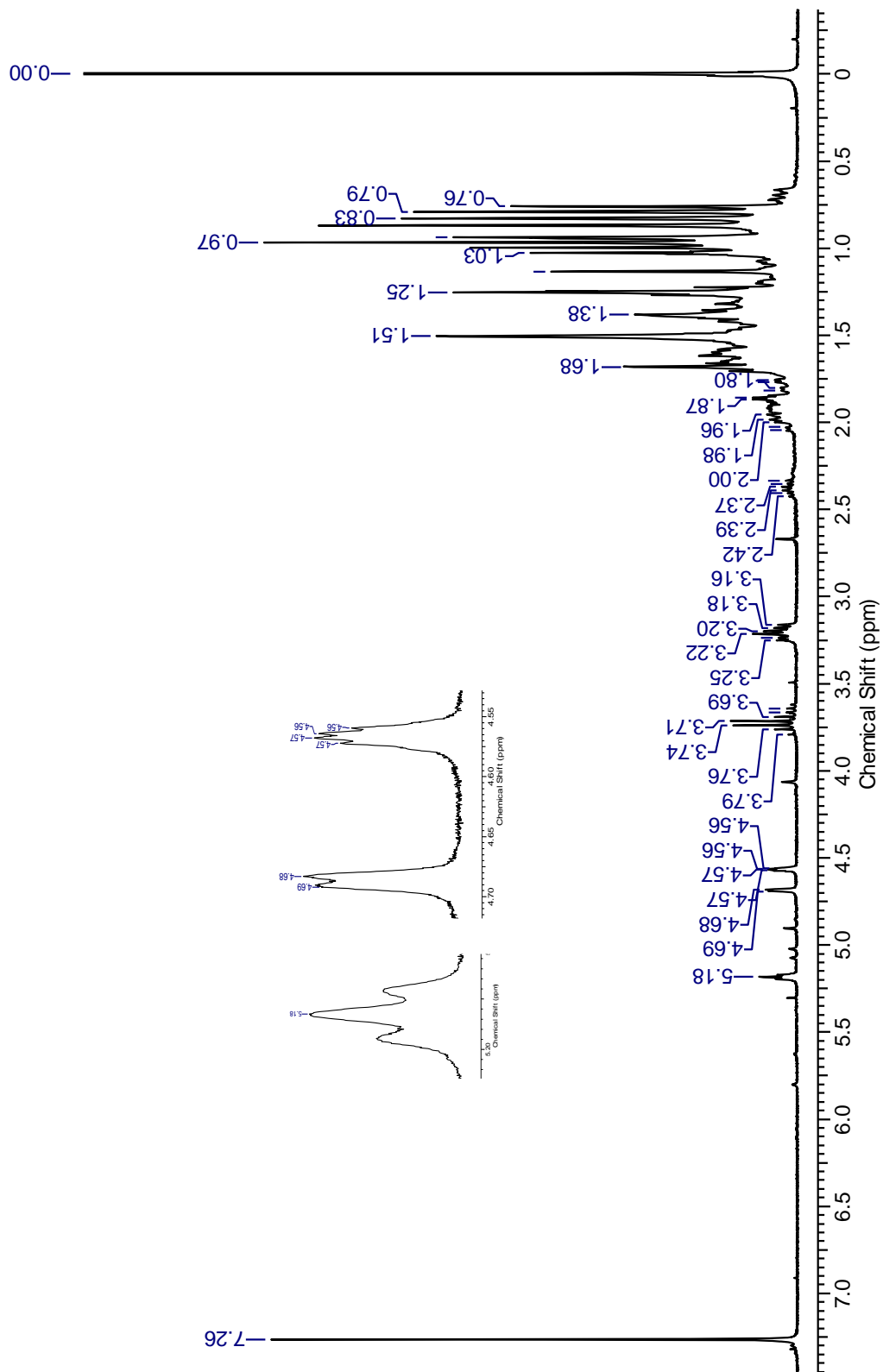


Figura 22 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de triterpenos lupeol (3) e  $\beta$ -amirina (4) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz)

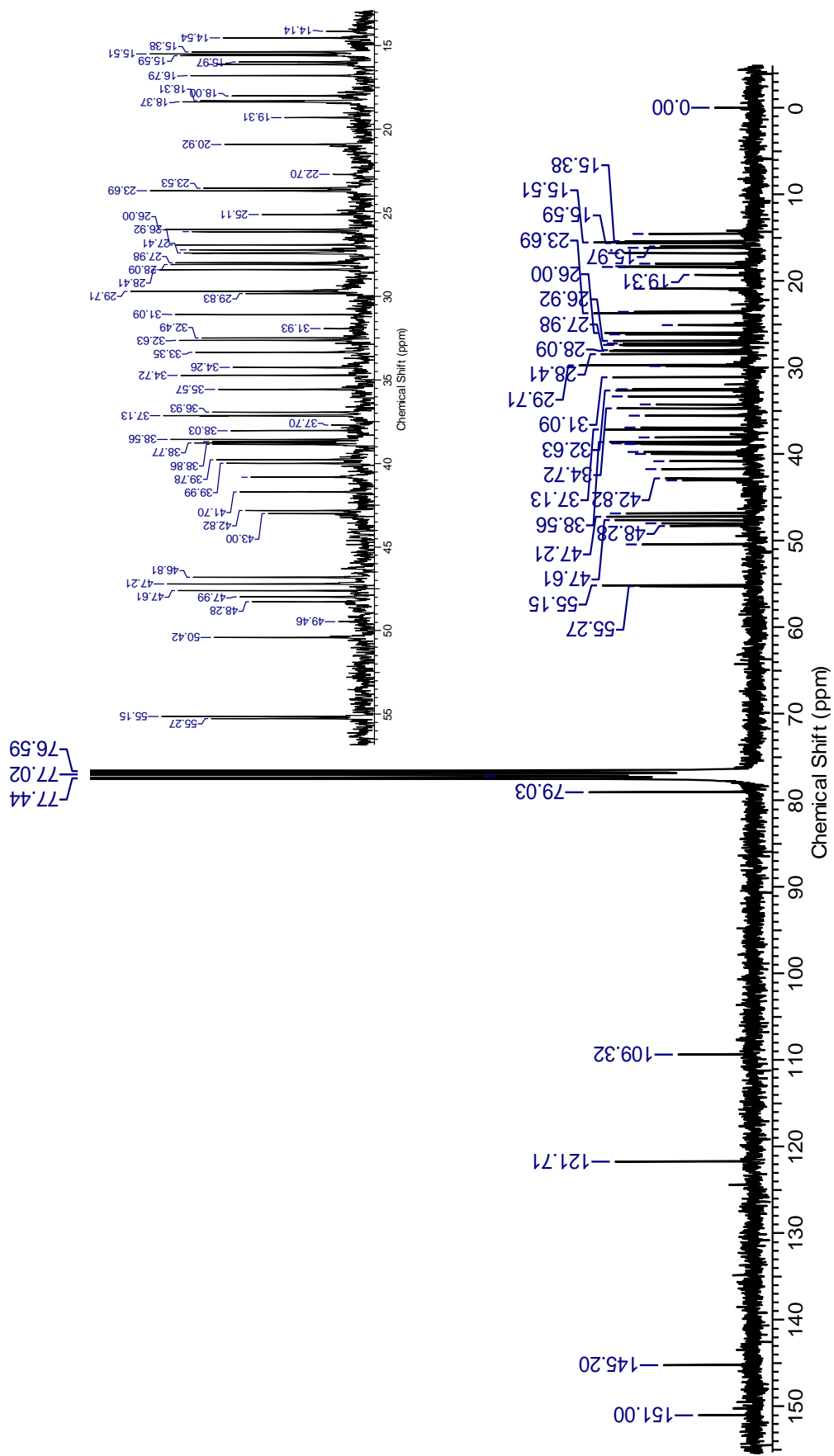
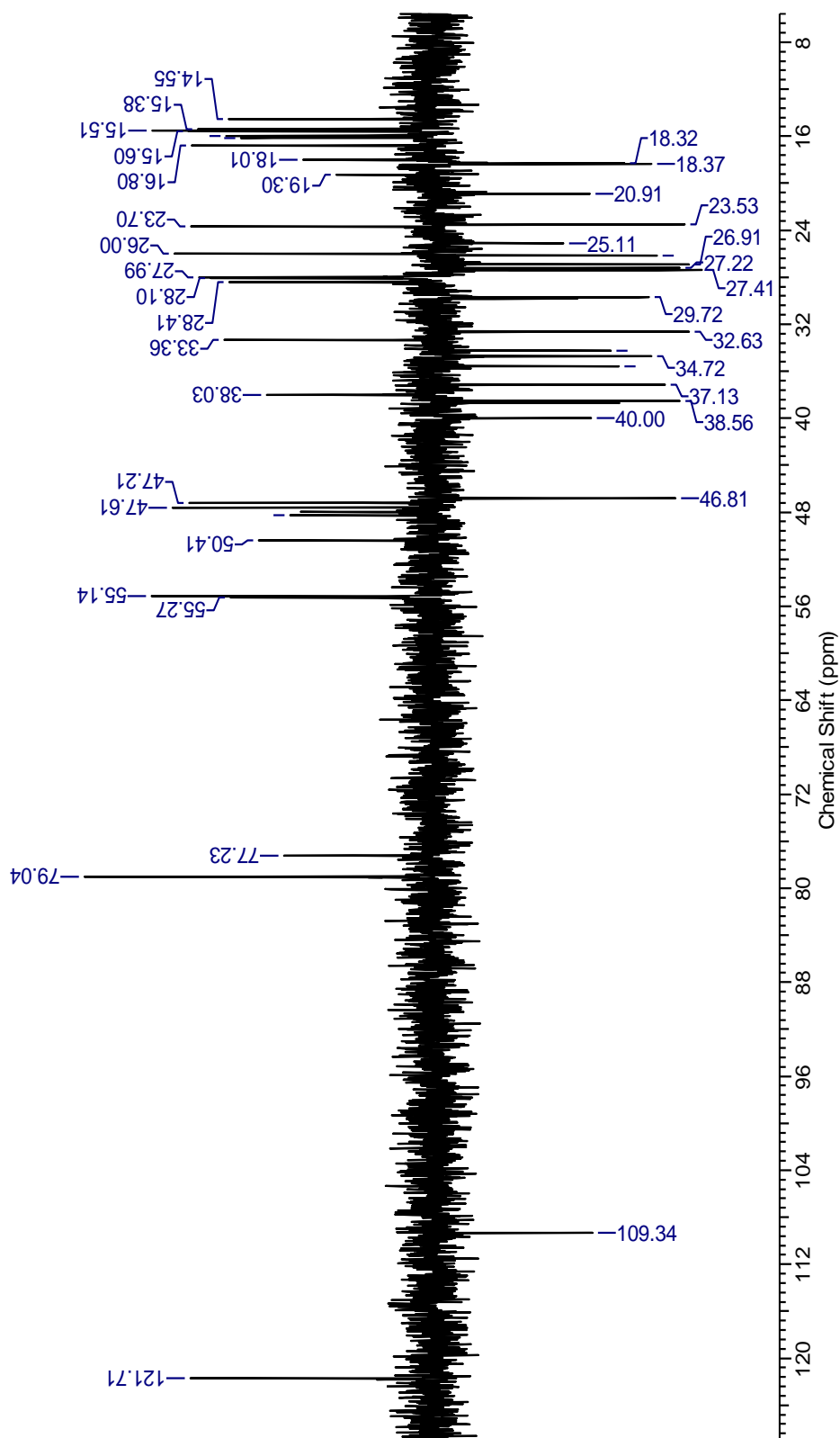
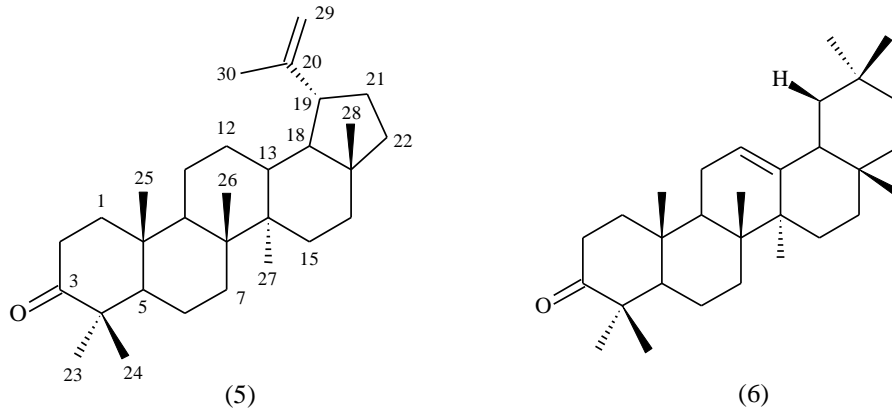


Figura 23 - Espectro DEPT 135° da mistura dos triterpenos lupeol (3) e  $\beta$ -amirina (4) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz)



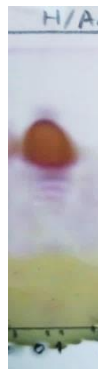
### 5.3.2.2 Substâncias 5 e 6: Lupen-3-ona e $\beta$ -amirin-3-ona

Figura 24 - Estrutura das substâncias lupen-3-ona (5) e  $\beta$ -amirin-3-ona (6)



A mistura das substâncias **5** e **6** foi obtida na fração 0-1 da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos como cristais brancos. Na análise por CCDC foi observada uma macha amarela em anisaldeído sulfúrico, com  $R_f = 0,60$  (Figura 25).

Figura 25 - Cromatoplaça de CCDC da fração 0-1 revelada em anisaldeído sulfúrico. Sistema: hexano/AcOEt (95:5)



Para o triterpeneo **5**, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 26) pode-se destacar os sinais mais intensos na região de ligações duplas terminais em  $\delta$  4,57 (1H, *dd*,  $J = 2,5$  e 1,0 Hz) e  $\delta$  4,69 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz) referentes aos 2 hidrogênios da ligação dupla terminal (H-29), indicando a presença de um triterpeneo com esqueleto lupano. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 30) e DEPT 135° (Figura 31), verificou-se o sinal em  $\delta$  150,9 referente ao carbono



quaternário e em  $\delta$  109,4 sinal de CH<sub>2</sub> da ligação dupla, e em  $\delta$  218,3 foi observado a presença da carbonila (CURSINO et al., 2009).

Para o triterpeno **6**, no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 26), pode-se destacar sinais dos hidrogênios no C-2 próximos ao grupo carbonila na região de  $\delta$  2,25 – 2,60, além do sinal em  $\delta$  5,21 (1H, *t*, *J* = 3,6 Hz), indicando a presença do triterpeno com esqueleto oleanano. Nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 27) e DEPT 135° (Figura 28) foi possível observar os sinais em  $\delta$  145,2 (C) e 121,4 (CH) referentes aos carbonos olefínicos, e em  $\delta$  218,3 foi observado a presença de carbonila (SHAN et al., 2014).

A comparação dos dados de RMN com os da literatura (Tabelas 13 e 14) possibilitou identificar as substâncias como sendo a mistura dos triterpenos: lupen-3-ona e  $\beta$ -amirin-3-ona. Esta identificação foi baseada na metodologia que indica que sinais de intensidades semelhantes são da mesma substância (OLEA e ROQUE, 1990).

A lupen-3-ona é um triterpeno do tipo lupano que possui uma um grupo cetona na posição C-3 do anel nuclear. Esse triterpeno tem despertado interesse para fins medicinais devido ao seu potencial terapêutico para muitas doenças. Algumas atividades farmacológicas relatadas para esse metabólito secundário são anti-inflamatória, antiviral – vírus do herpes simples (HSV-1 e HSV-2), vírus da peste suína africana (ASFV) – e chikungunya (CHIKV), antidiabético e anticancerígeno (XU et al. 2018). Além de atividade antifúngica, com efeito aditivo ao fluconazol, reduzindo pela metade a quantidade de fármaco necessária para inibir o crescimento de *Candida tropicalis*, e atividade antimicobacteriana com CIM de 125 mg/mL (NASSER et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019).

A  $\beta$ -Amirin-3-ona é um triterpeno do tipo oleanano que possui atividade anti-inflamatória, antifúngica. Esse triterpeno também apresenta outras atividades como atividade antiviral contra o chikungunya. Ela inibe a atividade da  $\alpha$ -glucosidase e da acetilcolinesterase, e também pode ser usada na pesquisa de doenças inflamatórias, infecciosas e obesidade (ATA et al., 2011; BOURJOT et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015; OH et al., 2021). Na família Coulaceae essa é a primeira vez que a  $\beta$ -amirin-3-ona está sendo relatada.

Tabela 13 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) da substância lupen-3-ona (**5**) comparados com a literatura, ambos em  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2009)

<b>Posição</b>	<b><math>\delta_c</math> Observado</b>	<b><math>\delta_c</math> Literatura</b>	<b>DEPT</b>
<b>1</b>	39,9	39,5	$\text{CH}_2$
<b>2</b>	34,1	34,0	$\text{CH}_2$
<b>3</b>	218,3	217,9	$\text{C}=\text{O}$
<b>4</b>	47,2	47,2	<b>C</b>
<b>5</b>	54,8	54,8	<b>CH</b>
<b>6</b>	19,6	19,6	$\text{CH}_2$
<b>7</b>	33,5	33,5	$\text{CH}_2$
<b>8</b>	40,7	40,7	<b>C</b>
<b>9</b>	49,7	49,7	<b>CH</b>
<b>10</b>	36,8	36,8	<b>C</b>
<b>11</b>	21,4	21,4	$\text{CH}_2$
<b>12</b>	25,1	25,1	$\text{CH}_2$
<b>13</b>	38,1	38,1	<b>C</b>
<b>14</b>	42,8	42,8	<b>C</b>
<b>15</b>	27,4	27,3	$\text{CH}_2$
<b>16</b>	35,4	35,4	$\text{CH}_2$
<b>17</b>	42,9	42,9	<b>C</b>
<b>18</b>	48,2	48,2	<b>CH</b>
<b>19</b>	47,9	47,8	<b>CH</b>
<b>20</b>	150,9	150,7	<b>C</b>
<b>21</b>	29,7	29,7	$\text{CH}_2$
<b>22</b>	39,9	39,9	$\text{CH}_2$
<b>23</b>	26,6	26,6	$\text{CH}_3$
<b>24</b>	21,0	20,9	$\text{CH}_3$
<b>25</b>	15,9	15,9	$\text{CH}_3$
<b>26</b>	15,7	15,7	$\text{CH}_3$
<b>27</b>	14,4	14,4	$\text{CH}_3$
<b>28</b>	18,0	17,9	$\text{CH}_3$
<b>29</b>	109,4	109,3	$\text{CH}_2$
<b>30</b>	19,3	19,2	$\text{CH}_3$

Tabela 14 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) da substância  $\beta$ -amirin-3-ona (**6**) comparados com a literatura, ambos em  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz (SHAN et al., 2014)

Posição	$\delta\text{c}$ Observado	$\delta\text{c}$ Literatura	DEPT
1	39,2	39,4	$\text{CH}_2$
2	25,1	24,3	$\text{CH}_2$
3	218,3	218,0	$\text{C}=\text{O}$
4	47,9	47,6	C
5	55,2	55,4	CH
6	19,6	19,7	$\text{CH}_2$
7	32,1	32,2	$\text{CH}_2$
8	39,7	39,9	C
9	46,8	46,9	CH
10	36,6	36,8	C
11	23,6	23,7	$\text{CH}_2$
12	121,4	121,6	CH
13	145,2	145,4	C
14	41,8	41,9	C
15	26,1	26,2	$\text{CH}_2$
16	27,4	27,0	$\text{CH}_2$
17	32,5	32,6	C
18	47,3	47,4	CH
19	46,8	46,8	$\text{CH}_2$
20	31,0	31,2	C
21	34,6	34,8	$\text{CH}_2$
22	37,0	37,2	$\text{CH}_2$
23	26,4	26,5	$\text{CH}_3$
24	21,5	21,6	$\text{CH}_3$
25	15,2	15,3	$\text{CH}_3$
26	16,7	16,8	$\text{CH}_3$
27	26,1	26,0	$\text{CH}_3$
28	28,4	28,5	$\text{CH}_3$
29	33,3	33,4	$\text{CH}_3$
30	23,6	23,8	$\text{CH}_3$

Figura 26 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos triterpenos lupen-3-ona (5) e  $\beta$ -amirin-3-ona (6) (Clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz)

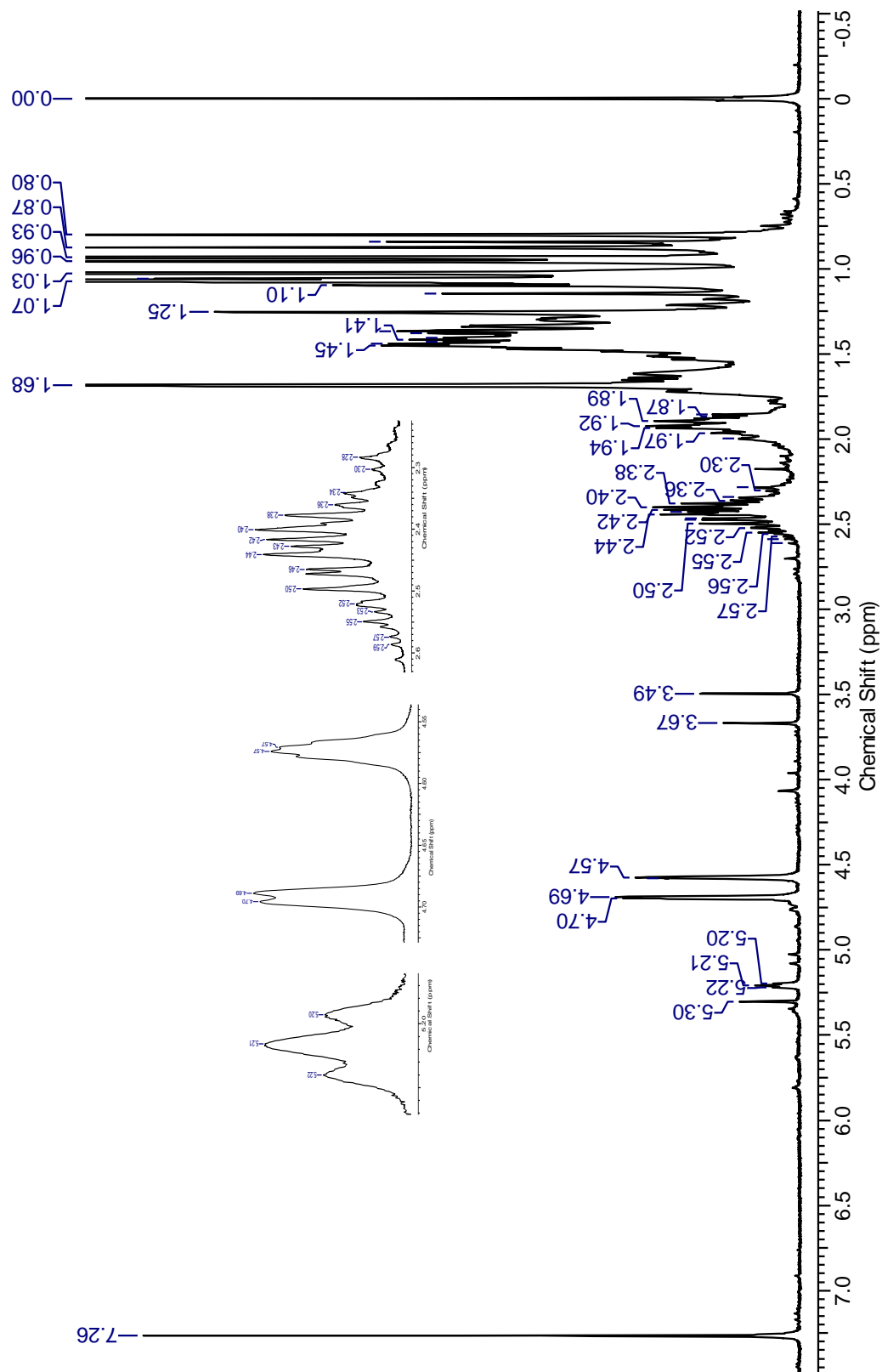


Figura 27 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos triterpenos lupen-3-ona (5) e  $\beta$ -amirin-3-ona (6) (Clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz)

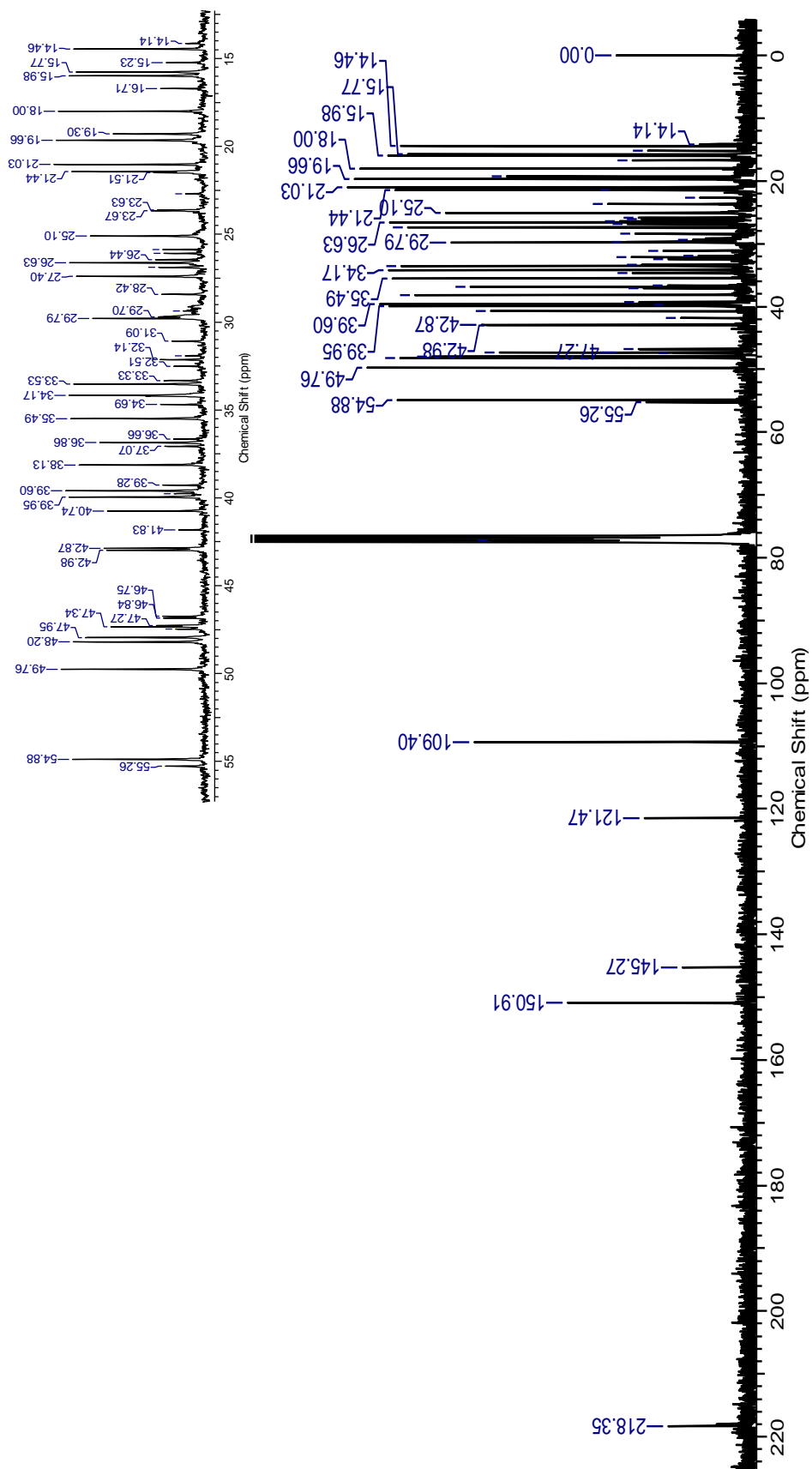
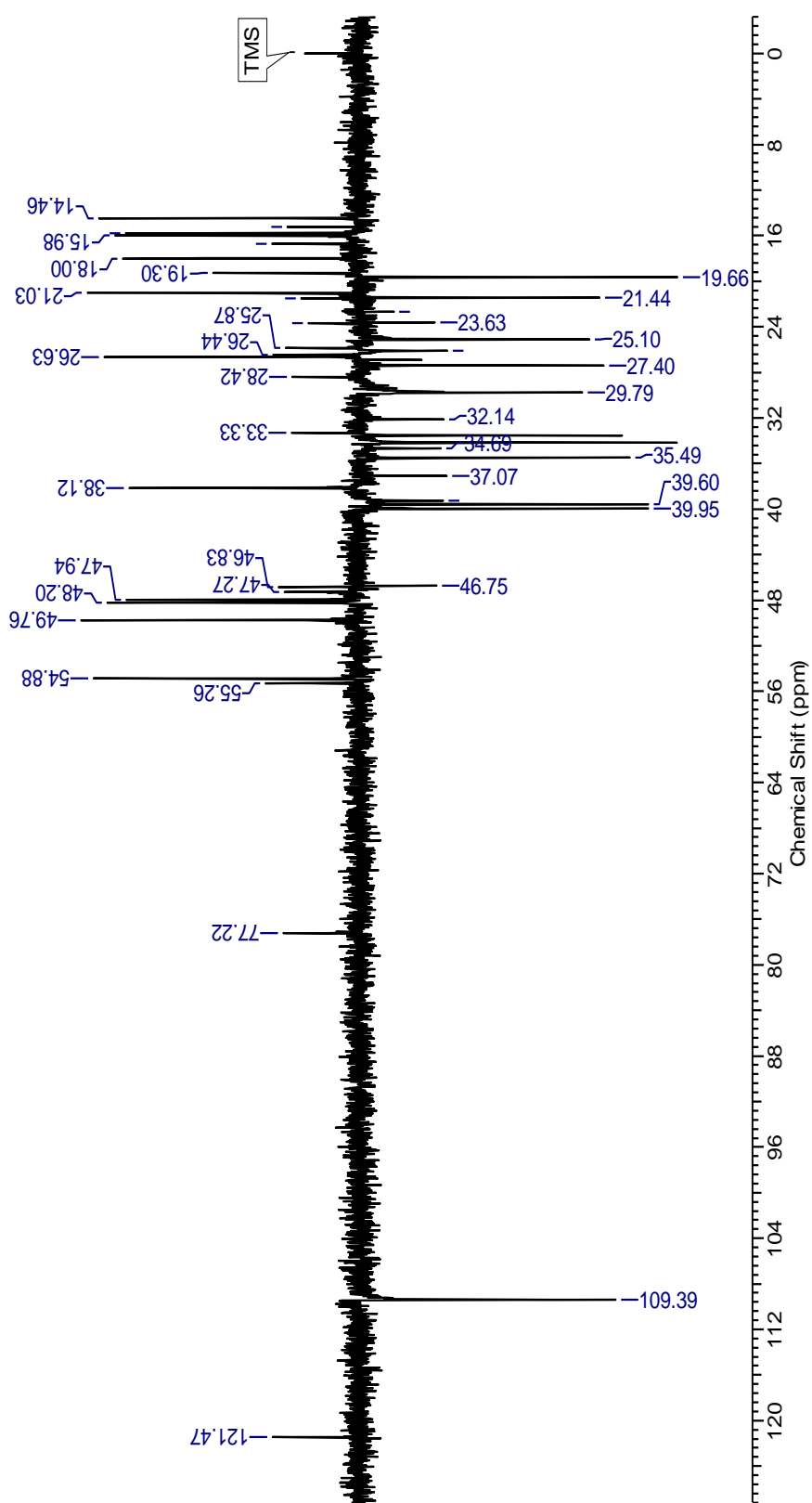
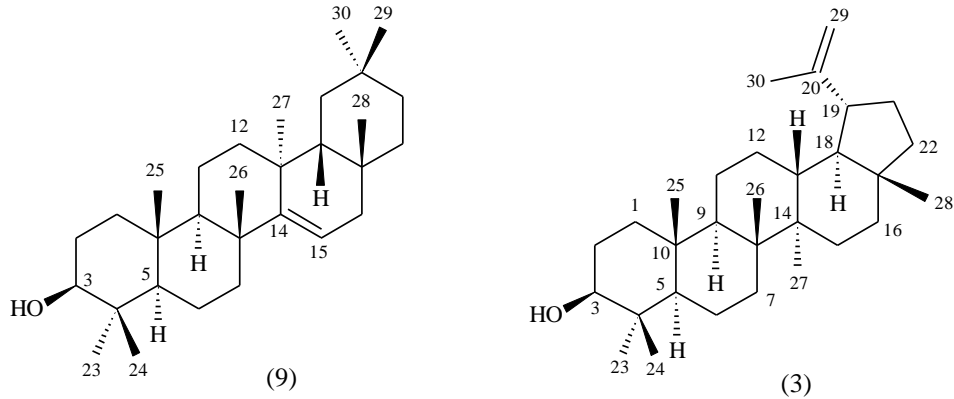


Figura 28 - Espectro de DEPT 135° da mistura dos triterpenos lupen-3-ona (5) e  $\beta$ -amirin-3-ona (6) (Clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz)



### 5.3.2.3 Substância 9: Taraxerol e lupeol

Figura 29 - Estrutura das substâncias taraxerol (9) e lupeol (3)



Essa mistura de substâncias foi obtida da fase AcOEt do extrato metanólico das folhas como cristais brancos. Na análise por CCDC foi observada uma macha lilás em anisaldeído sulfúrico, com  $R_f = 0,40$  (Figura 30).

Figura 30 - Cromatoplaça de CCDC da fração 11 revelada em anisaldeído sulfúrico. Sistema: hex/AcOEt (9:1)



Para o triterpeno **9**, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 31), podemos destacar a ligação dupla pela presença de um *dd* em  $\delta$  5,51 ( $J = 8,5$  e  $3,5$  Hz) e no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) e DEPT 135° (Figura 33) sinais correspondentes ao carbono quaternário em  $\delta$  158,0 e CH em  $\delta$  116,8, além do sinal em 79,0 referente ao carbono químico oxigenado em C-3, que permitiram a identificação do taraxerol, os demais sinais foram compatíveis com a estrutura proposta (CURSINO et al., 2009).

O outro triterpeno em mistura foi identificado como o lupeol (**3**), no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 33), destacam-se os sinais: em  $\delta$  4,69 (*d*,  $J = 2,4$  Hz) e um duplo duplete em  $\delta$  4,57 (*dd*,  $J = 2,4$  Hz) referentes aos 2 hidrogênios da ligação dupla terminal (H-29); outro sinal característico é o *dd* em  $\delta$  3,17 ( $J = 11,5$  e  $5$  Hz) referente ao H-3. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34) e DEPT  $135^\circ$  (Figura 35) apresentou sinais nos deslocamentos químicos em  $\delta$  151,0 e 109,3 característicos do grupo olefínico (C-20 e C-29) (CURSINO et al., 2012).

A comparação dos dados de RMN com os da literatura (Tabelas 15 e 16) possibilitou identificar substâncias como sendo a mistura dos triterpenos: taraxerol e lupeol (MAHATO e KUNDU, 1994; CURSINO et al., 2012).

O taraxerol, um triterpeno pentacíclico do tipo oleanano, é uma substância natural que tem sido investigada extensivamente por seu potencial de utilização no desenvolvimento de medicamentos (ALQAHTANI et al., 2013; MUS et al., 2022). Tem recebido grande atenção por seu potencial uso como agente terapêutico para o tratamento de várias doenças (SHENG e SUN, 2011) e devido às suas capacidades significativas na farmacologia moderna, como sua capacidade de atuar como agente antitumoral (TAKASAKI et al., 1999), antimicrobiano (SINGH, SAHU e SHARMA, 2002) e anti-inflamatório (BISWAS et al., 2009) e no tratamento da doença de Alzheimer (NGO e LI, 2013).



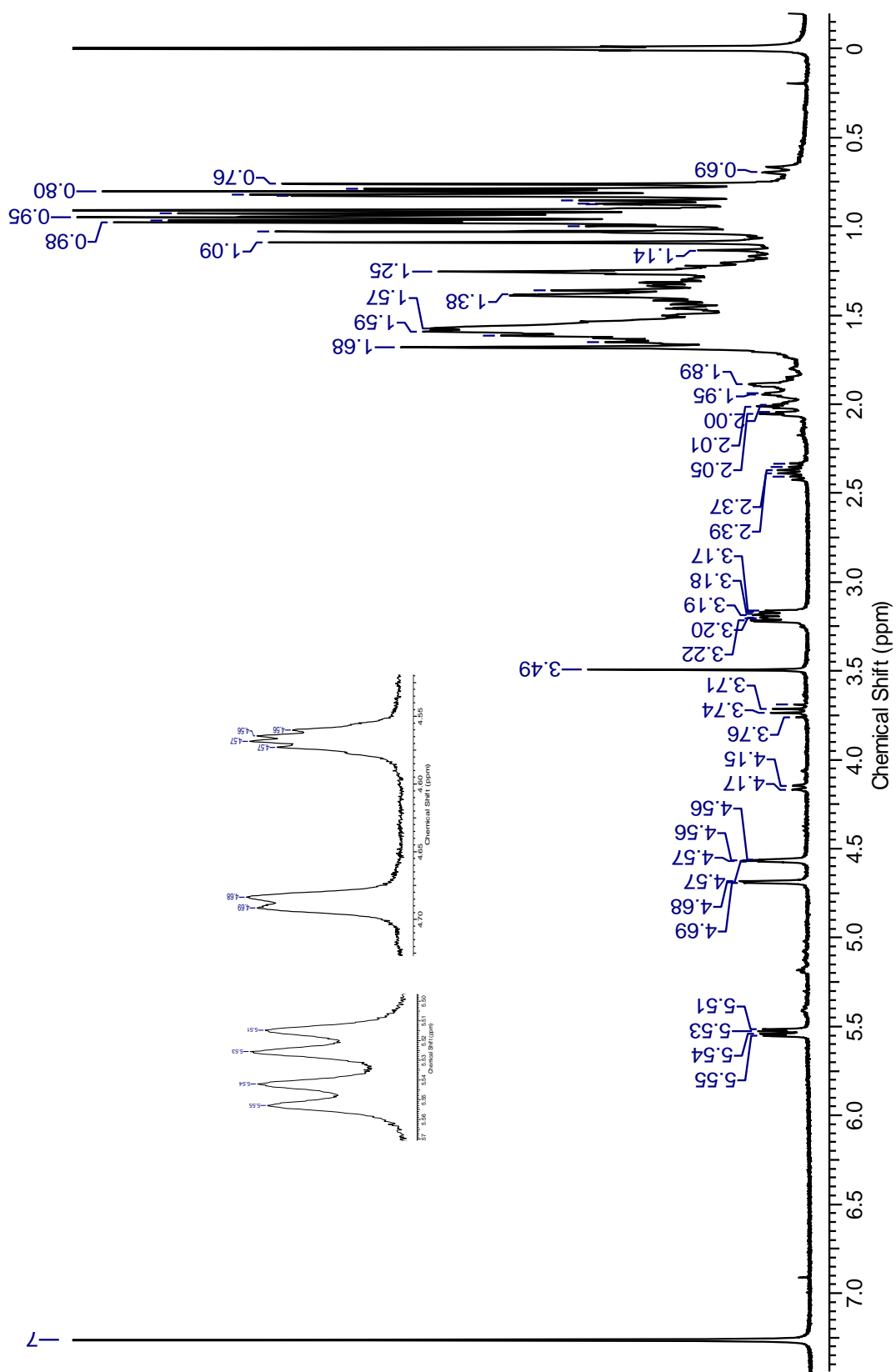
Tabela 15 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) da substância taraxerol (**9**) comparados com a literatura, ambos obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2009)

<b>Posição</b>	<b><math>\delta\text{c}</math> Observado</b>	<b><math>\delta\text{c}</math> Literatura</b>	<b>DEPT</b>
<b>1</b>	38,0	37,9	CH <sub>2</sub>
<b>2</b>	27,1	27,3	CH <sub>2</sub>
<b>3</b>	79,0	79,3	CH
<b>4</b>	39,9	39,2	C
<b>5</b>	55,5	55,7	CH
<b>6</b>	19,3	19,0	CH <sub>2</sub>
<b>7</b>	35,1	35,6	CH <sub>2</sub>
<b>8</b>	38,9	38,9	C
<b>9</b>	48,7	49,0	CH
<b>10</b>	37,7	37,8	C
<b>11</b>	17,4	17,7	CH <sub>2</sub>
<b>12</b>	35,7	37,9	CH <sub>2</sub>
<b>13</b>	37,7	38,2	C
<b>14</b>	158,0	158,3	C
<b>15</b>	116,8	117,1	CH
<b>16</b>	36,6	36,9	CH <sub>2</sub>
<b>17</b>	38,0	36,0	C
<b>18</b>	49,2	49,5	CH
<b>19</b>	41,2	41,5	CH <sub>2</sub>
<b>20</b>	29,8	29,8	C
<b>21</b>	33,6	33,9	CH <sub>2</sub>
<b>22</b>	33,0	33,3	CH <sub>2</sub>
<b>23</b>	28,8	28,2	CH <sub>3</sub>
<b>24</b>	15,5	15,6	CH <sub>3</sub>
<b>25</b>	15,4	15,6	CH <sub>3</sub>
<b>26</b>	29,9	30,0	CH <sub>3</sub>
<b>27</b>	25,9	26,1	CH <sub>3</sub>
<b>28</b>	29,9	30,1	CH <sub>3</sub>
<b>29</b>	33,6	33,5	CH <sub>3</sub>
<b>30</b>	21,3	21,5	CH <sub>3</sub>

Tabela 16 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ppm) do lupeol (**3**) comparados com a literatura, ambos obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz (CURSINO et al., 2009)

Posição	$\delta\text{c}$ Observado	$\delta\text{c}$ Literatura	DEPT
1	38,7	38,7	$\text{CH}_2$
2	27,4	27,4	$\text{CH}_2$
3	79,0	78,9	CH
4	38,8	38,8	C
5	55,2	55,3	CH
6	18,3	18,3	$\text{CH}_2$
7	34,2	34,2	$\text{CH}_2$
8	40,8	40,8	C
9	50,4	50,4	CH
10	37,1	37,1	C
11	20,9	20,9	$\text{CH}_2$
12	25,1	25,1	$\text{CH}_2$
13	38,0	38,0	CH
14	42,8	42,8	C
15	27,4	27,4	$\text{CH}_2$
16	35,5	35,5	$\text{CH}_2$
17	42,8	43,0	C
18	48,2	48,0	CH
19	47,9	47,9	CH
20	151,0	150,9	C
21	29,8	29,8	$\text{CH}_2$
22	39,9	40,0	$\text{CH}_2$
23	27,9	28,0	$\text{CH}_3$
24	15,3	15,4	$\text{CH}_3$
25	16,1	16,1	$\text{CH}_3$
26	15,9	15,9	$\text{CH}_3$
27	14,5	14,5	$\text{CH}_3$
28	18,0	18,0	$\text{CH}_3$
29	109,3	109,3	$\text{CH}_2$
30	19,3	19,3	$\text{CH}_3$

Figura 31 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura dos triterpenos taraxerol (9) e lupeol (3) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz)



7

Figura 32 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura dos triterpenos taraxerol (9) e lupeol (3) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 75 MHz)

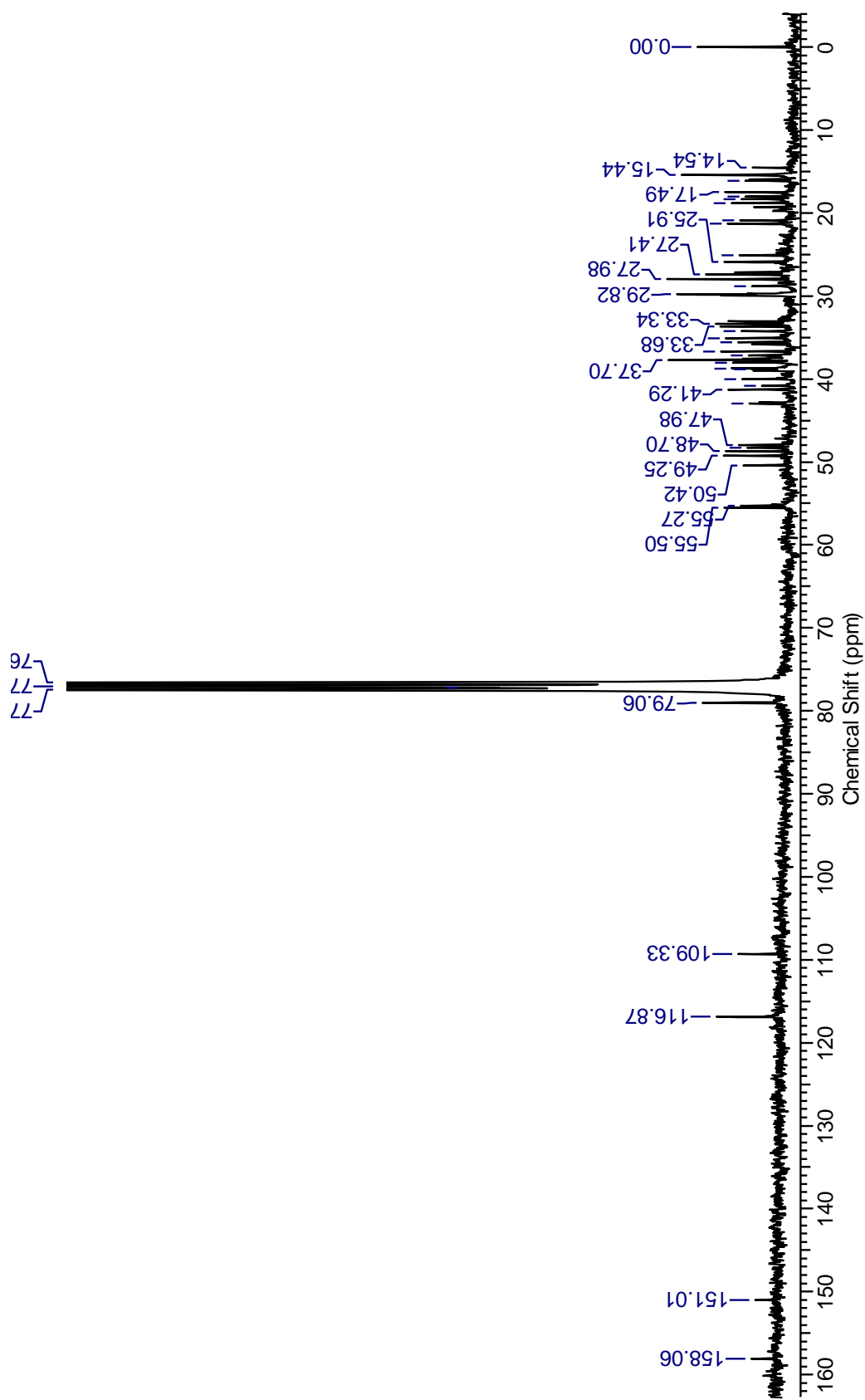
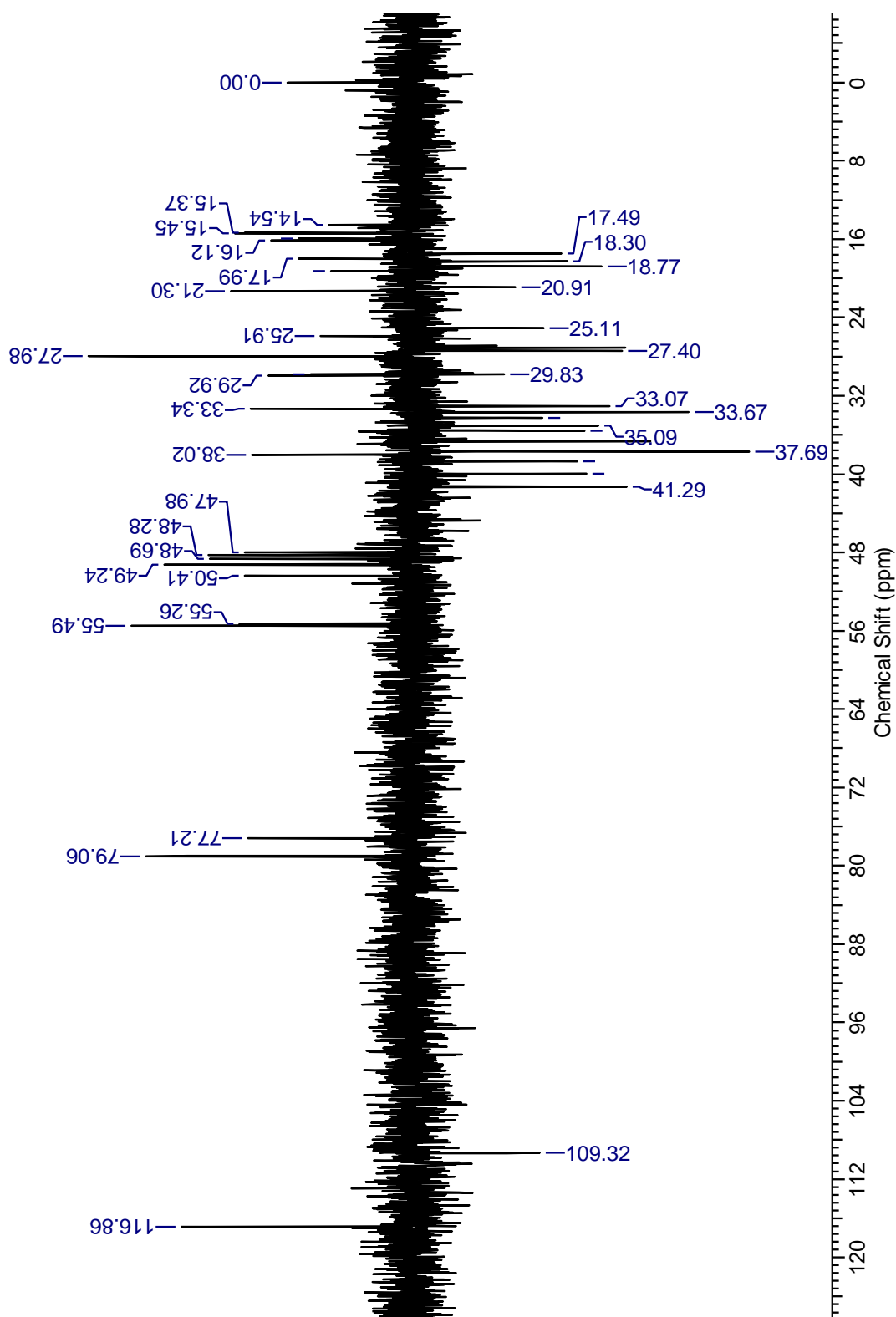


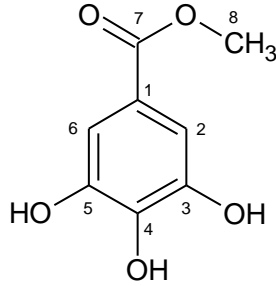
Figura 33 - Espectro DEPT 135° da mistura de triterpenos taraxerol (9) e lupeol (3) (clorofórmio deuterado, padrão TMS, 300 MHz)



### 5.3.3 Substâncias fenólicas

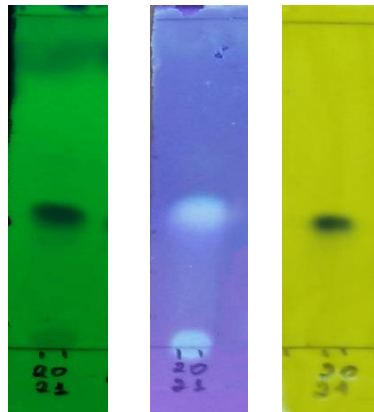
#### 5.3.3.1 Substância 7: Galato de metila

Figura 34 - Estrutura química da substância galato de metila (7)



A substância **7** foi isolada da fase AcOEt do extrato MeOH dos galhos na fração 20-21 como um sólido amorfo branco. Na análise por CCDC foi observada uma macha escura sob luz UV 254 nm, uma fluorescência em NP/PEG após observar em 365 nm, uma mancha escura em FeCl<sub>3</sub>, com R<sub>f</sub> = 0,51 (Figura 35).

Figura 35 - Cromatoplasas de CCDC da fração 20-21 reveladas em luz UV 254 nm (esquerda), NP/PEG (centro), FeCl<sub>3</sub> (direita). Sistema: DCM/MeOH (9:1)



A presença de apenas um sinal aromático  $\delta$  7,04 (s, 2H) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 37) indicou que a substância fenólica deveria ser simétrica e possuir quatro grupos constituintes. Foi observado também um simpleto em  $\delta$  3,82 com integral para 3H.

O mapa de correlação HSQC (Figura 38) mostra que o sinal do C-8 em  $\delta$  50,7 tem correlação direta com H-8 em  $\delta$  3,82, e o sinal do C-6 em  $\delta$  109,7 com o H-6 em  $\delta$  7,04,

indicando a estrutura molecular aromática simétrica com anel tetrassubstituído. A análise do mapa de correlação de HMBC (Figura 39) mostrou correlação a longa distância do sinal do C-7 em  $\delta$  168,7 com o H-8 em  $\delta$  3,82, indicando a esterificação da função ácida. Outras correlações observadas são dos sinais dos carbonos em  $\delta$  109,7,  $\delta$  121,4,  $\delta$  139,4,  $\delta$  168,7 com o sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,04. Algumas correlações de HMBC da substância **7** se encontram na Figura 36.

Na análise por espectrometria de massas (Figura 40) a substância apresentou peso molecular  $m/z$  183,0295 na fonte de ionização ESI-MS  $[M-H]^-$ . A biblioteca do espectrômetro de massas inferiu fórmula molecular  $C_8H_7O_5$   $[M-H]^-$  com  $m/z$  183,0299. O espectrômetro mediu o erro em 2,6 ppm para a massa isotópica. O erro é considerado aceitável para confirmação da fórmula molecular  $C_8H_8O_5$ .

Com base nos dados espectroscópicos e espectrométricos e comparação com a literatura (Tabela 17) foi possível identificar a substância como o galato de metila, um éster metílico do ácido gálico, que possui um ácido metil carboxílico ligado ao C-1 e três grupos hidroxila (OH) ligado aos carbonos 3, 4 e 5 – os grupos -OH, orientados na mesma direção em torno do anel benzênico funcionam como doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio (TAN, CHAN e LIM, 2015).

O galato de metila é um fitoquímico que já foi encontrado em muitas espécies, mas que ainda não havia sido relatado na família Coulaceae. Essa substância apresenta atividade antibacteriana (CHOI et al., 2008, CHOI et al., 2014), bem como fortes propriedades antioxidantes (CHEN e ZHANG, 2003), e outras atividades biológicas como atividade antiplaquetária, proteção de danos ao DNA contra o estresse oxidativo (HSIEH et al., 2004), atenuação do estresse oxidativo diabético e atividade anti-apoptótica (SCIUTO e MORAN, 2001), anticâncer (KAMATHAMA, KUMAR e GUDIPALLI, 2015) e antiviral (KANE et al., 1988).

Tabela 17 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e HMBC (ppm) da substância **7** (galato de metila) comparados com a literatura em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) (TAN, CHAN e LIM, 2015)

Posição	RMN $^1\text{H}$	Observado (HMBC)		Literatura	
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$		$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
1	–	121,4	H-1, H-6	–	120,0
2	7,04	109,7	H-1, H-6	7,04	108,6
3	–	146,2	H-1, H-6	–	145,1
4	–	139,4	H-1, H-6	–	138,3
5	–	146,2	H-1, H-6	–	145,1
6	7,04	109,7	H-1, H-6	7,04	108,6
$\text{C}=\text{O}$	–	168,7	H-8	–	167,6
$\text{COOCH}_3$	3,82	50,7	–	3,83	50,9

Figura 36 - Algumas correlações de HMBC da substância **7** (galato de metila)

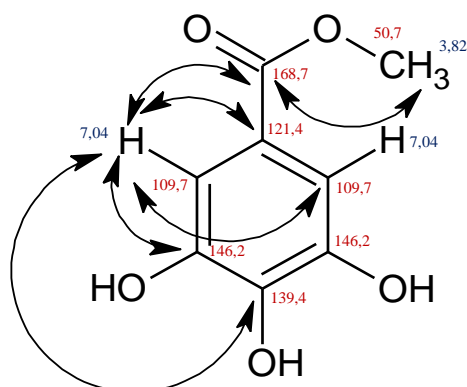




Figura 37 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância galato de metila (7) (metanol deuterado, 300 MHz)

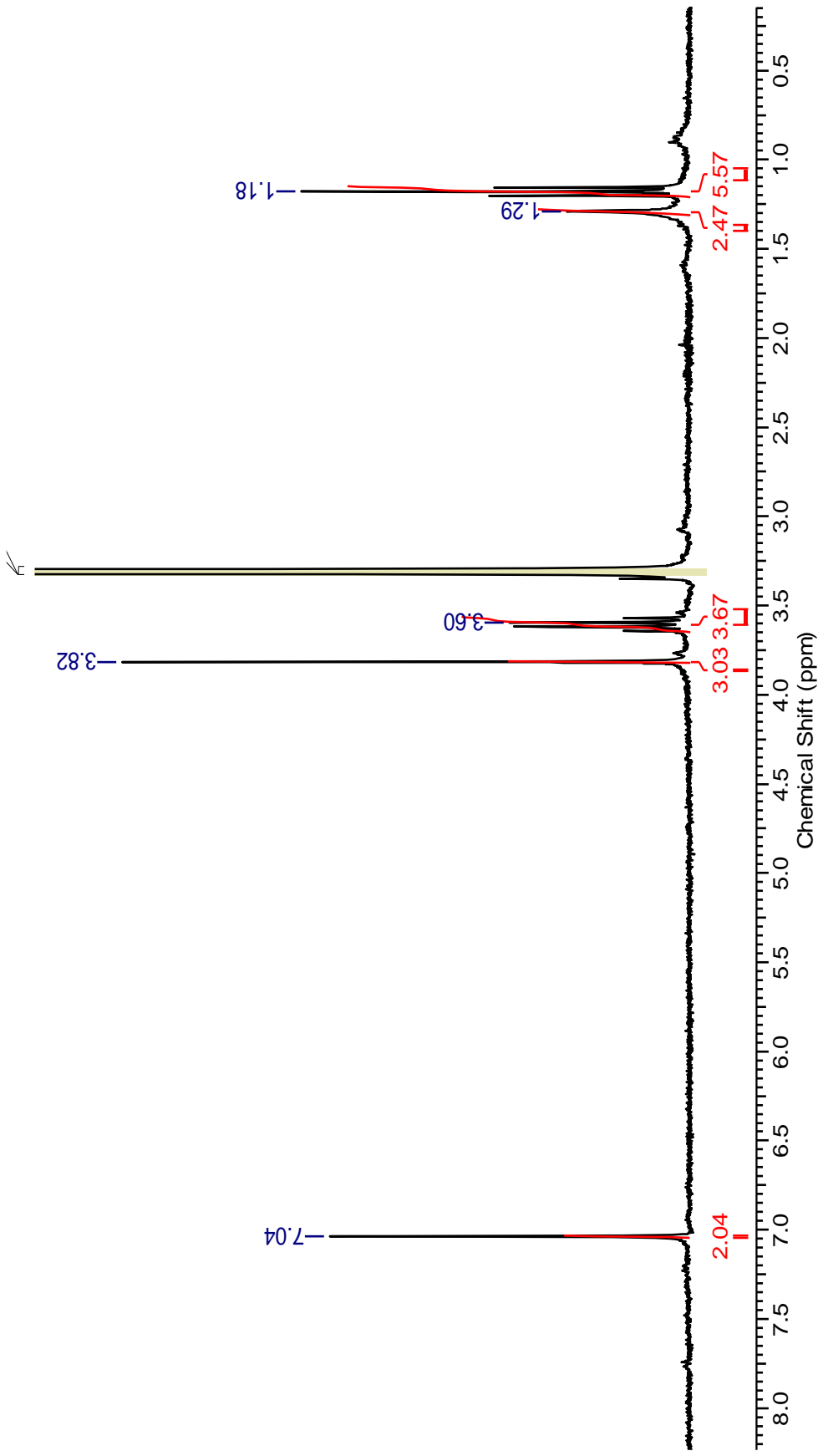


Figura 38 - Mapa de correlação HSQC da substância galato de metila (7) (metanol deuterado, 300 MHz)

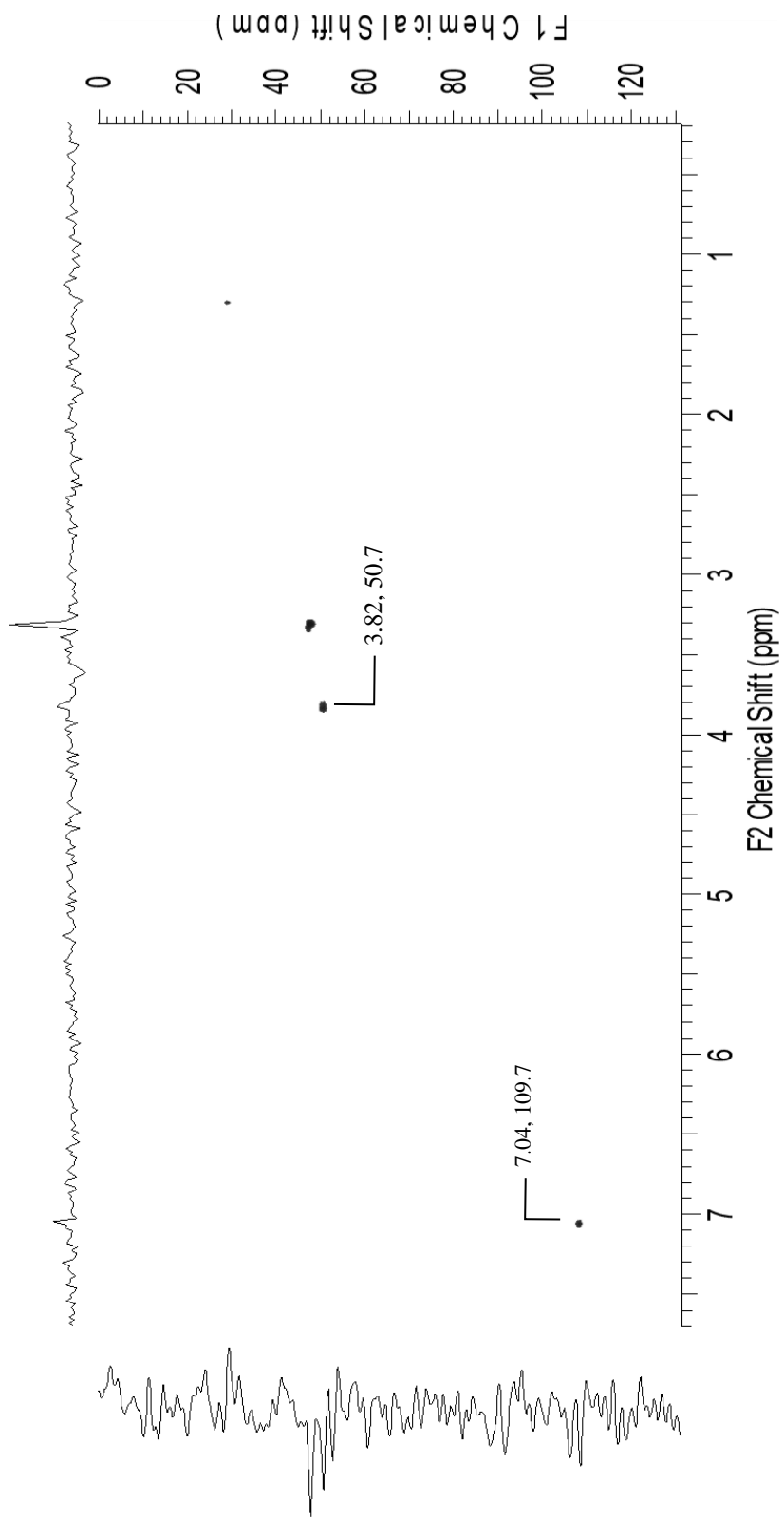


Figura 39 - Mapa de correlação HMBC da substância galato de metila (7) (metanol deuterado, 300 MHz)

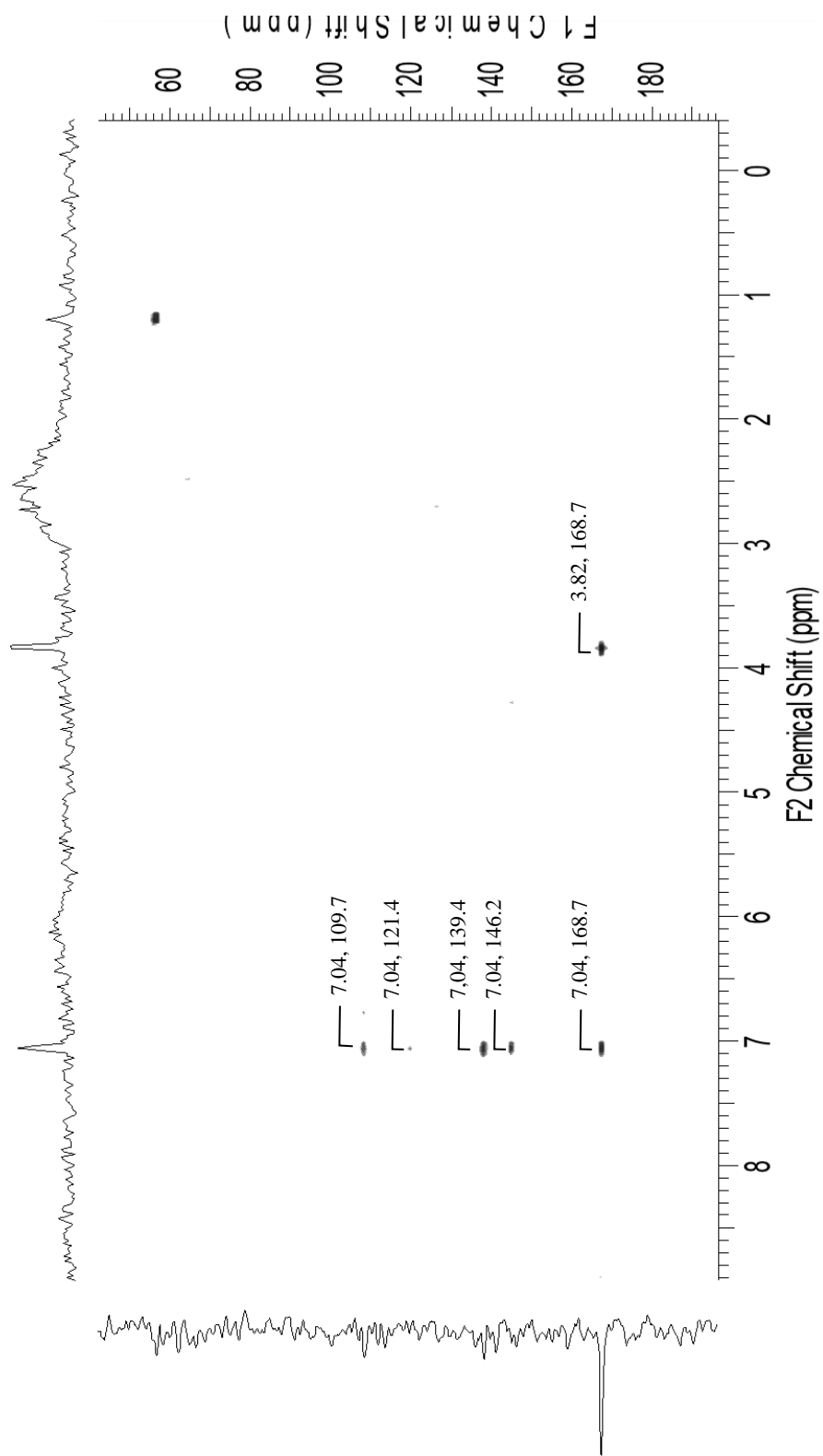
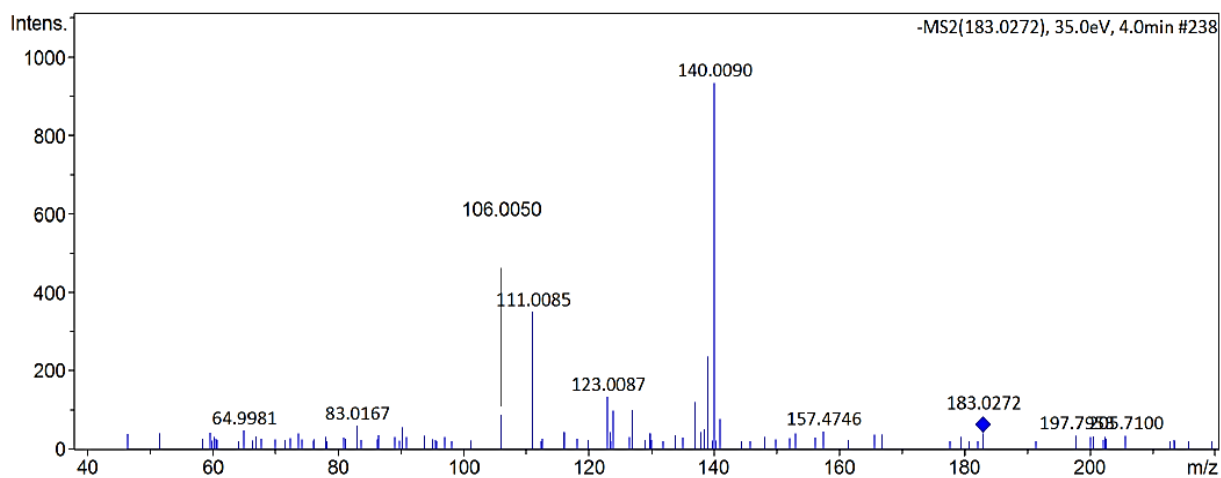
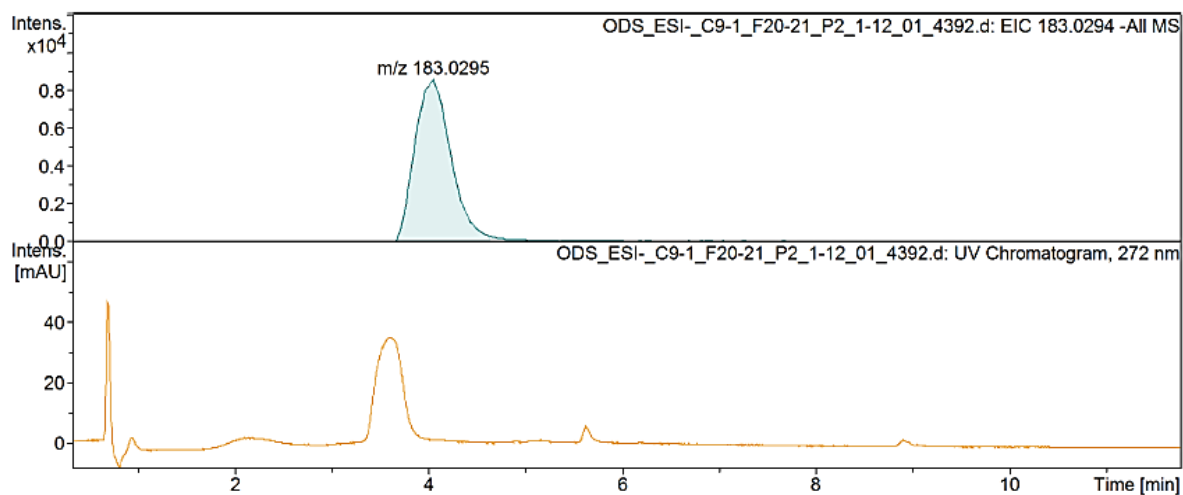


Figura 40 - Espectro de massas da substância galato de metila (7) (fonte ESI modo negativo).

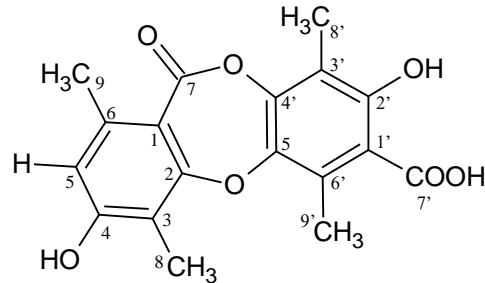


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
183.0294	1	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	183.0299	2.6	48.1	1	100.00	5.5	even	ok



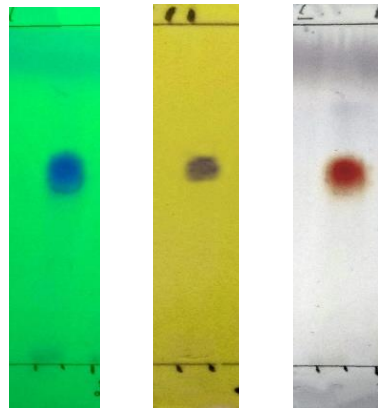
### 5.3.3.2 Substância 8: Ácido hipoprotocetrário

Figura 41 - Estrutura da substância ácido hipoprotocetrário (8)



A substância **8** foi isolada na fração 7-9 do extrato metanólico dos galhos como um sólido amorfo vermelho. Na análise por CCDC foi possível observar uma única macha, com  $R_f = 0,58$ , sob luz UV 254 nm, uma mancha em  $FeCl_3$ , e uma mancha vermelha em anisaldeído sulfúrico (Figura 42).

Figura 42 - Cromatoplasas de CCDC da fração 7-9 reveladas em luz UV 254 nm (esquerda),  $FeCl_3$  (centro), anisaldeído sulfúrico (direita). Sistema: AcOEt/MeOH (8:2)



No espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 44) foi possível observar sinais de hidrogênios de metilas nos deslocamentos químicos de  $\delta$  2,17,  $\delta$  2,32,  $\delta$  2,37, e  $\delta$  2,74, (cada simpleto com integral para 3H), e um simpleto em 6,55 com integral para 1H, referente ao hidrogênio ligado ao anel aromático.

No mapa de correlação HSQC (Figura 45) foi possível assinalar o sinal do H-5 em  $\delta$  6,55 com o C-5 em  $\delta$  114,1, o sinal do H-9' ( $\delta$  2,74) com C-9' ( $\delta$  14,7), H-9 ( $\delta$  2,37) com C-9 ( $\delta$  19,7), H-8' ( $\delta$  2,17) com C-8' ( $\delta$  8,0), H-8 ( $\delta$  2,32) com C-8 ( $\delta$  9,0).

Os carbonos quaternários (C) foram assinalados por HMBC (Figura 43), onde o sinal do C-1 em  $\delta$  111,6 correlaciona com o sinal do H-5 em  $\delta$  6,55 e H-9 em  $\delta$  2,37, o sinal do C-2

( $\delta$  160,7) com o H-8 (2,32), C-3 ( $\delta$  113,0) com H-8 ( $\delta$  2,32), C-4 ( $\delta$  161,7) com H-8 ( $\delta$  2,32), C-6 ( $\delta$  141,6) com H-9 ( $\delta$  2,37), C-1' ( $\delta$  115,4) com H-9' ( $\delta$  2,74), C-2' ( $\delta$  157,2) com H-8' ( $\delta$  2,17), C-3' ( $\delta$  113,4) com H-8' ( $\delta$  2,17), C-4' ( $\delta$  144,6) com H-8' ( $\delta$  2,17), C-5' ( $\delta$  142,3) com H-9' ( $\delta$  2,74), e C-6' ( $\delta$  129,3) com H-9' ( $\delta$  2,74).

A espectrometria de massas no modo negativo com fonte ESI (Figura 47) mostrou um íon quase-molecular com  $m/z$  343,0818. A biblioteca do espectrômetro de massas inferiu fórmula molecular  $C_{18}H_{15}O_7$  (M-H)<sup>-</sup> com  $m/z$  343,0823. O espectrômetro mediu o erro em 2,0 ppm para essa massa isotópica. O erro é considerado aceitável para a fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_7$ .

Com base nos dados espectroscópicos e espectrométricos e comparação com a literatura (Tabela 18) foi possível identificar a substância como o ácido hipoprotocetrário, uma depsidona pertencente a classe das substâncias fenólicas. As depsidonas são principalmente encontradas em líquens e são descritas na literatura possuindo diferentes atividades, como antiproliferativa, antimalárica, citotóxica, antibacteriana, anti-hipertensivo, antileishmania, herbicida, larvicida, inibidor da colinesterase, antioxidante e antifúngica (IBRAHIM et al., 2018). O ácido hipoprotocetrário já foi relatado apresentando atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de dez microrganismos patogênicos com valor da CIM de 12,2 a 278  $\mu\text{g/mL}$  (NEERAJ et al., 2011). Na família Coulaceae essa é a primeira vez que o ácido hipoprotocetrário está sendo relatado.

Tabela 18 - Dados de RMN 1D e 2D (ppm) da substância **8** (ácido hipoprotocetrárico) em comparação com a literatura em DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>1</sup>H (270 MHz) e <sup>13</sup>C (25 MHz) (HUNECK e YOSHIMURA, 1996)

Posição	Observado			Literatura	
	<sup>1</sup> H	HSQC <sup>13</sup> C	HMBC	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1C	–	111,6	H-5, H-9	–	119,4
2C	–	160,7	H-8	–	160,2
3C	–	113,0	H-8	–	120,0
4C	–	161,7	H-8	–	152,8
5C	6,55 (s,1H)	114,1	H-9	6,62	122,1
6C	–	141,6	H-9	–	141,5
7C	–	N.O.	–	–	161,8
8C	2,32 (s, 3H)	9,0	–	2,21	10,3
9C	2,37 (s, 3H)	19,7	–	2,29	20,5
1'C	–	115,4	H-9'	–	122,9
2'C	–	157,2	H-8'	–	145,2
3'C	–	113,4	H-8'	–	122,5
4'C	–	144,6	H-8'	–	147,4
5'C	–	142,3	H-9'	–	144,7
6'C	–	129,3	H-9'	–	128,0
7'C	–	N.O.	–	–	170,0
8'C	2,17 (s, 3H)	8,0	–	2,11	10,7
9'C	2,74 (s, 3H)	14,7	–	2,50	14,9

N.O.: não observado

Figura 43 - Correlações de HMBC observadas na substância **8**

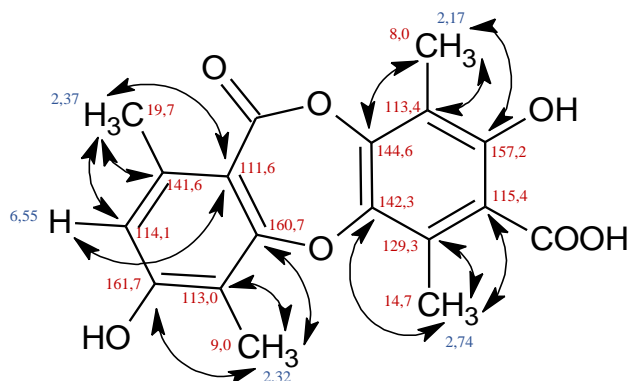


Figura 44 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância ácido hipoprotocetrário (8) (metanol deuterado, 300 MHz)

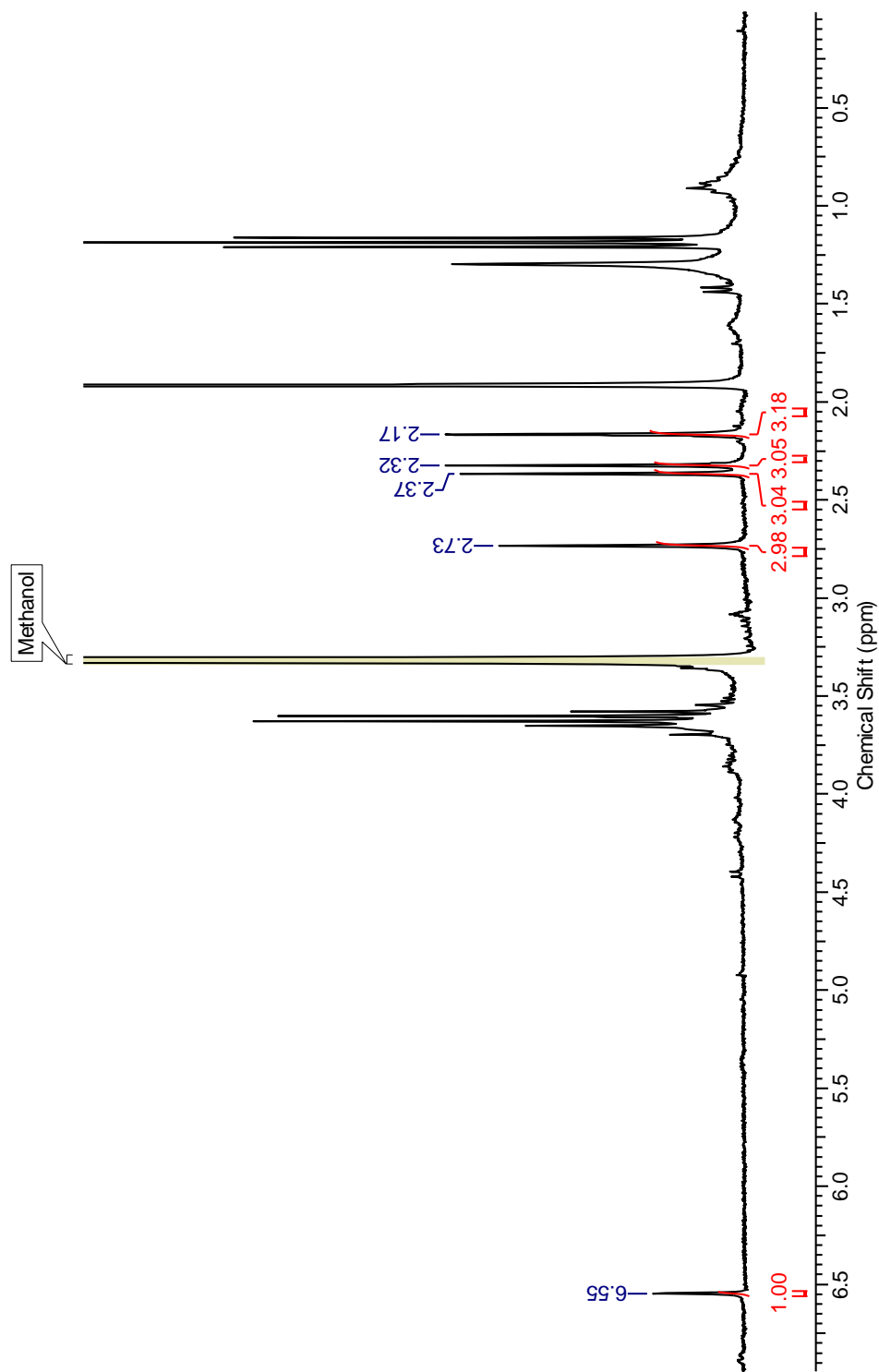




Figura 45 - Mapa de correlação HSQC da substância ácido hiprocotetrárico (8) (metanol deuterado, 300 MHz)

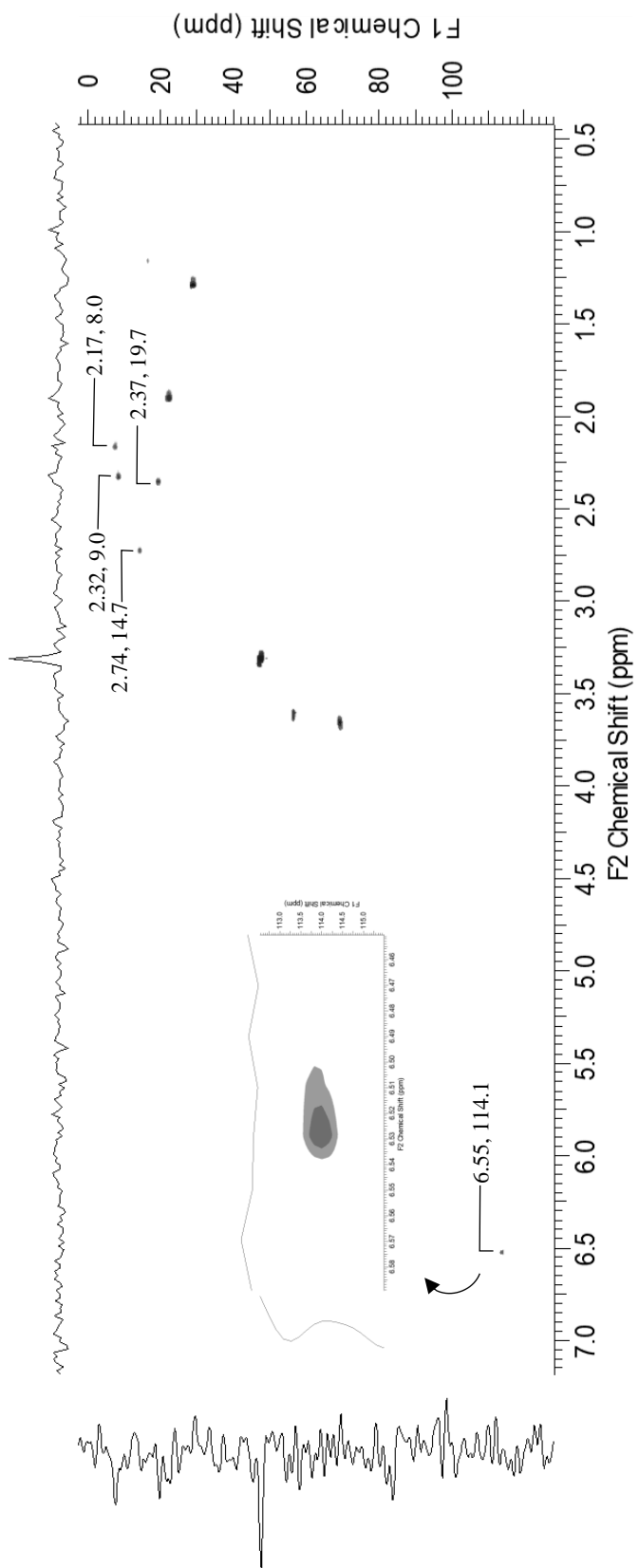


Figura 46 - Mapa de correlação HMBC da substância ácido hipoprotocetrárico (8) (metanol deuterado, 300 MHz)

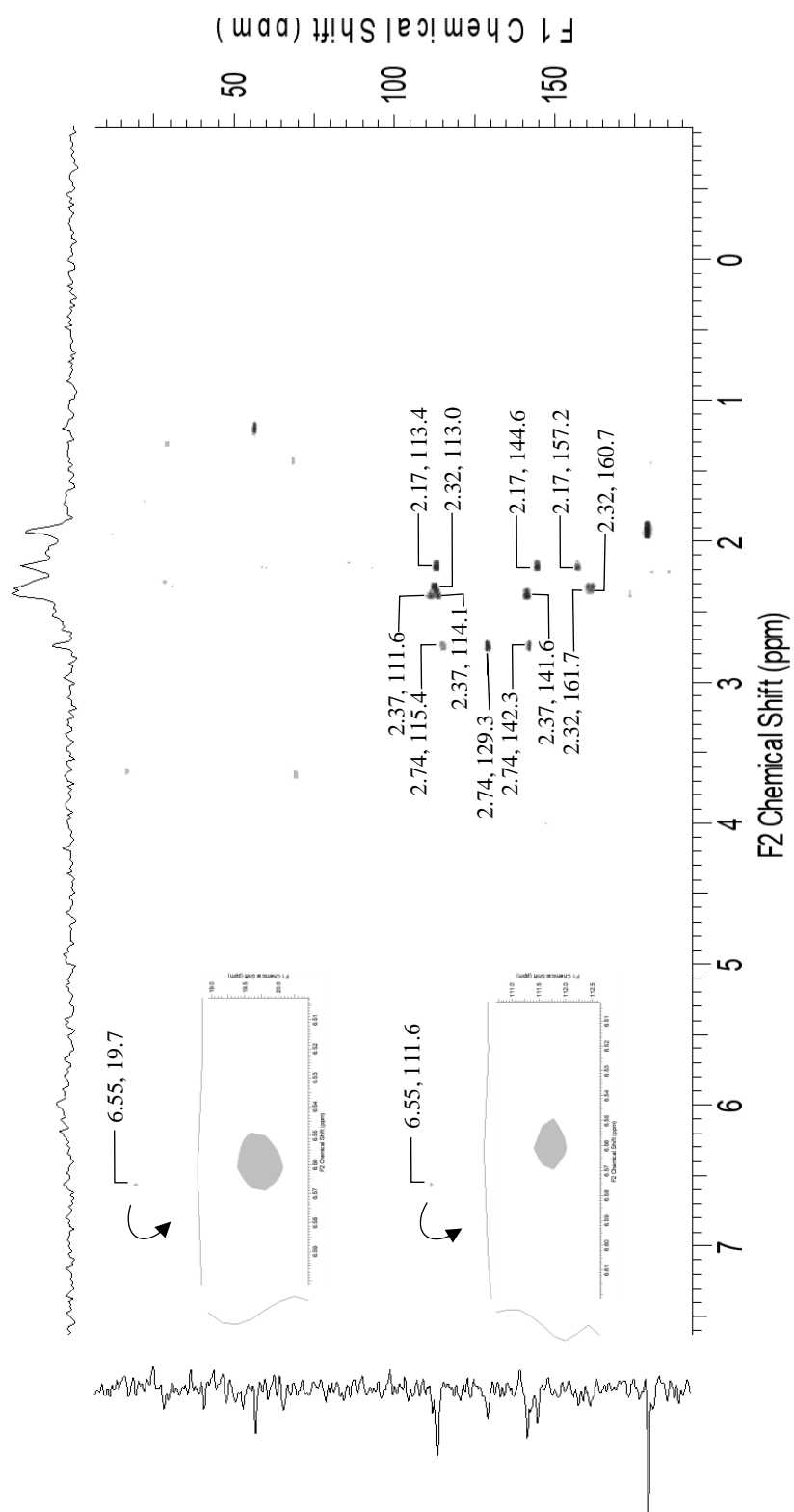
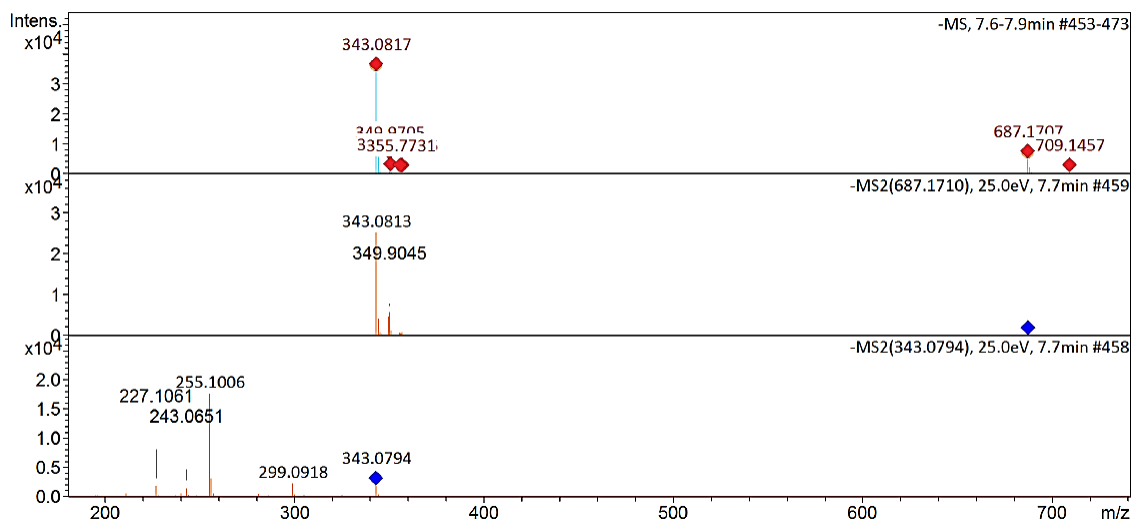
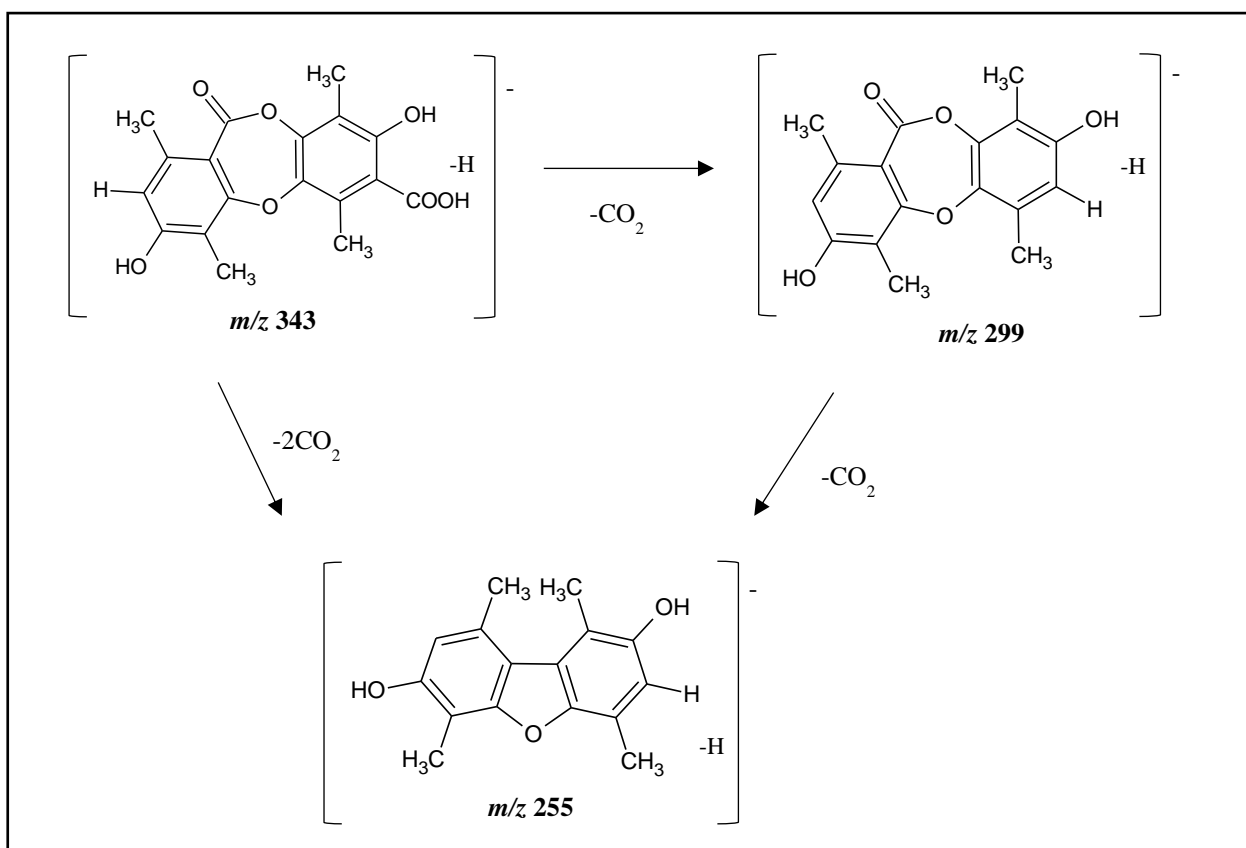


Figura 47 - Espectro de massas com a fragmentação da substância **8** (ESI modo negativo)

No espectro de massas foi evidenciado duas fragmentações, uma de  $m/z$  299,0918 (correspondente a perda de  $\text{CO}_2$ ) e outra de 255,1006 (perda de outro  $\text{CO}_2$ ) (PARROT et al., 2013). Uma breve proposta para a perda de  $\text{CO}_2$  na estrutura da substância **8** é apresentada na Figura 48.

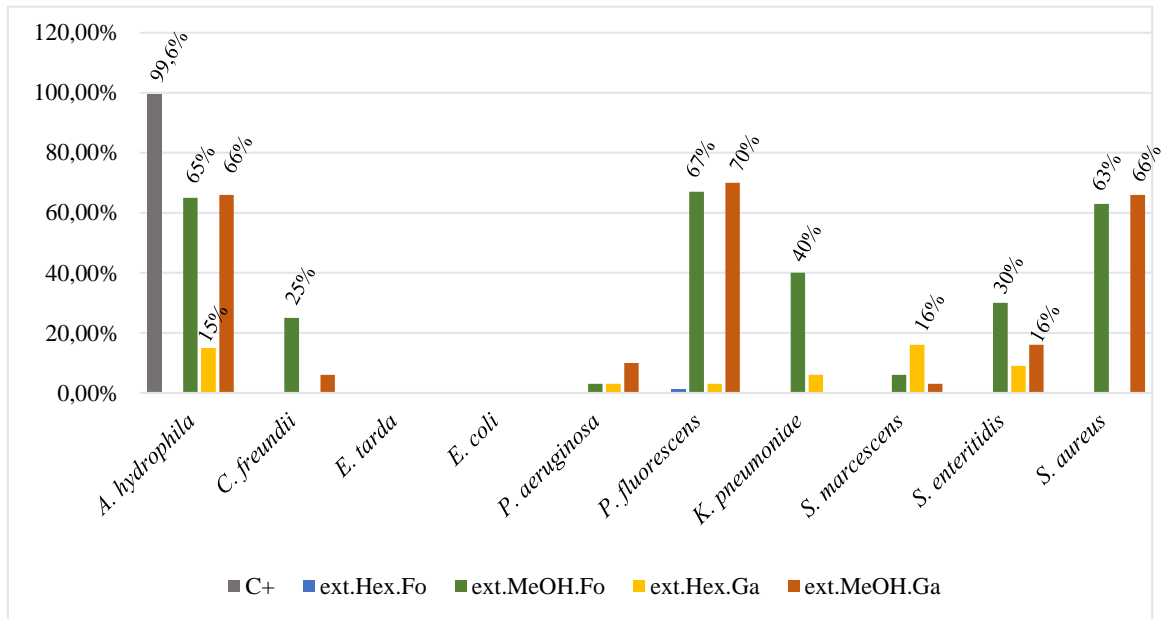
Figura 48 - Perda de  $\text{CO}_2$  na fragmentação da substância **8** (ESI modo negativo)

#### 5.4 Ensaio antibacteriano dos extratos de folhas e galhos de *M. guianensis*

Os dados obtidos do ensaio antibacteriano pelo método de microdiluição em caldo foram expressos em porcentagem de inibição das amostras, comparado ao padrão antibiótico. As amostras foram avaliadas na concentração de 1000 µg/mL, e de acordo com a leitura espectrofotométrica foi calculada a inibição no crescimento do microrganismo.

Com base nos resultados (Figura 49), nota-se que os extratos metanólicos de galhos e folhas foram os que apresentaram maior atividade, com porcentagem de inibição de 63 a 70% frente as bactérias Gram-negativas *A. hydrophyla* e *P. fluorescens*, e contra *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva. Nesse ensaio as bactérias Gram-negativas *C. freundii*, *K. pneumoniae* e *S. enteritidis* também foram sensíveis frente ao extrato metanólico das folhas, porém, apresentaram inibição com valores menores, entre 25 e 40%.

Figura 49 - Gráfico indicando o percentual de inibição dos extratos de *M. guianensis* frente a cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positiva



ext.Hex.Fo (extrato hexânico das folhas), ext.MeOH.Fo (extrato metanólico das folhas), ext.Hex.Ga (extrato hexânico dos galhos), ext.MeOH.Ga (extrato metanólico dos galhos)

Neste trabalho, a composição química do extrato metanólico dos galhos de *M. guianensis* mostrou a presença de triterpenos e fenólicos, os quais podem ter sido os responsáveis pela atividade inibitória de 66-70% contra as cepas de *P. fluorescens*, *A. hydrophyla*, e *S. aureus*. A atuação em sinergia das substâncias ou mesmo a atuação individual devem ser consideradas válidas pela bioatividade do extrato, uma vez que os triterpenos lupeol e  $\beta$ -amirina possuem atividade antibacteriana comprovada frente a algumas bactérias. O lupeol

já mostrou ser ativo contra *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* (SHAI et al., 2008). A  $\beta$ -amirina mostrou-se um efetivo agente inibidor de crescimento de *S. aureus*, *E. faecalis* e outros (KLIPIMO et al., 2011; ZHENG et al., 2011; ABDEL-RAOULF et al., 2015). O galato de metila também é descrito na literatura com atividade antibacteriana, bem como potencializador de outras substâncias (KANG et al., 2008).

O estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *M. guianensis* resultou no isolamento de substâncias que possuem atividade antibacteriana, como o lupeol e o taraxerol (KOAY et al., 2013; PATIL et al., 2018).

Cursino et al. (2011b) relatou atividade antibacteriana do extrato diclorometânico das folhas de *M. guianensis* contra *S. aureus*, desse mesmo extrato foram isolados os triterpenos lupeol, taraxerol e lupenona, sugerindo que há grande chance de essas substâncias serem as responsáveis pela atividade inibitória dos extratos metanólicos das folhas e dos galhos de *M. guianensis* frente à *S. aureus*, encontrada neste trabalho.

De modo geral, a atividade inibitória de alguns extratos brutos e a inatividade de outros poderia ser justificada mediante duas possibilidades. A primeira é o sinergismo, onde a interação de duas ou mais substâncias resultam na atividade agonista ou antagonista frente um organismo teste. Outra possibilidade refere-se à ação de uma única substância sendo responsável pela bioatividade (PANDE e KOST, 2017).

Algumas espécies bacterianas são inatamente resistentes a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos. Nesses casos, todas as cepas daquela espécie bacteriana apresentam resistência a todos os membros daquelas classes antibacterianas (TENOVER, 2006). Além disso, ainda que a mesma constituição química para todas as bactérias Gram-negativas seja a mesma, a camada celular possui diferenciação no arranjo dessas estruturas, limitando a ação e provavelmente auxiliando a resistência da bactéria à determinadas substâncias consideradas antibacterianas (TOUANI et al., 2014).

A atividade frente a bactérias Gram-negativas mostra que mesmo com as diferenças estruturais presentes na parede celular desses microrganismos, como a camada de lipopolissacarídeos, os extratos metanólicos de folhas e galhos tiveram ação inibitória na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , demonstrando um potencial no combate a essas cepas bacterianas (KHAMENEH et al., 2019).

## CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico dos extratos das folhas e dos galhos de *M. guianensis* mostrou que os extratos hexânicos possuem terpenos e os extratos metanólicos também apresentam essa classe de substância, além de substâncias fenólicas.

O estudo fitoquímico do extrato metanólico dos galhos permitiu o isolamento da mistura dos esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, mistura dos triterpenos lupeol e  $\beta$ -amirina, lupen-3-ona e  $\beta$ -amirin-3-ona, e os fenólicos galato de metila e ácido hipoprotocetrárico.

O fracionamento do extrato metanólico das folhas conduziu ao isolamento da mistura dos triterpenos taraxerol e lupeol.

Neste trabalho os extratos metanólicos dos galhos e folhas de *M. guianensis* demonstraram potencial antibacteriano, inibindo o crescimento de duas bactérias Gram-negativas e uma bactéria Gram-positiva. Os resultados deste estudo sugerem que as substâncias isoladas desses extratos ativos desempenham um papel fundamental na atividade inibitória observada, respaldando-se em dados científicos existentes que corroboram com essas descobertas.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o conhecimento da atividade antibacteriana e principalmente para o conhecimento da composição química de *M. guianensis*.

Vale ressaltar que os triterpenos  $\beta$ -amirina e  $\beta$ -amirin-3-ona, bem como os fenólicos galato de metila e ácido hipoprotocetrárico estão sendo relatados pela primeira vez na família Coulaceae, de acordo com a literatura consultada.

Os resultados encontrados reforçam a pesquisa com produtos naturais, demonstrando que a espécie *M. guianensis* pode ser uma fonte alternativa viável para a produção de substâncias estratégicas que possam ser usadas no combate a microrganismos patogênicos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-ENAZI, N. M.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M.; AL-OTHMAN, M. R.; HATAMLEH, A. A. Antibacterial  $\beta$ -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*. **Arabian J. Chem.**, v. 8, p. 32–37, 2015. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.09.033
- ADEBAYO-TAYO, B. C.; AJIBESIN, K. K. Antimicrobial activities of *Coula edulis*. **Res. J. Med. Plant**, v. 2, n. 2, p. 86-91, 2008.
- AIT-OUAZZOU, A.; ESPINA, L.; GELAW, T.; LAMO-CASTELLVÍ, S.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, n. 1, p. 173–185, 2013.
- ALQAHTANI, A.; HAMID, K.; KAM, A.; WONG, K. H.; ABDELHAK, Z.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; CHAN, K.; LI, K. M.; GROUNDWATER, P. W.; LI, G. Q. The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, p. 908–931, 2013.
- ALMEIDA, P. D. O.; BOLETI, A. P. A.; RÜDIGER, A. L.; LOURENÇO, G. A.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, 293768, 2015. DOI: 10.1155/2015/293768
- ANAND, U.; JACOBO-HERRERA, N.; ALTEMIMI, A.; N, LAKHSSASSI. A Comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, v. 9, p. 258, 2019.
- ANDRADE-OCHOA, S.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; VILLANUEVA-GARCÍA, M.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B. E.; RODRÍGUEZ-VALDEZ, L. M., et al. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.
- ANTIMICROBIAL RESISTENCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- ASAHI, Y.; NOIRI, Y.; MIURA, J.; MAEZONO, H.; YAMAGUCHI, M.; YAMAMOTO, R.; AZAKAMI, H.; HAYASHI, M.; EBISU, S.; et al. Effects of the tea catechin epigallocatechin catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. **J. Appl. Microbiol.**, v. 116, n. 5, p. 1164–1171, 2014.
- ATA, A.; TAN, D.; MATOCHKO, W.; ADESANWO, J. Chemical constituents of *Drypetes gossweileri* and their enzyme inhibitory and anti-fungal activities. **Phytochem. Lets.**, v. 4, v. 1, p. 34-37, 2011. DOI: 10.1016/j.phytol.2010.10.007
- ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Revs.**, v. 20, p. 201, 2021.

- AZIZ, N.; KIM, M.; CHO, J. Y. Anti-inflammatory effects of luteolin: a review of in vitro, in vivo, and in silico studies. **J. Ethnopharm.**, v. 225, p. 342–358, 2018.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I, S, M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. A.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **J. Food Engin.**, v. 137, p. 426–436, 2013.
- BAG, P.; CHATTOPADHYAY, D.; MUKHERJEE, H.; OJHA, D.; MANDAL, N.; SARKAR, M. C.; CHATTERJEE, T.; DAS, GOBARDHAN.; CHAKRABORTI. Anti-herpes virus activities of bioactive fraction and isolated pure constituent of *Mallotus peltatus*: an ethnomedicine from Andaman Islands. **Virology J.**, v. 9, p. 1–12, 2012.
- BANERJEE, M.; PARAI, D.; CHATTOPADHYAY S.; MUKHERJEE S. K. Andrographolide: antibacterial activity against common bacteria of human health concern and possible mechanism of action. **Folia Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 237-244, 2017.
- BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiol. Res.**, v. 196, p. 44–68, 2017.
- BESERRA, F. P.; XUE, M.; MAIA, G. L. A.; ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H.; JACKSON, C. J. Lupeol, a pentacyclic triterpene, promotes migration, wound closure, and contractile effect *in vitro*: possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK.MAPK Pathways. **Molecules**, v. 23, p. 1-17, 2018.
- BETTS, J. W.; SHARILI, A. S.; PHEE, L. M.; WAREHAM, D. W. *In vitro* activity of epigallocatechin gallate and quercetin alone and in combination versus clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Nat. Prod.**, v. 78, n. 8, p. 2145–2148, 2015.
- BI, X.; HAN, L.; QU T; MU, Y.; GUAN, P.; QU, X.; WANG, Z.; HUANG, X. Anti-Inflammatory effects, SAR, and action mechanism of monoterpenoids from *Radix Paeoniae alba* on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 715, 2017. DOI: 10.3390/molecules22050715
- BISWAS, M.; BISWAS, K.; GHOSH, A.K.; HALDAR, P. K. A pentacyclic triterpenoid possessing anti-inflammatory activity from the fruits of *Dregea volubilis*. **Pharmacogn. Mag.**, v. 5, p. 64–68, 2009.
- BOUGARD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Sci.**, v. 161, p. 839–851, 2001.
- BOURJOT, M.; LEYSSEN, P.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J. C.; CANARD, B.; RASOANAIVO, P.; GUÉRITTE, F.; LITAUDON, M. Chemical constituents of *Anacolosa pervilleana* and their antiviral activities. **Fitoterapia**, v. 83, n. 6, p. 1076-1080, 2012. DOI: 10.1016/j.fitote.2012.05.004



- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, p. 317-333, 1998.
- BROWN, A. R.; ETTEFAGH, K. A.; TODD, D.; COLE, P. S.; EGAN, J. M.; FOIL, D. H. A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. **Plos One.**, v. 10, n. 5, e0124814, 2015.
- CAMARGO, J. L.; FERRAZ, I. D. *Minquartia guianensis* Aubl. **Manual de Sementes da Amazônia**. INPA, p. 1-7, 2004.
- CAMARGO, M. R. M. **Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minquartia guianensis* Aubl. coletadas em Roraima**. 96 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Roraima, 2011.
- CANTRELL, C. L., FRANZBLAU, S. G., FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.**, v. 67, n. 1, p. 1-10, 2001.
- CHAN, B. C. L.; IP, M.; LAU, C. B. S.; LUI, S. L.; JOLIVALT, C.; GANEM-ELBAZ, C. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, n. 1, p. 767-73, 2011.
- CHAUHAN, A. K.; KANG, S. C. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella Ser. typhimurium* *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an *ex vivo* model. **Res. Microbiol.**, v. 16, n. 7, p. 559-565, 2014.
- CHEN, A.; ZHANG, L. The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation *in vitro* by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor-beta receptor. **J. Biol. Chem.**, 278: 23381-23389, 2003.
- CHEN, C. C.; HUANG, C. Y. Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* DnaB helicase by the flavonol galangin. **Protein J.**, v. 30, n. 1, p. 59-65, 2011.
- CHING, J., CHUA, T., CHIN, L., LAU, A., PANG, Y., JAYA, J., TAN, C., KOH, H.  $\beta$ -Amyrin from *Ardisia elliptica* Thunb. is more potent than aspirin in inhibiting collagen-induced platelet aggregation. **Indian J. Exp. Biol.**, 48, 275-279, 2010.
- CHINSEMBU, K. C. Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. **Acta Tropica.**, v. 153, p. 46-56, 2016.
- CHO, Y. S.; OH, J. J.; OH, K. H. Synergistic anti-bacterial and proteomic effects of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Phytomed.**, v. 18, n. 11, p. 941-946, 2011.
- CHO, M.; SO, I.; CHUN, J. N.; JEON, J-H. The antitumor effects of geraniol: modulation of cancer hallmark pathways review. **Int. J. Oncol.**, v. 48, n. 5, p. 1772-1782, 2016. DOI: 10.3892/ijo.2016.3427

- CHOI, J. G.; KANG, O. H.; LEE, Y. S.; OH, Y. C.; CHAE, H. S.; JANG, H. J.; KIM, J. H.; SOHN, D. H.; SHIN, D. W.; PARK, H.; KWON, D. Y. *In vitro* activity of methyl gallate isolated from *Galla rhois* alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of *salmonella*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 1848–1852, 2008.
- CHOI J. G.; MUN, S. H.; CHAHAR, H. S.; BHARAJ. P.; KANG, O. H. et al. Methyl gallate from *Galla rhois* successfully controls clinical isolates of *Salmonella* infection in both *in vitro* and *in vivo* systems. **Plos one**, v. 9, n. 7, 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0102697
- CHU, M.; DING, R.; CHU, Z.; ZHANG, M.; LIU, X.; XIE, S.; ZHAI, Y. Role of berberine in antibacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.14, n. 89, 2014. DOI: 10.1186/1472-6882-14-89.
- CHUNG, P. Y.; CHUNG, L.Y.; NAVARATNAM, P. Potential targets by pentacyclitriterpenoids from *Callicarpa farinosa* against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 94, p. 48–54, 2014.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. **M07 A10**. v. 35, p. 1-87, 2015.
- COHEN, S. D.; KENNEDY, J. A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, v. 50, p. 620-643, 2010.
- COSTA-LIMA, J.L.; CHAGAS, E.C.O. Coulaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB19958>>. Acesso em: 03 jan. 2023
- CRUZ, F., ROQUE, N., GIESBRECHT, A., DAVINO, S. Antibiotic activity of diterpenes from *Mikania triangularis*. **Fitoterapia**, v. 67, n. 2, p. 189–190, 1996.
- CUI, Y.; OH, Y.; LIM, J.; YOUN, M.; LEE, I.; PAK, H.; et al. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol(–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Food Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 80–87, 2012.
- CUNHA, W. R.; DE MATOS, G. X.; SOUZA, M. G. M.; TOZATTI, M. G., ANDRADE E SILVA, M. L.; MARTINS, C. H.; et al. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. **Pharm. Biol.**, v. 48, n. 2, p. 166–169, 2010.
- CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181–186, 2009.
- CURSINO, L. M. C. **Estudo fitoquímico e bioatividade dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olacaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, 2011(a).
- CURSINO, L. M. C.; SANTOS, I.; MARIÚBA, L. A. M.; JEFFREYS, M. F.; LIMA, N. M.; OLIVEIRA, J. L.; ORLANDI, P. P.; NUNEZ, C. V. Antibacterial activity of *Minquartia*

- guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emir. J. Food Agric.**, v. 23, n. 6, p. 505-510, 2011(b).
- CURSINO, L. M. C.; NUNEZ, C. V.; DE PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; DOS SANTOS, P. A. Triterpenes from *Minquartia guianensis* (olacaceae) and in vitro antimalarial activity. **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2165–2168, 2012.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 23, n. 2, p. 174–181, 2012.
- DARSHANI, P.; SARMA, S. S.; SRIVASTAMA, A. K.; BAISHYA, R.; KUMAR, D. Anti-viral triterpenes: a review. **Phytochem. Rev.**, v. 21, p. 1761-1842, 2022. DOI: 10.1007/s11101-022-09808-1
- DIAS, M. I.; SOUSA M. J.; ALVES, R. C.; FERREIRA, I. C. F. R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. **Indust. Crops and Prod.**, v. 82, p. 9-22, 2016.
- DUARTE, N.; FERREIRA, M. J. U.; MARTINS, M.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L. Antibacterial activity of ergosterol peroxide against *Mycobacterium tuberculosis*: dependence upon system and medium employed. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 7, p. 601–604, 2007.
- DZOTAM, J. K.; KUETE, V. Antibacterial and antibiotic-modifying activity of methanol extracts from six cameronian food plants against multidrug-resistant enteric bacteria. **Biomed. Res. Inter.**, p. 1-19, 2017.
- EL-SEEDI, H. R.; HAZELL, A. C.; TORSELL, K. B. G. Triterpenes, lichexanthone and an acetylenic acid from *Minquartia guianensis*. **Phytochem.**, v. 35, n. 5, p. 1297–1299, 1994.
- ERDEM, S. A., NABAVI, S. F., ORHAN, I. E., DAGLIA, M., IZADI, M., NABAVI, S. M. Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. **Daru J.Pharm. Sci.**, v. 23, n. 1, p. 1, 2015.
- ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control.**, v. 22, n. 6, p. 896–902, 2011.
- FAN, T. P.; YEH, J. C.; LEUNG, K. W.; YUE, P. Y. K.; WONG, R. N. S. Angiogenesis: from plants to blood vessels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, p. 297–309, 2006.
- FANG, C.; FERNIE, A. R.; LUO, J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. **Trends Plant Sci.**, v. 1, p. 83-98, 2019.
- FERNIE, A. R.; TOHGE, T. The genetics of plant metabolism. **Ann. Rev. Gen.**, v. 51, p. 287–310, 2017.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends. Food Sci. Technol.**, v. 19, n. 3, p. 156–164, 2008.

- FORT, D. M.; KING S. R.; CARLSON, T. J.; NELSON, S. T. Miquartynoic acid from *Coula edulis*. **Bioch. System. Eco.**, v. 28, p. 489-490, 2000.
- FUKUMITSU, S.; VILLAREAL, M.O.; FUJITSUKA, T.; AIDA, K.; ISODA, H. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of pentacyclic triterpenoids maslinic acid through NF- $\kappa$ B inactivation. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 2, 399-409, 2016.
- Global Biodiversity Information Facility. <https://www.gbif.org/pt/species/3686157>. Acessado em 20 janeiro 2023.
- GE, F.; ZENG, F.; LIU, S.; GUO, N.; YE, H.; SONG, Y.; et al. *In vitro* synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin and ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, n. 5, p. 567-572, 2010.
- GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 1, p. 77-80, 2001.
- GUNSTONE, F. D.; SEALY, A. J. The acetylenic acids of isano (Boleko) Oil. Fatty acids, Part XII. **J. Chem. Soc. (Resumed)**, p. 5772-5778, 1963.
- GUPTA, V. K.; FATIMA, A.; FARIDI, U.; NEGI, A. S.; SHANKER, K.; KUMAR, J. K.; RAHUJA, N.; LUQMAN, S.; SISODIA, B. S.; SAIKIA, D.; DAROKAR, M. P.; KHANUJA, S. P. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. **J Ethnophar.**, v. 116, n. 2, p. 377-80, 2008. DOI: 10.1016/j.jep.2007.11.037.
- HANNAN, A., SALEEM, S., CHAUDHARY, S., BARKAAT, M., ARSHAD, M. U. Antibacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ayub Med. Coll. Abbottabad.**, v. 20, n. 3, p. 72-74, 2008
- HASSAN, B. A. R. Medicinal plants (Importance and uses). **Pharmac. Analyt. Acta**, v. 3, p. 10, 2012.
- HSIEH, T. J.; LIU, T. Z.; CHIA, Y. C.; CHERN, C. L.; LU, F. J, et al. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 843-850, 2004.
- Flora do Brasil. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19958>, acessado em Fev 2023.
- HU, J.; ZHAO, J.; CHEN, W.; LIN, S.; ZHANG, J.; HONG, Z. Hepatoprotection of 1  $\beta$  hydroxyeuscaphic acid-the major constituent from *Rubus aleaefolius* against CCl<sub>4</sub>-induced injury in hepatocytes cells. **Pharm. Boil.** v. 6, 686-690, 2013.
- HUANG, S.; CAO, Y. Y.; DAI, B. D.; SUN, X. R.; ZHU, Z. Y.; CAO, Y. B. *In vitro* synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 12, p. 2234-2236, 2008.

- IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; AL HAIDARI, R. A.; EL-KHOLY, A. A., ZAYED, M. F.; KHAYAT, M. T. Biologically active fungal depsidones: Chemistry, biosynthesis, structural characterization, and bioactivities. **Fitoterapia**, v. 129, p. 317–365, 2018. DOI:10.1016/j.fitote.2018.04.012
- IGNACIMUTHU, S.; SHANMUGAM, N. Antimycobacterial activity of two natural alkaloids, vasicine acetate and 2-acetyl benzylamine, isolated from Indian shrub *Adhatoda vasica* Ness. leaves. **J. Biosci.**, v. 35, n. 4, p. 565–70, 2010. DOI: 10.1007/s12038-010-0065-8.
- IMRAN, M.; RAUF, A.; ABU-IZNEID, T.; NADEEM, M.; SHARIATI, M. A.; KHAN, I. A.; et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: a review. **Biomed. & Pharmacoth.**, v. 112, p. 108–612, 2019.
- ITA, B. N.; NDUKWE, G. I. Antioxidant activity of *Coula edulis* Baill. seed extracts. **Eur. J. Med. Plants**, v.17, n. 4, p. 1-7, 2016.
- IZZO, A., DI CARLO, G., BISCARDI, D., DE FUSCO, R., MASCOLO, N., BORRELLI, F., et al. Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity. **Phytother. Res.**, v. 9, n. 4, p. 281–286, 1995.
- JANUÁRIO, A. H.; RODRIGUES, E.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phytother. Res.**, v. 16, n. 5, p. 445-8, 2002.
- JAYASURIYA, H.; HERATH, K. B.; ONDEYKA, J. G.; GUAN, Z.; BORRIS, R. P.; TIWARI, S.; JONG, W.; CHAVEZ, F.; MOSS, J.; STEVENSON, D. W.; BECK, H. T.; SLATTERY, M.; ZAMORA, N.; SCHULMAN, M.; ALI, A.; SHARMA, N.; MACNAUL, K.; HAYES, N.; MENKE, J. G.; SINGH, S. B. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 1247-1252, 2005.
- JEON, J.; KIM, J. H.; LEE, C. K.; OH, C. H.; SONG, H. J. The antimicrobial activity of(–)-epigallocatechin-3-gallate and green tea extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolated from skin wounds. **Ann. Dermatol.**, v. 26, n. 5, p. 564–569, 2014.
- KAISER, C. R.; CUNICO, W.; PINHEIRO, A. C.; OLIVEIRA, A. G.; PERALTA, M. A.; SOUZA, M. V. N. Oxazolidinonas: uma nova classe de compostos no combate à tuberculose. **Rev. Bras. Farm.** v. 88, n. 2, p. 83–88, 2007.
- KAMATHAMA, S.; KUMAR, N.; GUDIPALLI, P. Isolation and characterization of gallic acid and methylgallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. And their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. **Toxicol. Repts**, v. 2, p. 520–529, 2015.
- KANE, C. J.; MENNA, J. H.; SUNG, C. C.; YEH, Y. C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specificinhibitor of herpes simplex virus *in vitro*. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives, **Biosci. Rep.**, v. 8, p. 95–102, 1988.

- KANG, M. S.; OH, J. S.; KANG, I. C.; HONG, S. J.; CHOI, C. H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **The J. Microb.**, v. 46, n. 6, p. 744-750, 2008. DOI 10.1007/s112275-008-0235-7
- KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Crit. Rev. Food Sci. and Nut.**, v. 44, p. 453-464, 2004.
- KHAMENEH, B.; DIAB, R.; GHAZVINI, K.; FAZLY BAZZAZ, B. S. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microb. Pathog.**, v. 95, p. 32-42, 2016.
- KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V.; FAZLY BAZZAZ, B. S. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrob. Resist. Infect. Contr.**, v. 8, p. 118, 2019.
- KLANCNIK, A.; SIKIC POGACAR, M.; TROST, K.; TUSEK ZNIDARIC, M.; MOZETIC VODOPIVEC, B.; SMOLE, M. S. Anti-campylobacter activity of resveratrol and an extract from waste pinot noir grape skins and seeds, and resistance of camp. Jejuni planktonic and biofilm cells, mediated via the CmeABC efflux pump. **J. Appl. Microbiol.**, v. 122, n. 1, p. 65-77, 2017.
- KLIPIMO, J. J.; KOORBANALLY, N. A.; CHENIA, H. Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v. 5, n. 8. p. 1150-1156.
- KOAY, Y. C.; WONG, K. C.; OSMAN, H.; ELDEEN, I. M. S.; ASMAWI, M. Z. Chemical constituents and biological activities of *Strobilanthes crispus* L. **Rec. Nat. Prod.**, v. 7, n. 1, p. 59-64, 2013. EISSN:1307-6167
- KONTOGIORGIS, C., DETSI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin-based drugs: a patent review (2008 -- present). **Expert. Opin. Ther. Pat.**, v. 22, n. 4, p. 437-54, 2012. DOI: 10.1517/13543776.2012.678835.
- KRAUZE-BARANOWSKA, M.; MAJDAN, M.; HAŁASA, R.; GŁÓD, D.; KULA, M.; FECKA, I.; et al. The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. **Food Funct.**, v. 5, n. 10, p. 2536–2541, 2014.
- KWEIFIO-OKAI, G., DE MUNK, F., MACRIDES, T.A., SMITH, P., RUMBLE, B. A. Antiarthritic mechanisms of lupeol triterpenes. **Drug Dev. Res.**, v. 36, p. 20–24, 1995.
- LAIRD, K.; ARMITAGE, D.; PHILLIPS, C. Reduction of surface contamination and biofilms of *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus aureus* using a citrus-based vapour. **J. Hosp. Infect.**, v. 80, n. 1, p. 61–66, 2012.
- LAW, M.; SHAABAN, A.; RAHMAN, M. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. **FEMS Microbiol. Revs.**, v. 43, p. 490–516, 2019.
- LECHNER, D.; GIBBONS, S.; BUCAR, F. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, n. 2, p. 345–8, 2008.

- LEE, K. A.; MOON, S. H.; KIM, K. T.; MENDONCA, A. F.; PAIK, H. D. Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157: H7 cell growth and lipopolysaccharide production. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 19, n. 1, p. 257–261, 2010.
- LIAO, P.; HEMMERLIN, A.; BACH, T. J.; CHYE, M-L. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. **Biotechnol Adv.**, v. 34, n. 5, p. 697-713, 2016.
- LISEWSKI A. M.; QUIROS J. P.; NG, C. L, ADIKESAVAN, A. K.; MIURA, K.; PUTLURI, N.; EASTMAN, R. T. et al. Supergenomic network compression and the discovery of EXP1 as a glutathione transferase inhibited by artesunate. **Cell.**, v. 158, n. 4, p. 916-928, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.07.011
- LIU, H., MOU, Y., ZHAO, J., WANG, J., ZHOU, L., WANG, M., et al. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules* 15 (11), 7933–7945, 2010.
- LIU, Q.; NIU, H.; ZHANG, W.; MU, H.; SUN, C.; DUAN, J. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 60, n. 5, p. 421–430, 2015.
- LOZANO, S. A.; BRILHANTE, A. B. S.; DE SOUZA, J. C.; DA SILVA, D. R.; SALAZAR, M. G. M.; HALICKI, P. C. B.; RAMOS, D. F.; DA SILVA, P. E. A.; NUNEZ, C. V. *Duroia saccifera*: in vitro germination, friable calli and identification of  $\beta$ -sitosterol and stigmaterol from the active extract against *Mycobacterium tuberculosis*. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.
- MAEDA, H. A. Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution to plant chemical diversity. **Front. in Plant Sci.**, v. 10, p. 881, 2019.
- MAHMOUD, M. F., ALRUMMAN, S. A., HESHAM, A. E. L. Biological activities of some *Acacia* spp. (Fabaceae) against new clinical isolates identified by ribosomal RNA gene-based phylogenetic analysis. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 29, n. 1, p. 221–229, 2016.
- MAITRA, A., MUNSHI, T., HEALY, J., MARTIN, L. T., VOLLMER, W., KEEP, N. H., BHAKTA, S. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 43, p. 548–575, 2019.
- MANDAL, S. M., ROY, A., GHOSH, A. K., HAZRA, T. K., BASAK, A., FRANCO, O. L. Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phagesutilization. **Front. Pharmacol.**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2014.
- MANN, A.; IBRAHIM, K.; OYEWALE, A. O.; AMUPITAN, J. O.; FATOPE, M. O.; OKOGUN, J. I. Antimycobacterial Friedelane-terpenoid from the Root Bark of *Terminalia Avicennioides*. **Amer. J. Chem.**, v. 1, n. 52, 2011.
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R.; NEILL, D. A. Isolation of a novel cytotoxic polyacetilene from a traditional anthelmintic medicinal plant *Minquartia guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 2, p. 261-266, 1989.

- MARTINEZ, A. M.; GAMBIN, Y.; SIERECKI, Y. Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance. **Inter. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 6, p. 1255–1277, 2019. DOI: 10.3390/ijms20061255.
- MENG, L. L.; HUANG, C. S.; LIU, H. X. Advances in research on natural triterpenoids with bioactivities. **Guihala**, v. 6, p. 856–860, 2008.
- MIETHKE, M.; PIERONI, M.; WEBER, T. et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. **Nat. Rev. Chem.**, v. 5, p. 726-749, 2021. DOI 10.1038/s41570-021-00313-1
- MOLINOWSKA, M.; MIROSLAW, B.; SIKORA, E.; Ogonowski, J.; WOJTKIEWICZ, A. M.; SZALENEIC, M.; PASIKOWSKA-PIWKO, ERIS, I. New lupeol esters as active substances in the treatment of skin damage. **Plos One**, v. 14, n. 3, p. 1-15, 2019.
- MOREL, C.; STERMITZ, F. R.; TEGOS, G.; LEWIS, K. Isoflavones as potentiators of antibacterial activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 19, p. 5677–5679, 2003.
- MUS, A. A.; GOH, L. P.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A. The biosynthesis and medicinal properties of taraxerol. **Biomed**s, v. 10, p. 807, 2022.
- NABAVI, S. M., MARCHESE, A., IZADI, M., CURTI, V., DAGLIA, M., NABAVI, S. F. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. **Food Chem.**, v. 173, p. 339–347, 2015.
- NAIR, J. J.; MULAUDZI, R. B.; CHUKWUJEKWU, J. C.; VAN HEERDEN, F. R.; VAN STADEN, J. Antigonococcal activity of *Ximenia caffra* Sond. (Olacaceae) and identification of the active principle. **South Afr. J. Bot.**, v. 86, p. 111–115, 2013. dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2013.02.170.
- NASCIMENTO, P. G. G.; LEMOS, T. L. G.; BIZERRA, A. M. C.; ARRIAGA, A. M. C.; FERREIRA, D. A.; SANTIAGO, G. M.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. G. M. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. **Molecules**, v. 19, p. 1317–1327, 2014.
- NASSER, A. L. M.; PAVAN, F. R.; BORALLE, N.; ZOCCOLO, G. L.; SANTOS, L. C.; MARCHI, M. R. R.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W. Esteroides e triterpenos de espécies de *Qualea* – bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 34, n. 4, p. 513-517, 2013.
- NCUBE, B.; STADEN, J. V. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v. 20, p. 12698–12731, 2015.
- NEERAJ, V.; BEHERA, B. C.; PARIZADEH, H.; SHARMA, B. O. Bactericidal Activity of some lichen secondary compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* & *Parmotrema sancti-angelii*. **Inter. J. Drug Develop. Res.**, v. 3, n. 3, 2011.
- NGO, S. T.; LI, M. S. Top-leads from natural products for treatment of Alzheimer's disease: docking and molecular dynamics study. **Mol. Simul.**, v. 39, 279–291, 2013.



- NICKRENT, D. L.; MALÉCOT, V.; VIDAL-RUSSELL, R.; DER, J. P. A revised classification of Santalales. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 538–558, 2010. <https://doi.org/10.1002/tax.592019>
- OH, K. K.; ADNAN, M.; CHO, D. H. Elucidating drug-like compounds and potential mechanisms of corn silk (*Stigma maydis*) against obesity: a network pharmacology study. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 43, n. 3, p. 1906–1936, 2021.
- OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de <sup>13</sup>C. **Quím. Nova**, v. 13, p. 278–281, 1990.
- OLIVEIRA, J. C. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Composição química das cascas das raízes e flores de *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). **Química Nova**, v. 39, p. 189–193, 2016.
- OLIVEIRA, N. N. T.; LEMOS, S. O.; PEREIRA, A. P. O.; FABRI, R. L.; CHEDIERA, L. M. Atividade antifúngica do látex de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae) e de lupenona isolada de suas folhas. **Rev. Virt. Quím.**, v. 11, n. 5, 2019.
- PANDE, S.; KOST, C. Bacterial unculturability and the formation of Intercellular metabolic networks. **Trends Microbiol.**, v. 25, n. 5, p. 1–13, 2017. ISSN 0966-842X
- PARROT, D.; JAN, S.; BAERT, N.; GUYOT, S.; TOMASI, S. Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina siliquosa* complex using LC–ESI-MS/MS approach. **Phytochem.**, v. 89, p. 114–124, 2013.
- PATIL, S. P.; JAIN, P. D.; SANCHETI, J. S.; GHUMATKAR, P. J.; TAMBE, R.; SATHAYE, S. Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 192–202, 2014.
- PATIL, P.; SOUJANYA, B.; KIRAN, K. A. A review on lupeol: superficial triterpenoid from horticulture crops. **Internat. J. Chem. Stud.**, v. 6, n. 3, p. 3301–3305, 2018. ISSN: 2349–8528
- PAWAR, S.; PAL, S. Antimicrobial activity of extracts of *Terminalia catappa* root. **Indian. J. Med. Sci.**, v. 56, n. 6, p. 276, 2002.
- PEDROZA, L. S.; SALAZAR, M. G. M.; OSORIO, M. I. C.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; OLIVEIRA, A. B.; NUNEZ, C. V. Estudo químico e avaliação da atividade antimalárica dos galhos de *Piranhea trifoliata*. **Revista Fitos**, v. 14, n. 4, p. 476–491, 2020.
- PELÁEZ, G. L. M.; SIERRA, J. A.; ALZATE, F.; HOLZGRABE, U.; RAMIREZ-PINEDA, J. R. Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 5, 754–761, 2013.
- PEREIRA, E. P. L.; BRAGA-DE SOUZA, S.; SANTOS, C. C.; SANTOS, L. O.; CERQUEIRA, M. D.; RIBEIRO, P. R.; FERNANDEZ, L. G.; SILVA, V. D. A.; COSTA, S. L. *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Ver. Bras. Farmac.**, v. 27, p. 199–205, 2017.

- PERTUIT, D.; MITAINE-OFFER, A.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, C.; DELAUDE, C.; LACAILLE-DUBOIS, M. Triterpene saponins of the root bark of *Olax obtusifolia* De Wild. **Phytochem. Lett.**, v. 28, p. 174–178, 2018. DOI.org/10.1016/j.phytol.2018.09.018
- PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomed.**, v. 7, n. 4, p. 335–8, 2000.
- PIVATTO, M.; BACCINI, L. R.; SHARMA, A.; NAKABASHI, M.; DANUELLO, A.; VIEGAS JR, C.; GARCIA, C. R. S.; BOLZANI, V. S. Antimalarial activity of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* and semisynthetic derivatives. **J. Brazil. Chem. Soc.**, v. 25, p. 1900–1906, 2014.
- PUEBLA, P.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, M. G. S.; RUBEM-MAURO, L.; FELICIANO, A. S. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, in active species against *Bothrops jararacussu* venom. **Molecules**, v. 15, p. 8193-8204, 2010.
- QIU, C.; SMUTS, J.; SCHUG, K. A. Analysis of terpenes and turpentine using gas chromatography with vacuum ultraviolet detection. **J. Separ. Sci.**, 40: 869- 877, 2017.
- QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; PINTO, A. C. S.; SANTOS, E. V. M.; MORAIS, S. K. R.; ALECRIM, A. M.; PEDROSO, A. C. S.; CYRINO, B. R. B.; MELO, C. S.; FINNEY, E. K.; GOMES, E. O.; SOUZA, K. S.; OLIVEIRA, L. C. P.; DON, L. C.; SILVA, L. F. R.; QUEIROZ, M. M. A.; HENRIQUE, M. C.; SANTOS, M.; PINTO, P. S. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 93-104. 2003.
- RAGOZONI, A. A.; VASCONCELOS, M. A. L.; GALVÃO, D. F.; CUNHA, N. L.; NICOLELLA, H. D.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M.; SILVA, M. L. A.; TABARES, D. C.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Antimicrobial activity of triterpene acids against phytopathogens. **Braz. J. Dev.**, v. 7, n. 3, p. 27870-27881, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-478
- RANDHAWA, H. K.; HUNDAL, K. K.; AHIRRAO, P. N.; JACHAK, S. M.; NANDANWAR, H. S. Efflux pump inhibitory activity of flavonoids isolated from *Alpinia calcarata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biologia**, v. 71, n. 5, p. 484–93, 2016.
- RASHID, M. A.; GUSTAFSON K. R.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. HIV-inhibitory natural products part 61 - Absolute stereochemistry and anti-HIV activity of minquartynoic acid, a polyacetylene from *Ochanostachys amentacea*. **Nat. Prod. Lett.**, v. 15, p. 21-26, 2001.
- RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A.; HUANSI, A. G. Absolute configuration and antiprotozoal activity of Minquartynoic acid. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 9, p. 1295–1296, 2000.
- RHODES, M. J. C. Physiological role for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. **Plant Mol. Biol.**, v. 24, p. 1–20, 1994.

- RIBEIRO, J. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. p. 816
- RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A.; ROUMY, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. **J. Ethnopharm.**, v. 133, p. 917–921, 2011.
- SALUDES J. P.; GARSON M. J.; FRANZBLAU S. G.; AGUINALDO, A. M. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). **Phytother. Rese.**, v. 16, n. 883-685, 2002.
- SALIH, E. Y. A.; JULKUNEN-TIITTO, R.; LAMPI, A. M.; KANNINEN, M.; LUUKKANEN, O.; SIPI, M.; LEHTONEN, M.; VUORELA, H.; FYHRQUIST, P. *Terminalia laxiflora* and *Terminalia brownii* contain a broad spectrum of antimycobacterial compounds including ellagitannins, ellagic acid derivatives, triterpenes, fatty acids and fatty alcohols. **J. Ethnop.**, v. 227, n. 82, 2018.
- SANSORES-PERAZA, P.; ROSALDO-VALLADO, M.; BRITO-LOEZA, W.; MENAREJÓN, G. J.; QUIJANNO, L. Cassine, an antimicrobial alkaloid from *Senna racemosa*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 690–692, 2000.
- SANTIAGO, C., PANG, E. L., LIM, K. H., LOH, H. S., TING, K. N. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from *Duabanga grandiflora*. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.
- SANTOS-FILHO, L. G. A.; CASTRO, K. N. C.; PEREIRA, A. M. L.; DINIZ, F. M. **Deteção da atividade antibacteriana in vitro de compostos naturais à base de plantas: metodologia científica**. Embrapa, Piauí, v. 1, p. 7, 2019. ISSN 0104-7647
- SCIUTO, A. M.; MORAN, T. S. Effect of dietary treatment with n-propyl gallate or vitamin E on the survival of mice exposed to phosgene. **J. Appl. Toxicol.**, v. 21, p. 33–39, 2001.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALN, P. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: a review. **Internat. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 1573, 2018.
- SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 119, p. 238-244, 2008. DOI 10.1016/j.jep.2008.06.036
- SHAN, L. Y.; THING, T. C.; PING, T. S.; AWANG, K.; HASHIM N. M.; NAFIAH, M. A.; AHMAD, K. Cytotoxic, antibacterial and antioxidant activity of triterpenoids from *Kopsia singaporensis* Ridl. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 6, n. 5, p. 815-822, 2014. ISSN: 0975-7384
- SHARMA, S.; KUMAR, M.; SHARMA, S.; NARGOTRA, A.; KOUL, S.; KHAN, I. A. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium*

*tuberculosis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, n. 8, p. 1694-701, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq186

SHENG, H.; SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 543, 2011.

SHU, C.; ZHAO, H.; JIAO, W.; LIU, B.; CAO, J.; JIANG, W. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing back spot roto on apple fruit and possible mechanisms involved. **Sci. Hortic.**, v. 256, p. 108–636, 2019.

SIDDIQUE, R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. **Life Sciences**, v. 88, p. 285-293, 2011.

SILVA, K. A. B. S.; MANJAVACHI, M. N.; PASZUCK, A. F.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; CALIXTO, J. B. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. **Neuropharma.**, v. 62, p. 967–977, 2012.

SILVA, N.; ALVES, S.; GONÇALVES, A.; AMARAL, J. S.; POETA, P. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Sci. Tech. Intern.**, v. 19, n. 6, p. 503–510, 2013.

SINGH, B.; SAHU, P. M.; SHARMA, M. K. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Nees. **Phytomed.**, v. 9, p. 355–359, 2002.

SINGH, R.; HUSSAIN, S.; VERMA, R.; SHARMA, P. Anti-mycobacterial screening of five Indian medicinal plants and partial purification of active extracts of *Cassia sophora* and *Urtica dioica*. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 6, n. 5, p. 366-71, 2013. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60040-1.

SIRIWONG, S.; THUMANU, K.; HENGPRATOM, T.; EUMKEB, G. Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes*. Evid. Based Complement. **Altern. Med.**, p. 459-759, 2015.

SOUTH, S. A. Africa warns of emergence of “totally” drug-resistant tuberculosis. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 309, p. 1097–1098, 2013.

SUJA K. P.; JOSE, L., LAKSHMANAN, D., VIDYA, A. G., RESHMI, N. R. J., KUMAR R. A. Isolation and characterization of antimycobacterial compounds from fruits of *Aegle marmelos* (L.) Correa. **J. communic. diseases**, v. 49, n. 4, p. 32-38, 2017.

TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; TOKUDA, H.; MASUDA, K.; ARAI, Y.; SHIOJIMA, K.; AGETA, H. Anti-carcinogenic activity of *taraxacum* plant. **I. Biol. Pharm. Bull.**, v. 22, p. 602–605, 1999.

TAMOKOU, J. D. D.; KUIATE, J. R.; GATSING, D.; EFOUET, A. P. N.; NJOUENDOU, A. J. Antidermatophytic and toxicological evaluations of dichloromethane-methanol extract, fractions and compounds isolated from *Coula edulis*. **Iran. J. Med. Sci.**, v. 36, n. 2, p. 111, 2011.

- TAN, Y. P.; CHAN, E. W. C.; LIM, C. S. Y. Potent quorum sensing inhibition by methyl gallate isolated from leaves of *Anacardium occidentale* L. (cashew). **Chiang Mai J. Sci.** v. 42, n. 3, p. 650-656, 2015.
- TANTILLO, D. J. Biosynthesis via carbocations: Theoretical studies on terpene formation. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p.1035-1053, 2011.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Infect. Control.**, v. 34 p. 3–10, 2006. DOI: 10.1016/j.ajic.2006.05.219
- TIWARI, B.; SHAILAJAN, S.; MENON, S.; KULKARNI, S. Tuberculosis: history, epidemiology, antitubercular drugs and plant-based alternatives. **Indian J. Pharmaceut. Scis.**, v. 81, p. 200-210, 2019.
- TOGASHI, N.; HAMASHIMA, H.; SHIRAISHI, A.; INOUE, Y.; TAKANO, A. Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* of terpene alcohols with aliphatic carbon chains. **J. Essent. Oil Res.**, v. 22, n. 3, p. 263–269, 2010.
- TOUANI, F. K., SEUKEP, A. J., DJEUSSI, D. E., FANKAM, A. G., NOUMEDEM, J. A., KUETE, V. Antibiotic-potential activities of four *Cameroonian dietary* plants against multidrug-resistant Gram-negative bacteria expressing efflux pumps. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 14, n. 1, 2014.
- TRUONG, D. H.; NGUYEN, D. H.; TA, N. T. A.; BUI, A. V.; DO, T. H.; NGUYEN, H. C. Evaluation of the use different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. **J. Food Qual.**, v. 1 p. 1-9, 2019.
- TUNG MUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A.; YANGSABAI, A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical. **Medicines**, v. 5, p. 93, 2018.
- VANDEVELDE N. M.; TULKENS P. M.; VAN BAMBEKE, F. Modulating antibiotic activity towards respiratory bacterial pathogens by co-mediations: a multi-target approach. **Drug Discov. Today**, v. 21, n. 7, p. 1114-29, 2016.
- VERMA, N.; BEHERA, B. C.; PARIZADEH, H.; SHARMA, B. O. Bactericidal activity of some lichen secondary compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* & *Parmotrema sancti-angelii*. **Internat. J. Drug Develop. Resear.**, v. 3, n. 3, 2011.
- VERPOORTE, R.; HEIJDEN, R. V.; HOOPEN, H. J. G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotech. Lett.**, v. 21, p. 467-479, 1999.
- VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, p. 326–337, 2006.
- WAL, A.; SRIVASTAVA, R. S.; RAI, A. R. Synthesis and Antitubercular activity of novel lupeol derivatives. **Der. Pharmacia. Lettre**, v. 8, n. 18, p. 79-85, 2016.

- WANG, H.; TANG, M.; SU, C.; ZHANG, W.; XU, R.; GUAN, Y.; DAI, C. The alleopathic compound luteolin from peanut litter affects peanut nodule formation and the rhizosphere microbial community. **Agron. J.**, v. 110, p. 2587–2595, 2018.
- WANG, S.; ALSEEKH, S.; FERNIE, A. R.; LUO, J. The structure and function of major plant metabolite modifications. **Molec. Plant**, v. 12, p. 899–919, 2019.
- WOLDEMICHAEL, G. M.; FRANZBLAU, S. G.; ZHANG, F.; WANG, Y.; TIMMERMANN, B. N. Inhibitory Effect of Sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. **Planta Medica**, v. 69, 628–631, 2003.
- XU, X.; ZHOU, X. D.; WU, C. D. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 3, p. 1229–1236, 2011.
- XU, F.; HUANG, X.; WU, H.; WANG, X. Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. **Biomed. Pharmacot.**, v. 103, p. 198–203, 2018.
- YAGUI, M. Resistencia antimicrobiana: nuevo enfoque y oportunidad. **Rev. Peru. Med. Exp. Sal. Púb.**, vol. 35, n. 1, p. 7-8, 2018. DOI: 10.17843/rpmesp.2018.351.3594
- YAMAMOTO, E. S.; CAMPOS, B. L. S.; LAURENTI, M. D.; LAGO, J. H. G.; GRECCO, S. S.; CORBETT, C. E. P.; PASSERO, F. D. Treatment triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. **Parasit. Res.**, v. 113, p. 333–339, 2014.
- YANG W.; CHEN, X.; LI, YANLI.; GUO, SHAOFEN.; WANG, ZHEN.; YU, XIULING. Advances in pharmacological activities of terpenoids. **Nat. Prod. Communic.**, v. 15, n. 3, p. 1–13, 2020.
- YODA, Y.; HU, Z. Q.; ZHAO, W. H.; SHIMAMURA, T. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. **J. Infect. Chemother.**, v. 10, n. 1, p. 55–58, 2004.
- ZANG, M.; HU, L.; ZHANG, B.; ZHU, Z.; LI, J.; ZHU, Z.; YAN, M.; LIU, B. Luteolin suppresses angiogenesis and vasculogenic mimicry formation through inhibiting Notch1-VEGF signaling in gastric cancer. **Bioch. and Biophys. Res. Communicat.**, v. 490, p. 913-919, 2017.
- ZHANG, L.; KONG, Y.; WU, D.; ZHANG, H.; WU, J.; CHEN, J.; et al. Three flavonoids targeting the  $\alpha$ - $\beta$ -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from helicobacter pylori: crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. **Protein. Sci.**, v. 17, n. 11, p. 1971–1978, 2008.
- ZHENG, Y.; HUANG, W.; YOO, J.; EBERSOLE, J. L.; HUANG, C. B. Antibacterial compounds from *Siraitia grosvenorii* leaves. **Nat. Prod. Res.**, v. 25, n. 9, p. 890-897, 2011. DOI 10.1080/14786419.2010.490212

- ZHOU, L.; DING, Y.; CHEN, W.; ZHANG, P.; CHEN, Y.; LV, X. The in vitro study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. **Oral Dis.**, v. 19, n. 5, p. 494–500, 2013.
- ZOFOU, D.; TENE, M.; NGEMENYA, M. N.; TANE, P.; TITANJI, V. P. K. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of extracts of selected medicinal plants used by traditional healers of western cameroon. **Mal. Res. Treat.**, p. 1-6, 2011.
- ZOU, Y.; LEE, Y.; HUH, J.; PARK, J. W. Synergistic effect of xylitol and ursolic acid combination on oral biofilms. **Restor. Dent. Endod.**, v. 39, n. 4, p. 288–295, 2014.